

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792285

研究課題名(和文)変形性顎関節症におけるHIF-1とBMP-2の役割

研究課題名(英文)The role of HIF-1 and BMP-2 in Temporomandibular joint osteoarthritis.

研究代表者

白倉 麻耶 (Shirakura, Maya)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・助教

研究者番号：70549013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：変形性顎関節症は軟骨と軟骨下骨に変性が起こる複合型の疾患である。これまでの報告で細胞外マトリクスの欠失が変形性顎関節症と関連していることが報告されており、また、BMP-2が影響する可能性が示唆されている。そこで今回、変形性顎関節症の動物モデルとして細胞外マトリクスのうちbiglycanおよびfibromodulinの欠損マウスを用い、器官培養にてBMP-2の影響を検討した。その結果、BMP-2は骨・軟骨両方の形成系、破壊系両遺伝子を亢進し、顎関節のターンオーバーを促進していることが示唆された。また、biglycanおよびfibromodulinはこれらを調節する作用を持つことが示された。

研究成果の概要(英文)：Temporomandibular joint osteoarthritis (TMJ-OA) is a complex disease that affects both cartilage and subchondral bone. It is accompanied by loss of extracellular matrix (ECM) and may be affected by Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2). We analyzed the effect of BMP-2 in both cartilage and subchondral bone in a TMJ-OA animal model that is deficient in biglycan and fibromodulin (DKO) using an explant culture system. As a result, the upregulation of both anabolic and catabolic genes in the WT and DKO TMJs treated with BMP-2 suggests that BMP-2 increases matrix turnover in the condyle and, further, that Bgn/Fmod could have protective roles in regulating this process.

研究分野：細胞生物学

キーワード：軟骨 骨 代謝 低酸素 機械刺激

1. 研究開始当初の背景

Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) は低酸素下で発現する転写因子であり、がんや心疾患などの身近な疾患の発症・進行に重要な働きをしていることが報告されている。変形性顎関節症は多因子的な要素が強い疾患で、その原因は未だ解明されていない。近年、変形性顎関節症において低酸素下で活性化する転写因子 Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) が関与している可能性が示唆された。一方、申請者らの研究により、機械刺激が HIF-1 経路を介して骨の形成や破骨細胞の活性化に関連の深い bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) の過剰発現を誘導する可能性が示唆された。

The 59th Japanese Association for Dental Research(Hiroshima), Shirakura M, Mechanisms of hypoxia-inducible factor-1 α in cartilage degradation by mechanical stress. 2011 年、広島

2. 研究の目的

本研究では、特に変形性顎関節症における骨・軟骨部位での HIF-1 α と骨の形成に関連深い BMP-2 に注目し、変形性顎関節症の発症・進行における機械刺激および BMP-2 の関与とその相互の関係ならびに詳細な機序を明らかにすることにより、変形性顎関節症の発症機序の一部を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 野生型 (WT) のマウスの下顎骨を摘出し、器官培養を行った。その際、培養液に BMP-2 を添加し、BMP-2 の下顎頭軟骨部ならびに軟骨下骨への影響を micro CT ならびに組織学的・分子生物学的に検討を行った。

さらに、変形性顎関節症モデルとして細胞外マトリクス biglycan および fibromodulin をダブルノックアウト (DKO) したマウスを用い、同様の実験を行い変形性顎関節症に対する BMP-2 の影響を検討した。

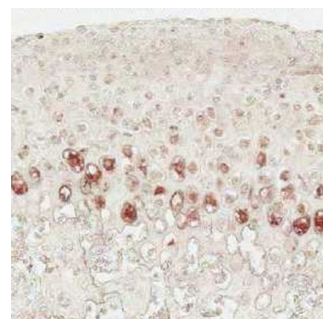
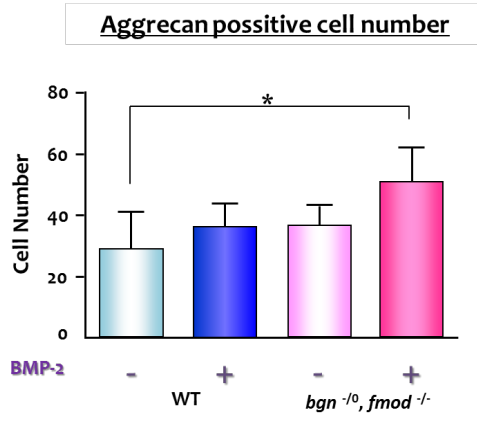
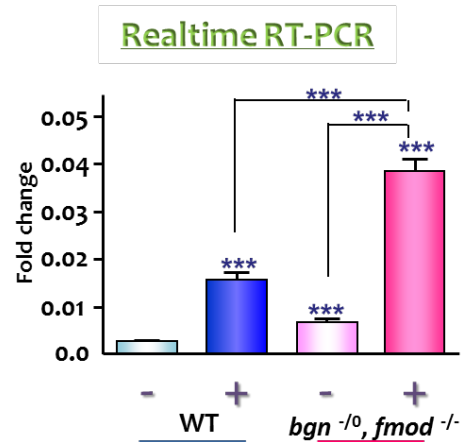


