

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 6 月 15 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792002

研究課題名（和文） 顎関節における細胞外マトリックス代謝機構に関する研究

研究課題名（英文） Metabolisms of extracellular matrix in temporomandibular joint

研究代表者

有吉 渉 (ARIYOSHI WATARU)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：40405551

研究成果の概要（和文）：

軟骨細胞におけるアグリカナーゼの発現と酵素活性に対するヒアルロン酸（HA）オリゴ糖の作用を解析した。HA オリゴ糖により、軟骨細胞における ADAMTS4 および ADAMTS5 の発現、そして GPI 結合タンパク MT4-MMP と ADAMTS4 との複合体形成が活性化された。NF-κB 阻害薬により、この発現誘導は抑制された。以上の結果から、HA オリゴ糖による軟骨マトリックスの分解やアグリカナーゼの発現の活性化には、NF-κB シグナル経路が関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Hyaluronan (HA) oligosaccharides serve as competitive receptor antagonists to displace HA from the cell surface and induce cell signaling events. We determined changes in the expression and function of aggrecanases after disruption of chondrocyte CD44-HA interactions. Disruption of chondrocyte CD44-HA interactions with HA oligosaccharides induced the transcription of ADAMTS-4 and ADAMTS-5. The association of GPI-anchored MT4-MMP with ADAMTS-4 was also induced in articular chondrocytes by HA oligosaccharides. Inhibition of the NF-kappa B pathway blocked HA oligosaccharides-mediated stimulation of aggrecanases. These results suggest that disruptive changes in chondrocyte- matrix interactions by HA oligosaccharides induce matrix degradation and elevate aggrecanases via the activation of the NF-kappa B signaling pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2011 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：顎関節・細胞外マトリックス・アグリカナーゼ・ヒアルロン酸

1. 研究開始当初の背景

軟骨の主要なプロテオグリカン（PG）であるアグリカンは、分子量 210kDa のコアタン

パク質にコンドロイチン硫酸鎖やケラタン硫酸鎖が結合したものが、結合タンパク質共存のもとヒアルロン酸に結合している巨大

分子である。これらが、軟骨組織の力学的強度を生み出している。

変形性関節症では、アグリカンの分解亢進による軟骨減少が関節機能低下につながる。これまでアグリカン分解に関与する因子としては、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) が中心と考えられていた。しかし 1999 年に同定された ADAMTS-4 と ADAMTS-5 が、初期のアグリカン分解の中心的役割を有することが明らかになった。

これらアグリカナーゼはアグリカンの Interglobular domain (IGD) をアミノ酸特異的に分解する。しかし、その分解機構に関する詳細は不明な点が多く、ほとんど知見が得られていない。

先の研究で、われわれは、顎関節症患者より採取した関節滑液中のヒアルロン酸分子量が健常者に比し、著しく低下していることを明らかにした。また、低分子量ヒアルロン酸が CD44 受容体を介して破骨細胞前駆細胞に作用し、その分化や骨吸収能を増強することも報告している。このことから、顎関節内におけるヒアルロン酸分子量の低下は骨軟骨代謝に対して破壊的に作用し、病態形成に関与することが示唆された。

今回、これまでの知見をもとにヒアルロン酸分子量の低下とアグリカナーゼの発現、活性化との関連性を検索し、関節破壊のメカニズムに関する詳細を明らかにすることが目的である。

2. 研究の目的

顎関節内における細胞外マトリックスの主要構成成分アグリカンの代謝に焦点をおいた研究を展開する。アグリカン分解酵素として、近年関節疾患の病態への強い関与が報告されている、アグリカナーゼ (ADAMTS4、ADAMTS5) の発現・活性化に与える低分子量ヒアルロン酸の影響を分子生物学的に解明する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

初代関節軟骨細胞は、ウシ中趾足根関節より採取し、酵素処理後、培養に使用した。同細胞の高密度単層培養系に対し、さまざまなシグナル阻害薬で前処理を行った後、低分子量のヒアルロン酸オリゴ糖を添加後、サンプルを回収し、生化学的分析に用いた。

(2) 生化学的分析

① Real-time RT-PCR 解析

刺激後の細胞より mRNA を抽出し、real-time RT-PCR 法を用いて、アグリカナーゼの遺伝子レベルの発現を定量した。

② Western blotting 解析

刺激後の細胞より産生されるアグリカナ

ーゼタンパクについては、培養上清を回収し、スピンカラムを用いて濃縮後、Western blotting 法を用いて、タンパク発現を同定した。

③アグリカナーゼ活性解析

②で産生されたアグリカナーゼのアグリカン分解能を評価するために、HA オリゴ糖をウシ軟骨組織片に添加して、培養を行った。培養上清をサイド回収し濃縮後、アグリカン分解フラグメント (ITEGE epitope) に対する抗体を用いて Western blotting 法を行い、その分解活性を解析した。

④ 共免疫沈降法解析

ADAMTS4 の産生に関して GPI 結合タンパクである MT4-MMP との相互作用同定のために、ADAMTS4 抗体を吸着させた磁性ビーズに培養後の細胞より抽出したタンパクを反応し、高純度免疫沈降法を用いて ADAMTS4 と複合体形成をしているタンパク分画を回収した。回収後のサンプルについては、Western blotting 解析により、複合体形成タンパクの同定を行った。

4. 研究成果

(1) HA オリゴ糖によるアグリカナーゼ遺伝子発現誘導

HA オリゴ糖刺激下に培養した関節軟骨細胞より、mRNA を抽出、real time RT-PCR 法にてアグリカナーゼ発現の同定を行った。ADAMTS4、ADAMTS5 とともに低分子量ヒアルロン酸の添加により、時間依存的に mRNA の発現が上昇した (Figure 1A, B)。また、この HA オリゴ糖によるアグリカナーゼ発現誘導能は、刺激後 6 時間 (white bar)、24 時間 (red and blue bar) とともに濃度依存的な増強が認められた。(Figure 1C, D)。

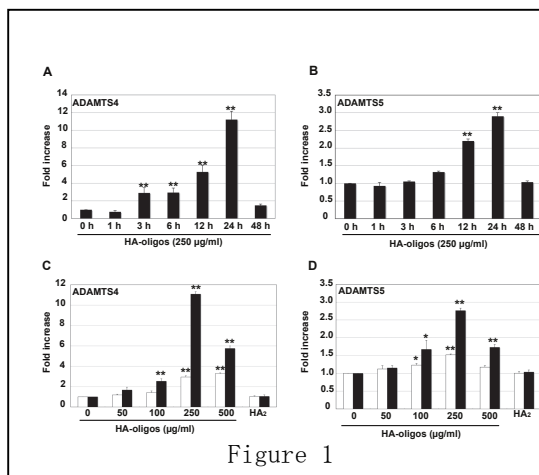


Figure 1

(2) HA オリゴ糖によるアグリカナーゼタンパク発現誘導および C-terminal truncation の増強

関節軟骨細胞を HA オリゴ糖刺激下に単層培

養後、培養上清を回収した。回収したサンプルを濃縮 (x10)、透析の後、western blot 法にて ADAMTS4, ADAMTS5 発現を同定した (Figure 2)。mRNA 同様、低分子量ヒアルロン酸添加により、ADAMTS4, ADAMTS5 ともに時間依存的 (A, B)、濃度依存的 (C, D) なタンパク発現増強が認められた。

また、ADAMTS4 は C 末端の truncation により、アグリカン分解能が増強することが知られている。Figure 2A, C に示すように低分子量ヒアルロン酸は truncation form (p53, p40) の発現も増強することが示された。この結果により、低分子量ヒアルロン酸がアグリカナーゼの発現とともに、アグリカン分解能も増強する可能性が示唆された。

