

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06310・19K21397

研究課題名（和文）不飽和脂肪酸およびレゾルビンを応用した顎関節症治療法の新規確立

研究課題名（英文）Establishment of effective treatment for temporomandibular joint disorders with Docosahexaenoic acid (DHA) and Resolvin

研究代表者

矢野下 真 (Yanoshita, Makoto)

広島大学・病院（歯）・歯科診療医

研究者番号：20823199

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：実験1：マウス軟骨細胞を用い、コンピューター制御下細胞伸展装置を用い過度な機械的刺激を付与すると炎症関連因子および基質分解酵素の遺伝子発現は増加し、レゾルビンD1添加により有意に抑制された。またウェスタンブロット法にてintegrin-FAKシグナルが関与している可能性が示唆された。実験2：ラット下顎頭高負荷モデルにより炎症関連因子および基質分解酵素の遺伝子発現は増加した。しかし、レゾルビンD1およびDHAのラットへの投与はコスト的に実験中断を余儀なくされた。そのため、代替案としてex vivoの器官培養法で検討を続け遺伝子レベルでは良好な結果を得ており現在も検討を続けている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らは、3不飽和脂肪酸（ドコサヘキサエン酸）の代謝産物であるレゾルビンの軟骨における機能に着目し検討を行った。軟骨細胞に機械的刺激を付与したときに生じる炎症関連因子の発現（IL1-、TNF、COX2、MMP3および13）はレゾルビンの添加により有意に抑制された。この結果は変形性顎関節症のような顎関節疾患の治療法へとつながる貴重な知見だと考える。

研究成果の概要（英文）：Experiment 1 (in vitro) : Cyclic tensile strain (CTS) induced gene expression of inflammation-related factors and MMPs and treatment with Resolvin D1 suppressed CTS-induced expression of pro-inflammatory cytokine genes. In addition, western blot analysis indicated that Resolvin D1 might suppress inflammation via integrin-FAK signal. Experiment 2 (in vivo, ex vivo) : Gene expression of inflammation-related factors and MMPs was increased in TMJ rat model. However, injection of Resolvin D1 and oral administration of DHA to rats was forced to interrupt the experiment due to cost problems. Therefore, as an alternative, we used ex vivo organ culture model. and Resolvin D1 suppressed inflammation at the gene level. We plan to continue further studies.

研究分野：成長および発育系歯学関連

キーワード：レゾルビンD1 機械的負荷 炎症 軟骨 滑膜 不飽和脂肪酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

顎関節症は、顎関節や咀嚼筋の疼痛、関節雑音、開口障害ないし顎運動異常を主症状とする疾患で、就寝時のブラキシズムなど過度な機械的負荷が発症要因の一つと考えられている。また、顎関節症は重篤化すると変形性顎関節症となり下顎頭の変形・吸収を生じる。

申請者らは顎関節症の原因の1つと考えられている過度な機械的刺激に着目し、細胞接着因子であるインテグリンやFAKの阻害による炎症性マーカーの発現抑制効果の検討を行い、その効果が確認された。しかし、それらは細胞内外の情報伝達や骨格維持に関連する因子であり、副作用が懸念される。

3不飽和脂肪酸のひとつであるDHAは魚に含まれ体内に摂取されると酵素によりレゾルビンD1に分解される。レゾルビンD1は炎症細胞の浸潤を抑制することで炎症を積極的に収束させると考えられている。神経細胞においてレゾルビンD1はMAPKカスケードを介して炎症性サイトカインの発現を抑制すると報告されており、軟骨の炎症に対するレゾルビンD1の抗炎症効果が期待される。さらに、インテグリン阻害剤やFAK阻害剤が機械的刺激シグナルそのものを阻害するのに比べ、レゾルビンD1投与はより選択的に炎症反応を抑制すると推察される。顎関節炎に対する抗炎症効果が実証できれば、長期投与によるリスクはインテグリン阻害剤やFAK阻害剤より少ないと考えられる。このようにDHAやレゾルビンD1は顎関節炎に対して有用な治療法となり得ると考え、DHAおよびレゾルビンD1の抗炎症効果を検討するに至った

## 2. 研究の目的

本研究は、軟骨細胞に対するレゾルビンD1の抗炎症作用とそのメカニズムを解明し、さらにラット顎関節炎に対するレゾルビンD1、DHAの軟骨保護および修復作用について検討する。これらを顎関節症治療に応用し、新規治療法の確立を目的とする。

## 3. 研究の方法

### 【2018年度】軟骨細胞におけるレゾルビンD1の機能に関する検討 (in vitro)

実験1：13週齢Wister系ラットの顎関節より採取培養した軟骨細胞を使用し、現有の細胞伸展装置Flexer Strain Unitを用い細胞を機械的に変形させる。その後レゾルビンD1を添加し抗炎症作用を確認する。

#### 実験1-1 炎症性サイトカインおよび細胞外基質構成タンパクの産生に与える影響

現有のLight cycler 480システム(Roche)を用いた定量PCRによる遺伝子解析により、各種炎症系マーカー(IL-1 $\beta$ , MMP-1, 3, 13など)および軟骨基質構成タンパク(Type II, Xコラーゲン、アグリカンなど)の遺伝子解析を行い、また定量Western blotによる解析を行う。

#### 実験1-2 細胞増殖、細胞死へ与える影響

BrdU細胞増殖Assayを用いて細胞増殖への影響を確認する。また、Caspase 3/7 Assayを用いて解析を行い、細胞死への影響を検討する。

### 【2019年度】ラット下顎頭高負荷モデルを用いた検討 (in vivo)

実験2：我々が開発したラット下顎頭高負荷モデルを使用する。本モデルは、13週齢Wister系ラットを用い、咬合挙上装置を上下切歯で噛ませる。これにより下顎頭は上方へ圧迫され、軟骨組織は変性する。このモデルラットを用いて以下の実験を行う。

#### 実験2-1 レゾルビンD1の局所投与が下顎頭軟骨の炎症に与える影響

レゾルビンD1を顎関節部にシリンジを用いて投与する。

## **実験 2-2 DHA の摂取が下顎頭軟骨の炎症に与える影響**

レゾルビン D1 の前駆段階である DHA を粉餌に混ぜて摂取させる。

**検討方法：**実験 2-1,2 いずれも、投与後経時的に顎関節を回収し顎関節部の組織切片を作製する。HE 染色、サフラニン O 染色および軟骨器質構成タンパク（各種コラーゲンおよびアグリカン）の免疫組織化学染色を行い、軟骨基質の性状について検討する。さらに X 線写真および CT 撮影により下顎頭形態について三次元的解析を行う。

### 4 . 研究成果

#### 実験 1 ( in vitro )

まず、不死化ヒト軟骨細胞においてレゾルビン D1 の受容体である ALX および FRP-2 の発現を確認した。次いで不死化ヒト軟骨細胞に対し、炎症反応を惹起するため、現有のコンピューター制御下細胞伸展装置 Flexer Strain Unit® を用い細胞を機械的に変形させ、炎症反応および基質分解酵素の遺伝子発現量の変化について定量 PCR 検討を行った。負荷付与後 1、3、6、12、24 時間まで炎症マーカーである IL-1、COX-2、TNF- $\alpha$ 、基質分解酵素である MMP-3、MMP-13 の遺伝子発現が有意に上昇し続け、36、48 時間後には継時的に減少した。軟骨細胞に対し現有の Flexer Strain Unit を用い、レゾルビン添加下で細胞伸展刺激 (CTS) を与え、レゾルビン D1 の integrin-FAK シグナルに及ぼす影響について western blot 解析を行った。なお、初年度に軟骨細胞において CTS による炎症反応は FAK-MAPKs カスケードを介することを報告している (矢野下ら, Inflamm, 2018)。その結果、integrin-FAK-MAPKs シグナル伝達経路と関連する可能性が示唆された。

さらに、軟骨細胞のみならず滑膜細胞を用い脂肪酸代謝産物であるプロテクチン、マレシンの炎症抑制効果および軟骨保護効果の検討を行った。IL-1 添加により炎症反応を惹起した滑膜細胞に対してプロテクチン、マレシンを添加したところ IL-6、MMP-3, 9, 13 および TIMP-1 の有意な遺伝子発現の低下を認めた。

#### 実験 2

予定していた 13 週齢 Wister 系ラットを用い申請者らが確率し使用してきた下顎頭高負荷モデルを作製し、コントロール群では炎症および軟骨破壊反応を確認した。しかし、レゾルビン D1 および DHA のラットへの投与はコスト的に実験中断を余儀なくされた。そのため、代替案として少ない薬剤量で対応できる ex vivo の器官培養法で検討を続け遺伝子レベルでは良好な結果を得ており現在も検討を続けている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Hirose Naoto, Okamoto Yuki, Yanoshita Makoto, Asakawa Yuki, Sumi Chikako, Takano Mami, Nishiyama Sayuri, Su Shao Ching, Mitsuyoshi Tomomi, Kunimatsu Ryo, Tanne Kazuo, Tanimoto Kotaro | 4. 巻<br>44              |
| 2. 論文標題<br>Protective effects of cilengitide on inflammation in chondrocytes under excessive mechanical stress   | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Cell Biology International   | 6. 最初と最後の頁<br>966 ~ 974 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/cbin.11293   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>該当する            |
| 1. 著者名<br>Sakata Shuzo, Kunimatsu Ryo, Tsuka Yuji, Nakatani Ayaka, Hiraki Tomoka, Gunji Hidemi, Hirose Naoto, Yanoshita Makoto, Putranti Nurul Aisyah Rizky, Tanimoto Kotaro                     | 4. 巻<br>9               |
| 2. 論文標題<br>High-Frequency Near-Infrared Diode Laser Irradiation Attenuates IL-1 -Induced Expression of Inflammatory Cytokines and Matrix Metalloproteinases in Human Primary Chondrocytes        | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Clinical Medicine   | 6. 最初と最後の頁<br>881 ~ 881 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/jcm9030881   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>該当する            |
| 1. 著者名<br>Hirose Naoto, Sumi Chikako, Yanoshita Makoto, Takano Mami, Nishiyama Sayuri, Tsuboi Eri, Asakawa Yuki, Tanimoto Kotaro   | 4. 巻<br>2019            |
| 2. 論文標題<br>Elucidation of the inflammatory mechanism of mandibular cartilage development and the establishment of a prevention method for PCR using Sema3A                                       | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Impact   | 6. 最初と最後の頁<br>67 ~ 69   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.21820/23987073.2019.4.67  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Takano Mami, Hirose Naoto, Sumi Chikako, Yanoshita Makoto, Nishiyama Sayuri, Onishi Azusa, Asakawa Yuki, Tanimoto Kotaro   | 4. 巻<br>-               |
| 2. 論文標題<br>ANGPTL2 Promotes Inflammation via Integrin 5 1 in Chondrocytes  | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>CARTILAGE  | 6. 最初と最後の頁<br>-         |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1177/1947603519878242   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yanoshita Makoto, Hirose Naoto, Takano Mami, Sumi Chikako, Nishiyama Sayuri, Tsuboi Eri, Asakawa Yuki, Onishi Azusa, Yamauchi Yuuka, Tanimoto Kotaro |
| 2. 発表標題<br>Anti - inflammatory effects of FAK inhibitor on condylar cartilage under excessive mechanical stress   |
| 3. 学会等名<br>The 97th General Session of International Association for Dental Research (Vancouver), 2019. (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yanoshita Makoto, Hirose Naoto, Takano Mami, Sumi Chikako, Nishiyama Sayuri, Tsuboi Eri, Asakawa Yuki, Onishi Azusa, Yamauchi Yuuka, Tanimoto Kotaro |
| 2. 発表標題<br>Effects of FAK inhibitor on condylar cartilage under the excessive mechanical stress in organ culture model  |
| 3. 学会等名<br>Effects of FAK inhibitor on condylar cartilage under the excessive mechanical stress in organ culture model (国際学会)                                   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                 | 備考 |
|-------|---|---------------------------------------|----|
| 研究協力者 | 廣瀬 尚人<br><br>(Hirose Naoto)<br><br>(50611935)     | 広島大学・医系科学研究科(歯)・助教<br><br><br>(15401) |    |
| 研究協力者 | 谷本 幸太郎<br><br>(Tanimoto Kotaro)<br><br>(20322240) | 広島大学・医系科学研究科(歯)・教授<br><br><br>(15401) |    |