

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：27102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2013

課題番号：25893216

研究課題名(和文)マトリックス破壊による顎関節症病態形成メカニズムの解明

研究課題名(英文)Pathogenesis of temporomandibular disorder induced by matrix degradation

研究代表者

片岡 良浩 (KATAOKA, Yoshihiro)

九州歯科大学・歯学部・その他

研究者番号：50714698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円、(間接経費) 330,000円

研究成果の概要(和文)：今回、変形性顎関節症の病態解明のため、培養滑膜および軟骨細胞を用いた実験を行った。ヒト軟骨細胞株に対して、炎症性サイトカインとして腫瘍壊死因子(TNF- α)を添加して培養を行ったところ、マトリックスメタロプロテアーゼであるMMP-13の遺伝子発現が有意に増強した。この誘導系に対して、高分子量ヒアルロン酸を添加したところ、TNF- α によるMMP-13遺伝子の発現は有意に抑制された。

一方、インターロイキン17(IL-17)は、滑膜肉腫細胞株に対して、MMP-3の発現を亢進した。ヒト顎関節滑膜細胞には、IL-17受容体が同定され、IL-17の関節内のターゲット細胞であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examined the effects of inflammatory cytokines on synovial fibroblasts and chondrocytes in vitro. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) enhanced matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) mRNA expression in chondrocytes. Pre-treatment with high molecular weight hyaluronic acid suppressed TNF-alpha-mediated enhancement of MMP-13.

On the other hand, interleukin-17 (IL-17) stimulates MMP-3 mRNA expression in synovial sarcoma cells. Immunofluorescent staining in synovial fibroblasts derived from human temporomandibular joints (TMJ) revealed that expression of IL-17 receptor (IL-17RA) that was primarily localized on the cell surface, whereas no immunofluorescent staining was seen in chondrocytes. These results suggest that the main target of IL-17 in TMJ is synovial tissue.

研究分野：外科系歯学

科研費の分科・細目：医師薬学 外科系歯学

キーワード：細胞外マトリックス 関節破壊 滑膜 軟骨 マトリックスメタロプロテアーゼ 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(OA)は、「関節軟骨の変性・摩耗とその後の軟骨・骨の新生増殖および二次性滑膜炎などに基づく進行性の変性関節疾患」と定義される。顎顔面領域においては顎関節を構成する下顎頭や側頭骨に退行性変化が見られる場合に変形性顎関節症と診断され、可動域の制限、開口時の疼痛を呈する難治性の疾患であることが知られている。OAの詳細な発症機序は、未だ解明されていないが、病態形成において細胞外マトリックス(ECM)の主要な構成成分であるアグリカンの変性が重要な役割を果たしていると考えられている。

現在までに関節構成細胞より分泌されるアグリカナーゼおよびマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)に、アグリカン分解活性が確認されている。申請者らはこれまで培養ヒト正常滑膜細胞を用いて代表的なアグリカナーゼであるADAMTS4発現に対する高分子量ヒアルロン酸の影響を分子生物学的に検証してきた。この結果から、高分子量ヒアルロン酸はADAMTS4の発現に対して抑制的に働き、顎関節の軟骨細胞の過剰な分化、骨形成によって生じる変形性顎関節症の治療薬になり得ることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、顎関節症の病態で早期から変化が認められる滑膜および軟骨に着目し、病態形成に関与するといわれているADAMTS, MMPなどのプロテアーゼ発現に及ぼす高分子量ヒアルロン酸の影響を分子生物学的に解析することを目的とした。

3. 研究の方法

今回、変形性顎関節症の病態について、マトリックス破壊の観点に立って検証するために、患者より採取した顎関節滑膜および、培養滑膜・軟骨細胞を用いた *in vitro* の実験系を併行した。

(1) 顎関節滑液・滑膜採取

本大学倫理委員会の規定に従い、附属病院受診の保存的療法が施行しなかった顎関節症患者で、パンピング・マニキュレーション、顎関節腔洗浄療法、関節鏡視下手術、もしくは顎関節開放手術を施行したものを対象とした。術前に十分なインフォームドコンセントを行い、同意が得られたものより術中顎関節滑液、および滑膜を採取した。また、コントロール群としては、関節鏡視下手術、もしくは顎関節開放手術を施行した習慣性顎関節症患者より、滑液・滑膜の採取を行った。

(2) 細胞培養

採取した滑膜を outgrowth 法により、培養し、得られた細胞を顎関節滑膜線維芽細胞として使用した。諸実験には継代3~5代目を顎関節滑膜線維芽細胞として用いた。また、

患者検体数が不足していたため、滑膜細胞としてヒト滑膜肉腫細胞株であるHS-SY- およびヒト軟骨細胞株であるC28/I2についての培養も行った。この際、炎症性サイトカインとしてインターロイキン-1 (IL-1)、腫瘍壊死因子 (TNF-)、IL-17による刺激を行った。

(3) Real-time RT-PCR 分析

ECM分解因子の遺伝子レベルでの発現同定のために、培養細胞より mRNA を抽出、逆転写を行い、cDNA を合成した。リアルタイム RT-PCR システムを用いて、MMPs やアグリカナーゼの mRNA の発現量を定量的に計測した。

(4) Western blotting 分析

(3)で観察された phenotype の変化に関するシグナル分子の同定のために、培養を行った細胞より、タンパクを抽出し、サンプルとした。抽出タンパクについて、抗体を用いて、Western blotting 法による検出を行った。

4. 研究成果

(1) 高分子量ヒアルロン酸は、軟骨細胞において、TNF により誘導される MMP13 に発現を抑制する。

C28/I2細胞に対して、IL-1 刺激を行ったところ、IL-1 刺激により、MMP-13 遺伝子の発現増強が確認された(図1A)。さらに、高分子量ヒアルロン酸存在下に上記培養を行ったところ、IL-1 刺激による MMP-13 の発現増強の抑制傾向が観察された(図1B)。

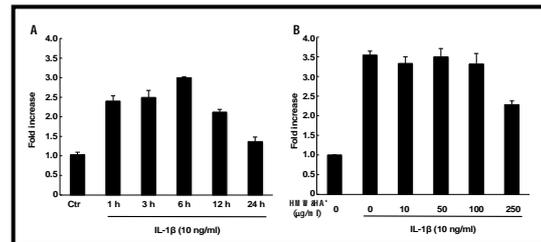


図1. IL-1 による MMP-13 遺伝子発現誘導に対する高分子量ヒアルロン酸の影響

IL-1 刺激により、C28/I2細胞における MMP-13 遺伝子の発現が誘導された(A)。IL-1 6時間刺激群に高分子量ヒアルロン酸を添加して培養を行ったところ、MMP-13 遺伝子発現は、濃度依存的な減少傾向を示した(B)。

高分子量ヒアルロン酸添加により、IL-1 誘導の MMP-13 遺伝子発現は抑制されるものの、その効果は軽度であり、今後刺激濃度・刺激時間に関して詳細な検証が必要と考えている。また、IL-1 以外の炎症性サイトカインとして、TNF 刺激群について検討を追加した。

その結果、6時間の TNF 刺激により誘導される MMP-13 の発現亢進は、高分子量のヒアルロン酸添加により、著しく抑制された(図2)。今後、TNF 受容体である TNFR 下流

のシグナル分子に対する高分子量ヒアルロン酸の影響に関して、解析を行っていく予定である。また、ヒアルロン酸の受容体であるCD44やRHAAM等の関与についても検討を重ねる。

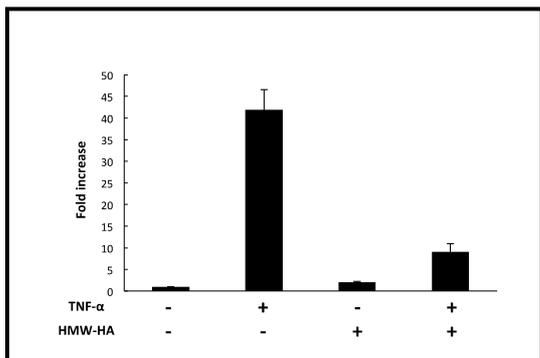


図2. TNF- α による MMP-13 遺伝子発現誘導に対する高分子量ヒアルロン酸の影響

TNF- α 刺激による C28/I2 細胞における MMP-13 遺伝子の発現誘導は、高分子量ヒアルロン酸を添加により、著しく抑制された。

(2) IL-17 はヒト滑膜肉腫細胞における MMP3 の発現を亢進する。

IL-17 は、慢性炎症への関与が報告されている炎症性サイトカインで、OA 患者滑液でその発現が亢進することが知られている。我々の検討では、ヒト顎関節滑膜の細胞表面において、その受容体である IL-17RA が発現していることを証明した(図3)。同受容体は、軟骨細胞に発現が観察されないことから、IL-17 の関節内におけるメインのターゲット細胞は滑膜細胞であることが示唆された。

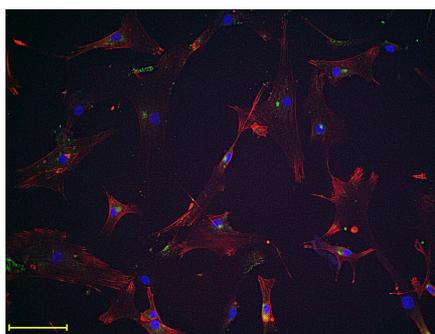


図3. ヒト顎関節滑膜細胞における IL-17 受容体 (IL-17R) の発現

蛍光免疫染色による検討の結果、ヒト顎関節より、採取した滑膜細胞上に、IL-17 受容体の発現が観察された。

顎関節滑膜細胞と同様に、IL-17RA の発現が確認されている HS-SY-II に対して、IL-17 を添加して培養したところ、MMP-3 の遺伝子発現の亢進が観察された。この IL-17 による滑膜細胞に対する MMP-3 の発現誘導の分子メカニズムとして、シグナル分子に対する Western blotting 解析の結果から、p38 Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK)、

Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK)および c-jun N-terminal kinase (JNK) を介するシグナル経路の活性化が関与している可能性が示唆され (data 未掲載)、同分子の選択的阻害剤を用いた詳細な分子メカニズムの解析を継続中である。

(5) 所見の発表

本研究期間中に得られた結果に関して、骨・軟骨代謝に関連する学会で発表を行うとともに、追加実験および、考察を加えて、英文誌への投稿を予定している。さらに本研究課題で得られたデータをベースに、平成 26 年度以降の大型研究費の取得を目指す。

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 1 件)

Nogami S, Yamauchi K, Kataoka Y, Takano H, Yamashita Y, Takahashi T, Clinical comparison between arthrocentesis and conventional conservative treatment with maxillomandibular fixation for unilateral high condylar fractures, J. Oral Rehabil., 査読有, 2014, 41 (2): 141-147.

DOI: 10.1111/joor.12124

[学会発表](計 0 件)

[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:

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 片岡 良浩

(KATAOKA Yoshihiro)

九州歯科大学・歯学部・医員

研究者番号：50714698

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：