

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：31201
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2023
課題番号：20K10234
研究課題名（和文）間葉系幹細胞の抗炎症性免疫細胞誘導能を応用した変形性顎関節症新規治療戦略の確立
研究課題名（英文）Establishment of novel therapy against TMJ-OA with application of anti-inflammatory reaction by mesenchymal stem cells
研究代表者
間山 寿代（Mayama, Hisayo）
岩手医科大学・歯学部・准教授
研究者番号：90382639
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：変形性顎関節症（TMJ-OA）は、顎関節周囲滑膜炎とその癒痕化や下顎頭の変形や吸収による顎運動障害を引き起こす。TMJ-OA発症の原因は、不正咬合などにより顎関節周囲で生じる酸化ストレスであるとの予測はされていたが、その細胞・分子レベルでの発症メカニズムについては不明であった。我々は、顎関節由来の線維芽細胞様滑膜細胞株（FLS1）に酸化ストレスを与えると、好中球の走化性を高めて炎症を惹起することが知られているケモカインCXCL15の発現が、シグナル伝達分子MEK/ERK依存的に上昇することを明らかとした。このことは、MEK阻害剤がTMJ-OA治療薬として利用できる可能性を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TMJ-OAは、下顎頭軟骨の破壊、顎関節滑膜炎ならびに下顎頭の変形や吸収などの症状を呈する。TMJ-OA患者では、顎運動障害を示す場合があるが、顎関節領域への外科的療法が術後組織の癒痕化を引き起こす恐れがあるために、スプリントや非ステロイド性抗炎症薬の投与などの保存的な治療法が選択されることが多く、その治療法は対症療法が主流とされてきた。

今回、我々は、マウス顎関節由来FLS1細胞に酸化ストレスを与えた際に、局所への炎症性細胞浸潤を促すケモカインがMEK/ERKシグナルを介して発現誘導されることを明らかとした。この研究成果は、新規TMJ-OA治療法の開発に繋がるものとして期待される。

研究成果の概要（英文）：Temporomandibular joint-osteoarthritis (TMJ-OA) seemed to be caused by oxidative stress around TMJ which were induced by malocclusion. However, mechanisms underlying the malocclusion-induced TMJ-OA remained to be clarified at cellular-, and molecular-levels. Then, we found that oxidative stress-induced MEK/ERK signal significantly promoted chemokine CXCL15 in the TMJ-derived fibroblast-like synoviocytes FLS1, suggesting that MEK inhibitor can be a candidate for therapeutic drug against to TMJ-OA.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：変形性顎関節症 酸化ストレス ケモカイン 細胞内シグナル

1. 研究開始当初の背景

(1) 変形性顎関節症 (TMJ-OA) は、慢性的な痛み伴う下顎頭軟骨の組織破壊、顎関節周囲滑膜炎ならびに下顎頭の変形や吸収などによる退行性病変を呈することを特徴とする。TMJ-OA の患者では上記の病変により著しい顎運動障害を示す場合があるが、顎関節領域への外科的療法自体が術後組織の癒着化を引き起こし顎運動制限する恐れがあるために、サプリメントや非ステロイド性抗炎症薬の投与などの保存的な治療法が選択されることが多く、その治療法は対症療法が主流となっていた。このように、一旦発症すれば、患者の摂食機能が著しく障害されて QOL を低下させる可能性の高い TMJ-OA の発症原因に直接効力を示す積極的な療法の開発は、されていないのが実情であった。

(2) 下顎頭の変形や吸収が起こる際には、① 顎関節周囲の炎症性組織より分泌されたケモカインが働いて、マクロファージなどの炎症性細胞を顎関節炎症巣にホーミング (動員) させる。② ホーミング後のマクロファージは炎症組織中で活性化され、炎症性マクロファージ (M1-MΦ) へと分極化して、IL-1β や TNF-α などの炎症性サイトカインを放出して周囲の炎症反応をさらに高めるとともに、タンパク質分解酵素等を分泌して軟骨組織を破壊する。③ M1-MΦ より放出された炎症性サイトカインは、周囲の単球/マクロファージ系前駆細胞に作用して破骨細胞への分化や活性化を誘導し、炎症性骨破壊を進行させるものと考えられていた。

2. 研究の目的

(1) 抗炎症性細胞として知られている間葉系幹細胞 (MSC) や抗炎症性マクロファージ (M2-MΦ) が、どのような分子メカニズムで TMJ-OA における炎症抑制作用を示すのかについて、*in vivo* TMJ-OA 誘導モデルを利用して調査し、MSC や M2-MΦ による抗炎症性効果の発現に係るモデルキー分子を明らかとする。また、マウス TMJ 由来線維芽細胞様滑膜細胞株 (FLS1) に TMJ-OA の発症の原因の一つとされる酸化ストレスを与えた際に、その発現頻度に差が認められる分子について *in vitro* 実験レベルで調査して、上記の *in vivo* 実験で得られたモデルキー分子の発現頻度との関連性についても明らかとする。

(2) (1) の研究結果により明らかとなった TMJ-OA の発症に係るモデルキー分子が、実際に、*in vivo* TMJ-OA モデルの炎症症状を軽減するのかどうかについて調査して、真の抗炎症性効果の発現に係るキー分子を特定し、新規 TMJ-OA 治療法開発のための分子基盤を構築したい。

3. 研究の方法

(1) マウス TMJ 由来線維芽細胞様滑膜細胞株 (FLS1) における TMJ-OA の発症に係るキー分子の解明：酸化ストレスを引き起こすことが知られている過酸化水素 (H₂O₂) を FLS1 細胞に与え、Reverse transcription quantitative-polymerase chain reaction (RT-qPCR) 法を用いて、H₂O₂ がどのようなケモカインの発現を誘導するのかについて、明らかとする。また、ウェスタンブロット法とシグナル伝達分子阻害剤を用いて、H₂O₂ がどのようなシグナル伝達分子を活性化することにより、ケモカインの発現を誘導するのかについて、明らかとする。加えて、FLS1 細胞に H₂O₂ を作用させた際の細胞内の活性酸素種 (ROS) の発生について、ヒドロキシラジカルをそのターゲットとして、明らかとする。

(2) TMJ-OA の患部組織中に MSC や M2-MΦ がホーミングするためにキーとなるモデル分

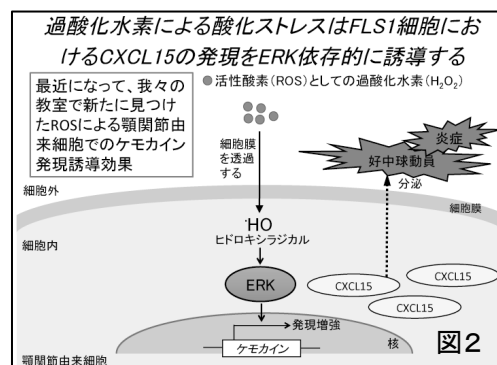
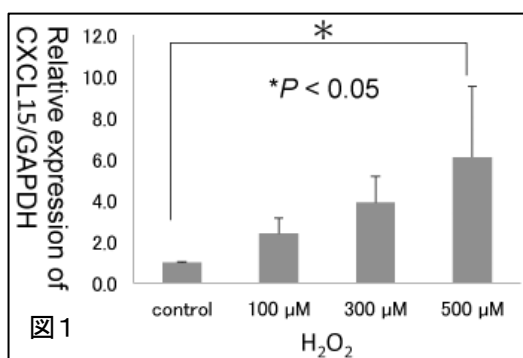
子のピックアップ：マウスに持続的な過開口を強いる方法による *in vivo* TMJ-OA モデルを利用する。次に、強蛍光発現トランスジェニック (TG) マウスより強蛍光発現 MSC や M2-MΦ を採取し、TMJ-OA モデルマウスに尾静脈あるいは腹腔経由で移植する。その後、TMJ-OA 患部組織中への移植後 MSC や M2-MΦ のホーミングについて、組織学的検索により蛍光発現細胞の存在を確認する。加えて、TMJ-OA 患部組織中より、マイクロダイセクション装置を用いて蛍光ラベルされた MSC や M2-MΦ を切離・回収した後、これらの細胞より mRNA を抽出する。その後、プライマーアレイ等を利用して、MSC や M2-MΦ で発現の高いケモカイン受容体について網羅的に調査し、それらを TMJ-OA 患部組織への MSC や M2-MΦ ホーミング誘導のために働くモデルキー分子とする。

(3) 新規 TMJ-OA 治療法開発のための分子基盤の構築：(1) で明らかとされたシグナル伝達分子の阻害剤、あるいは、その siRNA を TMJ-OA モデルマウスの TMJ 部に局所投与するとともに、(2) で明らかとされた TMJ-OA 患部組織へのホーミング誘導のために働くモデルキー分子を強発現させた MSC や M2-MΦ を TMJ-OA モデルマウスの腹腔や尾静脈に投与して、TMJ-OA の症状が軽減することを確認する。

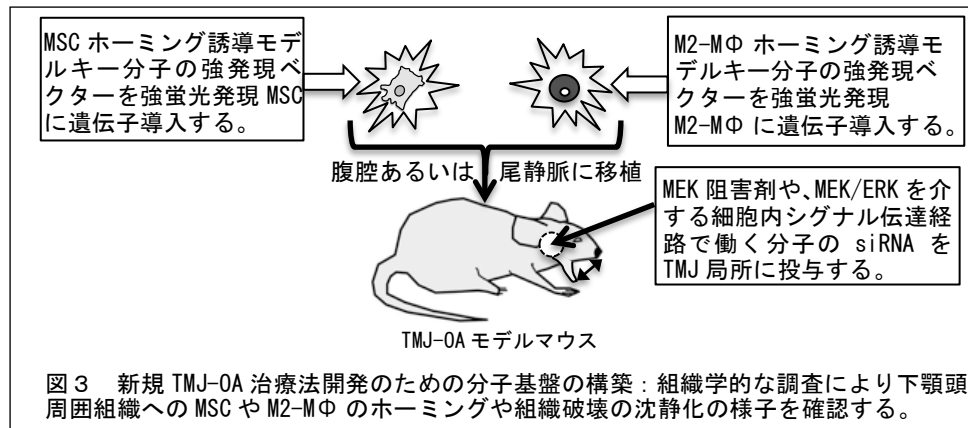
4. 研究成果

(1) ① H₂O₂ は、ケモカイン CXCL15 の発現を濃度依存的に有意に増強した (図1)。② H₂O₂ を FLS1 細胞に与えた後、ウェスタンブロット法にて、シグナル伝達分子のリン酸化についてタンパク質レベルで確認したところ、MAPK のサブファミリーである ERK1/2、p38 MAPK および Akt のリン酸化が、有意に増強された。③ MEK 阻害剤 U0126 を FLS1 細胞に投与すると、H₂O₂ により誘導された CXCL15 の発現増強効果が、有意に抑制された。一方、p38 MAPK 阻害剤 SB203850 や PI3K 阻害剤である LY294002 の投与では、H₂O₂ 誘導性の CXCL15 の発現増強効果は、抑制されなかった。④ H₂O₂ は、FLS1 細胞におけるヒドロキシラジカルの産生を有意に増強した。⑤ ROS 発生阻害剤 N-アセチル-L-システインは、H₂O₂ による ERK1/2 のリン酸化増強効果を部分的に抑制したが、H₂O₂ による CXCL15 の発現促進効果は抑制しなかった。これらの結果より、H₂O₂ 刺激により発生する酸化ストレスは、マウス TMJ 由来 FLS1 細胞において、MEK/ERK 依存的に CXCL15 の発現を促進することが、示唆された (図2)。また、一般的に、CXCL15 は、好中球の走化性促進因子として知られている。このことから、酸化ストレス環境下の TMJ 周囲の線維芽細胞様滑膜細胞が CXCL15 を分泌して好中球を顎関節周囲組織に動員することにより、TMJ-OA の発症に関わる可能性が示唆された。また、このように、TMJ-OA の発症に促進的に働くキー分子の一つは、ERK1/2 である可能性が示された。

本研究成果により、MEK 阻害剤 U0126 は、TMJ-OA 治療薬として有用である可能性が示唆された。また、上記の⑤の結果より、N-アセチル-L-システインより強力な ROS 発生阻害剤が、TMJ-OA 治療薬として有用である可能性が残されているため、現在、このことについても、調査中である。



また、現在、当初の研究計画に従い、研究方法の（2）にある通りに、MSC や M2-MΦ がホーミングするためにキーとなるモデル分子のピックアップ作業を進めている。そこで、今後の本研究の展開として、このホーミング促進性キー分子の強発現ベクターを導入した MSC や M2-MΦ を TMJ-OA モデルマウスに移植した場合には、これらの細胞の患部組織へホーミングする能力が増強されることや、TMJ 周囲の炎症反応が抑制されることを確認する（図 3



上)。また、研究方法（1）で明らかとした FLS1 細胞における炎症誘導性シグナル伝達分子 MEK に対する阻害剤や MEK/ERK を介する細胞内シグナル伝達経路で働く分子の siRNA を TMJ-OA モデルマウスの TMJ 局所に投与して、TMJ 周囲の炎症反応が抑制されることを確認する（図 3 下）。これらの研究成果により、新規 TMJ-OA 治療法開発のための分子基盤を構築する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Asanuma Kanna, Yokota Seiji, Chosa Naoyuki, Kamo Masaharu, Ibi Miho, Mayama Hisayo, Iri? Tarou, Satoh Kazuro, Ishisaki Akira	4. 巻 65
2. 論文標題 Hydrogen peroxide-induced oxidative stress promotes expression of CXCL15/Lungkine mRNA in a MEK/ERK-dependent manner in fibroblast-like synoviocytes derived from mouse temporomandibular joint	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 97 ~ 103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2022.12.002	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 -

1. 著者名 Matsumoto S, Yokota S, Kyakumoto S, Chosa N, Satoh K.	4. 巻 45
2. 論文標題 Adenosine 5'-triphosphate strengthens receptor tyrosine kinase-mediated suppression of fibrogenic activity in fibroblast-like synoviocytes derived from mouse temporomandibular joints possibly through P2Y2, P2Y4, and P2Y13 purinergic receptors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 岩手医科大学歯学雑誌	6. 最初と最後の頁 46-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20663/iwateshigakukaishi.45.1_46	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 阿部 カレン、横田 聖司、浅沼 莞奈、吉田 弘法、間山 寿代、帖佐 直幸、佐藤 和朗、石崎 明
2. 発表標題 変形性顎関節症において発現誘導される炎症性サイトカインの網羅的解析研究
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浅沼莞奈、横田聖司、間山寿代、帖佐直幸、桑島幸紀、松本識野、阿部カレン、吉田弘法、衣斐美歩、加茂政晴、入江太郎、佐藤和朗、石崎 明
2. 発表標題 酸化ストレスを介した顎関節周囲滑膜炎の発症メカニズムの解明
3. 学会等名 第60回特定非営利活動法人 日本口腔科学会北日本地方部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横田聖司、帖佐直幸、客本齊子、加茂政晴、石崎 明
2. 発表標題 顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞におけるADPのケモカイン発現への影響
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石崎 明、客本齊子、横田聖司、加茂政晴、帖佐直幸
2. 発表標題 間葉系幹細胞を用いた新たな再生医療の樹立戦略
3. 学会等名 第57回日本口腔組織培養学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅沼莞奈、横田聖司、帖佐直幸、加茂政晴、松本識野、吉田弘法、桑島幸紀、間山寿代、佐藤和朗、石崎 明
2. 発表標題 マウス顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞における酸化ストレスの影響によるケモカインの発現変化について
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上暁子、安平進士、松本識野、桑島幸紀、間山寿代、前沢千早、佐藤和朗
2. 発表標題 非症候群性に歯の先天欠如が見られた家計における原因遺伝子要因の探索
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅沼莞奈、横田聖司、帖佐直幸、松本識野、間山寿代、石崎 明、佐藤和朗
2. 発表標題 酸化ストレスがマウス顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞におけるケモカインの発現に与える影響について
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横田聖司、帖佐直幸、松本識野、客本齋子、加茂政晴、石崎 明
2. 発表標題 顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞におけるケモカイン発現へのeATPの影響
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020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
研究分担者	藤原 尚樹 (Fujiwara Naoki) (20190100)	岩手医科大学・歯学部・教授 (31201)	
研究分担者	石崎 明 (Ishisaki Akira) (20356439)	岩手医科大学・歯学部・教授 (31201)	
研究分担者	横田 聖司 (Yokota Seiji) (50802401)	岩手医科大学・歯学部・講師 (31201)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	佐藤 和朗 (Satoh Kazuro) (60295996)	岩手医科大学・歯学部・教授 (31201)	

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