

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861970

研究課題名(和文)顎関節症の病態形成に対するアクチビンの関与と治療への応用

研究課題名(英文) Involvement of Activin-A in temporomandibular joint disease

研究代表者

三次 翔 (MITSUGI, SHO)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：00636920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス頭蓋骨膜由来の未分化細胞にアクチビンを追加した場合、軟骨分化マーカーの発現低下を認めた。同様にアクチビンはマウス前軟骨細胞の軟骨分化を抑制するが、高分子量ヒアルロン酸を追加した場合、その抑制作用が増強された。アクチビンは軟骨細胞分化を負に制御し、肥大軟骨細胞への過剰な分化亢進を抑え、顎関節の恒常性維持に関与することが示唆された。その際、高分子量ヒアルロン酸はアクチビンに相乗的に作用した。一方、滑膜様細胞に慢性炎症性サイトカインIL-17を追加したところ、MMP3とADAMTS4の遺伝子発現レベルが上昇した。今後はアクチビンと炎症性サイトカインネットワークの関与について検討予定である。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the effects of activin-A on chondrogenesis in vitro. The addition of Activin-A to monolayer cultures of mouse periosteal cell from cranium, reduced chondrogenic gene expression. Equally, on mouse chondrocyte ATDC5 cells, Activin-A suppressed chondrogenesis. Moreover, pretreated with high molecular weight hyaluronan, reinforced the suppression of chondrogenesis by Activin-A. We suggest that Activin-A as well as high molecular weight hyaluronan may inhibit acceleration of differentiation for hypertrophic chondrocyte, and maintain the homeostasis of a jaw joint structures. On the other hand, we determined Interleukin-17A induced mRNA expressions of MMP-3 and ADAMTS4 in the human synovial sarcoma cells HS-SY-II. We try to elucidate the possibility Activin-A interact to chronic inflammation induced by such as IL-17.

研究分野：医歯薬学

キーワード：顎関節 アクチビン 軟骨細胞 ヒアルロン酸

1. 研究開始当初の背景

顎関節の変形性関節症 (Osteoarthritis, OA) は、メカニカルストレスや炎症性サイトカインなどの様々な刺激により関節組織が変形し、臨床的には可動域の制限、開口時の疼痛を呈する難治性疾患である。これまで OA に関する数多くの研究が展開されてきたが、詳細な発生機序は、未だ解明されていない。アクチピンは TGF- β ファミリーに属するサイトカインで、顎関節を含む様々な組織に発現し、細胞種に応じた分化の調節を担う。アクチピンは関節炎の滑膜において、炎症性サイトカインの増加に伴って、その発現が亢進することが報告されている。また、アクチピンは IL-1 などの炎症性サイトカインに誘導されるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) や ADAMTS などのマトリックス分解酵素による軟骨基質の破壊を抑制し、関節軟骨の恒常性維持に関与することが示唆されている。われわれは、これまでマウス前軟骨細胞株 ATDC5 の軟骨分化に対するアクチピンの影響とそのメカニズムについて分子生物学的な解析を行ってきた。

先の研究で、われわれは、アクチピンを前軟骨細胞に作用させたと、細胞内シグナルを介して Sox9 の遺伝子発現が低下し、軟骨細胞分化が抑制されることを明らかにした (文献 1)。この結果から、アクチピンは軟骨細胞の分化を負に制御し、顎関節部における肥大軟骨細胞への過剰な分化亢進を抑えることで、変形性顎関節症の病態形成に対して抑制的に作用する可能性が考えられた。

一方、変形性顎関節症では、関節腔内で種々の炎症性サイトカインの産生が亢進し、病態形成に関与するが、これらの炎症性サイトカインとアクチピンとの相互作用については、不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、アクチピンの軟骨細胞分化に対する影響と炎症性サイトカインによるサイトカインネットワークに対する影響を分子生物学的手法を用いて解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス骨膜由来細胞の軟骨分化に対するアクチピンの影響について

初代骨膜細胞はマウス C57BL/6 の頭蓋骨骨膜より outgrowth 法にて培養した。培地は 10%FBS 添加の α -MEM を使用した。同細胞の高密度単層培養系に対し、アクチピン 50ng/ml を添加後、サンプルを回収し、real time RT-PCR 分析にて collagen type II、Sox9 の遺伝子レベルの発現を定量した。

(2) アクチピンの軟骨分化抑制作用に高分子量ヒアルロン酸が及ぼす影響について

顎関節腔に存在し、マトリックスの恒常性維持に深く関与する高分子量ヒアルロン酸

を添加することで、顎関節症の病態に近づけた条件とした。マウス前軟骨細胞株 ATDC5 を 10%FBS 添加 DMEM 培地で単層培養し、アクチピン 50ng/ml を作用させる 3 時間前に高分子量 (2000 kDa) ヒアルロン酸ナトリウムを 100 μ g/ml 添加した。軟骨細胞分化への影響を collagen type II、collagen type I、Sox9 の遺伝子発現レベルで定量した。

(3) 慢性の滑膜炎による軟骨基質分解因子の発現について

滑膜細胞のモデルとしてヒト滑膜肉腫細胞株 HS-SY-1 を用いた。軟骨基質であるアグリカン分解に関与が報告されているマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) と ADAMTS-4、5 の発現が慢性炎症性サイトカイン IL-17 によって上昇するかを real time RT-PCR 法で解析した。培地は 5%FBS 添加 DMEM を用い、IL-17 は 100 ng/ml の濃度で刺激し、MMP3、ADAMTS4 の遺伝子発現レベルを real time RT-PCR 法によって定量した。

4. 研究成果

(1) アクチピンによる骨膜由来細胞の軟骨分化の抑制

マウス C57BL/6 の頭蓋骨骨膜から得た骨膜細胞は紡錘形の線維芽細胞様の形態であった。(Figure 1)

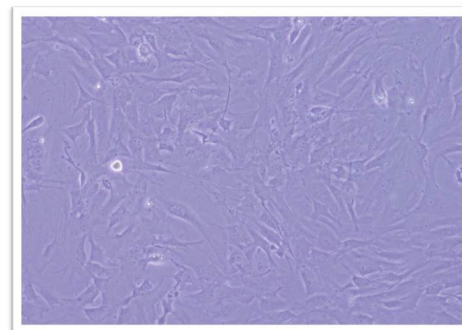


Figure 1

同細胞にアクチピン 50ng/ml を添加後、サンプルを回収し、mRNA を抽出、real time RT-PCR 法にて軟骨分化マーカーである collagen type II、Sox9 の遺伝子発現を定量した。アクチピンの添加により、collagen type II、Sox9 とともに、mRNA の発現が減少した。(Figure 2)

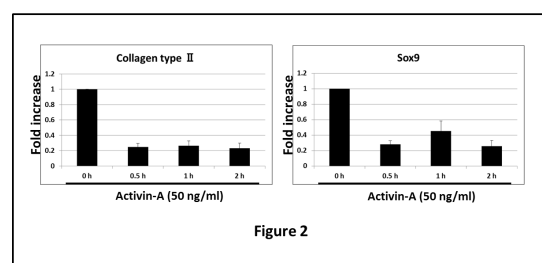


Figure 2

(2) ヒアルロン酸の存在によるアクチピンの

軟骨分化作用の相互効果

マウス前軟骨細胞株である ATDC5 に対するアクチピンの軟骨分化抑制作用は、ヒアルロン酸を 3 時間前に添加することで、より増強された。(Figure 3)

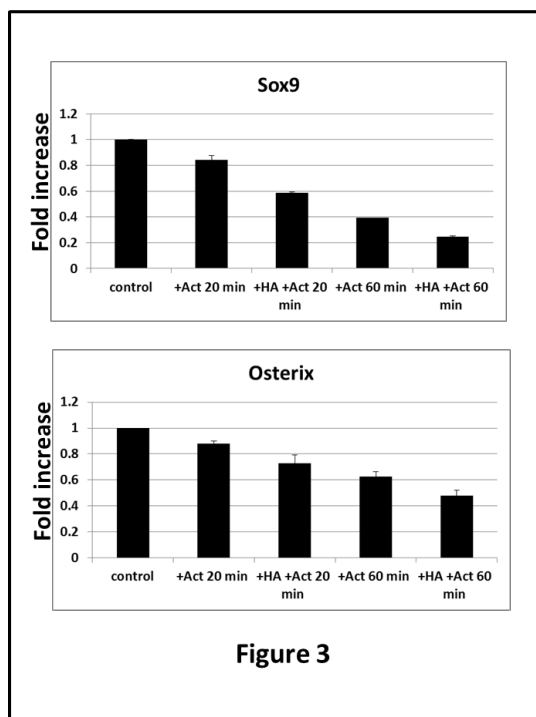


Figure 3

(3)慢性関節炎をモデルとした滑膜細胞への IL-17 刺激実験

顎関節の慢性関節炎の病態へのアクチピンの関与を解明するために、その前段階として、関節炎炎症性サイトカイン IL-17 刺激によって軟骨基質分解に関与する因子の発現が上昇するかを遺伝子発現レベルで解析した。その結果、ヒト滑膜肉腫細胞 HS-SY-1 に IL-17 を添加することでアグリカナーゼ ADAMTS4 とマトリックスメタロプロテアーゼ MMP3 の遺伝子発現が上昇した。(Figure 4)

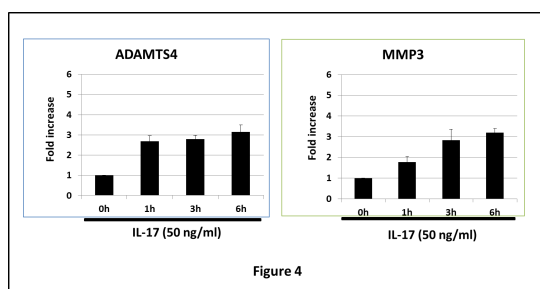


Figure 4

今回の研究で、骨膜由来細胞において、アクチピンが軟骨への分化を負に制御している可能性が示唆された。また、前軟骨細胞に対するアクチピンの軟骨分化の抑制作用は、高分子量ヒアルロン酸ナトリウムを転換することで増強された。これらの知見から、アクチピンは顎関節症の病態において、肥大軟骨への過剰な分化を抑制し、変形性顎関節症の病態形成を制御する可能性があり、さらに、

高分子量ヒアルロン酸はその作用を増強させ、関節機能の保護の働きがあることが考えられた。また、炎症性サイトカイン IL-17 刺激によって滑膜細胞における細胞外マトリックス分解に関与する因子の合成が誘導されることが明らかとなった。今後の展望として、アクチピンと炎症性サイトカインネットワーク、特に IL-17 との関与について解析していく予定である。

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 9 件)

Kiyomiya H, Ariyoshi W, Okinaga T, Kaneuji T, Mitsugi S, Sakurai T, Habu M, Yoshioka I, Tominaga K, Nishihara T. IL-33 inhibits RANKL-induced osteoclast formation through the regulation of Blimp-1 and IRF-8 expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 2015 May 1;460(2):320-6. doi:

10.1016/j.bbrc.2015.03.033.

田中 謙光、平山 聞一、野上 晋之介、山内 健介、金氏 毅、宮本 郁也、三次 翔、吉賀 大午、高橋 哲: 当科におけるインプラント脱落、除去症例の臨床的検討, 東北大学歯学雑誌, 査読無, (0287-3915)33 巻 1 号 16-21(2014.06)

Yoshiga D, Nakamichi I, Yamashita Y, Yamamoto N, Yamauchi K, Nogami S, Kaneuji T, Mitsugi S, Tanaka K, Kataoka Y, Sakurai T, Kiyomiya H, Miyamoto I, Takahashi T. Prognosis factors in the treatment of bisphosphonate-related

osteonecrosis of the jaw - Prognostic factors in the treatment of BRONJ. *J Clin Exp Dent*. 査読有, 2014 Feb 1;6(1):22-8.

Kataoka Y, Ariyoshi W, Okinaga T, Kaneuji T, Mitsugi S, Takahashi T, Nishihara T. Mechanisms involved in suppression of ADAMTS4 expression in synoviocytes by high molecular weight hyaluronic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 査読有, 2013;432(4):580-585

Yoshiga D, Yamashita Y, Nakamichi I, Tanaka T, Yamauchi K, Yamamoto N, Nogami S, Kaneuji T, Mitsugi S, Sakurai T, Kiyomiya H, Tominaga K, Morimoto Y, Takahashi T. Weekly teriparatide injections successfully treated

advanced bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. Osteoporos Int. 査読有, 2013 Aug;24(8):2365-2369
櫻井 拓真、吉賀 大午、石川 文隆、宮本 郁也、野上 晋之介、金氏 毅、三次 翔、森本 泰宏、山下 善弘、高橋 哲：上顎洞および鼻腔に開窓した巨大な含歯性嚢胞の一例；九州歯科学会雑誌, 査読無, 2013 67(1):18-23
Mitsugi S, Ariyoshi W, Okinaga T, Kaneuji T, Kataoka Y, Takahashi T, Nishihara T. Mechanisms involved in inhibition of chondrogenesis by activin-A. Biochemical and Biophysical Research Communications. 査読有, 2012;420(2):380-4
Kanzaki S, Ariyoshi W, Takahashi T, Okinaga T, Kaneuji T, Mitsugi S, Nakashima K, Tsujisawa T, Nishihara T. : Dual effects of heparin on BMP-2-induced osteogenic activity in MC3T3-E1 cells. Pharmacological reports. 査読有, 2011;63(5):1222-30
野上 晋之介、宮本 郁也、山内 健介、三次 翔、山下 善弘、高橋 哲：両側陳旧性顎関節脱臼に対して観血的整復術を施行した1例；日本顎関節学会雑誌 2011 23(1):5-9