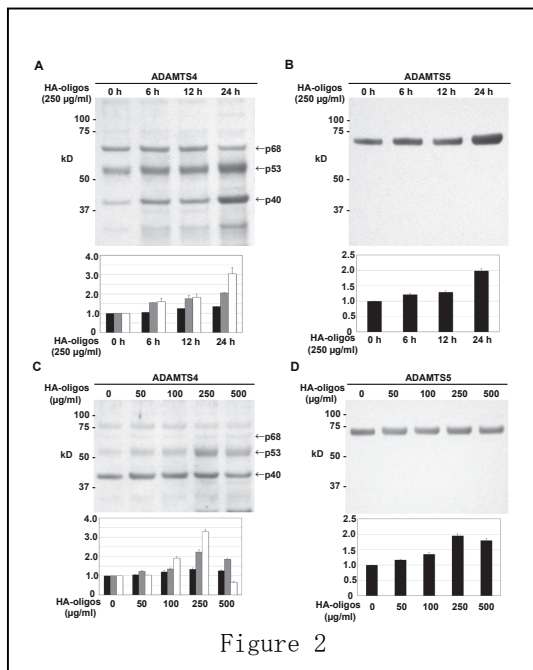


Figure 2

(3) HA オリゴ糖によるアグリカナーゼのアグリカン分解活性の増強

アグリカナーゼは、アグリカン G1-G2 ドメイン間の Interglobular domain (IGD) 間でアミノ酸配列特異的に分解活性を示す。

アグリカナーゼ分解により形成される neoepitope である ITEGE 抗体を用いて、アグリカナーゼの活性について検討を行った。ウシ関節軟骨器官培養系に対し、HA オリゴ糖を加えて、培養を行った。培養上清を回収し、Figure 2 と同様の処理を行ったサンプルに対し、western blotting 法にて、ITEGE の発現を検討した。

Figure 3 に示すように培養上清中の ITEGE 発現は HA オリゴ糖添加後、時間依存的に増強しており、HA オリゴ糖によるアグリカナーゼ活性の増強能が示唆された。

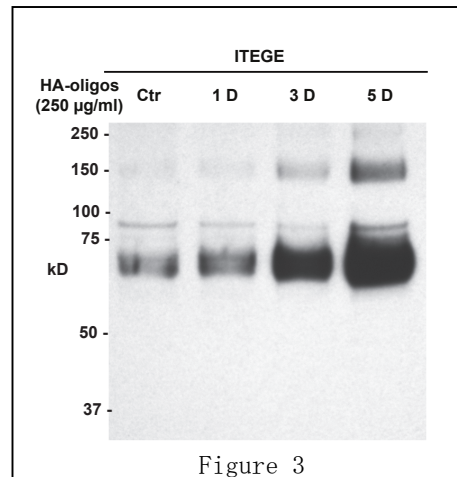


Figure 3

(4) HA オリゴ糖による MT4-MMP と ADAMTS4 複合体の形成の亢進

過去の報告により、ADAMTS4 は分泌過程で、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) 結合タンパクである MT4-MMP と複合体を形成することが知られている。今回、HA オリゴ糖で刺激した関節軟骨細胞より、タンパクを抽出後、ADAMTS4 抗体を結合したマグネットビーズを用いた共免疫沈降法にて、ADAMTS4-MT4MMP 複合体の発現を同定した (Figure 4)。

Figure に示すように ADAMTS4 と複合体を形成する MT4-MMP のタンパク発現は HA オリゴ糖の添加により増強した。この結果から、HA オリゴ糖による ADAMTS4 発現増強過程において、MT4-MMP との複合体形成が関与していることが示唆された。

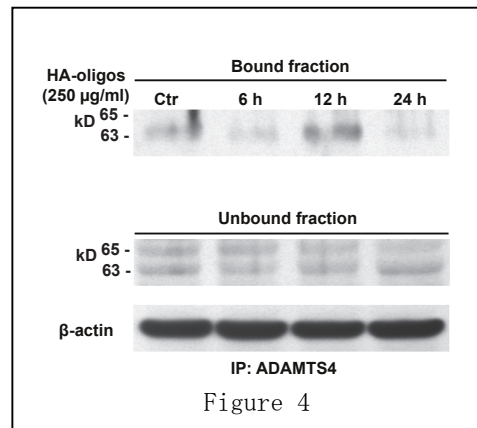


Figure 4

(5) HA オリゴ糖によるアグリカナーゼ誘導活性における NF- κ B シグナル経路の関与

細胞に HA オリゴ糖による ADAMTS4, ADAMTS5 発現誘導に関する詳細なメカニズムの解明に種々の阻害剤を用いた研究をおこなった。関節軟骨細胞を各シグナル阻害剤で前処理の後、HA オリゴ糖 (250 μ g/ml) で刺激し、抽出した ADAMTS4, ADAMTS5 の mRNA 量お

よび、培養上清中のタンパク発現量を real-time RT-PCR 法および western blot 法にてそれぞれ同定した (Figure 5)。

HA オリゴ糖により活性化される ADAMTS4、ADAMTS5 の発現は mRNA レベル (A, B)、分泌タンパクレベル (C, D) とともに Helenalin の前処理により、強い阻害が認められた。その他の阻害剤では、明らかな変化は認められなかった。

この結果より、HA オリゴ糖によるアグリカナゼ発現増強には NF- κ B 経路の活性化を介して誘導されることが示唆された。

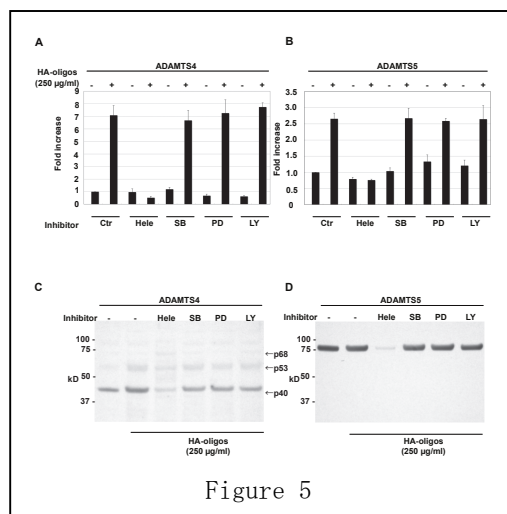


Figure 5

今回の研究で、HA オリゴ糖が、NF- κ B シグナリング経路の活性化を介して、アグリカナゼの発現、活性化を増強することが示された。顎関節症患者では、これまで、われわれは顎関節滑液中のヒアルロン酸分子量が低下していること、そして低分子量ヒアルロン酸が破骨細胞の分化、骨吸収能の活性化を介して、関節破壊に関与している可能性を報告した。これらの知見から、滑液内で、低分子化したヒアルロン酸は、細胞外マトリックスの分解を亢進させ、初期の関節破壊にも関与している可能性が示された。

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 10 件)

- ① Schmitz I, Ariyoshi W, Takahashi N, Knudson CB, Knudson W, Hyaluronan oligosaccharide treatment of chondrocytes stimulates expression of both HAS-2 and MMP-3, but by different signaling pathways, Osteoarthritis cartilage, 査読有, 2010, 18 (3): 447-54.
DOI:10.1016/j.joca.2009.10.007

- ② Takahashi N, Knudson CB, Thankamony S, Ariyoshi W, Mellor L, Im HJ, Knudson W, Induction of CD44 cleavage in articular chondrocytes, Arthritis and Rheumatism, 査読有, 2010, 62 (5): 1338-48.
DOI: 10.1002/art.27410
- ③ Ariyoshi W, Knudson CB, Luo Na, Fosang AJ, Knudson W, Internalization of aggrecan G1 domain neopeptide ITEGE in chondrocytes requires CD44, The Journal of Biological Chemistry, 査読有, 2010, 285 (46): 36216-36224.
DOI:10.1074/jbc.M110.129270
- ④ Kawano M, Ariyoshi W, Iwanaga K, Okinaga T, Habu M, Yoshioka I, Tominaga K, Nishihara T, Mechanisms involved in enhancement of osteoblast differentiation by hyaluronic acid, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有, 2011, 405 (4): 575-80.
DOI:10.1016/j.bbrc.2011.01.071
- ⑤ Kaneuji T, Ariyoshi W, Okinaga T, Toshinaga A, Takahashi T, Nishihara T, Mechanisms involved in regulation of osteoclastic differentiation by mechanical stress-loaded osteoblasts, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有, 2011, 408 (1): 103-109.
DOI:10.1016/j.bbrc.2011.03.128
- ⑥ Takao M, Okinaga T, Ariyoshi W, Iwanaga K, Nakamichi I, Yoshioka I, Tominaga K, Nishihara T, Role of heme oxygenase-1 in inflammatory response induced by mechanical stretch in synovial cells, Inflammation Research, 査読有, 2011, 60 (9): 861-867.
- ⑦ Suke Dai M, Ariyoshi W, Okinaga T, Iwanaga K, Habu M, Yoshioka I, Tominaga K, Nishihara T, Inhibition of adjuvant arthritis in rats by electroporation with interleukin-1 receptor antagonist, Journal of Interferon & Cytokine Research, 査読有, 2011, 31 (11): 839-846.
DOI:10.1089/jir.2011.0024
- ⑧ Takahashi O, Okinaga T, Ariyoshi W, Tominaga K, Nishihara T, Novel histone deacetylase inhibitor exhibits antitumor activity via apoptosis induction in oral squamous cell carcinoma, Journal of Biophysical Chemistry, 査読有, 2011, 2 (3), 215-221.
DOI: 10.4236/jbpc.2011.23026

- ⑨ Kanzaki S, Ariyoshi W, Takahashi T, Okinaga T, Kaneuji T, Mitsugi S, Nakashima K, Tsujisawa T, Nishihara T, Dual effects of heparin on BMP-2-induced osteogenic activity in MC3T3-E1 cells, *Pharmacological Reports*, 査読有, 2011, 63 (5): 1222-1230.
- ⑩ Ariyoshi W, Tanakashi N, Hida D, Knudson CB, Knudson W, Mechanisms involved in enhancement of the expression and function of aggrecanases by hyaluronan oligosaccharides, *Arthritis & Rheumatism*, 2012, 64 (1): 187-97. DOI:10.1002/art.33329

[学会発表] (計 20 件)

- ① WATARU ARIYOSHI, NA LUO, DAISUKE HIDA, CHERYL B KNUDSON, WARREN KNUDSON: Turnover of aggrecan G1 domains is dependent on CD44-mediated endocytosis. *Hyaluronan 2010*, Kyoto, Japan, June 6-11, 2010
- ② WARREN KNUDON, NOBUNORI TAKAHASHI, WATARU ARIYOSHI, LILIANA MELLOR, CHERYL B KNUDSON: Chondrocytes exhibit proteolytic fragmentation of CD44. *Hyaluronan 2010*, Kyoto, Japan, June 6-11, 2010
- ③ DAISUKE HIDA, NOBUNORI TAKAHASHI, WATARU ARIYOSHI, CHERYL B KNUDSON, WARREN KNUDSON: The turnover of chondrocyte CD44 relies on multiple pathways. *Hyaluronan 2010*, Kyoto, Japan, June 6-11, 2010
- ④ NOBUNORI TAKAHASHI, WATARU ARIYOSHI, CHERYL B KNUDSON, WARREN KNUDSON: Hyaluronan oligosaccharide induce endogenous BMP-7 synthesis via transcriptional activation of NF- κ B and p38 MAP kinase pathways in articular chondrocytes. *Hyaluronan 2010*, Kyoto, Japan, June 6-11, 2010
- ⑤ MICHINAO KAWANO, TOSHINORI OKINAGA, KENJIRO IWANAGA, WATARU ARIYOSHI, MANABU HABU, KAZUHIRO TOMINAGA, TATSUJI NISHIHARA: Effect of Hyaluronic acid and BMP-2 on osteoblasts differentiation. 88 the General Session & Exhibition of the IADR, Barcelona, Spain, July 15-16, 2010
- ⑥ WATARU ARIYOSHI, TOSHINORI OKINAGA, TATSUJI NISHIHARA: CD44 mediated internalization of aggrecan G1 domain by chondrocytes. 58th annual Meeting of JADR, Kitakyushu, Japan, November 20-21, 2010
- ⑦ TOSHINORI OKINAGA, WATARU ARIYOSHI, TATSUJI NISHIHARA: SOCS regulates cell cycle arrest in periodontopathic bacterium-infected macrophages. 58th annual Meeting of JADR, Kitakyushu, Japan, November 20-21, 2010
- ⑧ SHO MITSUGI, WATARU ARIYOSHI, TOSHINORI OKINAGA, TETSU TAKAHASHI, TATSUJI NISHIHARA: Hyaluronic acid induces osteogenesis in periosteal cell. 58th annual Meeting of JADR, Kitakyushu, Japan, November 20-21, 2010
- ⑨ MASANOBU TAKAO, TOSHINORI OKINAGA, WATARU ARIYOSHI, KENJIRO IWANAGA, MANABU HABU, KENJIRO OKINAGA, TATSUJI NISHIHARA: The investigation of HO-1 in mechanical stretch induced inflammation. 58th annual Meeting of JADR, Kitakyushu, Japan, November 20-21, 2010
- ⑩ MICHINAO KAWANO, WATARU ARIYOSHI, KENJIRO IWANAGA, TOSHINORI OKINAGA, MANABU HABU, KAZUHIRO TOMINAGA, TATSUJI NISHIHARA: Hyaluronic acid enhances BMP-2 induced osteogenesis in MG63 cells. 58th annual Meeting of JADR, Kitakyushu, Japan, November 20-21, 2010
- ⑪ TAKESHI KANEUJI, WATARU ARIYOSHI, TOSHINORI OKINAGA, TETSU TAKAHASHI, TATSUJI NISHIHARA: Regulatory effect on osteoclast differentiation of soluble factors. 58th annual Meeting of JADR, Kitakyushu, Japan, November 20-21, 2010
- ⑫ SEIKO FUJII, TOSHINORI OKINAGA, WATARU ARIYOSHI, OSAMU TAKAHASHI, KENJIRO IWANAGA, MANABU HABU, KAZUHIRO TOMINAGA, TATSUJI NISHIHARA: HDAC inhibitor induces cell cycle arrest in myeloma cells. 58th annual Meeting of JADR, Kitakyushu, Japan, November 20-21, 2010
- ⑬ MASATERU MORISHITA, KEISUKE NAKASHIMA, TOSHINORI OKINAGA, WATARU ARIYOSHI, MAKOTO YOKOTA, TATSUJI NISHIHARA: Effects of lipoproteins on the plaque formation of moraine macrophages. 58th annual Meeting of JADR, Kitakyushu, Japan, November 20-21, 2010
- ⑭ SACHIKO FUJIMOTO, NORIKO SAITO, WATARU ARIYOSHI, TOSHINORI OKINAGA, KAZUNORI YAMAGUCHI, TATSUJI NISHIHARA: Purified fraction of EMD inhibits the

- proliferation of epithelial cells. 58th annual Meeting of JADR, Kitakyushu, Japan, November 20-21, 2010
- ⑮ RYOSHUKE SAEKI, MASATERU MORISHITA, TOSHINARI MAEDA, HIROAKI OGAWA, TOSHINORI OKINAGA, WATARU ARIYOSHI, TATSUJI NISHIHARA: Role of pili in *S. sanguinis* to cell adhesion. 58th annual Meeting of JADR, Kitakyushu, Japan, November 20-21, 2010
- ⑯ OSAMU TAKAHASHI, TOSHINORI OKINAGA, KENJIRO IWANAGA, WATARU ARIYOSHI, MANABU HABU, KAZUHIRO TOMINAGA, TATSUJI NISHIHARA: Effects of HDAC inhibitor in oral squamous cell carcinoma. 89th General Session & Exhibition of the IADR, San Diego, United States, March 16-19, 2011.
- ⑰ TAKESHI KANEUJI, WATARU ARIYOSHI, TOSHINORI OKINAGA, TETSU TAKAHASHI, TATSUJI NISHIHARA: Mechanical stress inhibits osteoclast differentiation through noncanonical Wnt pathway. 89th General Session & Exhibition of the IADR, San Diego, United States, March 16-19, 2011.
- ⑱ TOSHINORI OKINAGA, WATARU ARIYOSHI, TATSUJI NISHIHARA: The role of SOCS in periodontal bacterium-infected macrophages. 89th General Session & Exhibition of the IADR, San Diego, United States, March 16-19, 2011.
- ⑲ MASANOBU TAKAO, TOSHINORI OKINAGA, WATARU ARIYOSHI, KENJIRO IWANAGA, MANABU HABU, KAZUHIRO TOMINAGA, TATSUJI NISHIHARA: Induction of H0-1 by mechanical stretch in synovial cells. 89th General Session & Exhibition of the IADR, San Diego, United States, March 16-19, 2011.
- ⑳ WATARU ARIOSHI, TOSHINORI OKINAGA, TATSUJI NISHIHARA: Hyaluronan oligosaccharide up-regulate aggrecanase expression and function. 89th General Session & Exhibition of the IADR, San Diego, United States, March 16-19, 2011.

[図書] (計3件)

- ① 有吉 渉、沖永敏則、西原達次、医学出版、月刊糖尿病 歯周病が関連する疾患4 感染症、2010、90-95
- ② 西原達次、沖永敏則、有吉 渉、学校法人 福岡歯科学園 福岡歯科大学、口腔の病気と全身の健康 口腔内細菌による病気、2011、20-26
- ③ 井上博雅、有吉 渉、クインテッセンス

出版株式会社 微生物学 滅菌と消毒、2012、55-62

[産業財産権]
○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]
特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有吉 渉 (ARIYOSHI WATARU)
九州歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：40405551

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし