

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07019

研究課題名(和文) HIF-1 遺伝子欠損マウスを用いた変形性顎関節症発症メカニズム解明

研究課題名(英文) The mechanism of TMJ-OA pathogenesis in HIF-1a gene deficient mice

研究代表者

森 浩喜 (MORI, Hiroki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・助教

研究者番号：90779985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：10日間、WTおよびHIF-1 +/-マウスの顎関節に機械的ストレスを与えることとした。HE染色、サフランin-O /ファストグリーン染色、および免疫組織学的染色にて、組織学的分析を行った。HIF-1 が関節軟骨における恒常性維持にとって重要であり、機械的ストレス条件下でTMJにおける関節軟骨破壊を防ぐことができることを示し、したがって、HIF-1 はTMJ-OAにおいて重要な新たな治療標的となる得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mechanical stress was applied to the TMJ of C57BL/6Ncr wild-type (WT) and HIF-1 +/- mice with a sliding plate for 10 days. Histological analysis was performed by HE staining, Safranin-O/Fast green staining, and immunostaining specific for articular cartilage homeostasis. HIF-1 +/- mice had thinner cartilage and smaller areas of proteoglycan than WT controls, without and with mechanical stress. Mechanical stress resulted in prominent degenerative changes with increased expression of HIF-1 $\alpha$ , VEGF, and the apoptosis factor cleaved Caspase-3 in condylar cartilage. Our results indicate that HIF-1 may be important for articular cartilage homeostasis and protective against articular cartilage degradation in the TMJ under mechanical stress condition, therefore HIF-1 could be an important new therapeutic target in TMJ-OA.

研究分野：矯正歯科

キーワード：TMJ

## 1. 研究開始当初の背景

OA は顎関節を含む全身の関節の骨軟骨破壊などの退行性変性を本態とし、下顎頭吸収・変形が顔面変形に関連している可能性が指摘されている。その結果、顎変形症を発症する要因となり、矯正治療中に発症した場合には治療目標が達成できないなど問題となる。したがって、OA の顎関節における軟骨破壊機構を解明することが歯科臨床の一助となり、その基礎的背景を明らかにすることがきわめて重要となる。我々はこれまでに Smad3 KO マウスを用い、変形性顎関節症 (TMJ-OA) の病態形成について検索し、TGF- $\beta$ /Smad3 シグナルと S1P/S1PR レセプター 3 (S1PR3) シグナルのシグナルクロストークにより軟骨細胞の遊走能が制御され、Smad3/S1PR3 シグナル経路が顎関節の恒常性維持ばかりでなく、TMJ-OA 病態形成においても重要な役割を果たしていることを報告してきた。また、S1P/S1PR の発見によって、骨代謝系において破骨細胞、骨芽細胞並びに軟骨細胞の遊走能、活性化機構の解明が急速に進歩してきており、その中で免疫系細胞が骨代謝や骨軟骨破壊機構に密接に関与していることを当教室から報告してきた。それに加え、顎関節に対する過剰な機械的負荷が、関節軟骨の血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor: VEGF) の発現・局在に関与し、過剰な負荷により低酸素状態となったラット顎関節組織での Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 の活性化が VEGF を誘導し、軟骨細胞における HIF-1 の活性化が、破骨細胞形成を促進することを報告している。しかしながら、HIF-1 がマウス顎関節における関節軟骨や骨破壊を引き起こす詳細なメカニズムの全容は、いまだ明らかとなっていない。HIF-1 は、低酸素環境における細胞生存に必須のタンパクであり、発生期においても軟骨組織中央の低酸素領域で様々な生理機能を制御することから HIF-1 が多様な生物活性を介して顎関節組織の構造および機能の維持においても重要であると考えられる。しかしながら、同疾患における全身の関節破壊機構の究明は行われているものの、顎関節における詳細な機構解明を行っているものは少ない。そこで、OA の自然発症モデルとして知られている HIF1- $\beta$  HKO マウス顎関節における OA 病態の詳細な解析を行うとともに、軟骨細胞における HIF-1、TGF- $\beta$ /Smad3 シグナルと S1P/S1PR のシグナルクロストークを介した分子メカニズムを解明することで、病因論に基づく OA 新規治療法の開発を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

変形性関節症 (Osteoarthritis: OA) は、顎関節を含む全身の関節軟骨の破壊や骨の変形を特徴とするが、その病態形成機構については不明な点が多い。本研究は OA を自然発症することが知られている低酸素応答遺伝子

