

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：33303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659838

研究課題名(和文) おとり遺伝子を用いた変形性関節症への新規遺伝子治療法の応用

研究課題名(英文) Newky gene therapy using decoy system for degenerative arthritis

研究代表者

石橋 浩晃 (ISHIBASHI, Hiroaki)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90254630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：顎関節における未分化間葉系細胞を用いてEGFにより促進された細胞遊走が、抗uPA抗体や、合成uPA阻害剤によって抑制された。EGFはまた、uPAやuPARレセプター(uPAR)を蛋白発現とmRNAの発現、同様に、転写因子activator protein-1(AP-1)の転写活性を増大させた。これらはデキサメサゾン(DEX)で処理することにより抑制された。細胞遊走におけるEGFとDEXの相反効果は、転写因子AP-1の介在する事が示唆された。DEXは、uPAやuPARの発現を抑制し、このuPAとuPARの相互作用は、顎関節における変形性関節症に対し有効的な治療になりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Human TMJ cells were isolated and cultured from surgically resected mandibular condyles, and were transfected with either NF- κ B decoy, which are constituted of synthetic double stranded oligodeoxynucleotide (17bp) including consensus sequence of NF- κ B binding site (7bp), or mutant type decoy using the HVJ (hemagglutinating virus of Japan)-liposome method. Transfected and non-transfected cells were stimulated by TNF- α (-100ng/ml) and examined for uPA and MMP-1 mRNAs and protein expression by a Northern blot analysis and ELISA. The expression of uPA and MMP-1 mRNAs of TMJ cells was enhanced by TNF- α stimulation in a dose dependent manner. While uPA and MMP-1 mRNAs and protein expression by cultured cells were not affected by the treatment with either HVJ-liposome containing mutant type decoy or empty one, transfection of wild type decoy decreased uPA and MMP-1 mRNAs expression to 30% and proteins to about 40% as compared with non-transfected and TNF- α stimulated cells.

研究分野：口腔外科学

キーワード：変形性関節症 細胞外基質 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

顎関節における未分化間葉系細胞は、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (uPA) やプラスミン、コラゲナーゼファミリーの一つであるメタロプロテアーゼ (MMP) などに代表される細胞外プロテアーゼによって、細胞外基質を分解することが知られている。本研究で、我々は、顎関節における未分化間葉系細胞を上皮成長因子 (epidermal growth factor: EGF) で処理すると、再構成基底膜成分であるマトリゲルへの細胞遊走が促進されことを確認した。そして EGF によって促進された細胞遊走は、抗 uPA 抗体や、合成 uPA 阻害剤によって抑制された。EGF はまた、uPA や uPA レセプター (uPAR) を蛋白発現と mRNA の発現、同様に、転写因子 activator protein-1 (AP-1) の転写活性を増大させた。これらの、EGF により誘導された変化は、デキサメサゾン (DEX) で処理することにより抑制された。DEX はまた、プラスミノゲンアクチベーター・インヒビター-1 (PAI-1) の産生を促進した。以上の結果から、顎関節における未分化間葉系細胞は主に uPA-プラスミンカスケードを介してマトリゲルに浸潤し、細胞遊走における EGF と DEX の相反効果の大部分は、転写

因子 AP-1 の介在に寄与するものであることが示唆された。DEX は、uPA や uPAR の発現を抑制し、この uPA と uPAR の相互作用は、最終的に細胞遊走や浸潤を誘導する、細胞外基質分解作用の活性化や uPAR に関するシグナル伝達に必要と考えられるため、顎関節における変形性関節症に対し有効的な治療になりうる可能性が示唆された。

また、本研究では AP-1 抑制による顎関節における未分化間葉系細胞の細胞遊走の制御を目的とする別の方法として、デコイ遺伝子を SCC に導入した。その結果、uPA および uPAR の発現はデコイ遺伝子導入により抑制され、顎関節における未分化間葉系細胞の浸潤能も低下させることを明らかにした。この AP-1 を標的としたデコイシステムや DEX は、顎関節における未分化間葉系細胞の基質破壊酵素産生の抑制を標的とした新規の治療法となりうることが示唆された。

2. 研究の目的

顎関節における未分化間葉系細胞の細胞遊走や周囲の基質破壊酵素には、プラスミノゲンアクチベーター (PA), プラスミンや、コラゲナーゼの一つであるメタロプロテアーゼ (MMP) ファミリーを含む、細

胞外プロテアーゼによって BM や ECM を分解することが知られている。実際、ウロキナーゼ型 PA (uPA), MMP-1, MMP-2 や MMP-9, などのプロテアーゼが SCC 組織の浸潤先端部に高発現していることが明らかにされている。顎関節における未分化間葉系細胞でプロテアーゼ活性が高い1つの機構として uPA-プラスミンカスケードがある。このカスケードは、顎関節における未分化間葉系細胞の細胞表面に発現する uPAR に高い親和性をもつ uPA によって発起される。細胞表面の uPA は、不活性型の前酵素であるプラスミノゲンを活性型のセリンプロテアーゼであるプラスミンに変換し、このプラスミンはフィブロネクチン、ラミニンや他の非コラーゲン性の ECM 蛋白を直接的に分解し、一方で潜在型のコラゲナーゼを活性化する働きも持っている。顎関節における未分化間葉系細胞は、uPA 産生に加えて uPA の阻害作用を有する PAI-1 の産生にも関与し、両者の相互作用により、細胞の微小環境において PA 活性の調節を行っている。このように、顎関節における未分化間葉系細胞の ECM 分解活性は、顎関節における未分化間葉系細胞が産生する蛋白分解酵素とその阻害因子によって調節されていると思われる。

生体において、細胞増殖因子やサイトカインは、細胞接着や ECM 分解酵素の産生、細胞の運動性を変化させることで、癌の浸潤性を調節していると思われる。前述のごとく、顎関節における未分化間葉系細胞が EGFR を高発現し多量の EGF が存在することから、本研究では顎関節における未分化間葉系細胞の基質破壊酵素産生に及ぼす EGF の影響について、基底膜浸潤の1つのモデルであるマトリゲルを用いた遊走実験により検討した。その結果、EGF が顎関節における未分化間葉系細胞の uPA や uPAR の発現を促進することによりマトリゲルへの遊走を増強することが示された。さらに EGF による上記の促進作用はデキサメサゾン (DEX) により抑制され、EGF と DEX の相反する効果の大部分は転写因子 activator protein-1 (AP-1) の活性化によって調節されていることが示された。そこで、AP-1 のプロモータ領域に結合する二本鎖オリゴヌクレオチド (AP-1 デコイ) を Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) を用いた HVJ-リポソーム法により細胞にトランスフェクションし

たところ,EGF による uPA ,uPAR の発現やマトリゲルへの浸潤の促進作用は著しく抑制された。以上の結果は, AP-1 を標的とした DEX や AP-1 デコイが,顎関節における基質破壊酵素抑制療法になる可能性を示唆したものである。

3.研究の方法

顎関節における未分化間葉系細胞の遊走には種々の機構が複雑に関与していると思われるが,少なくとも細胞接着,細胞遊走,細胞外基質分解の3つのステップが必要なことが示唆されている。本研究では,基底膜浸潤を想定したマトリゲルによる in vitro 遊走モデルの実験系を用いた。この系において EGF により促進された細胞遊走は,抗 uPA 抗体やアミロライド, EACA により強く抑制された。アミロライドは,uPA の酵素活性をブロックし,同様に細胞表面において uPA が関与する様々な ECM 分解もブロックするが,tPA (tissue type PA; 組織型 PA) の活性は阻害しないことが報告されている。EACA はフィブリンへの結合の際に必要なプラスミノーゲンのリジン結合部位をブロックすることが報告されている。以上のことから,本実験のマトリゲルへの遊走に uPA-プラスミン系が強く関与していると思われた。

事実,EGF は uPA や uPAR の発現を促進した。なお,外因的に uPA を添加しても,遊走を促進することはなかった。これらの結果から,本システムでは,顎関節における未分化間葉系細胞のマトリゲルへの遊走には,内因性の uPA と uPAR の発現が必要であることが示唆された。細胞表面での uPA と uPAR の相互作用は,プラスミノーゲンの活性化や,uPAR を介したシグナル伝達に重要な役割を果たしていることが報告されている。また本研究の結果は,顎関節における未分化間葉系細胞において uPA 産生や ECM 分解への EGF の増強効果について研究された他の報告と一致していた。

4.研究成果

uPA と uPAR の相互作用およびそれらの調節している AP-1 は,顎関節における変形性関節症の分子標的になりうることを示唆した。DEX や AP-1 デコイは,uPA と uPAR の両者の発現を抑制し,遊走を抑制することから,関節症の有効的な治療になりうる可能性が示唆された。

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2件)

1) Ishibashi H, Onimaru M, Sueishi K, Antisense transfection against tissue factor inhibits VIIa-induced oral squamous cell carcinoma cells invasion

by suppression of urokinase type plasminogen activator receptor、Oral Oncol. (in process)

2) Ishibashi H、Nariai Y、Kanno T、Onimaru M、Sekine J. Effects of transforming growth factor on the plasminogen activation system, collagen synthesis, and proliferation of rabbit mandibular conylar chondrocytes、Int J Oral Maxillofac Surg. 43:321-339,2014.

〔学会発表〕(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

石橋 浩晃 (ISHIBASHI, Hiroaki)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90254630