

令和元年6月14日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11704

研究課題名(和文) 顎関節炎におけるインフラマソームと分子プロセス研究

研究課題名(英文) Study of inflammasome and molecular process of inflammation in temporomandibular joint

研究代表者

近藤 壽郎 (KONDOH, Toshirou)

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：70178416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：顎関節内障患者では、滑膜炎症状が観察されるが、感染関節であることは稀である。近年、生体内代謝物質による慢性炎症が生活習慣病や癌などの病態形成に関与するといわれている。顎関節の炎症病態に内在性代謝物質が関与するのか検討した。細胞外基質フィブロネクチンの分解産物は、ヒト顎関節滑膜細胞(滑膜細胞)のケモカイン等の炎症性因子の産生を上昇させること、発現上昇にはNF- κ Bが関与していることが示唆された。また、ケモカインによって遊走してくるモノサイトと滑膜細胞が接触すると炎症性サイトカイン産生が上昇することが明らかとなった。細胞外基質代謝産物は顎関節滑膜炎の進展に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎関節は、咀嚼、開閉口など顎運動の支点となる関節であり、顎関節の運動障害や機能障害は、食事や会話に支障を来し、日常生活のクオリティーを著しく低下させる。顎関節症の治療は、従来からの痛みの軽減や開口障害の回復を目的とした対症療法が行われているのが現状である。顎関節炎の発症プロセスを分子生物学的に明らかにすることによって、顎関節症の診断および新規治療薬の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Synovitis frequently accompanies internal derangement and/or osteoarthritis in temporomandibular joint (TMJ) that is rarely infected. Recently, metabolite of extracellular matrix has been shown one of pathogenesis for chronic inflammation in life-related diseases and cancer. Fibronectin fragments (FN-Fs) are metabolite in which fibronectin is degraded by enzyme. We investigated the role of fibronectin fragments in inflammation pathogens of temporomandibular joint disorders. FN-Fs induced the gene expression of inflammatory molecules such as chemokines via activation of NF- κ B in synovial fibroblasts from human TMJ. Chemokines produced from fibroblasts may induce monocytes migration into synovium. The co-culture of synovial fibroblasts and monocytes enhance the production of inflammatory cytokines in compared to each monoculture in this study. These results suggest that the extracellular matrix fragments are associated with the inflammatory progression of TMDs.

研究分野：口腔外科学

キーワード：顎関節 顎関節滑膜炎 網羅的遺伝子発現解析 シグナリング・パスウェイ解析 顎関節滑膜細胞 モノサイト

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年、生活習慣病や神経疾患、がんの病態形成には、病原微生物感染を伴わない非感染性炎症の慢性化が関わっていると考えられるようになった。本来であれば病原体を認識する病原体センサーが、代謝産物等を内因性リガンドとして認識することによって免疫応答を誘発すると考えられている。顎関節症患者の滑液では IL-1 β や TNF- α といった炎症性サイトカイン濃度の上昇や、滑膜では顎関節内視鏡所見による毛細血管の増生や、組織学的研究による炎症性細胞の浸潤が報告されている。顎関節において感染性関節症は稀であることから、何がこのような炎症病態発症の原因であるのかは不明な点が多い。そこで、本申請では、顎関節内障の炎症病態発症に、内因性リガンドを病原体センサーが認識することによる免疫応答が関与するのか、関与としたなら病原体センサー分子や内在性リガンドは何なのか、顎関節包内炎症の分子基盤について研究を行う。

2. 研究の目的

(1) 顎関節炎症の内在性リガンドの検索

関節症包内病態で高頻度に発生する顎関節円板障害および変形性顎関節症では滑膜の炎症所見が確認されている。そこで、ヒト培養顎関節滑膜細胞を用いて、非感染性炎症を誘発する内在性リガンド物質を検索するとともに、顎関節包内炎症病態形成因子およびその機序を検討する。

(2) 顎関節の慢性炎症プロセスの検討

顎関節滑膜炎では、炎症性細胞浸潤が認められる。よって、顎関節の慢性炎症プロセスを明らかにするには、滑膜細胞と炎症性細胞間との細胞間クロストークについても検討することが必要であると示唆される。そこで、ヒト培養顎関節滑膜細胞とヒト CD14 陽性細胞またはマクロファージとの共培養を行い、慢性炎症プロセスの検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 関節鏡視下洗浄療法の際に顎関節滑膜組織を採取する。

(2) 顎関節滑膜組織から、滑膜細胞を out growth 法で分離後、初代及び継代培養を行う。

(3) フィブロネクチン（滑膜組織の細胞外基質の一つ）の分解産物を培養ヒト顎関節滑膜細胞（滑膜細胞）に作用させ、total RNA を抽出する。

(4) 抽出した total RNA と SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K v2 Microarray を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行う

(5) 網羅的遺伝子発現解析結果を用いて、signaling pathway 解析を行う。

(6) ヒト培養顎関節滑膜細胞とヒト CD14 陽性細胞またはマクロファージとの共培養を行う。

(7) 共培養の培養上清を採取し、IL-1 β 等の炎症性サイトカインを測定する。

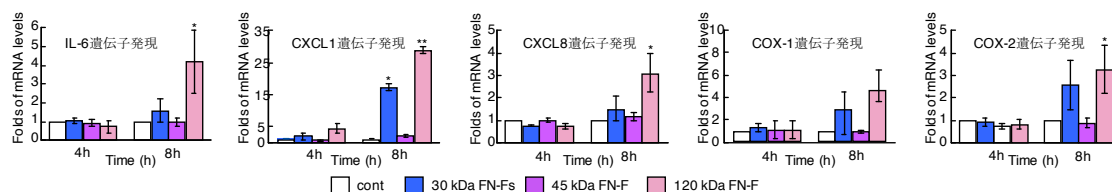
4. 研究成果

(1) 顎関節炎症の内在性リガンドの検索

フィブロネクチン (FN) はコラーゲンやヘパリン、細胞と結合する部位を持ち、細胞外基質の高分子会合体を構成する糖タンパクである。FN は細胞外基質分解酵素などによって 30 kDa, 45 kDa および 120 kDa のフラグメント (FN-Fs) に分解される。変形性関節疾患患者の膝関節滑液では FN-Fs が検出され、FN-Fs が関節炎の進行に関与すると報告されている。本研究では、顎関節における FN-Fs の影響を検討するため、顎関節滑膜細胞（滑膜細胞）に FN-Fs を作用させ、炎症性因子の発現および、作用機序について検討を行った。

① 炎症性因子の遺伝子発現に対するフィブロネクチンフラグメントの影響

滑膜細胞に 150 nM FN-Fs を 4 および 8 時間作用させ、顎関節内障患者滑液で上昇している因子の遺伝子発現を測定した。COX はプロスタグランジン E2 生成に必要な酵素である。

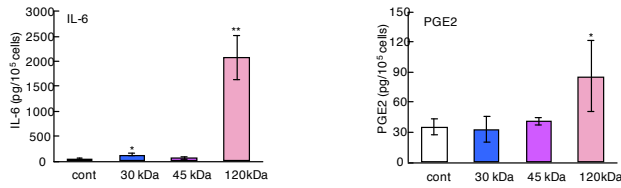


FN-Fs 刺激 4 時間では、IL-6, CXCL1, CXCL8 および COX-2 の遺伝子発現量の上昇は認められなかった。FN-Fs 刺激 8 時間では遺伝子発現量は、120 kDa FN-Fs で有意に上昇を認めた。CXCL1 遺伝子発現は 30 kDa FN-Fs でも有意に上昇を認めた。また、COX-1 の遺伝子発現量は FN-Fs 刺激 4 時間および 8 時間で有意差は認められなかった。(n=3, mean \pm SD) *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

② 炎症性因子産生に対するフィブロネクチンフラグメントの影響

FN-Fs 刺激滑膜細胞で IL-6 と COX2 の遺伝子発現上昇が認められた。そこで、IL-6 タンパ

ク質産生量とプロスタグランジン E2 産生量を測定した。滑膜細胞 150 nM の FN-Fs を 48 時間作用させた。

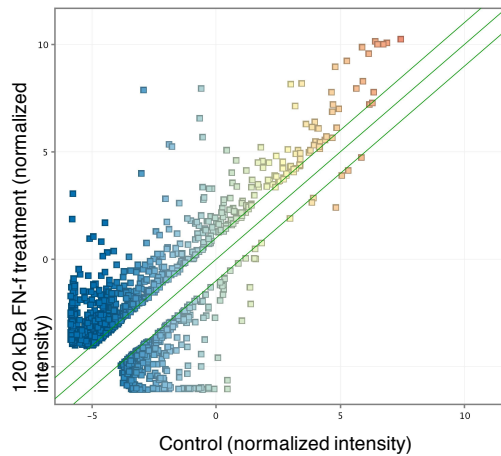


IL-6 産生量は 30 kDa および 120 kDa FN-Fs 刺激において有意に上昇した。PGE2 産生量は 120 kDa FN-F 刺激において有意に上昇した。(n=4, mean ± SD) *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

③ 120 kDa FN-Fs 刺激滑膜細胞の DNA マイクロアレイ解析

滑膜細胞の炎症性因子の遺伝子発現および産生量は、120 kDa FN-Fs 刺激が最も高い値を示した。そこで、120 kDa FN-F を作用させた滑膜細胞で DNA マイクロアレイ解析を行った。

Scatter Plots



Top 20 upregulated genes by 120 kDa FN-f stimulus

Rank	Gene Symbol	GenbankAccession	Fold change	Gene Name
1	MT1G	NM_001301257	1822.9	metallothionein 1G
2	CXCL8	NM_000584	474.1	chemokine (C-X-C motif) ligand 8
3	CXCL1	NM_001511	392.1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1
4	CCL8	NM_005623	209.5	chemokine (C-C motif) ligand 8
5	CXCL1	NM_001511	156.6	chemokine (C-X-C motif) ligand 1
6	CXCL2	NM_002089	154.1	chemokine (C-X-C motif) ligand 2
7	CXCL2	NM_002089	133.6	chemokine (C-X-C motif) ligand 2
8	CXCL3	NM_002350	131.4	chemokine (C-X-C motif) ligand 3
9	IL6	NM_000600	78.5	interleukin 6
10	CCL5	NM_002985	74.3	chemokine (C-C motif) ligand 5
11	CCL20	NM_004591	67.9	chemokine (C-C motif) ligand 20
12	CCL7	NM_008273	65.8	chemokine (C-C motif) ligand 7
13	GCH1	NM_000161	44.9	GTP cyclohydrolase 1
14	MT1X	NM_005952	35.8	metallothionein 1X
15	LOC284570	BC040156	34.9	uncharacterized LOC284570
16	ICAM1	NM_002001	29.8	intercellular adhesion molecule 1
17	CXCL10	NM_001565	29.3	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
18	NEURL3	NM_001285486	28.5	neurallized E3 ubiquitin protein ligase 3
19	OASL	NM_003733	27.6	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like
20	CCL2	NM_002982	27.5	chemokine (C-C motif) ligand 2

DNA マイクロアレイ解析の結果、58,341 遺伝子中滑膜細胞で発現していた遺伝子は 29,775 遺伝子であった。120 kDa FN-F で 2 倍以上上昇または 1/2 以下に減少した遺伝子を発現変動した遺伝子とした。発現変動した遺伝子は 1,260 遺伝子で、発現上昇した遺伝子は 872 遺伝子、発現減少した遺伝子は 388 遺伝子であった。

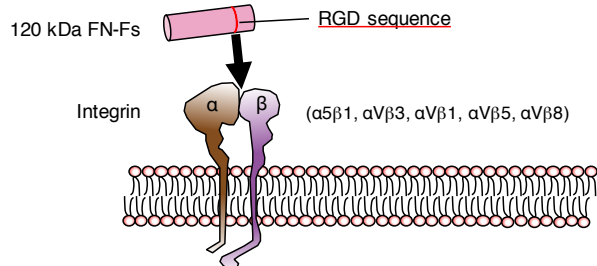
発現上昇率上位 20 位中 12 遺伝子がケモカインメンバーであった。

④ シグナリングパスウェイ解析

120 kDa FN-Fs にはアルギニン-グリシン-アスパラギン酸からなる RGD 配列が存在する。RGD 配列を認識するレセプターとして、integrin $\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha V\beta 6$, $\alpha V\beta 8$ および $\alpha IIb\beta 3$ がある。そこで、滑膜細胞の integrin 遺伝子発現量を調べた。

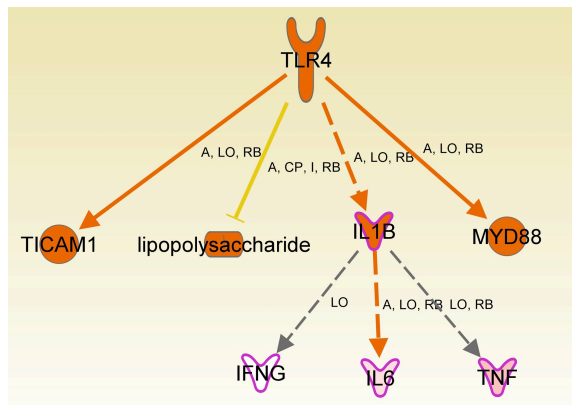
Gene Symbol	Integrin	Gen Bank ID	4h Cont Raw date	4h 120kDa FN-f Raw date
ITGA2B	Integrin α II B	NM_000419	Not Detected	Not Detected
ITGA5	Integrin α 5	NM_002205	8491.3	8252.0
ITGAV	Integrin α V	NM_002210	70552.3	69098.7
ITGB1	Integrin β 1	NM_133376	17228.7	15967.7
ITGB3	Integrin β 3	NM_000212	1285.6	1433.7
ITGB5	Integrin β 5	NM_002213	46675.7	45805.9
ITGB6	Integrin β 6	NM_000888	Not Detected	Not Detected
ITGB8	Integrin β 8	NM_002214	491.8	306.6

DNA microarray data



滑膜細胞では integrin α 鎖は、 $\alpha 5$ および αV が、integrin β 鎖は、 $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$ および $\beta 8$ が発現していた。滑膜細胞において integrin $\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha V\beta 8$ を介して 120 kDa FN-Fs のシグナルが伝達される可能性が示唆された。

120 kDa FN-Fs によって 2 倍以上発現上昇した遺伝子を Ingenuity Pathway Analysis (IPA) へ upload し、上流のシグナル伝達因子の検索を行った。

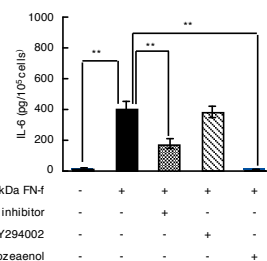
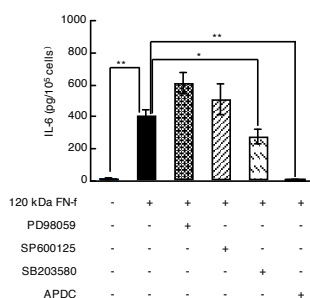
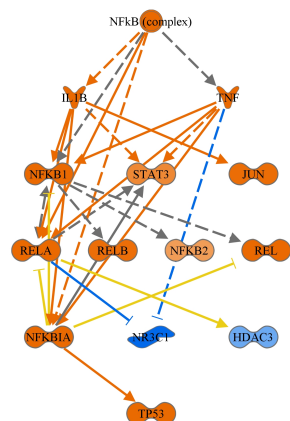


Gene Symbol	Gen Bank ID	4h Cont Raw date	4h 120kDa FN-F Raw date
TLR1	NM_003263	673.9	855.0
TLR2	NM_003264	Not Detected	66.1
TLR3	NM_003265	730.8	1025.1
TLR4	NM_138554	5373.5	4616.2
TLR5	NM_003268	517.4	509.0
TLR6	NM_006068	Not Detected	Not Detected
TLR7	NM_016562	Not Detected	Not Detected
TLR8	NM_016610	Not Detected	Not Detected
TLR9	NM_017442	67.0	60.4
TLR10	NM_030956	Not Detected	Not Detected

DNA microarray data

120 kDa FN-Fs は Toll-like receptor (TLR) を介して IL-1 β を発現上昇させ、上昇した IL-1 β が IL-6 および TNF 遺伝子発現を上昇させるネットワークが構築された。滑膜細胞において、TLR は、TLR1, 2, 3, 4, 5, および 9 遺伝子の発現を認めた。TLR4 の遺伝子発現量は高く、また、TLR4 は、細胞外基質分解産物のレセプターになることが報告されていることから、滑膜細胞においても TLR4 を介して 120 kDa FN-Fs のシグナルが伝達される可能性が示唆された。

次に、120 kDa FN-F は、滑膜細胞の Integrin や TLR に結合し、どのようなシグナル伝達経路を介して IL-6 等の発現を誘導するのかを IPA を用いて検討したところ、NF κ B 活性化経路が候補にあがった。また、JUN を活性化する MAPK 経路の関与も考えられた。



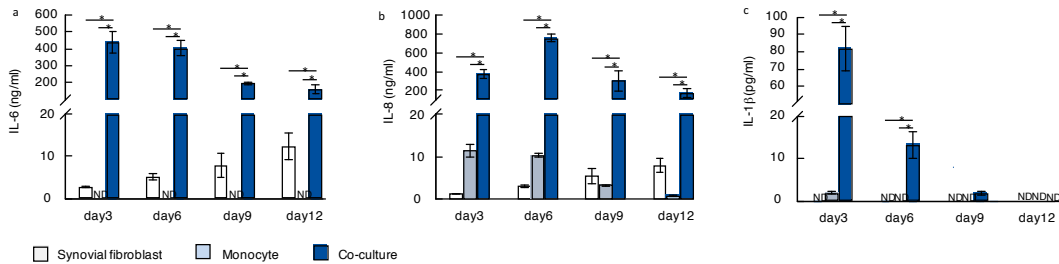
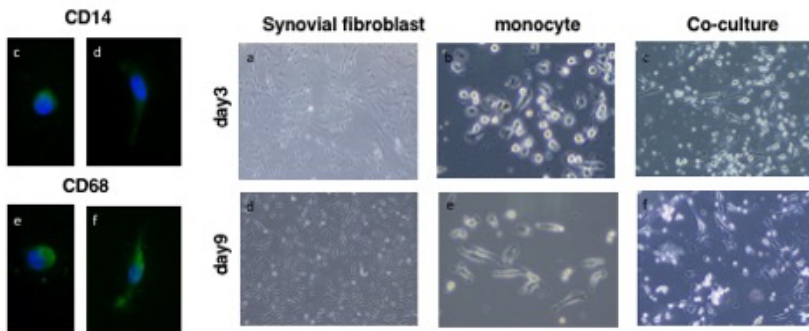
そこで、NF κ B および MAPK 経路に働くキナーゼ阻害剤を滑膜細胞に作用させて IL-6 産生量を測定した。その結果、NF κ B および P38MAPK 阻害剤によって、IL-6 産生は減少した。特に、NF κ B 阻害剤では 98.8% 阻害した。さらに、NF κ B 活性化経路について詳細に調べたところ、IL-1 レセプターや TLR の直下で働く IRAK 阻害剤でも IL-6 産生が減少した。

120 kDa FN-F 刺激で上昇した IL-6 は破骨細胞の誘導や B リンパ球の成熟化に、CXCL1 および CXCL8 は好中球走化や血管新生に、TNF は炎症の誘発や炎症性因子の産生に、COX-2 は刺激誘導性に産生される PGE2 の律速段階酵素であり、PGE2 は血管拡張、血管透過性亢進および発痛に関与している。

以上の結果から、120 kDa FN-F は顎関節の炎症および骨破壊を亢進させる内在性リガンドの可能性が示唆された。

(2) 顎関節の慢性炎症プロセスの検討

滑膜細胞にフィブロネクチン分解産物を作用させ時、発現上昇した遺伝子群には多くのケモカインファミリーメンバーが認められた。ケモカインは血管から炎症部位へ各種血球細胞を遊走させる働きがある。さらに、一部のケモカインは、血管新生を誘導する。よって、滑膜炎の発症および慢性化の機序を明らかにするには、滑膜細胞と炎症性細胞とのクロストークについて調べる必要があると考えられる。そこで、末梢血由来の単球 (CD14, CD68 陽性細胞) と滑膜細胞を共培養し、顎関節内障患者滑液で上昇しているサイトカイン濃度を測定した。



滑膜細胞または単球の単独培養に比べて、共培養では IL-6, IL-8 および IL-1 β のタンパク質産生量は著しく上昇した。IL-1 β は、不活性型である前駆体 (pro-IL-1 β) として合成された後、インフラマソームが活性化されることによってカスパーゼ 1 が活性化し、成熟 IL-1 β として細胞外へ放出される。インフラマソームは IL-1 β の転写促進とは別に病原菌や尿酸などによって活性化される必要がある。本研究の結果から、滑膜細胞と単球のクロストークによって、インフラマソームが活性化される可能性が示唆された。

細胞外基質フィブロネクチンは代謝や基質分解酵素によって小分子化する。この分解産物が刺激となって滑膜細胞のケモカイン産生が上昇する。産生されたケモカインによって血液から単球等の炎症性細胞が滑膜組織中へ遊走してくる。滑膜細胞と単球 (炎症性細胞) が接触することによって、IL-1 β の産生および細胞外への放出が促進されることが視された。フィブロネクチン分解産物が内在性リガンドとなり、非感染性の慢性炎症が起こる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

① 鈴木麻由, 小倉直美, 矢野照雄, 高橋康輔, 山崎文恵, 渡辺 駿, 石上大輔, 清水 一, 伊藤 耕, 近藤壽郎. ヒト顎関節滑膜細胞の Monocyte chemotactic protein 産生に対するフィブロネクチンフラグメントの影響. 日本顎関節学会雑誌, 査読有, 31 (1): 8-14, 2019. <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/gakukansetsu/-char/ja/>

② 河島 睦, 小倉直美, 矢野照雄, 石上大輔, 渡辺 駿, 服部俊夫, 福里英彦, 伊藤 耕, 近藤壽郎. 遺伝子発現プロファイリングを用いた IL-1 β 刺激顎関節滑膜細胞に対する COX 阻害剤の抗炎症効果の解析. 日本歯科薬物療法学会雑誌, 査読有, 38 (1): 15-21, 2019. <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jsotpl/-char/ja/>

③ Teruo Yano, Naomi Ogura. CXCL1, 2, and 3 Expression Stimulated by Fibronectin Fragments in Synovial Fibroblasts from Human Temporomandibular Joints. International Journal of Oral-Medical Sciences, 査読有, 16 (3,4): 70-77, 2018. 10.5466/ijoms.16.39.

④ 矢野照雄, 小倉直美, 河島 睦, 高橋康輔, 服部俊夫, 渡辺 駿, 石上大輔, 鈴木麻由, 清水 一, 伊藤 耕, 近藤壽郎. ヒト顎関節滑膜細胞における MMP-1 および MMP-3 産生に対する TNF- α の影響. 日本顎関節学会雑誌, 査読有, 29(2): 100-107. 2017. <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/gakukansetsu/-char/ja/>

[学会発表] (計 10 件)

① 鈴木麻由, 小倉直美, 伊藤 耕, 近藤壽郎, 他 6 名. フィブロネクチン分解産物を作用した培養ヒト顎関節滑膜細胞の経時的遺伝子発現解析. 第 63 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会, 2018.

② 鈴木麻由, 小倉直美, 伊藤 耕, 近藤壽郎, 他 7 名. ヒト顎関節滑膜細胞の MCPs 産生に対する FN-Fs の影響. 第 31 回一般社団法人日本顎関節学会総会・学術大会, 2018.

- ③ 鈴木麻由, 小倉直美, 伊藤 耕, 近藤壽郎、他 7 名. 30 kDa フィブロネクチン分解産物が培養ヒト顎関節滑膜細胞に与える影響. 第 72 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会、2018.
- ④ 矢野照雄, 小倉直美, 伊藤 耕, 近藤壽郎、他 6 名. フィブロネクチン分解産物刺激培養ヒト顎関節滑膜細胞の網羅的遺伝子発現解析. 第 62 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会、2017.
- ⑤ 石上大輔, 小倉直美, 伊藤 耕, 近藤壽郎、他 6 名. 顎関節滑膜細胞の MCPs 産生における IL-17 の影響. 第 30 回 (一般社団法人) 日本顎関節学会総会. 学術大会、2017.
- ⑥ 矢野照雄, 小倉直美, 伊藤 耕, 近藤壽郎、他 6 名. ヒト顎関節滑膜細胞の炎症性因子に対するフィブロネクチン分解産物の影響. 第 71 回 (NPO 法人) 日本口腔科学会学術集会、2017.
- ⑦ 渡邊 駿, 小倉直美, 伊藤 耕, 近藤壽郎、他 6 名. ヒト顎関節滑膜細胞の BM-CSF および G-CSF 産生における IL-1 β および TNF- α の相乗効果. 第 61 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会、2016.
- ⑧ 矢野照雄, 小倉直美, 伊藤 耕, 近藤壽郎、他 6 名. ヒト顎関節滑膜細胞に対するフィブロネクチン分解産物の影響. 第 61 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会、2016.
- ⑨ 矢野照雄, 小倉直美, 伊藤 耕, 近藤壽郎、他 4 名. ヒト顎関節滑膜細胞における MMP-1 産生に対する TNF- α の影響. 第 29 回一般社団法人日本顎関節学会総会・学術大会、2016.
- ⑩ 渡邊 駿, 小倉直美, 伊藤 耕, 近藤壽郎、他 4 名. IL-1 β および TNF- α 刺激ヒト顎関節滑膜由来線維芽細胞様細胞における M-CSF, GM-CSF, G-CSF の発現. 第 70 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会、2016.

[図書] (計 2 件)

- ① 近藤壽郎 他. 日本医事新報社. 1336 専門家による私の治療, 2017-18 年度版. 2017, 1-1734 (1423-1426).
- ② 近藤壽郎 他. クインテッセンス出版、カラーアトラス 顎関節外科の手術手技. パンピングから関節鏡, 円板切除, 全置換術まで. 2016, 219 (7-14).

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小倉 直美
ローマ字氏名：OGURA naomi
所属研究機関名：日本大学
部局名：松戸歯学部
職名：講師
研究者番号 (8 桁)：10152448

研究分担者氏名：伊藤 耕
ローマ字氏名：ITO ko
所属研究機関名：日本大学
部局名：松戸歯学部
職名：講師
研究者番号 (8 桁)：20419758

(2)研究協力者

研究協力者氏名：渡辺 駿
ローマ字氏名：WATANABE suguru
研究協力者氏名：矢野 照雄
ローマ字氏名：YANO teruo
研究協力者氏名：鈴木 麻由
ローマ字氏名：SUZUKI mayu

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。