

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890163

研究課題名(和文) 潤滑機能性蛋白 SZP の発現調節機構の解明と顎関節機能改善を目指した治療法の開発

研究課題名(英文) Clarification in regulatory expression mechanism of lubrication functional protein SZP and therapeutic development of temporomandibular joint

研究代表者

神谷 貴志 (Kamiya Takashi)

広島大学・医歯薬学総合研究科・特任助教

研究者番号：40551057

研究成果の概要(和文)：

SZP は、growth factor および cytokine により影響を発現調節されていることが明らかとなった。また過度な付加は、cytokine の産生を亢進させ SZP 産生を減少し、その結果摩擦係数を増加させることが明らかとなった。顎関節症の発現に SZP が関与していることおよびその発現メカニクスの一端を解明することができた。

研究成果の概要(英文)：

It was suggested that SZP is regulated by growth factor and cytokine. Overloading may cause the reduction of the SZP expression and increase the frictional coefficient as the result of mechanical stress-induced cytokines. From these results, it was suggested SZP is involved in the first stage of cartilage degradation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,120,000	336,000	1,456,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,070,000	621,000	2,691,000

研究分野：矯正歯科

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：SZP、サイトカイン、機械的負荷、摩擦係数

1. 研究開始当初の背景

近年、顎関節症が矯正歯科領域においても重要な治療対象として扱われるようになってきた。中でも開咬、過蓋咬合、臼歯部交叉咬合などの不正咬合を呈する患者において顎関節症の発現率が高いことが示されている。その理由として、歯列不正による下顎頭の運動制限や下顎窩内の偏位、ならびに関節円板による下顎頭への運動障害が顎関節に近接した構造を障害する圧迫力となる。その結果、生理的範囲を超えた過度の顎関節への負荷が下顎頭の変性や形態変化を導くと考

えられている。また、下顎頭骨吸収により突発的に下顎骨後退を起こすケースが報告されている。若年者では下顎骨成長の減少、成人では下顎頭の変形、大きさの減少、下顎枝の高さの短縮、下顎骨の後方回転などに加えて、関連症状として機能時の筋肉や関節の痛み、開口障害や下顎骨の成長抑制が報告されている。吸収や変形を呈した軟骨の修復は困難であり、これに対する有効な治療法は開発されていない。したがって、顎関節における病態を明らかにし、対症療法に変わる真に有効な治療法の探求することは学術的にも歯

科医学の進歩に大きく資するものと思われる。

2. 研究の目的

正常な顎関節では、下顎頭と下顎窩の間に関節円板が介在しクッションの役割を果たすことにより、負荷に対する緩衝作用を發揮している。しかしながら様々な因子による、潤滑機能の低下は顎関節病変の初期変化とされ、関節円板の前方転位や、関節軟骨の退行性変化へと進行する関節構成体において、ヒアルロン酸は高い保水性や粘弾性を有することから、関節の潤滑状態を保つ重要な分子と考えられていた。しかしながら、関節滑液にヒアルロナーゼ処理を施しても摩擦係数には直接影響しないという報告もありヒアルロン酸が摩擦に直接機能しているかは懐疑的となってきた。

SZP は、分子量 345kDa のプロテオグリカンであり、1404 個のアミノ酸から構成されている。また、複数の vitronectin 様ドメインと中央に多くのムチン様リピート構造を有しており、この部位が境界潤滑に機能していると考えられている。末端の N-terminal、C-terminal は疎水性であり、表層リン脂質と結合している可能性が考えられる。またその他にも *heparin* や glycosaminoglycan 結合部位、N-linked ligosaccharide 置換部位を有している。SZP は四肢の関節軟骨に存在し、境界潤滑機能の役割を果たすことで関節運動時に重要な機能を發揮していると報告されている。我々は、この SZP が下顎頭軟骨にも存在することを明らかとした。顎関節は一般関節とは異なり、関節円板を有しており、また下顎頭軟骨表層は線維軟骨で覆われていることから、SZP は表層軟骨細胞および滑膜細胞で特異的に発現が認められたものの、その発現に関する調節機構および顎関節の潤滑機能に対する影響については、未だ不明な点が多い。そのため、本研究では、下顎頭軟骨における SZP の発現調節機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

第一に、SZP 発現に対するサイトカインの影響について検討を行う。変形性顎関節症や関節リウマチ患者の滑液中には、IL-1 β や TNF- α が顕著に増加しており病態の進行に関与していると考えられている。また、初期の変形性顎関節症においては、関節軟骨の最表層が影響を受ける。そのため、下顎頭表層軟骨細胞における SZP 産生と炎症性サイトカインとの関連性について検討を行った。コンフルエントに達した後、培養液中に成長因子として transforming growth factor (TGF)- β 1、insulin-like growth factor (IGF)-1、platelet-derived growth

factor (PDGF)、basic fibroblast growth factor (bFGF)、サイトカインとして interleukin (IL)-1 β 、tumor necrosis factor (TNF)- α 、interleukin (IL)-6 をそれぞれ 10 ng/ml 添加し 3、6、12 時間後に細胞層より total RNA 抽出し、定量 PCR 解析を行った。またコンフルエントに達した後、0-10 ng/ml の TGF- β 1 および IL-1 β を培養液中に添加し、12 時間後に細胞層より total RNA を抽出し、定量 PCR 解析を行った。

第二に機械的負荷の違いにより SZP 発現に及ぼす影響について検討を行った。ブタ下顎頭表層より細胞を回収しコンフルエントになるまで培養を行った。その後、細胞に 5 および 15 kPa の機械的伸張刺激を負荷し、12、24、48 時間後に細胞層より total RNA を抽出した定量 PCR 解析を行った。また、回収した培養上清中の SZP 蛋白発現をウェスタンブロット解析にて検討した。なお、ウェスタンブロット解析については前述の手順に従って同様に行った。

関節軟骨表層は phosphatidylcholine 等のリン脂質で覆われている。SZP は表層のみに存在することから、リン脂質と結合能を有していると推測される。そこで第三に、炎症時に上昇するホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) により処理を行い、リン脂質の除去が下顎頭表層 SZP に及ぼす影響について検討を行った。ブタ下顎頭表層より凍結切片を作製し、0.01 U/ml 含有 0.1 M Tris buffer を凍結切片に滴下し 1 時間処理を行い、リン脂質の除去を行った。その後、前述の方法に準じて免疫組織化学染色を行い、光学顕微鏡を用いて SZP の局在を観察した。また前述の手順と同様に、同一ブタの両側顎関節表層より組織を採取した。片側については、摘出後速やかに AFM (キーエンス、大阪)による観察を行い、反対側については、リン脂質の除去を目的として 10 U/ml の PLA₂ による処理を 3 時間行った後、AFM を用いて観察を行った。

さらに振り子型摩擦試験機を用いて、ブタ顎関節の摩擦係数を測定した。実験には生後 6-9 ヶ月のブタ 10 頭から摘出した 20 関節(実験群 10 関節、対照群 10 関節)を使用した。ブタ頭蓋から下顎頭を切り取り、軟組織を可及的に除去した。対照群においては摘出後、速やかに試験機に装着し、測定を行った。一方、実験群では、表層リン脂質の除去を目的として 10 U/ml の PLA₂ による処理を行い、3 時間後に測定を行った。

主軸にはセラミック板を、振り子軸に固定された上板には下顎頭を石膏を用いて固定した。初期振幅を 5 度として顎関節を回転中心とした振り子運動を行い、その時の下顎頭の位置変化を試験機上部に取り付けられた 3 軸角度センサー (GU-3024, Data System

Technology, 東京) により測定し、そこから摩擦係数の検討を行った。

4. 研究成果

成長因子として TGF- β 1、IGF-1、PDGF、bFGF を添加し、3、6、12 時間後の SZP 遺伝子レベルについて検討を行った。その結果、TGF- β 1 添加により SZP 遺伝子レベルは 3、6、12 時間後に、それぞれ 1.4、2.2、2.3 倍に増加し、対照群と比べて有意に大きい値を示した。IGF-1 添加群では、大きな変化は認められなかった。PDGF 添加では、3 時間で 1.6 倍と有意に大きい値が認められたが、6、12 時間では有意差が消失した。bFGF 添加では、3、6、12 時間後にそれぞれ、1.7、2.4、2.0 倍に増加し、対照群と比べて有意に大きい値を示した。

次に、サイトカインとして IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 を添加し 3、6、12 時間後の SZP 遺伝子レベルについて検討を行った結果、IL-1 β では 3、6、12 時間後にそれぞれ 0.3、0.5、0.6 倍に減少し、有意に小さい値を示した。また、TNF- α 添加では、3、6、12 時間後にそれぞれ 0.7、0.7、0.6 倍と減少し、有意に小さい値を示した。一方、IL-6 添加により減少傾向を示したものの、有意差は認められなかった。

