

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890140

研究課題名(和文) 潤滑機能蛋白SZPの発現調節機構の解明と顎関節症に対する新規治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic agents for temporomandibular joint disease and elucidation of expression control mechanism of lubricating function protein SZP

研究代表者

光吉 智美 (Mitsuyoshi, Tomomi)

広島大学・大学病院・歯科診療医

研究者番号：00633687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円、(間接経費) 570,000円

研究成果の概要(和文)：関節症および歯科領域における顎関節症に対して、治療薬として最適なヒアルロン酸の分子量と濃度を特定し、さらに関節内に存在する潤滑機能蛋白Superficial zone protein(SZP)を関節治療の新規治療薬として応用する目的で、関節内に存在する蛋白SZPが関節潤滑機能の向上に及ぼす影響を解明し、関節症および歯科領域における顎関節症に対するSZPの新規治療薬としての有用性を検討した。

研究成果の概要(英文)：It was shown that HA formulations were effective for SZP expression and joint lubrication and providing a protective barrier for the cells in the deep zone of cartilage in early OA. Moreover, it was suggested that HA affects SZP expression. Interaction between SZP and HA in articular cartilage may be critical for proper lubricating function on the surface of articular cartilage.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：医歯薬学・矯正・小児系歯学

キーワード：潤滑 ヒアルロン酸 顎関節症 SZP

1. 研究開始当初の背景

関節の潤滑機能は、高い潤滑機能を有する蛋白 SZP による境界潤滑と、滑液の主要成分で高い保水性および粘弾性を有するヒアルロン酸 (hyaluronic acid; HA) による流体潤滑の二つの潤滑様式が複合した混合潤滑によりなる。SZP は正常状態で分子量 345 kDa、濃度 0.05~0.5 mg/ml のプロテオグリカンで、1404 個のアミノ酸から構成されている。関節軟骨表層や滑膜に存在し、細胞増殖、細胞保護作用、細胞外基質との結合など外的因子からの刺激を防御する多くの生物学的機能を有している (Flannery *et al.*, 1999)。また、炎症条件下ではその発現は低下し (Young *et al.*, 2006)、SZP の消失は摩擦係数を増加させ (Chan *et al.*, 2010)、関節の潤滑機能の低下を引き起こすことが報告されている (Chawla *et al.*, 2010)。このように、SZP は正常な関節機能と恒常性の維持に重要な役割を担っていると推察される。顎関節症の初期変化として、関節潤滑機能の低下が報告されている。我々は、これまでの検討により SZP が下顎頭軟骨表層において高発現すること (Ohno *et al.*, 2006)、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こと (Kamiya *et al.*, 2010)、また、SZP は下顎頭軟骨の表層において境界潤滑に関与すること (Tanimoto *et al.*, 2011) を明らかとしてきたが未だ不明な点が多く、SZP の潤滑に関する明確な報告はほとんどない。

SZP の突然変異によって発症する CACP 症候群は、常染色体劣性遺伝で家族性があり、関節症、屈指症、内反股奇形、心膜炎を主症状とする。SZP は、複数の Homopexin 様ドメイン構造と中央に多くの Mucin 様ドメイン構造を有しており、それぞれの部分が境界潤滑機能に関与していると考えられているが、CACP 症候群に関する国内外における報告はわずかであるこ

とから、詳細についてはまったく明らかにされていない。CACP 患者における変異の多くが Homopexin 様ドメイン構造内に認められることから (Sulman *et al.*, 2011)、本研究では、正常型 SZP および、Homopexin 様ドメイン構造が欠如した変異型 SZP を精製し、ブタ顎関節に投与することで、それぞれの潤滑機能に対する効果を定量評価し、比較検討する。これにより、SZP の構造のどの部位が潤滑に関与しているかを明らかにすることを目的とした。

一方、関節症や顎関節症の治療のひとつに、高分子 HA 製剤の関節内注入療法が挙げられる。HA は安全性が高く、優れた物理化学的特性および生物活性を有しているが、関節潤滑機能に対する HA の影響について詳細は不明である。関節症治療で使用される HA は、高分子過ぎると粘性が高いため関節への注入が困難であり、逆に低分子過ぎると為害性あるいは効果が減弱してしまうと考えられている。そのため、顎関節症に対して HA を治療薬として用いる場合には、HA が顎関節の機能を最適化するための条件を検討する必要があり、本研究では潤滑機能改善に最適な HA の分子量と濃度を特定することとした。我々はこれまでに、培養ヒト滑膜細胞、軟骨細胞に対し、炎症状態を想定した条件において高分子 HA の添加が SZP の産生を亢進させることをすでに明らかにしている。また、HA と SZP は複合体を作り関節潤滑機能に関与するとの報告もあり (J.J.Kwiecinski *et al.*, 2011)、HA と SZP は何らかの相互作用を持ちながら関節潤滑を担っているものと考えられる。すなわち、関節に過剰な負荷が生じることで滑液中の HA による流体潤滑や緩衝機能が低下している場合には、SZP が中心となって関節表面の境界潤滑機能を維持することで剪断応力を軽減し、軟骨組織の損傷を抑制すると考えられる。

本研究では、これまで臨床で行われてきた顎関節内への高分子 HA 投与を応用し、独自の潤滑機能測定装置を用いた動物実験で、HA だけでなく精製した SZP も顎関節内へ投与することで、潤滑機能の向上に対する相乗効果を期待した治療法を目指すところに独創性があり、臨床応用も視野に入れた重大な成果が得られると考えられる。さらに、臨床において、変形性顎関節症による下顎頭の吸収は顎偏位による顔面の非対称や、下顎骨の後退による著しい開咬および上顎前突を呈することが多く、その場合上下顎骨の骨切り術を併用した矯正歯科治療の適応になることも多いため、患者に対して多大な負担となっている。したがって顎関節症の治療薬または進行抑制の治療法を確立することは、臨床的に極めて重要であると考えられる。また SZP は膝関節など顎関節以外の関節でも存在が報告されており、SZP の機能の解明は歯科医学のみならず様々な医療の進歩に大きな貢献を果たすものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、関節内に存在するタンパク superficial zone protein (SZP) が関節潤滑機能の向上に及ぼす影響を解明し、Camptodactyly-arthropathy-coxa-vara-pericarditis (CACV) 症候群をはじめとした関節症、および歯科領域における顎関節症に対する SZP の新規治療薬としての有用性を検討することを目的としている。さらに、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

顎関節症の治療法のひとつとして高分子 HA の顎関節内投与が行われているが、治療に最適に HA の条件は、現在のところ明確にされていない。また、潤滑機能における HA と SZP の関係性を明らかとするために、培養ヒト滑膜細胞に対して、高分子 HA、中分子 HA、低分子 HA および HAase を添加した場合の SZP の発現調節機構の変化を、現有の定量 PCR 解析機器(Light cycler 350s)および近赤外蛍光イメージャー(Odyssey)を用いて、遺伝子およびタンパクレベルで定量解析した。

また、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。

4. 研究成果

1. 培養ヒト滑膜細胞への様々な分子量の高分子HA存在下におけるSZP発現調節機構について検討したところ、SZP発現亢進に最適な条件のHAを概ね同定することが出来た。

2. 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。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。

3. 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。以上の結果より、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。

4. 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。以上の結果より、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。

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. Shao-Ching Su, Kotaro Tanimoto, Yuki Tanne, Ryo Kunimatsu, Naoto Hirose, Tomomi Mitsuyoshi, Yuki Okamoto, Kazuo Tanne. Celecoxib exerts protective effects on extracellular matrix metabolism of mandibular condylar chondrocytes under excessive mechanical stress. Osteoarthritis Cartilage. 2014; in press.

2. Tamami Yanagida-Suekawa, Kotaro Tanimoto, Yuki Tanne, Tomomi Mitsuyoshi, Naoto Hirose, Shaoching Su, Kazuo Tanne and Eiji Tanaka, Synthesis of hyaluronan and superficial zone protein in synovial membrane cells modulated by fluid flow. Eur J Oral Sci. 2013 ;121(6):566-72.

{学会発表}(計4件)

1. Mitsuyoshi T et al., Modulation of PRG4 expression by hyaluronan through CD44 receptor and ERK. The 113th Annual Session of American of Orthodontics. philadelphia (America) 2013/5/3-5/7.

2. Tanne K. Current status of TMD. 8th

Asian Pacific Orthodontic Conference
47th Indian Orthodontic Conference.
New Delhi (India) 2012/12/2.

3. Mitsuyoshi T et al. Modulation of PRG4 expression by hyaluronan through CD44 receptor and ERK. The 8th Asian Pacific Orthodontic Conference 47th Indian Orthodontic Conference. New Delhi (India) 2012/12/2.

4. 光吉智美ら. 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. 北海道 2012/7/14-15.

〔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：
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/research/research.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

光吉 智美(Mitsuyoshi, Tomomi)

広島大学・病院(歯)・歯科診療医

研究者番号：00633687

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし