

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19246

研究課題名(和文)新規シグナル分子8-ニトロ-cGMPに着目した変形性顎関節症の新規治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of a novel therapeutic agent for TMJ disorder focusing on 8-nitro-cGMP

研究代表者

金子 児太郎(Kotaro, Kaneko)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：50826964

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):変形性顎関節症は治療が難渋する場合も多い。変形性顎関節症の病因として、一酸化窒素(NO)の影響や炎症性サイトカインの影響が報告されている。本研究では、NOの下流シグナル分子として発見された8-ニトロ-cGMPの変形性顎関節症における役割を明らかにするため、破骨細胞、骨芽細胞における同物質の生成および機能を解析した。破骨細胞、骨芽細胞は8-ニトロ-cGMPを生成した。内因性の8-ニトロ-cGMPは破骨細胞分化を抑制し、骨芽細胞による石灰化を抑制し、ターゲットとなるタンパク質の同定した。これらの結果、変形性顎関節症の病因に8-ニトロ-cGMPが関与していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

8-ニトロ-cGMPが骨吸収を促進し、骨形成を抑制することが示唆された。生体内での8-nitro-cGMPの生成経路、シグナル伝達様式および不活性化経路は、すでに明らかになっている。これらの結果から変形性顎関節症のみならず、他部位の変形性関節症や骨粗鬆症など骨量が減少する疾患に8-ニトロ-cGMPが関与している可能性が明らかになった。この研究を続けることにより、それらの疾患に関しての病態改善にもつながることになると思われる。

研究成果の概要(英文):Osteoarthritis of the TMJ is often difficult to treat. The effects of nitric oxide (NO) and inflammatory cytokines have been reported as the etiology of osteoarthritis of the TMJ. In this study, we analyzed the production and function of 8-nitro-cGMP, which was found to be a downstream signaling molecule of NO, in osteoclasts and osteoblasts to clarify its role in TMJ osteoarthritis. Osteoclasts and osteoblasts produced 8-nitro-cGMP. Endogenous 8-nitro-cGMP suppressed osteoclast differentiation and osteoblast calcification. These results indicate that 8-nitro-cGMP is involved in the etiology of TMJ osteoarthritis.

研究分野：口腔外科

キーワード：8-ニトロ-cGMP 変形性顎関節症 破骨細胞 骨芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

顎関節症は頻繁に外来で遭遇する疾患である。顎関節症の中で、関節円板の破壊と軟骨下層の骨の吸収が生じるものは変形性顎関節症である。変形性顎関節症の中でも、若年性に突発的に起こる突発性下顎骨吸収が起こる例が発見され、現在注目を集めている。変形性顎関節症は、他の関節に見られる変形性関節症と同様、治療が困難なケースが多い。変形性顎関節症発症の要因としては、外傷や過負荷が重要な要素であることは明らかであり、その下流についてはさまざまな報告がある。例えば、直接的な機械的損傷または関節の圧迫により生じた低酸素状態からの再灌流により生成する NO が関与するという報告や、痛み刺激に誘発された神経因性炎症により生じる炎症性サイトカインが原因となる可能性も示唆されている(1)。しかしながら、詳細については不明な点が多く残されている。したがって、変形性顎関節症による骨破壊の詳細なメカニズムの解明は変形性顎関節症の治療のため極めて意義のあるものと言える。

血管拡張や神経伝達など、NO はさまざまな場面で重要な役割を果たすことが以前より知られている。NO はフリーラジカルのため、細胞内でシグナルを伝達する分子としてグアノシン 3',5'-環状ヌクレオチド (cGMP) を二次メッセンジャーとする経路が知られている。しかし、近年、赤池らにより NO の新規細胞内シグナル分子として 8-ニトロ-cGMP が同定され、その機能が注目されている(2)。8-ニトロ-cGMP は、cGMP の 8 位がニトロ化された物質である。cGMP とは異なる特異的な翻訳後修飾を介してシグナルを伝達する。さらに、細胞内で CARS2 といわれる酵素により生じた活性イオウ分子種 (RSS) が 8-ニトロ-cGMP の分解反応を開始することが明らかになった(3)。この RSS も強い抗酸化物質であることから、酸化ストレスの分野で現在注目が集まっている。8-ニトロ-cGMP はタンパク質中のシステイン残基に cGMP 構造を付加する「タンパク質の S-グアニル化」と呼ばれる特異的な翻訳後修飾を行うことで、細胞内の種々のタンパク質の活性を変化させ、細胞の機能が変化する例が報告されている(4)。8-ニトロ-cGMP の生体内における役割は次第に明らかになってきたが、硬組織における 8-ニトロ-cGMP の生成あるいは機能についての報告は皆無であった。これまでも NO の硬組織代謝における役割についてはさまざまな報告があるが、詳細は明らかになっていないことから、硬組織における 8-ニトロ-cGMP の生成・代謝およびその機能の解明は極めて興味深い研究課題である。

我々はすでに骨のリモデリングに関与する破骨細胞と骨芽細胞に及ぼす影響について研究を進め、破骨細胞、骨芽細胞において内因性に 8-ニトロ-cGMP の生成を確認した。さらに、炎症性サイトカインの刺激により 8-ニトロ-cGMP の生成が亢進され、8-ニトロ-cGMP の投与により破骨細胞の分化が促進され、骨芽細胞の石灰化が抑制されるのを明らかにしていた。これらより、8-ニトロ-cGMP は骨のリモデリングのバランスを骨吸収優位にする内因性のシグナル分子であることが示唆された。

## 2. 研究の目的

変形性顎関節症の関節局所でも NO の生成や炎症性サイトカインの生成が確認されていることから、我々は、8-ニトロ-cGMP が本疾患に関与している可能性があると考えた。そこで、変形性顎関節症の病態形成における 8-ニトロ-cGMP の生成と機能を解析することで、今後の変形性顎関節症に対する新規治療法の開発に繋げることを目標とした。

## 3. 研究の方法

まず、破骨細胞、骨芽細胞における内因性の 8-ニトロ-cGMP の機能を解析するため、8-ニトロ-cGMP の分解反応も担う CARS2 遺伝子を破骨細胞および骨芽細胞で siRNA を用いてノックダウンを行い、細胞内の 8-ニトロ-cGMP を増加させ、増殖を MTS 法を用いて・分化を定量的 PCR 法を用いて解析することで、内因性の 8-ニトロ-cGMP の骨リモデリングにおける役割を明らかにした。さらに、破骨細胞の分化促進と骨芽細胞の分化抑制に関する 8-ニトロ-cGMP のタンパク質の S-グアニル化のターゲットとなるタンパク質の同定を行い、メカニズムを明らかにするため、8-ニトロ-cGMP 添加し培養した細胞の溶解物を用いて、二次元電気泳動を行い、その後抗 S-グアニル化タンパク質抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

次に、マウスにスプリングを使用した開口器を用いて物理的に大開口させ変形性顎関節症を誘発(5)。その後、下顎頭の組織切片を作製し、8-ニトロ-cGMP と S-グアニル化タンパク質の抗体を用いた免疫染色を行い、それらの生成を組織学的に解析を行った。また、病態を誘発させていないマウスと比較を行った。

## 4. 研究成果

破骨細胞、骨芽細胞において 8-ニトロ-cGMP の分解を司る CARS2 遺伝子を siRNA を用いてノックダウンさせたのちに CARS2 の遺伝子発現を real time PCR で確認しノックダウン行っていることを確認。両細胞とも増殖に関しては変化が認められなかったものの、分化に関しては 8-ニトロ-cGMP 添加実験と同様に破骨細胞の分化を促進させ、骨芽細胞の石灰化を抑制した。この結果は添加実験より著名にあらわれ、内因性の 8-ニトロ-cGMP が破骨細胞、骨芽細胞分化に関与

していることが明らかになり、骨のリモデリングにおいて重要な役割を果たしていることが明らかになった。さらに、骨芽細胞における分化抑制するメカニズムが cGMP 依存性タンパク質キナーゼ (PKG) の経路ではないことを確認できており、8-ニトロ-cGMP 特異的なタンパク質の S-グアニル化による可能性が高いことを見出したので、そのグアニル化のターゲットとなるタンパク質の同定を行うため、二次元電気泳動を行い、ウエスタンブロッティングを行った。その結果、ターゲットとなるいくつかのタンパク質を絞ることができ、タンパク質の S-グアニル化が骨芽細胞の分化の抑制に関与していることを見出した (この結果は現在論文印刷中)。

直接的にマウスに顎関節症を誘発させ、関節部の切片を作成し 8-ニトロ-cGMP の発生を確認する実験を行っていたが、安定した顎関節症モデルマウスが作成できず、現在は同様の疾患メカニズムである、変形性膝関節症のマウスを作成し、研究を継続する方向で進んでいる。

実験の途中であるが、今回炎症性の疾患における 8-ニトロ-cGMP の破骨細胞と骨芽細胞の影響のメカニズムを見出しており、8-ニトロ-cGMP が炎症性骨疾患の成因に重要な役割を果たしていることを見出した。

#### <引用論文>

- (1) E Tanaka, M S Detamore, L G Mercuri. Degenerative disorders of the temporomandibular joint: etiology, diagnosis, and treatment. *J Dent Res* 2008; 4: 296-307.
- (2) Sawa T, Zaki MH, Okamoto T, *et al.* Protein-S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Nat Chem Biol* 2007; 3: 727-735.
- (3) Ida T, Sawa T, Ihara H, *et al.* Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111: 7606-7611.
- (4) Nishida M, Sawa T, Kitajima N, *et al.* Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. *Nat Chem Biol* 2012; 8: 714-724.
- (5) Takashi Izawa, Hiroki Mori, Tekehiro Shinohara, *et al.* Rebamipide Attenuates Mandibular Condylar Degeneration in a Murine Model of TMJ-OA by Mediating a Chondroprotective Effect and by Downregulating RANKL-Mediated Osteoclastogenesis. *PLoS one*, 2016; 4: e0154107.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugisaki Risa, Miyamoto Yoichi, Yoshimura Kentaro, Sasa Kiyohito, Kaneko Kotaro, Tanaka Motohiro, Itose Masakatsu, Inoue Sakie, Baba Kazuyoshi, Shirota Tatsuo, Chikazu Daichi, Kamiyo Ryutaro	4. 巻 132
2. 論文標題 Possible involvement of elastase in enhanced osteoclast differentiation by neutrophils through degradation of osteoprotegerin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115216 ~ 115216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2019.115216	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金子児太郎、小川隆、上條竜太郎、近津大地
2. 発表標題 新規内因性シグナル分子8-Nitro-cGMPは骨の吸収を促進させる
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子児太郎、宮本洋一、赤池孝章、杉崎リサ、小川 隆、近津大地、上條竜太郎
2. 発表標題 8-NO2-cGMPによる骨芽細胞分化の抑制と破骨細胞分化の促進
3. 学会等名 第19回日本NO学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子児太郎、小川隆、近津大地
2. 発表標題 一酸化窒素の新規シグナル分子8-nitro-cGMPによる骨リモデリング調整の解明
3. 学会等名 第183東京医科大学医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子児太郎、小川隆、奥山文子、近津大地
2. 発表標題 デノスマブ投与中に多数インプラント埋入し、予後不良となった1例
3. 学会等名 第23回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子児太郎、宮本洋一、杉崎リサ、上條竜太郎、近津大地
2. 発表標題 酸化ストレスのシグナル分子8-ニトロ-cGMPによる骨代謝調節
3. 学会等名 第76回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金子児太郎、杉崎リサ、近津大地
2. 発表標題 新規内因性シグナル分子8-nitro-cGMPは炎症において骨吸収を促進させる
3. 学会等名 第25回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------