〔学会発表〕(計 16件)

三次 翔、上原雅隆、平林文香、早川真奈、吉賀大午、國領真也、土生 学、笹栗正明、吉岡 泉、富永和宏：3次元立体モデルで手術を計画した顔面変形と顎関節強直を呈する陳旧性顔面外傷の1例, 第59回日本口腔外科学会学術大会, 幕張, 2014.10.18 .
原口 和也、上原 雅隆、早川 真奈、三次 翔、吉賀 大午、笹栗 正明、富永和宏：テトラサイクリンの蛍光により切除範囲を決定した難治性下顎骨骨髓炎の1例, 第68回日本口腔科学学会学術大会, 東京, 2014.5.8.
永尾 史徳、土生 学、藤井 誠子、兒玉 正明、清宮 弘康、吉賀 大午、三次 翔、宮本 郁也、國領 真也、高橋 哲、吉岡 泉、富永 和宏：当科にて観血的処置を施行した咀嚼筋腱・腱膜過形成症に関する臨床的検討, 第73回九州歯科学会総会, 北九州, 2013.5.18.
片岡 良浩、有吉 涉、三次 翔、金氏 毅、富永 和宏、高橋 哲：滑膜細胞に

おける ADAMTS4 産生に及ぼす高分子量ヒアルロン酸の影響, 第73回九州歯科学会総会, 北九州, 2013.5.18.
三次 翔、金氏 毅、石川文隆、野上 晋之介、山本哲彰、山内健介、吉賀大午、松尾 拓、宮本郁也、高橋 哲：上顎歯肉に生じた歯源性線維腫の1例, 第66回日本口腔科学会学術集会, 広島, 2012.5.17.
三次 翔、有吉 涉、沖永 敏則、片岡良浩、高橋 哲、西原 達次：前軟骨細胞に対するアクチピンとヒアルロン酸の影響, 第53回歯科基礎医学会学術大会, 岐阜, 2011.10.2 .
片岡 良浩、有吉 涉、沖永 敏則、三次 翔、高橋 哲、西原 達次：活性化マクロファージのプロテアーゼ産生に及ぼすHAの作用について, 第53回歯科基礎医学会学術大会, 岐阜, 2011.10.2 .
三次 翔、金氏 毅、宮本 郁也、高橋 哲：アクチピンによる前軟骨細胞分化に対する高分子量ヒアルロン酸の影響, 第24回日本顎関節学会学術大会, 広島, 2011.7.23 .
三次 翔、有吉 涉、沖永 敏則、金氏 毅、片岡 良浩、高橋 哲、西原 達次：前軟骨細胞の分化に及ぼすアクチピンの影響について, 第71回九州歯科学会総会, 北九州, 2011.5.28 .
三次 翔、有吉 涉、金氏 毅、高橋 哲：ヒアルロン酸の骨分化における骨膜細胞の機能発現に及ぼす作用について, 第65回日本口腔科学会学術集会, 船堀, 2011.4.22 .
三次 翔、有吉 涉、沖永 敏則、高橋 哲、西原 達次：Hyaluronic acid induces osteogenesis in periosteal cell, 第58回 国際歯科研究学会日本部会(JADR)学術大会, 北九州, 2010.11.21.
三次 翔、菅崎 紳、金氏 毅、山下 善弘、高橋 哲：BMP2のMC3T3-E1分化誘導能に対するヘパリンの二相性調節機構について, 第55回日本口腔外科学会学術大会, 幕張, 2010.10.17 .
金氏 毅、三次 翔、高橋 哲：メカニカルストレスが及ぼす骨芽細胞による破骨細胞誘導系への影響について, 第55回日本口腔外科学会学術大会, 幕張, 2010.10.17 .
三次 翔、有吉 涉、一宮 久之、高橋 哲：低分子量ヒアルロン酸によるADAMTS4の発現、機能増強作用, 第23回日本顎関節学会学術大会, 船堀, 2010.7.25.

菅崎 紳、有吉 涉、金氏 毅、三次 翔、
高橋 哲：ヒアルロン酸の破骨細胞誘導
系に及ぼす影響，第 22 回 日本顎関節
学会学術大会，船堀，2009.7.25.

新名主 耕平、菅崎 紳、金氏 毅、三
次 翔、友寄 泰樹、高橋 哲：低分子
量ヒアルロン酸による破骨細胞支持能増
強作用のメカニズム，第 21 回 日本顎関
節学会学術大会，大阪，2008.7.26.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 件)

〔その他〕
特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三次 翔 (MITSUGI SHO)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：00636920

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし