

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19592237

研究課題名 (和文)

II 型可溶性 TNF 受容体を用いた重度変形性顎関節症に対する局所抗サイトカイン療法

研究課題名 (英文)

The local anti-cytokine therapy for severe osteoarthritis of temporomandibular joint with soluble TNF receptor type II

研究代表者

山崎 聖也 (YAMAZAKI SEIYA)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・医員

研究者番号：40444666

研究成果の概要：

本研究では、変形性顎関節症に対する新規関節腔内注入薬として可溶性腫瘍壊死因子受容体 (sTNFR-II) を対象に考えており、既に関節リウマチの治療薬として使用されているエタネルセプトにより、関節軟骨破壊に関与する一部のマトリックスメタロプロテアーゼの関節軟骨細胞からの産生を抑制する傾向がみられた。また、併せて変形性顎関節症に特異的なタンパク質を同定することで、本治療の効果判定の指標としたり、新規治療に応用するため、顎関節滑液中のタンパク質に関してもサイトカインアレイ解析や網羅的解析を行った。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2008 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：歯科補綴学

1. 研究開始当初の背景

本邦における変形性関節症 (OA) の患者数は現在 1000 万人といわれている。本疾患はこれまで非炎症性の退行性関節疾患とみなされてきたが、近年、TNF α のような炎症性サイトカインが、重度変形性関節症や関節リウマチ (RA) における軟骨破壊の進行に重要な役割を果たすことが明らかとなった。顎関節においても OA (変形性顎関節症：TMJ OA) を発症することは知られており、下顎頭の短小化により、二次的な咬合異常 (開咬) を引き起こすこともあり、障害の発生を早期に予測し、有効な治療法を開発する必要がある。

すでに、活動期の TMJ OA の滑液中に正常状態では認められない TNF α が存在することが報告されている。一方、TNF α は、軟骨細胞や滑膜線維芽細胞に存在する 2 種類の受容体 (TNFR-I, TNFR-II) に結合することによりその機能を発現する。ところが、これら膜貫通型受容体の細胞外セグメントは shedding と呼ばれる自己切断を受け、可溶性受容体 soluble TNFR-I, II (sTNFR-I, sTNFR-II) となって細胞周囲に存在し、そのリガンドと競合的に結合することにより、TNF α の強力な起炎作用を調節することが明らかになっている。これまで、我々は、ラット関節軟骨細

胞を炎症環境下で培養すると *tnfr-II* 遺伝子発現ならびに培養上清中の sTNFR-II タンパク質濃度が著しく増強されることから、炎症環境にある関節軟骨細胞は、膜型 TNFR-II を産生亢進するとともに、培養上清中にその炎症調節分子である sTNFR-II を遊離することを明らかにした。また、正常ならびに TMJ OA 患者顎関節滑液中に sTNFR s を初めて同定するとともに、特に sTNFR-II においては、その量が多いほど症状が緩やかであるという興味深い結果も得ている (Uehara J *et al.*: *Archives of Oral Biology*, 49(2): 133-142, 2004.)。以上から、なかなか症状の緩解しない重度変形性顎関節症患者では、sTNFR-II の供給が何らかの原因で抑制されていると考えられる。幸い、2005 年 1 月に日本においても関節リウマチの治療薬として sTNFR-II 製剤 (完全ヒト型可溶性 TNF α /LT α レセプター製剤 (エンブレル®) が認可されており、本薬剤を局所に供給することで、関節腔内の炎症や関節組織破壊を劇的にコントロールできる可能性がある。

2. 研究の目的

(1) エンブレル®の効果を確認するために、培養液中に炎症性サイトカインを添加した炎症環境下でラットより採取した関節軟骨細胞を培養し、エンブレル®を作用させることで、関節軟骨破壊に関与するとされるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) の発現変化を検討する。

(2) TMJ OA に特異的な蛋白質を同定し、エンブレル®の効果判定の指標タンパク質の探索とともに新規治療への応用のために、

- ①顎関節滑液中のタンパク質に関してサイトカインアレイ解析を行い検討する。
- ②顎関節滑液中のタンパク質に関して網羅的解析を行い検討する。

3. 研究の方法

(1) ラット新生児膝関節より採取した軟骨細胞を単離後初代培養し、サブコンフルエントの時点で TNF α (10 ng/ml), IL-1 β (10 ng/ml) を単独、同時添加し、その 6, 18 時間後にエンブレル® (300 ng/ml) を培養液中に添加、TNF α , IL-1 β 添加時から 12, 24 時間後の培養軟骨細胞における MMP3, 9, 13 遺伝子発現を real-time RT-PCR で定量し、エンブレル®の効果を検討した。

(2) TMJ OA に特異的な蛋白質を同定する目的で、健康被験者 1 名、TMJ OA 患者 2 名の顎関節滑液を対象にサイトカインアレイ解析 (RayBio® Cytokine Antibody Array) により 174 種類のサイトカインの発現を調べた (図 1)。

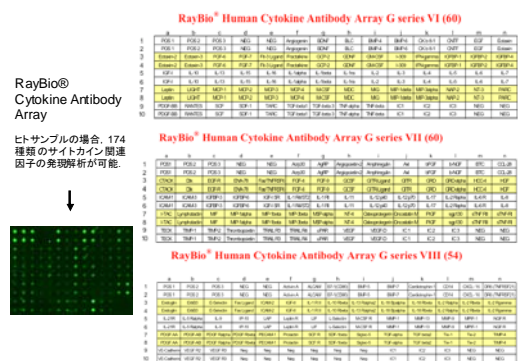


図1 サイトカインアレイ (RayBio® Cytokine Antibody Array)

(3) 質量分析計 (LC/MS System) を用い、健康被験者ならびに顎関節疾患患者の顎関節滑液内のタンパク質に関し網羅的に検出を行い、疾患特異的タンパク質の同定を試みた。①質量分析計 (LC/MS System) を用い、健康被験者 (Co) 群、変形性顎関節症 (OA) 群、関節リウマチ (RA) 群 (各 N=2) の顎関節滑液中タンパク質の網羅的解析 (LC/MS 解析) を行った (図 2)

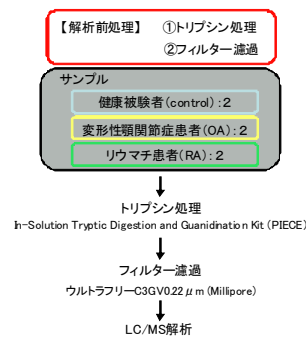


図2: 実験1 サンプルをそのままLC/MS解析へ

②そこで、血清内主要タンパク質による微量タンパク質のマスキングを抑制するために、Co 群 (N=3), OA 群 (N=3), 非復位性関節円板前方転位 (woR) 群 (N=2), RA 群 (N=2) に関して血清内主要タンパク質のカラム除去処理を行い、LC/MS 解析を行った (図 3)。

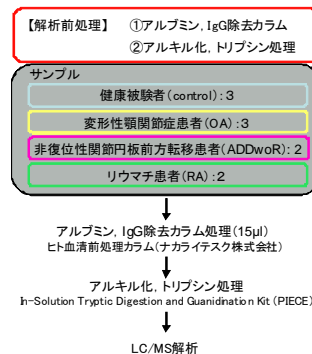
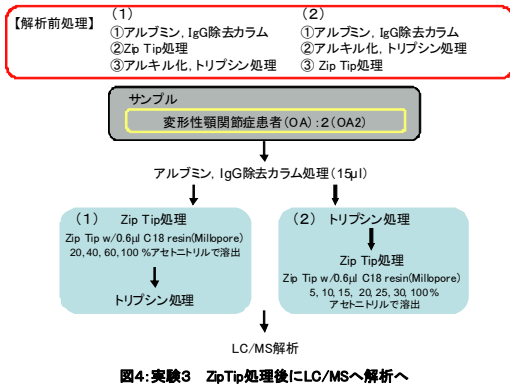


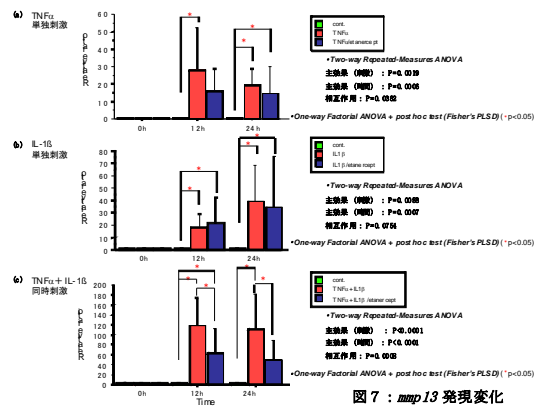
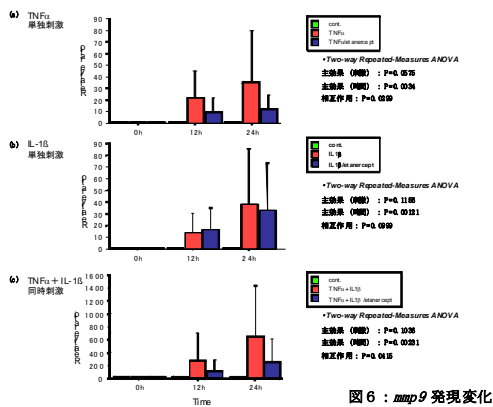
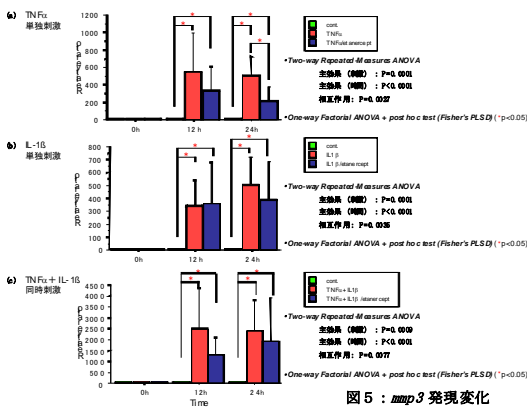
図3: 実験2 アルブミン除去後にLC/MS解析へ