SZP 発現は、5 kPa において 12、24、48 時間でそれぞれ 3.2 倍、4.0 倍、3.3 倍に増加し、いずれも対照群と比べて有意に大きい値を示した。一方、15 kPa においては 12 時間で 2.0 倍に増加し、対照群より有意に大きい値を示したが、その後減少傾向を示し 48 時間では 0.4 倍に減少し、対照群より有意に小さい値に達した。

PLA₂ 発現は、5 kPa において有意差は認められなかったが、15 kPa において 48 時間で 1.4 倍に増加し、対照群と比べて有意に大きい値を示した。

TGF- β 1 発現は、5 kPa において 12、24、48 時間でそれぞれ 2.6 倍、3.3 倍、4.1 倍に増加し、いずれも対照群と比べて有意に大きい値を示した。一方、15 kPa においては 12 時間で 2.0 倍に増加し、対照群より有意に大きい値を示したが、その後減少傾向を示した。

PLA₂ を用い、表層リン脂質除去後 SZP 抗体を用いてブタ下顎頭の免疫組織化学染色を行った結果、未処理群と比較して PLA₂ 処理により、下顎頭表層において SZP が減少することが明らかとなった。ブタ下顎頭を用い、片側は摘出後速やかに AFM にて観察を行い、反対側は、リン脂質の除去を目的として PLA₂ による処理後、AFM にて観察を行った。その結果、未処理においては、表層に突起状のものが点在しているのが確認された。一方、PLA₂ 処理によりこれらが消失し、滑沢な表面構造を示した

PLA₂ 処理により、表層リン脂質の除去を行った処理群、および未処理群について振り子型摩擦試験機に装着し摩擦係数の計測を行った。その結果、未処理群の摩擦係数は 0.0666 であったのに対し、PLA₂ 処理群は 0.0964 へと有意に大きい値を示した

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 3 件)

①Kotaro Tanimoto, Takashi Kamiya, Yuki Tanne, Ryo Kunimatsu, Motoko Yoshioka, Tomomi Mitsuyoshi, Kazuo Tanne. Superficial zone protein affects boundary lubrication on the surface of mandibular condylar cartilage. Cell tissue Res. In press. 2011(査読有)

②Kamiya T, Tanimoto K, Tanne Y, Lin YY, Kunimatsu R, Yoshioka M, Tanaka N, Tanaka E, Tanne K. Effect of mechanical stimuli on the synthesis of superficial zone protein in chondrocytes. J Biomed Mater Res A. 92, 801-805, 2010. (査読有)

③佐野良太, 谷本幸太郎, 丹根由起, 神谷貴志, 光吉智美, 大谷淳二, 杉山拓紀, 小澤奏, 丹根一夫: 不正咬合患者群における顎関節病態と顎顔面形態の関連性: 顎関節学会誌 31, 21-25, 2010. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

①光吉智美, 神谷貴志, 谷本幸太郎, 丹根由起, 丹根一夫: CD44 受容体を介したヒアルロン酸による PRG4 の発現調節: 第 23 回一般社団法人 日本顎関節学会総会・学術大会 (東京), 2010, 7/24-25.

②神谷貴志, 谷本幸太郎, 丹根由起, 岩渕泰憲, 光吉智美, 丹根一夫 過度な機械的刺激による下顎頭軟骨の変性、破壊機序: 第 23 回一般社団法人 日本顎関節学会総会・学術大会 (東京), 2010, 7/24-25.

③Mitsuyoshi T, Kamiya T, Tanimoto K, Tanne Y, Kunimatsu R, Yoshioka M, Yu-Ching H, Tanne K. Modulation of PRG4 expression by hyaluronan through CD44 receptor. The 88th International Association for Dental Research (Spain, Barcelona), 2010, 7/14-17.

④佐野良太, 谷本幸太郎, 丹根由起, 神谷貴志, 光吉智美, 杉山拓紀, 小澤奏, 丹根一夫 不正咬合患者群における顎関節病態と顎顔面形態の関連性: 第 20 回日本顎変形症学会総会 (札幌), 2010, 6/15-16.

⑤光吉智美, 神谷貴志, 谷本幸太郎, 丹根由起, 丹根一夫 Superficial zone protein 発現に対するヒアルロン酸の影響: 第 22 回一般社団法人 日本顎関節学会総会・学術大会 (東京), 2009, 7/24-25.

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷 貴志 (KAMIYA TAKASHI)
広島大学・医歯薬学総合研究科・特任助教
研究者番号：40551057

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：