

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17137

研究課題名（和文）顎関節軟骨の老化を制御する新規メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of a Novel Mechanism for Controlling Aging of Temporomandibular Joint Cartilage

研究代表者

桑原 実穂（Kawahara, Miho）

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：30868287

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：健康成人とOA患者から採取した大腿骨頭におけるCCN3の免疫染色では、OA群で軟骨細胞上層部に陽性細胞の集積と軟骨表層の基質での染色性の高い領域を認めた。また、単離した軟骨細胞の遺伝子解析では、健康群に比べOA群でCCN3 mRNAの発現が有意に上昇するとともに、p16やADAMTS4、Aggrecan mRNAなどの発現誘導も認められた。また、同サンプルのMankin scoreによって得られた組織学的変性度と、CCN3 mRNA発現レベルには正の相関を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CCN3の発現と軟骨組織変性の程度に相関があること、またトランスジェニックマウスの解析により軟骨基質分解を亢進することが示された。今回の研究成果は変形性関節症発症の病態解明の一助になると考えられる。超高齢社会において、高齢者に多く発症する同疾患の予防・治療法確立の足掛かりとしての意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：Immunostaining of CCN3 in the femoral head samples collected from healthy adults and patients with osteoarthritis (OA) revealed an accumulation of positive cells in the superficial layer of chondrocytes and highly stained areas in the matrix of the cartilage surface in the OA group. Moreover, gene analysis of isolated chondrocytes showed a significant increase in CCN3 mRNA expression in the OA group compared to the healthy group, along with induction of expression of genes such as p16, ADAMTS4, and Aggrecan mRNA. Furthermore, a positive correlation was observed between the histological degeneration degree obtained by the Mankin score of the same samples and the expression level of CCN3 mRNA.

研究分野：補綴歯科

キーワード：関節軟骨

1. 研究開始当初の背景

高齢者にみられる関節軟骨の変性を特徴とする変形性関節症は、顎関節を含む全身の関節に起こり、関節機能の障害・疼痛による日常生活動作や社会的活動の制限が問題となる。しかしその病態は未だ解明されていないことから根治療法がないのが現状である。変形性関節症の病因としては機械的負荷以外に加齢が広く知られている。酸化ストレスやテロメア短縮、DNA複製障害等の加齢に伴う現象により、細胞周期の不可逆的な停止を起こす“細胞老化”が軟骨組織でもみられる。また、軟骨細胞は加齢とともに増殖能力および基質産生能が低下する一方、炎症性メディエーターやマトリックス分解酵素産生能力は維持もしくは上昇することが示されている。つまり、加齢による軟骨代謝の恒常性破綻が関節軟骨の破壊と喪失をもたらすと考えるが、その分子メカニズムの詳細は不明である。

申請者らは、軟骨代謝における多様な生理作用を持つ CCN ファミリータンパク質のうち、CCN3 (Cellular communication network factor 3) について、軟骨組織特異的に CCN3 を過剰発現するマウスを作製し解析したところ、関節軟骨表層の粗造化及び関節軟骨菲薄化といった軟骨変性様所見を見出していた。

2. 研究の目的

CCN3 が軟骨組織変性に対しどのような作用を有するのか、細胞周期ならびに基質産生・分解に影響を与える細胞内の機構の解明と、CCN3 の制御による軟骨変性への影響解明を目的とした。

3. 研究の方法

加齢に伴う CCN3 発現レベルの解析

人工関節置換術を受けた 19 歳から 91 歳までの患者から得た関節軟骨組織から軟骨細胞を単離し培養後、RNA を抽出し CCN3 と老化指標遺伝子発現レベルを解析した。

人為的細胞老化誘導

で得たヒト初代培養関節軟骨細胞と、ラット軟骨細胞様細胞株 RCS 細胞に対し、細胞老化誘導として 200 μ M までの H₂O₂ を培地に加え 2 時間作用させた後 24 時間のインキュベーション後、各種遺伝子発現レベルの解析を行った。

細胞周期調節因子への影響

RCS 細胞に pEGFP-CCN3 ベクターをトランスフェクションさせ 48 時間後、p53 結合領域を含むプラスミドコンストラクトで p21 プロモーターの活性を測定した。また、RCS 細胞に対しリコンビナント CCN3 100ng/mL を添加し 24 時間作用させ、細胞周期調節因子発現レベルを解析した。

CCN3 過剰発現マウス解析

Col2a1 プロモーター下流に CCN3 遺伝子を接続し、軟骨組織特異的に CCN3 を過剰発現するマウスを作成した。膝関節組織について aggrecan neo-epitope の免疫染色を行った。また、関節軟骨から RNA を抽出して遺伝子発現レベルの解析をした。

健常成人と OA 患者の比較

人工関節置換術を受けた患者のうち、変性のない正常群 (74.0 \pm 6.8 歳) と OA 群 (71.9 \pm 10.0 歳) の関節軟骨において Safranin-O 染色と CCN3 免疫染色を行った。それぞれの軟骨組織破壊の程度について、Mankin Score を用いて定量評価をした。また、初代培養軟骨細胞の遺伝子発現レベルを解析した。

4. 研究成果

加齢に伴う CCN3 発現レベルの解析

マウスとヒト初代培養関節軟骨細胞において、年齢と CCN3 遺伝子発現レベルとの間に

有意な正の相関を示した。これは老化指標である p53、p21 遺伝子発現レベルの変動と同様であった。

人為的細胞老化誘導

RCS 細胞とヒト初代培養関節軟骨細胞において H₂O₂ 刺激を行ったところ、濃度の用量依存的に CCN3、p53、p21 遺伝子発現レベルの増加を認めた。

細胞周期調節因子への影響

RCS 細胞に CCN3 矯正発現後、p21 プロモーター活性の上昇を認めた。また、リコンビナント CCN3 の添加により p21、p53 遺伝子発現レベルの上昇を認めた。

CCN3 過剰発現マウスの解析

Tg マウスの関節軟骨は軟骨層の非薄化と表層の粗造な部位が観察されるとともに、aggrecan neo-epitope の集積を認めた。

健常成人と OA 患者での比較

大腿骨頭における CCN3 の免疫染色では、OA 群で関節軟骨表層に陽性細胞集積と基質にも染色性の高い領域を認めた。探知した軟骨細胞の遺伝子解析では、OA 群で OA 関連因子である p16 や ADAMTS5、Aggrecan 遺伝子発現レベルの上昇とともに、CCN3 遺伝子の発現上昇を認めた。また、同サンプルの Mankin score によって得られた組織学的変性度と、CCN3 遺伝子発現レベルには正の相関を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirose Kazuki, Kuwahara Miho, Nakata Eiji, Tetsunaga Tomonori, Yamada Kazuki, Saiga Kenta, Takigawa Masaharu, Ozaki Toshifumi, Kubota Satoshi, Hattori Takako	4. 巻 23
2. 論文標題 Elevated Expression of CCN3 in Articular Cartilage Induces Osteoarthritis in Hip Joints Irrespective of Age and Weight Bearing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 15311 ~ 15311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232315311	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Uchida-Fukuhara Yoko, Hattori Takako, Fu Shanqi, Kondo Sei, Kuwahara Miho, Fukuhara Daiki, Islam Md Monirul, Kataoka Kota, Ekuni Daisuke, Kubota Satoshi, Morita Manabu, Ikegame Mika, Okamura Hirohiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Maternal Gut Microbiome Decelerates Fetal Endochondral Bone Formation by Inducing Inflammatory Reaction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1000 ~ 1000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms10051000	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Murakami Asuka, Hara Tetsuya, Yamada-Kubota Chie, Kuwahara Miho, Ichikawa Tomoka, Minagi Shogo	4. 巻 66
2. 論文標題 Lack of occlusal support did not impact amyloid deposition in APP knock-in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Research	6. 最初と最後の頁 161 ~ 166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2186/jpr.JPR_D_20_00205	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Nagatsuka Hiroaki, Kawakami Shigehisa, Kuwahara Miho, Kubota Chie, Kodama Naoki, Minagi Shogo	4. 巻 66
2. 論文標題 Newly designed flat surface artificial tongue system for speech improvement in glossectomy patients: A preliminary study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Research	6. 最初と最後の頁 87 ~ 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2186/jpr.JPR_D_20_00230	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------