

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861788

研究課題名(和文) インテグリンの機械的負荷受容メカニズムの解明と、阻害剤を用いたPCR予防法の確立

研究課題名(英文) The elucidation of mechanotransduction of integrins and establishment of the PCR prevention with integrins inhibitor

研究代表者

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

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)：我々は顎関節症および、進行性下顎頭吸収(PCR)の予防法を求め研究を行った。これら疾患の原因の一つである下顎頭への機械的負荷は軟骨細胞表面のインテグリンで感受されていることが明らかとなっている。われわれは今回の実験でインテグリン V 5 の阻害薬 Cilengitide を用いることで機械的刺激の受容の軽減を行い、最終的にインテグリン-fak シグナルを抑制することによる炎症の抑制を確認した。これらは軟骨細胞を用いた実験を行った。また実際の患者さんの顎関節の状態を再現するためにラット下顎頭高負荷モデルを作製し炎症状態の検討を行ったが、Cilengitide の投与方法が困難で動物実験は完遂できなかった。

研究成果の概要(英文)：We conducted experiments for searching for the new treatment for PCR. It was already elucidated that mechanical stress was received at integrins on the surface of chondrocytes' cell membrane. We elucidated in this research that Cilengitide, which is the inhibitor of integrin V 5, inhibits receptive mechanism and finally suppresses the expression of inflammatory cytokines via integrin-FAK signaling. Additionally, We establish the rat model which condyle becomes overloaded in vivo experiments. however, we weren't able to accomplish this task because of some difficulties of how to inject cilengitide and reach it there.

研究分野：矯正歯科学

キーワード：インテグリン PCR 顎関節症

1. 研究開始当初の背景

近年、上顎前突や下顎前突といった遺伝的に著しい骨格的不正を持つ患者に対し、顎矯正手術を併用した矯正歯科治療が積極的に行われている。また外科矯正治療の技術の向上に伴い、以前と比較して様々な病態に対して安全で確実な治療が可能となってきている。**進行性下顎頭吸収 (Progressive Condylar Resorption : PCR)** は下顎頭の吸収性変化とそれに伴う下顎骨の後退、前歯部の開咬を呈する病態であり、患者は開咬に伴う咬合不全、顎関節痛、臼歯部の咬合痛を呈する。原因は下顎頭軟骨への異常な圧力もしくは顎関節への過大な牽引力と考えられているが、詳細は不明であり、厚生労働省より難治性疾患に認定されている。

さらに、PCR は矯正歯科治療における下顎後退症に対する下顎骨前方移動術の術後に高確率で生じることが知られている。その発症頻度は 4.5% から 21% ときわめて高確率であることが報告されており、矯正歯科治療において大きな問題となっている。術後に PCR を発症した場合、一般的にマウスピースを利用した安静療法を行うとともに、外科的手術を行わず矯正歯科治療単独で対応することとなるが、良好な咬合を獲得することは難しいのが現状である。

2. 研究の目的

これまでに申請者らは、矯正歯科治療における顎矯正手術の顎間固定時に下顎頭が前方へ牽引された状態を想定したラット下顎前方位モデルを作製し、下顎頭の前方位に高負荷がかけられた場合に生じる炎症性変化について検討を行ってきた。また、上記のモデルラットを用いて、炎症状態にあるラット下顎頭軟骨細胞を回収し定量 PCR による遺伝子解析を行った結果、細胞表面受容体であるインテグリン 2、V 3、V 5、Annexin V が発現していることが明らかとなった。中でもインテグリンが高発現であることから、これに焦点を当てて検討を進めることとした。

インテグリンは**機械的刺激受容体 (メカ**

ノレセプター) としての働きを有することが明らかとなってきた。インテグリンは細胞骨格を形成するアクチンフィラメントと結合することで、細胞骨格の歪みを認識し、それを生化学的シグナルに変換する機能を有しているのではないかと考えられている。よって、圧迫や牽引といった機械的刺激による細胞骨格の変形がインテグリンへと伝わり、炎症性のシグナルを励起するのではないかと推測される。申請研究では、PCR 発現に重要なインテグリンを特定するとともに、顎矯正手術の固定時に顎関節に存在するインテグリンの機能を選択的に抑制することで、過度の炎症を生じさせない PCR の予防法の確立を目指した本研究を着想するに至った。

3. 研究の方法

実験 1 ラット下顎前方位モデルを用いた検討 (in vivo)

1) 顎関節における炎症の発現とその病態の進行についての検討

下顎骨の前方位により生じた顎関節の炎症に対して、HE 染色、トルイジンブルー染色、サフラニン O 染色、および炎症性マーカーの免疫組織化学染色を行い、下顎頭および後部結合組織における炎症性変化を経時的に検討する。顎関節組織 (下顎頭軟骨・後部結合組織) を採取し、定量 PCR を用いて炎症性サイトカインの発現について遺伝子解析を行う。

2) 顎関節におけるインテグリンの分布と炎症との関連についての検討

下顎骨の前方位により生じた顎関節の炎症時に下顎頭および後部結合組織に存在しているインテグリンの種類およびその分布を、また経時的な変化を抗インテグリン抗体を用いて、免疫組織化学的に検討する。

実験 2 顎関節に存在するインテグリンの同定および、メカノレセプターとして機能するインテグリンの特定 (in vitro)

1) 下顎頭軟骨細胞および顎関節線維芽細胞に存在するインテグリンの同定

この実験では下顎前方位モデルラットの顎関節から後部結合組織を採取し、total RNA を抽出し、定量 PCR を用いた遺伝子解析により、発現しているインテグリンについて検討する。実験 1 の結果と合わせて、

炎症時に下顎頭軟骨および後部結合組織に発現しているインテグリンを特定する。

2) 機械的負荷により活性化されるインテグリンの特定およびメカノレセプターとしてのメカニズムの解明

実験には下顎前方位モデルラットの顎関節より切除した下顎頭から単離培養した軟骨細胞および、後部結合組織より単離培養した線維芽細胞を用いる。Flexcell strain unit にて細胞に機械的負荷を加える。

その時に発現する炎症性マーカーについても検討を行う。さらに機械的負荷時にインテグリンがメカノレセプターとして機能する場合に生じるインテグリンの活性化について、FAK (非受容体型チロシンキナーゼ) のリン酸化を定量 Western Blot 解析することで検討を行う。

実験3 下顎前方位モデルラット顎関節へのインテグリン阻害剤の投与 (in vivo)

我々が開発したラット下顎前方位モデルを使用し、顎関節にインテグリン阻害剤を局所投与した時の炎症反応の抑制について検討を行う。

4. 研究成果

実験1 ラット下顎前方位モデルを用いた検討 (in vivo)

初年度よりラット下顎前方位モデルを用いた検討を行ったが、装置脱離の問題を解決できなかったことから、我々が有していたもう一つの顎関節症モデル(下顎頭高負荷モデル)へ変更を行った。下顎の位置づけに違いが認められるものの、下顎に負荷を加えて炎症を惹起する点では同様である。モデルラット下顎頭を単離し、組織切片を作製、各種染色を行い、炎症性反応は軟骨前肥大層～肥大層で生じており、またそのときインテグリン V 5 が同部位に多く分布していることが明らかとなった。炎症の有無でインテグリンの発現部位に変化は認められなかった。

実験2 顎関節に存在するインテグリンの同定および、メカノレセプターとして機能するインテグリンの特定 (in vitro)

同モデルラットの下顎頭軟骨を採取し PCR にて各種タンパクの遺伝子発現を検討した。MMP3、13、IL-1、TNF、COX2 は高負荷時に発現増強した。しかしインテグリンの発現は高負荷時でも変化しなかった。

細胞実験についてはラットより採取した下顎頭軟骨を使用する予定であったが、培養が困難であったことから研究途中より Cell line である軟骨前駆細胞 ATDC5 を使用した。ATDC5 に Flexcell strain unit にて細胞に機械的負荷を加えて検討を行った。機械的刺激により各種炎症性マーカーの発現が増強した。またウェスタンブロットによりインテグリンの下流に存在する FAK のリン酸化が確認された

実験3 下顎前方位モデルラット顎関節へのインテグリン阻害剤の投与 (in vivo)

本実験でも同様に高負荷モデルへ変更して行う予定であった。しかしいずれのモデルラットにおいても、インテグリン阻害薬 Cilengitide の顎関節への確実な投与が確立できず研究が停滞した。そこで in vitro において ATDC5 を用い、Flexcell strain unit にて細胞に機械的負荷を加えて in vivo 実験に類似した環境を作製し実験を行った。機械的刺激を与えたことによる炎症反応は、Cilengitide 添加によって抑制された。またウェスタンブロットにおいて、Cilengitide は FAK 経路および NF-k 経路を經由して炎症の抑制を行っていることが示唆された。Cilengitide の顎関節症における炎症の沈静化に対する薬効が期待される。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

1. 過度な機械的負荷受容時の軟骨代謝における Cilengitide の影響: 岡本友希, 廣瀬尚人, 麻川由起, 國松亮, 光吉智美, 角千佳子, 矢野下真, 丹根一夫, 谷本幸太郎.: 第 28 回日本顎関節学会総会・学術大会(名古屋), 2015.

[その他]

ホームページ等

広島大学矯正歯科 H P

関節軟骨の変性と破壊に対する機械的負荷の影響の検討

<http://hiroshima-ortho-research.blogspot.jp/2015/12/blog-post.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 尚人 (Hirose Naoto)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・

助教

研究者番号 50611935

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：