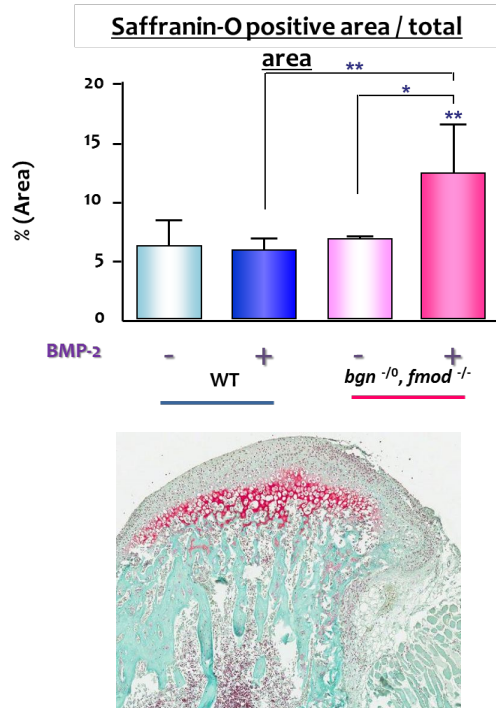
2) 機械刺激と HIF-1 の関連を調べるためさまざまな細胞 HepG2 (肝がん), BT-20 (乳がん), KOSC2 (口腔がん) を 6well プレートに播種・培養し、細胞を遠心分離器に搭載して様々な過重負荷環境 G (Gravity) を加え HIF-1 関連遺伝子ならびにタンパクの発現を

検討した。

4. 研究成果

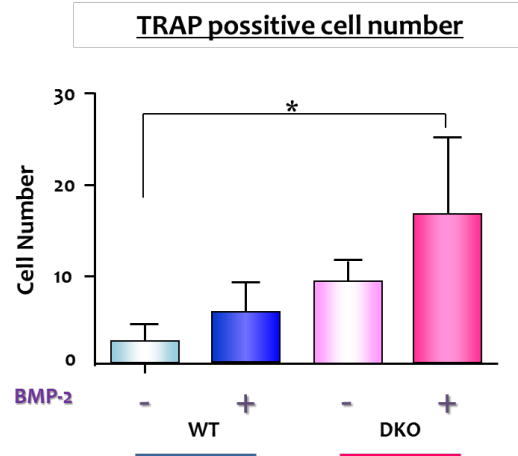
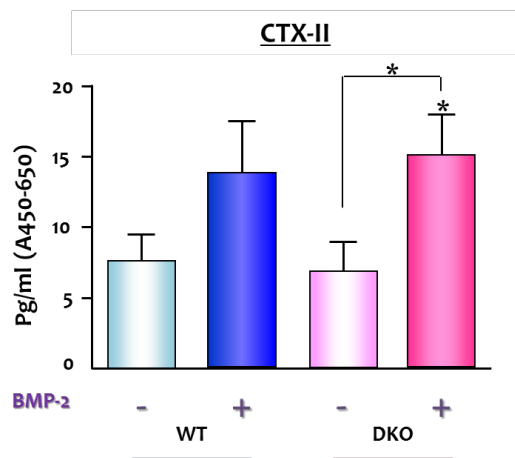
1) 軟骨の主要なプロテオグリカンであるアグリカンは、機械的刺激に対する緩衝剤として軟骨を保護することが知られており、アグリカンの喪失が関節炎を惹起することが報告されている。このアグリカンの有無を確認するためにリアルタイム RT-PCR、免疫組織染色ならびに Safranin-O 染色を行った。その結果、アグリカンの遺伝子発現が WT / DKO 両マウスの BMP-2 添加群で優位に増加し、特に DKO にその傾向を強く認めた。さらに、免疫組織染色でも陽性細胞数が同様に DKO マウスの BMP-2 添加群で優位に増加した。また Safranin-O 染色でも DKO マウスに BMP-2 を添加したものでアグリカンの染色面積が増加し、biglycan および fibromodulin の欠損により下顎頭軟骨の BMP-2 感受性が増加しアグリカンの産生が増加した可能性が示唆された。





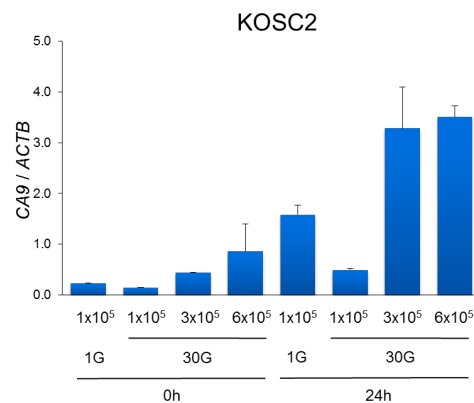
またリアルタイム RT-PCR で骨・軟骨の形成に関する遺伝子の発現を検討したところ、アグリカンと同様に WT / DKO 両マウスの BMP-2 添加群で優位に増加し、特に DKO にその傾向を強く認めた。

次に、軟骨が分解されるときに放出される Type II Collagen Fragment の培養液内の量を、ELISA を用いて確認したところ、DKO マウスに BMP-2 を添加したもので増加する傾向を認めた。さらに、TRAP 染色にて破骨細胞の数を比較し、骨・軟骨の代謝に関連する遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR にて検討したところ、アグリカンと同様にそれぞれで DKO マウスに BMP-2 を添加したもので優位に発現が増加しており、biglycan および fibromodulin の欠損により下顎頭軟骨の BMP-2 感受性が増加し骨・軟骨の形成だけでなく破壊・分解にも強く影響している可能性が示唆された。



2) 乳がん細胞 BT-20 および口腔がん細胞 KOSC2 を 6well プレートに播種し 24h または 48h 後に TOMY LC-100 にて遠心, 過重負荷 (400rpm = 30G) を 1h 加えた。遠心直後 (0h) または 24 通常培養後 (24h) の CA9 遺伝子発現解析をリアルタイム RT-PCR にて行った。その結果、両細胞において、過重負荷による CA9 発現増加が観察された。

そこで、同様に様々な細胞数の口腔がん細胞 KOSC2 を 6well プレートに播種し 24h 後に TOMY LC-100 にて遠心, 過重負荷 (400rpm = 30G) を 1h 加え、遠心直後 (0h) または 24 通常培養後 (24h) の CA9 遺伝子発現解析をリアルタイム RT-PCR にて行った。その結果、細胞数依存的な過重負荷による CA9 発現増加が観察された。しかしながら、負荷無しでも細胞密度の増加による遺伝子発現誘導が観察され、密度飽和による発現飽和も認められたことから、機会刺激による HIF-1 α の発現には組織の密度が関係する可能性が示唆された。



以上の結果をまとめると、1) の結果、変形性顎関節症の進行に BMP-2 が関与しておりこれは細胞外マトリクスの有無が大きく影響する可能性が示された。さらに 2) より機械刺激による HIF-1 の活性化が細胞密度に

影響を受ける可能性が示された。これまでの報告にある細胞外マトリクス欠損マウスが変形性顎関節症の組織変化を示すこと、また、これら 1) 2) の結果から、変形性顎関節症の発症・進行に、HIF-1 や BMP-2 が関係し、これらが影響する環境要因として細胞密度や機械刺激が関連す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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Shirakura M, Regulation of hypoxia-inducible factor-1 signals by mechanical stress, The 5th International Symposium of RIRBM, 2015 年 3 月 2,3 日, 広島

2. 白倉 麻耶, メカニカルストレスによる HIF シグナル制御, 第 12 回 がんとハイポキシア研究会, 2014 年 11 月 21,22 日, 佐賀

3. Shirakura M, BMP-2 effects on Chondrogenesis and Extracellular Matrix Turnover in Temporomandibular Joint Osteoarthritis, 43rd Annual Meeting & Exhibition of the AADR/38th Annual Meeting of the CADR, 2014 年 3 月 14-22 日, North Carolina, USA

4. Shirakura M, Effect of altered functional loading in a genetic model of Tempolomundibular joint-osteoarthritis, 2013 NIDCR Fellows Retreat, 2013 年 4 月 17-18 日, Maryland, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔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：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

白倉 麻耶 (Maya Shirakura)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：70549013

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：