

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390474

研究課題名(和文)変形性顎関節症における関節潤滑能の改善と軟骨修復・再生の有用性

研究課題名(英文)Elucidation of condylar cartilage resorption mechanism in TMJ-osteoarthritis and search of a new regulatory factor.

研究代表者

丹根 一夫(TANNE, KAZUO)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・名誉教授

研究者番号：30159032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円、(間接経費) 3,630,000円

研究成果の概要(和文)：滑膜細胞において、HAがCD44受容体を介してSZP発現に重要な役割を与える事が明らかになった。また、過度な機械的負荷(CTS)は関節軟骨の炎症性サイトカインやマトリックスプロテアーゼ(MMP)を亢進させるが、選択的Cox-2阻害剤は軟骨障害により、誘導されたサイトカインに対しての有効性が報告されている。本研究により、下顎骨軟骨において、Cox-2選択的阻害剤(Celecoxib)はCTSにより誘導された炎症性サイトカインに対して保護する役割があることが示唆された。以上の結果はOsteoarthritis Cartilageに掲載された。

研究成果の概要(英文)：It is suggested that hyaronan(HA) affects superficial zone protein (SZP) expression through CD44 receptor. Interaction between SZP and HA in articular cartilage may be critical for proper lubricating function in the surface of articular cartilage.

In addition, High magnitude cyclic tensile strain (CTS) upregulates pro-inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases (MMPs) in chondrocytes, while selective cyclooxygenase (COX)-2 inhibition has been shown to be beneficial to cytokine-induced cartilage damage. Celecoxib exerts protective effects on mandibular condylar chondrocytes under CTS stimulation by diminishing degradation and restoring synthesis of ECM. This result is in preparation to be submitted in the Journal of Cell tissue Res and Osteoarthritis Cartilage.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：歯学、矯正・小児系歯学

キーワード：歯学 再生医学 細胞・組織 シグナル伝達 生理活性

1. 研究開始当初の背景

変形性顎関節症 (OA) は関節軟骨の破壊を初期病変とする退行性疾患で、治療が困難な疾患である。下顎頭の進行性吸収による関節機能障害に加えて、重篤な顎偏位や顔面変形が引き起こされ、矯正歯科治療をより複雑にすることになる。

OA の初期変化として、関節潤滑機能の低下が報告されている。我々は、顎関節表層に潤滑機能蛋白 superficial zone protein (SZP) が局在することを発見した (Ohno S, *et al.* *Osteoarthritis Cartilage* 14(8): 807-13, 2006)。また、過度な機械的負荷が SZP 産生を低下させ、摩擦係数を増加させるとともに (Kamiya T, *et al.* *J Biomed Mater Res A* 92(2): 801-5, 2010)、MMP-1, 3, 9 の産生を亢進させ、型コラーゲン、アグリカン、ヒアルロン酸 (HA) などの基質破壊をもたらす一連の OA 発症のメカニズムを明らかにした (Tanne K. *Jap Dent Sci Rev* 44: 38-47, 2008)。

その治療としては、現在ヒアルロン酸ナトリウム (NaHA) の関節腔内注射が初期の顎関節症において良好な成績を収めている。高分子 HA は、その物理学的特性に加え、基質ネットワークの要としてシグナル伝達を司り、構造維持にも大きく寄与している。その生物学的活性としては、抗炎症作用、プロテオグリカン合成促進、軟骨基質保護作用等が挙げられるが、未だ不明な点も多い。また、HA は潤滑機能蛋白 SZP の発現調節と相互作用により関節潤滑を担っているものと考えられるが、その関連性についてもまったく報告がない。さらに、炎症やそれに伴う HA の低分子化が SZP 産生に影響を及ぼし、さらなる潤滑機能の低下につながる事が推察されるが、この点についてもさらなる解明が待たれる。

顎関節内障や OA に対する治療法としては、過度な負荷を可及的に除去することが重要であると考えられる。そして、関節への直接的な治療としては、ヒアルロン酸の関節内注射も症状を緩和し、顎機能の改善する効果が報告されている。

また、関節疾患における炎症抑制や鎮痛に非ステロイド (NSAIDs) の経口投与の有効性が示唆されている。とりわけ、Cox-2 選択阻害剤である Celecoxib は、胃粘膜保護、腎機能維持、血小板凝集に関与する Cox-2 の産生を阻害する事なく、炎症や疼痛に関与する Cox-2 を選択的に阻害する事により、副作用の少ない薬剤として整形外科分野を中心に関節リウマチなどに適応されている。日本においても、商品名 (セレコックス錠) として 2007 年に認可された。OA においても、軟骨組織などに Cox-2 の発現が認められる。Cox-2 はプロスタグランジン E2 (PGE2) 誘導性の発現を誘導するため、Cox-2 選択的阻害

剤は、PGE2 による疼痛や炎症の抑制に働くことにより、症状の改善の効果が得られると考えられる。Cox-2 選択的阻害剤が関節軟骨における PGE2 の産生を抑制に働くことにより、PGE2 誘導性のマトリックスプロテアーゼ (MMPs) の産生を抑制し、軟骨基質破壊を、直接抑制する効果も推察される。しかしながら、顎関節への過剰な負荷による軟骨破壊機序において、Cox-2 選択阻害剤が有効であるか、これまで検討されていない。

一方、進行した OA では軟骨組織そのものが修復能力に乏しいため、関節腔内への NaHA 注入療法だけでは、損傷した関節軟骨組織の再生には至らない。下顎頭軟骨は線維層、軟骨層、軟骨下骨層に分けられるが、線維層の細胞のみが SZP を産生し、軟骨層、軟骨下骨層の軟骨細胞はこれを産生しないことより、OA 患者の下顎頭軟骨は潤滑能を有しておらず、ますます病変が進行することが推察させる。そのため、新たな治療法の確立が急務であり、再生療法の実現に向けた研究体制の整備が期待されている。

近年、損傷した関節軟骨組織に対しては、未分化間葉系幹細胞 (MSC) を用いた再生療法の確立が期待される。MSC を用いた再生療法の成否に関わる重要な因子として、純度が高く十分量の MSC の確保、細胞の滞留や分化機能の発現のための場の構築などが挙げられる。これまで我々の研究グループでは、MSC の抽出、増殖、および、組織再生の場を提供する HA を主成分とする担体の開発を行ってきた (Yoneno K, *et al.* *J Biomed Mater Res A* 75(3): 733-41, 2005)。

このような背景から、第 1 に初期の顎関節症やその進行予防を目的として、高分子 HA の軟骨基質合成や SZP 産生調節機構への関与の詳細を検討することにより、潤滑機能改善効果や限界を明らかにする。第 2 に、過度な負荷を与えた軟骨細胞の基質代謝に Cox-2 選択阻害剤が及ぼす影響について検討する。第 3 に、進行した OA に対し、MSC を用いた下顎頭軟骨再生療法の確立を目指した検討を行う。すなわち、現行の治療法の効果や選択基準を明確にしておき、その限界から新たな治療法を確立することが重要と考えられる。

OA は世界人口の約 2-3% に発症していると報告されている。我が国においても、ストレス社会を背景に、患者は増加傾向にある。また、吸収や変形を呈した軟骨を修復することは困難であり、再発の可能性も高いとされている。したがって、OA によって低下した関節潤滑・緩衝機能を回復させるとともに、破壊された軟骨の修復や再生を目指すことは、

学術的にも大きな意義を有するとともに、
歯科医学の進歩に大きく資するものと思われ
れる。

2. 研究の目的

本研究では、OA に着目し、滑液による
潤滑・緩衝機能の改善と損傷した軟骨の修
復・再生について検討するとともに、顎関
節の構造と機能の回復ならびに長期の安定
性の可否を明らかにすることを最終的な目
的とする。

3. 研究の方法

本研究では、我々の研究グループにおけ
るこれまでの一連の研究成果を統括し、HA
を用いた治療法の詳細と限界、ヒトでの実
用化を視野に入れた下顎頭軟骨の再生を含
む新規 OA 治療体系を構築することを目的
として、研究期間内に以下の点を明らかに
する。

- ・ 異なる分子量のHAが軟骨基質代謝に
及ぼす影響について

滑膜性関節の潤滑機能に対する滑液の
果たす役割は大きく、特に主要成分であ
るHA は高い保水性や粘弾性を有してい
ることから、関節潤滑に重要な因子と考
えられている。一方、近年、関節軟骨表
層に関節潤滑機能蛋白であるSZPが局在
し、境界潤滑に関与している可能性が示
唆された。しかしながら、顎関節におけ
るSZPの発現調節機構、および炎症やこ
れに伴うHAの低分子化との関連性につ
いては、未だ不明な点が多い。そこで、
HAとSZPの相互作用を検討し、関節潤滑
の詳細を明らかにすることとした。

- ・ 過度な負荷による顎関節軟骨破壊機
序に対するCox-2 選択阻害剤の影響

過度な負荷を与えた軟骨細胞の基質代
謝にCox-2 選択阻害剤が及ぼす影響を解
明するため、まず、下顎頭軟骨組織に対
する予り応力負荷のCox-2 発現への影響
について検討する。次に下顎頭由来培養
軟骨細胞に対する機械的負荷による
Cox-2 の誘導とMMP発現への影響を検
討した。さらに下顎頭由来培養軟骨細胞
に対する機械的負荷によるCox-2 の誘導
およびMMP発現に対するCox-2 選択的
阻害剤の影響の検討を行った。

- ・ 由来の異なる MSC を用いた下顎頭軟骨
各層の再生

下顎頭は表層から線維層、軟骨層、軟骨
下骨層に分けられ、それぞれが異なる機能
を發揮しながら、さまざまな下顎運動によ
り生じる機械的刺激に应答している。この

ことから、再生軟骨組織が明瞭な層状構造
を有していることは、各層固有の機能を発
揮できるという点においてきわめて重要と
考えられる。そこで、滑膜由来 MSC およ
び骨髄由来 MSC からそれぞれ線維層、軟
骨層、軟骨下骨層の細胞への分化誘導が可
能であるか明らかにする。

4. 研究成果

異なる分子量のHA が軟骨基質代謝に及
ぼす影響についての検討では、ヒト滑膜細
胞を播種し、コンフルエントに達するまで
培養した。まず、HA によるSZP 遺伝子の
発現シグナル経路を解析するため、HA 受
容体であるCD44 の遮断実験を行った。抗
CD44 中和抗体を添加し12時間後のRNA
を回収し、RT-PCR 解析を行った。また、
滑膜細胞における高分子HA(2700kDa)と
CD44 受容体の結合後のシグナル伝達経路
として推測されるERK、p38、JNK、NF B
経路について、それぞれWestern blot 法に
よる解析を行った。さらに、ERK による
SZP 遺伝子の発現調節を検討するため、
ERK 遮断薬を添加し12時間後のRNAを回
収し、RT-PCR 解析を行った。

顎関節症の初期変化としてHA の低分子
化が知られているが、HA の分解は細胞外
基質の三次元構造の破壊による脆弱化を引
き起こすとともに、低分子化されたHA により細胞の異化反応を促進させる。そこで、
滑膜細胞における低分子HA のSZP 遺伝子
発現への影響を検討するために、低分子
HA(25 ~ 75kDa)あるいはヒアルロニダーゼ
(以下HAase)を添加し12時間培養後、RNA
を回収し、RT-PCR 解析を行った。次に、
滑膜細胞にFlexercell Strain Unit[®]を用いて
15 kPa の過度な機械的伸張刺激を毎分30
サイクルで12時間与えた時の高分子HA 添
加がSZP 遺伝子発現に及ぼす影響について
検討した。

その結果、以下の所見が明らかになった

1. 滑膜細胞への高分子HA 添加により、
SZP 遺伝子発現は増加傾向を示すことが
RT-PCR 解析により示唆された。また、高
分子HA 添加はERK 経路を活性化させるこ
とがWestern blot 解析により認められた。
さらに、抗CD44 中和抗体添加により、SZP
遺伝子発現は対照群に比べて有意に低下す
ることが明らかとなった。また、ERK 遮断
薬添加により、SZP 遺伝子発現は対照群に
比べて有意に低下した。抗CD44 中和抗体
とERK 遮断薬の同時添加時では、さらなる
SZP 遺伝子発現の低下は認められなかった。

2. 滑膜細胞への低分子HA 添加により、
SZP 遺伝子発現は有意に低下することが
RT-PCR 解析により明らかとなった。また、
ヒアルロニダーゼ(以下HAase) 添加時に
おいても、SZP 遺伝子発現は濃度依存的に
有意に低下した。さらに、HAase 処理後の
高分子HA 添加は、SZP 遺伝子発現を有意
に増加させた。

3. 滑膜細胞への過度な機械的伸張刺激負荷は、炎症性サイトカインおよび基質分解酵素の発現を上昇させるとともに、SZP 遺伝子発現を低下させることが明らかとなった。機械的伸張刺激負荷時の高分子 HA 添加は、SZP 遺伝子発現を有意に増加させた。また、高分子 HA 合成酵素は増加し、低分子 HA 合成酵素は減少することも示された。

過度な負荷による顎関節軟骨破壊機序に対する Cox-2 選択的阻害剤の影響についての検討では、まずブタ顎関節を用いて、関節軟骨表面に、圧縮負荷を加えながら、反復運動させることにより、ずり応力を負荷した。その後、顎関節の負荷前後の軟骨層の組織切片を作製し、IL-1 および Cox-2 の免疫染色を行った。ずり応力負荷することにより、下顎軟骨表層部の IL-1、Cox-2 の増加される所見を認めた。またずり応力負荷前後の軟骨細胞を回収し、IL-1 および Cox-2 の遺伝子発現を行った。その結果、ずり応力負荷により、IL-1 および Cox-2 の遺伝子発現が有意に亢進された。

次に、下顎頭由来軟骨細胞を用いて過度な機械的負荷による Cox-2 誘導を検討した。ブタ由来下顎軟骨細胞を単離・培養し、Flexercell Strain Unit[®]を用いて軟骨細胞に 15 kPa の伸張刺激を負荷し、Cox-2 および MMP-1,3,9 の遺伝子発現を定量 PCR 解析を行うとともに、ウエスタンブロット解析を行った。さらに、カゼインザイモグラフィによる MMP 活性の変化についても検討した。過度な機械的伸張刺激により、Cox-2 および MMP-1,3,9 の遺伝子発現が有意に亢進した。また、ウエスタンブロットおよびカゼインザイモグラフィによる解析でも、過度な機械的伸張刺激により、Cox-2 および MMP-1,3,9 発現が増加した。

また、合成阻害剤であるシクロヘキシミド存在下において、軟骨細胞に、Flexercell Strain Unit[®]を用いて機械的刺激を付与し、Cox-2、MMP-1,3,9 の遺伝子発現の変化を検討した。機械的刺激負荷 6 時間後の Cox-2、MMP-1,3,9 遺伝子は有意に亢進された。そして、機械的刺激受容体による直接的な Cox-2 の誘導および MMP 発現に対する Cox-2 選択的阻害剤の影響の検討では、Cox-2 選択的阻害剤である Celecoxib は、機械的刺激受容体による直接的な Cox-2 の誘導および MMP 発現を有意に抑制した。

由来の異なる MSC を用いた下顎頭軟骨各層の再生に関する実験は、下顎頭軟骨各層に分離・単離を行った。現在、各層における細胞の同定を行っている。そして、滑膜由来 MSC および骨髄由来 MSC からそれぞれ線維層、軟骨層、軟骨下骨層の細胞への分化誘導の可能性については、現在、模索中である。

以上の結果より、高分子 HA が CD44 と結合し、ERK を介して SZP 遺伝子発現を調

節することが示唆された。また、HA の分子量の違いにより SZP 遺伝子発現に対する影響が異なることが示された。さらに、過度な機械的伸張刺激負荷時の高分子 HA 添加は、SZP 遺伝子発現を増加させ、関節潤滑機能を改善させることが明らかとなった。本研究により、滑膜細胞における SZP 発現に対する高分子 HA の CD44 を介した亢進作用が明らかとなり、OA の発症過程における関節潤滑機能の調節機構の重要性が示唆された。また、顎関節へのずり応力を主体とした過剰な機械的な負荷が、軟骨層破壊に至る機序の一つとして、Cox-2 を介した経路も明確となった。Cox-2 選択的阻害剤 (Celecoxib) を顎関節症に応用した際の軟骨基質代謝への影響が明らかとなり、その有効性が示唆された。

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 4 件)

1. Su SC, Tanimoto K, Tanne Y, Kunimatsu R, Hirose N, Mitsuyoshi T, Okamoto Y, Tanne K, Celecoxib exerts protective effects on extracellular matrix metabolism of mandibular condylar chondrocytes under excessive mechanical stress. Osteoarthritis Cartilage. 2014; in press doi:10.1016/j.joca.2014.03.011(査読有).
2. Yanagida-Suekawa T, Tanimoto K, Tanne Y, Mitsuyoshi T, Hirose N, Su SC, Tanne K, Tanaka E., Synthesis of hyaluronan and superficial zone protein in synovial membrane cells modulated by fluid flow. Eur J Oral Sci. 2013 ;121(6):566-72, doi: 10.1111/eos.12082(査読有).
3. Tanne K, Papagerakis P, Papaccio G, Kitamura C, Tanimoto K., Tissue regeneration in dentistry. International Journal of Dentistry. 2011, doi: 10.1155/2012/586701 (査読有).
4. Tanimoto K, Kamiya T, Tanne Y, Kunimatsu R, Mitsuyoshi T, Tanaka E, Tanne K., Superficial zone protein affects boundary lubrication on surface of mandibular condylar cartilage. Cell tissue Res. 2011; 344: 333-340, doi:10.1007/s00441-011-1156-z (査読有).

[学会発表](計 6 件)

1. 岡本 友希, 谷本 幸太郎, 丹根 由起, 白倉 麻耶, 廣瀬 尚人, 光吉 智美, 蘇 少卿, 丹根 一夫. ラット変形性顎関節症モデルにおけるメカノレセプターと炎症性メディエーターの発現について. 第 26 回日本顎関節学会総会(東京). 2013/7/20-7/21.
2. Su SC, Tanimoto K, Tanne Y, Kunimatsu R, Hirose N, Mitsuyoshi T, Okamoto Y, Tanne K., Effect of Celecoxib on extracellular matrix metabolism in condylar chondrocyte

under excessive mechanical stress. The 26th Annual Meeting of the Japanese Society for the temporomandibular joint. (Tokyo) 2013/7/20-7/21

3. Mitsuyoshi T, Tanimoto K, Tanne Y, Hirose N, Okamoto Y, Tanne K., Modulation of PRG4 expression by hyaluronan through CD44 receptor and ERK. The 113th Annual Session of American of Orthodontics. (Philadelphia, USA) 2013/5/3-5/7.

4. Su SC, Tanimoto K, Tanne Y, Kunimatsu R, Hirose N, Mitsuyoshi T, Okamoto Y, Tanne K., Effects of Cox-2 inhibitor on the metabolism of extracellular matrix in stressed TMJ chondrocyte. The 45th Scientific Congress of Korean Association of Orthodontists 4th Joint Symposium of KAO and JOS. (Seoul, Korea) 2012/12/15.

5. Tanne K. Current status of TMD. 8th Asian Pacific Orthodontic Conference 47th Indian Orthodontic Conference. (New Delhi, India) 2012/12/2.

6. 光吉 智美, 谷本 幸太郎, 丹根 由起, 廣瀬 尚人, 鷺見 圭輔, 蘇 少卿, 栗田 哲也, 丹根 一夫. ヒアルロン酸および Superficial zone protein が関節潤滑に及ぼす影響. 第 25 回日本顎関節学会・学術大会. (札幌) 2012/7/14-15.

〔図書〕(計 1 件)

丹根 一夫. 矯正と TMD との関連を理解する。別冊 Quintessence TMD YEAR BOOK 2011 (クインテッセンス出版); 2011, 38-39.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/orthod/reruit/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹根 一夫・(TANNE, kazuo)

(広島大学・医歯薬保健学研究院・名誉教授)
研究者番号：30159032

(2) 研究分担者

谷本 幸太郎・(TANIMOTO, koutaro)

(広島大学・医歯薬保健学研究院・教授)
研究者番号：20322240

研究分担者

本川 雅英・(MOTOKAWA, masahide)

(広島大学・病院・助教)
研究者番号：90457268

研究分担者

丹根 由起・(TANNE, yuki)

(広島大学・医歯薬保健学研究院・助教)
研究者番号：50526241

國松 亮・(KUNIMATSU, ryo) (広島大学
・医歯薬保健学研究院・助教)

研究者番号：40580915

廣瀬 尚人・(HIROSE, naoto)

(広島大学・医歯薬保健学研究院・助教)
研究者番号：50611935

(3) 連携研究者

()

研究者番号：