

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009-2011

課題番号：21592536

研究課題名（和文）上皮-間葉移行に着眼した顎関節内障関節円板線維化の細胞生物学的病態解析

研究課題名（英文）Pathological analysis of the deformed temporomandibular joint disc in epithelial-mesenchymal transition and fibrosis.

研究代表者

藤田 茂之（フジタ シゲユキ）

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：50228996

研究成果の概要（和文）：

ヒト顎関節円板組織内にルミカン、ファイブロモジュリン、低分子ヒアルロン酸合成酵素の発現を確認し、同培養細胞でもIL-1 β 刺激でルミカンと低分子ヒアルロン酸合成酵素の発現の上昇を確認した。過開口運動させた野生型マウスに線維性癒着が生じたが、テネイシンCノックアウトマウスでは癒着が生じなかった。以上より、顎関節円板の細胞外マトリックスの病的変化を検索し上皮-間葉移行に関連した線維化誘導を解明する手がかりになると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we showed that in immunohistochemistry, positive staining for lumican and hyaluronan synthase 3 (HAS3) was observed in deformed temporomandibular joint (TMJ) disc, whereas fibromodulin expression was localized slightly below deformed TMJ disc surface. In cell culture experiment, the expression of lumican and HAS3 mRNA was significantly enhanced by stimulation with interleukin-1 β (IL-1 β), whereas there were no significant changes in the expression of fibromodulin mRNA in the presence or absence of IL-1 β . In animal experiment, fibrous adhesion observed in the wild-type mice TMJ, whereas there was no fibrous adhesion in the tenascin-C knockout mice.

These findings suggest that to analyze the changes in ECM structure of TMJ disc may be important for understanding fibrous induction in EMT.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：顎関節円板、ルミカン、ファイブロモジュリン、低分子ヒアルロン酸合成酵素

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、これまでに顎関節関節円板（以下：関節円板）を中心に顎関節内障の病態解析を行っている。しかし、関節円板の変形、転位のメカニズムの解明には至っていない。臨床的に顎関節内障の重篤な病的変化は、滑膜表層に著明に現れるが、関節円板の病的変化は予想外に軽度な場合が多い。申請者らはこの点に着目し、関節円板が外的ストレスに耐えようとする何らかの抑制維持機構が内在し、その均衡が崩れた場合に関節円板の変形が起ると考えている。その結果は、前方転位し異常に屈曲変形した関節円板の屈曲部位に高濃度のグリコサミノグリカン（ケラタン硫酸、コドロイチン硫酸）が局在し、それを囲みこむ円板の一部や変形肥厚した滑膜組織内には vascular endothelial growth factor (VEGF) の局在、heat shock protein (HSP-47) が増加し、付近の膠原線維走行がストレスに耐える構造に変貌する病態を把握している (Fujita et al, Oral Rehabilitation, 2001)。この重要な変化に富んだ病態解析を基に、これ以後は低酸素環境とサイトカイン IL-1 β 刺激の条件下での研究をおこなってきた。その成果として ① コラーゲン分解酵素の MMPs を、関節円板細胞が産生する (Yamaguchi et al, Archives Oral Biology, 2005)。② 結合組織の修復に先行して発現増加する糖蛋白のテネインが滑膜細胞から関節円板にシグナルを伝達する (Tojyo et al, Oral Disease, 2008)。③ 軟骨破壊因子として知られる ADAMTS-5 は関節円板細胞にて産生されている (Matsumoto et al, Histology and histopathology, 2008) を継続報告してきた。また、重度のヒト顎関節内障の関節円板組織に正常な関節円板には存在しない α -smooth muscle actin (α -SMA) が変形した関節円板組織に集積することを確認し、今回のテーマである上皮-間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) に関係した線維化が変形した関節円板組織で発生しているという着眼に至った。組織線維化の報告には、重度の慢性腎障害の尿細管上皮細胞において transforming growth factor- β (TGF- β) の作用により線維化が生じる。Tumor necrosis factor- α (TNF- α) ノックアウトマウスで角膜組織の創傷治癒過程において TGF- β の過剰発現が生じ、創傷治癒遅延になることから、TNF- α が常に TGF- β 作用を抑制し正常な治癒が維持できているという報告がされている。また、胸部疾患の肺線維化において低酸素環境が組織の線維化を亢進させる事実が報告された。これら結果から総合的に考察し、顎関節内障における関節円板の変性と変形機序において、EMT

に關係する線維化のメカニズムが關係しているとの仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

顎関節内障における関節円板の細胞外マトリックス (ルミカン、ファイブロモジュリン、ヒアルロン酸、テネイン) の変化が組織線維化にどのような影響をおよぼしているかを遺伝子、タンパク質レベルで解析することが目的である。

3. 研究の方法

- 1) ヒト顎関節内障の関節円板組織を用いて、免疫組織化学的染色を行った。
- 2) ヒト関節円板細胞を用いて、RT-PCR、リアルタイム PCR を行った。
- 3) テネインCのノックアウトマウスを用いて関節円板の線維化の検討を行った。

4. 研究成果

- 1) ヒト関節円板組織を用いた免疫組織化学的染色。ルミカン：変形した関節円板の内方に強い発現を認めた。特に線維芽細胞様細胞の周囲に強い発現を認めた。ファイブロモジュリン：変形した関節円板の表層に弱い発現を認めた。CD34, VEGF：変形した関節円板組織内に発生した血管壁に強い発現を認めた。低分子ヒアルロン酸合成酵素：変形した関節円板の裂隙に存在する軟骨細胞様細胞に強い発現をみとめた。
 - 2) ヒト関節円板培養細胞を用いた実験。ルミカン：通常酸素下におけるIL-1 β 刺激24, 48時間培養でmRNAの発現がIL-1 β 刺激なしと比較して有意に増加した。ファイブロモジュリン：通常酸素下におけるIL-1 β 刺激でmRNAの発現を認めなかった。低分子ヒアルロン酸合成酵素：低酸素培養下におけるIL-1 β 刺激3, 24時間培養でmRNAの発現がIL-1 β 刺激なしと比較して有意に増加した。
- 以上の結果を英文誌に報告した。

- 3) テネインCノックアウトマウスを用いた実験。野生型マウスに過開口運動を行うと関節円板の線維性癒着が生じるが、テネインCノックアウトマウスでは癒着が生じなかった。

意義：ルミカンはIL-1 β により関節円板組織内の環境変化に対する調整、組織再構築の役割があることが示唆された。ファイブロモジュリンはIL-1 β による環境変化に影響を受けないことが示唆された。低分子ヒアルロン酸合成酵素は関節円板の病的変化に関与することが示唆された。関節円板組織の病的組織再構築に細胞外マトリックスであるルミカン

、低分子ヒアルロン酸が関与していることがわかった。また、テネイシンCは関節円板の線維化に関与していることが示唆された。重要性：上記意義より、関節円板の細胞外マトリックスの変化を追及することが上皮-間葉移行に関係した線維化誘導を解明する大切な手がかりになると考えられた。

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 4 件)

- ① Norifumi Kiga. Histochemistry for studying structure and function of the articular disc of the human temporomandibular joint. *Eur J Histochem.* 55(1): e11, 2012 査読有
- ② Norifumi Kiga, Itaru Tojyo, Takashi Matsumoto, Yukihiro Hiraishi, Yuji Shinohara, Syuiti Makino, and Shigeyuki Fujita. Expression of lumican and fibromodulin following interleukin-1 beta stimulation of disc cells of the human temporomandibular joint. 55(2): e11, 2011 査読有
- ③ Takashi Matsumoto, Masaharu Inayama, Itaru Tojyo, Norifumi Kiga, Shigeyuki Fujita. Expression of hyaluronan synthase 3 in deformed human temporomandibular joint disc: in vivo and in vitro studies. *Eur J Histochem.* 54(4): e50, 2010 査読有
- ④ Norifumi Kiga, Itaru Tojyo, Takashi Matsumoto, Yukihiro Hiraishi, Yuji Shinohara, Shigeyuki Fujita. Expression of lumican related to CD34 and VEGF in the articular disc of the human temporomandibular joint. *Eur J Histochem.* 54(3): e34, 2010 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① 篠原裕志、東條格、郷与志彦、岡本健二郎、藤田茂之 マウス下顎頭過開口運動における細胞外基質デコリン、ビグリカンの変化. 第 23 回日本口腔科学会近畿地方部会 2011. 12. 大阪
- ② 木賀紀文、谷本幸司、西野耕治、東條格、松本隆司、篠原裕志、藤田茂之 ヒト顎関節円板細胞の IL-1beta 刺激によるルミカンとファイブロモジュリンの発現 第 56 回日本口腔外科学会総会学術大会 2011. 10. 大阪
- ③ 東條格、篠原裕志、田中章夫、木賀紀文、松本隆司、和田 健、藤田茂之：顎関節滑膜軟骨腫症の滑膜における軟骨関連因子の発現. 第 56 回日本口腔外科学会総会学術大会. 2011. 10. 大阪
- ④ 篠原裕志、東條格、郷与志彦、岡本健二郎、藤田茂之 マウス下顎頭過剰運動による顎関節癒着モデルにおける SLRP の発

現 和歌山医学会総会 2011. 7. 和歌山

- ⑤ 木賀紀文、東條格、松本隆司、篠原裕志、藤田茂之 ヒト顎関節円板におけるルミカンの発現 第 55 回日本口腔外科学会総会 2010. 10. 千葉
- ⑥ 松本隆司、東條格、木賀紀文、藤田茂之 変形したヒト顎関節円板における HAS3 の免疫組織化学的検討 第 78 回和歌山医学会総会 2010. 7. 和歌山
- ⑦ 木賀紀文、東條格、松本隆司、藤田茂之 ラット顎関節におけるスモールプロテオグリカンの局在性 第 78 回和歌山医学会総会 2010. 7. 和歌山
- ⑧ 藤田茂之 小児顎関節症の治療 日本臨床小児口腔外科学会総会 2009. 1. 松山

[図書] (計 2 件)

- ① よくわかる歯科医学・口腔ケア 医学情報社 第 1 版 分担 藤田茂之 顎関節症：54-56 頁 2011
- ② 顎口腔領域における MRI 診断 第 2 版 学建書院 分担 藤田茂之 172-182 頁 2010

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
該当なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田茂之 (FUJITA SHIGEYUKI)
和歌山県立医科大学 医学部 教授
研究者番号：50228996

(2) 研究分担者

東條格 (TOJYO ITARU)
和歌山県立医科大学 医学部 助教
研究者番号：70405439

(3) 連携研究者

該当なし。