③さらに微量タンパク質の検出を高めるために、OA滑液 (N=1) に関し、ZipTipによる分画を行った上で、LC/MS 解析を行った (図4).

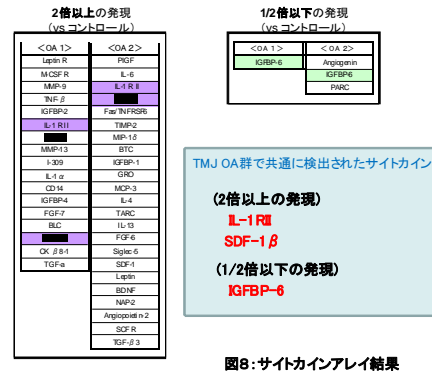


4. 研究成果

(1) IL-1β 単独添加により上昇した *mmp* 発現はエンブレル®により抑制されなかったが、TNFα 単独、TNFα と IL-1β 同時添加により上昇した *mmp* 発現に対しては抑制傾向がみられた。特に TNFα 単独添加 24 時間後の *mmp3* 発現が、TNFα と IL-1β 同時添加 12, 24 時間後の *mmp13* 発現がエンブレル®により有意に抑制された (図5, 6, 7)。



(2) 健康被験者に比べTMJ OA患者の顎関節滑液内で2倍以上の発現量であったサイトカインが各々17種、23種検出され、その内IL-1RII, SDF-1β が患者群で共通して多かった。一方、健康被験者に比べ1/2以下の発現量であったサイトカインは患者群で各々1種、3種でIGFBP-6が共通して少なかった (図8)。今後は解析サンプル数を増加しさらに解析を進めることで、TMJ OAに特異的なサイトカインの同定が期待できる。



(3)

①いずれの滑液からもアルブミン、IgG、トランスフェリン等の血清内主要タンパク質が多く検出され、疾患特異的タンパク質となりうるべきタンパク質は検出されなかった。

②除去カラム未使用と比べ、各群の検出タンパク質数は増加し、Co 群に比べ OA 群、woR 群、RA 群で検出タンパク質が多い傾向がみられた。しかし、各疾患に有意な存在が報告されているタンパク質が検出されず、同一群内での検出タンパク質にもばらつきがあった。

③カラム処理、トリプシン処理、ZipTip 処理の順で前処理を行うと、ZipTip 未処理と比べ検出タンパク質は増加する傾向がみられたが、処理ステップ増加に伴うタンパク質の喪失もみられた。

LC/MS 解析による本疾患の特異的タンパク質同定には前処理方法のさらなる検討が必要である。しかしその同定が可能となれば、II型可溶性TNF受容体による局所抗サイトカイン療法の効果判定への応用だけでなく、本疾患に体する新規治療法開発も期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Eguchi T, Kubota S, Kawata K, Mukudai Y, Uehara J, Ohgawara T, Ibaragi S, Sasaki A, Kuboki T, Takigawa M, Novel transcription factor-like function of human matrix metalloproteinase 3 regulating the CTGF/CCN2 gene, Mol Cell Biol, 28・7, 2391-2413, 2008, 査読有
- ② Fujisawa T, Hattori T, Ono M, Uehara J, Kubota S, Kuboki T, Takigawa M, CCN family 2/connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) stimulates proliferation and differentiation of auricular chondrocytes, Osteoarthritis Cartilage, 16・7, 787-795, 2008, 査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ① 上原淳二, Etanerceptは炎症環境下の軟骨細胞におけるMMPs産生を抑制する, 社団法人 日本補綴歯科学会第116回学術大会, 2007.5.18-20, 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 聖也 (YAMAZAKI SEIYA)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・医員

研究者番号：40444666

上原 淳二 (UEHARA JUNJI)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：10379836

(2) 研究分担者

窪木 拓男 (KUBOKI TAKUO)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00225195

松香 芳三 (MATSUKA YOSHIKAZU)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90243477

園山 亘 (SONOYAMA WATARU)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：40325121

(3) 連携研究者

なし