HIF-1 遺伝子ヘテロノックアウト (HKO) マウスの軟骨細胞の機能を詳細に解析するとともに、軟骨細胞の遊走能に重要な役割を果たす脂質メディエーターのひとつである、スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) のシグナル伝達系と細胞の個性に応じて機能する TGF- $\beta$  シグナリングの主要なシグナル伝達因子である Smad3 のシグナル伝達系との間のシグナルクロストークを解析することで、軟骨細胞の遊走能、同活性化・維持機構を明らかにすることを目的とする。さらに、顎関節を中心とした OA 関節病変への影響を検索し、新たな OA 診断・治療法を開発することを最終的な目標とする。

## 3. 研究の方法

本研究では OA 病態を経時的に自然発症することが知られている、低酸素応答遺伝子 HIF-1 HKO マウスの軟骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞などの骨系統細胞の機能について詳細に解析し、その中でも OA 病態に重要な役割を果たす軟骨細胞に焦点をあて、細胞遊走能に重要な役割を果たす脂質メディエーターのひとつである S1P およびそのレセプター S1PR による S1P/S1PR シグナルと、細胞の個性に応じて機能する TGF- $\beta$  シグナリングの主要な下流シグナルのひとつである転写因子 Smad3 シグナル間のシグナルクロストークの解明による軟骨細胞の遊走能調節機構、アポトーシスや活性化・維持機構を明らかにした上で、顎関節を含む関節病変への影響を詳細に検索し、新たな OA 診断・治療法を開発を図る。

## 4. 研究成果

スライディングプレートを用いて 10 日間、C57BL/6Ncr 野生型 (WT) および HIF-1 +/- マウスの顎関節に機械的ストレスを与えることとした。HE 染色、サフラニン-O / ファストグリーン染色、および免疫組織学的染色にて、組織学的分析を行った。

HIF-1 +/- マウスは、機械的ストレスの有無にかかわらず、WT マウスよりも軟骨領域が狭く、プロテオグリカン層の面積がより小さかった。機械的ストレスを与えた結果、下顎頭軟骨における HIF-1、VEGF、およびアポトーシス因子である Cleaved caspase 3 発現が増加した。

これらの結果から、HIF-1 が関節軟骨における恒常性維持にとって重要であり、機械的ストレス条件下で TMJ における関節軟骨破壊を防ぐことができることを示し、したがって、HIF-1 は TMJ-OA において重要な新たな治療標的となる得ることが示唆された。

## 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 5 件)

Hutami IR, Izawa T, Mino-Oka A, Shinohara T, Mori H, Iwasa A, Tanaka E. Fas/S1P1 crosstalk via NF- $\kappa$ B activation

in osteoclasts controls subchondral bone remodeling in murine TMJ arthritis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Sep 2;490(4):1274-1281. doi:

10.1016/j.bbrc.2017.07.006. 査読有  
Mino-Oka A, Izawa T, Shinohara T, Mori H, Yasue A, Tomita S, Tanaka E. Roles of hypoxia inducible factor-1 in the temporomandibular joint. *Arch Oral Biol.* 2017 Jan;73:274-281. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.10.028. 査読有

Shinohara T, Izawa T, Mino-Oka A, Mori H, Iwasa A, Inubushi T, Yamaguchi Y, Tanaka E. Hyaluronan metabolism in overloaded temporomandibular joint. *J Oral Rehabil.* 2016 Dec;43(12):921-928. doi: 10.1111/joor.12443. 査読有

Izawa T, Arakaki R, Mori H, Tsunematsu T, Kudo Y, Tanaka E, Ishimaru N. The Nuclear Receptor AhR Controls Bone Homeostasis by Regulating Osteoclast Differentiation via the RANK/c-Fos Signaling Axis. *J Immunol.* 2016 Dec 15;197(12):4639-4650. doi: 10.4049/jimmunol.1600822 査読有

Izawa T, Mori H, Shinohara T, Mino-Oka A, Hutami IR, Iwasa A, Tanaka E. Rebamipide Attenuates Mandibular Condylar Degeneration in a Murine Model of TMJ-OA by Mediating a Chondroprotective Effect and by Downregulating RANKL-Mediated Osteoclastogenesis. *PLoS One.* 2016 Apr 28;11(4): e0154107. doi: 10.1371/journal.pone.0154107. 査読有  
〔学会発表〕(計 13 件)

Hiroki Mori, Takashi Izawa, Takehiro Shinohara, Akiko Mino-Oka, Minami Sato, Natsuko Hichijo, Akihiko Iwasa, Islamy Hutami, Eiji Tanaka. Effect of Rebamipide Administration on TMJ-OA Model Mouse. The 95th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research. 2017 年 3 月 22-25 日. San Francisco (USA).

Islamy Hutami, Takashi Izawa, Hiroki Mori, Takehiro Shinohara, Akiko Mino-Oka, Akihiko Iwasa, Eiji Tanaka. Fas/S1P1 Signaling Controls Temporomandibular Joint Subchondral Bone Remodeling in Autoimmune-arthritis. The 95th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research. 2017 年 3 月 22-25 日. San Francisco (USA).

Minami Sato, Mutsumi Fujita, Akihiko Iwasa, Hiroki Mori, Akiko Oka, Natsuko Hichijo, Shinya Horiuchi, Eiji Tanaka. Effects of Low-intensity Pulsed Ultrasound on ATDC5 Cells Under

Inflammation. The 95th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research. 2017 年 3 月 22-25 日. San Francisco (USA).

森仁志, 森浩喜, 篠原丈裕, 天知良太, 塩屋園玲子, 渡邊佳一郎, 堀内信也, 菅野貴浩, 田中栄二. 比較的大きな顎裂を有する口唇口蓋裂患者に対する骨トランスポート骨延長法の応用. 第 75 回日本矯正歯科学会大会. 2016 年 11 月 8-10 日. 徳島.

Hutami IR, Izawa T, Mori H, Iwasa A, Shinohara T, Mino-Oka A, Tanaka E. The role of osteoclast in the spontaneously developed temporomandibular joint arthritis of the MRL/lpr mice. 第 75 回日本矯正歯科学会大会. 2016 年 11 月 8-10 日. 徳島.

Hutami IR, Izawa T, Mori H, Iwasa A, Shinohara T, Mino-Oka A, Tanaka E. Fas/S1P System Controls Subchondral bone remodeling of the temporomandibular joint in autoimmune arthritic mice. 2016 tokushima bioscience retreat. 2016 年 9 月 15-17 日. 徳島.

Takashi IZAWA, Hiroki MORI, Takehiro SHINOHARA, Akiko MINO-OKA, Islamy Rahma HUTAMI, Akihiko IWASA, Eiji TANAKA. Rebamipide attenuates mandibular condylar degeneration in a murine model of TMJ-OA by mediating a chondroprotective effect and by downregulating RANKL-mediated osteoclastogenesis. 13th Meeting of Bone Biology Forum. 2016 年 8 月 19-20 日. 千葉.

岩浅亮彦, 森浩喜, 井澤俊, 篠原丈裕, 岡彰子, 佐藤南, 堀内信也. 不正咬合患者における顎関節症の臨床統計学的調査. 第 29 回日本顎関節学会総会・学術大会. 2016 年 7 月 17-18 日. 神奈川.

佐藤南, 岩浅亮彦, 森浩喜, 堀内信也, 田中栄二. 関節滑膜細胞に対する低出力超音波照射によって生じる抗炎症シグナル伝達経路の解明. 第 29 回日本顎関節学会総会・学術大会. 2016 年 7 月 17-18 日. 神奈川.

篠原丈裕, 井澤俊, 岩浅亮彦, 森浩喜, 三野彰子, 犬伏俊博, 田中栄二. 変形性顎関節症モデルマウス下顎頭におけるヒアルロン酸代謝機構の役割. 第 29 回日本顎関節学会総会・学術大会. 2016 年 7 月 17-18 日. 神奈川.

岡彰子, 井澤俊, 篠原丈裕, 森浩喜, 田中栄二. HIF-1 +/--マウスを用いた変形性顎関節症における HIF-1 の機能解析. 第 29 回日本顎関節学会総会・学術大会. 2016 年 7 月 17-18 日. 神奈川.

佐藤博子, 井澤俊, 森浩喜, 岩浅亮彦, 木内奈央, 堀内信也, 田中栄二. Le Fort 型骨延長術後に上下顎骨移動術を施行した Apert 症候群の 1 例. 第 59 回中・四国矯正歯科学会大会. 2016 年 7 月 6-7 日. 福岡.

Hiroki Mori, Takashi Izawa, Eiji Tanaka.

Role of Rho-GTP/S1P/Smad3 Signaling on the Pathogenesis of TMJ-OA. 94th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research. 2016年6月22-25日. Seoul (Korea).  
〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森 浩喜 (MORI, HIROKI)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教  
研究者番号：90779985

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )