

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09833

研究課題名(和文) 変形性顎関節症の軟骨破壊に対するAngptl2の作用機序解明と新規治療法への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of Angptl2 on cartilage destruction in osteoarthritis of the jaw and its application to new therapies

研究代表者

麻川 由起(丹根由起)(Asakawa, Yuki)

広島大学・医系科学研究科(歯)・助教

研究者番号：50526241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：変形性顎関節症(TMJ-OA)は、下顎頭軟骨の破壊や骨の変形、円板の穿孔などを主徴とする疾患である。私たちはこれまで機械的負荷に着目し、生理的範囲を超えた機械的負荷が下顎頭軟骨破壊を引き起こすメカニズムについて解明してきた。本研究では、これまでの研究をさらに発展させ、慢性炎症のkey factorであるアンジオポエチン様タンパク質2(angiotensin-like protein: Angptl2)のTMJ-OAにおける下顎頭軟骨破壊への作用機序について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、ANGPTL2添加後の基質分解酵素の遺伝子発現の亢進は比較的迅速かつ顕著に生じていることにより、ANGPTL2は軟骨細胞においても基質分解酵素を強力に誘導する可能性が示唆された。さらに、ANGPTL2添加により、受容体であるIntegrin $\alpha 5$ および $\beta 1$ の遺伝子発現が亢進したことより、ANGPTL2が炎症を相乗的に増強させる因子であると考えられる。ANGPTL2を制御することが軟骨細胞における抗炎症作用を発揮することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Temporomandibular joint disease (TMJ-OA) is a disease whose main symptoms are destruction of mandibular condyle cartilage, bone deformation, and perforation of discs. We have focused on mechanical load and elucidated the mechanism by which mechanical load beyond the physiological range causes mandibular cranial cartilage destruction. In this study, we will further develop the previous studies and examine the mechanism of angiotensin-like protein (Angptl2), which is a key factor of chronic inflammation, on mandibular cranial cartilage destruction in TMJ-OA.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：変形性顎関節症 Angptl2

1. 研究開始当初の背景

変形性顎関節症 (TMJ-OA) は、下顎頭軟骨の破壊や骨の変形、円板の穿孔などを主徴とする疾患である。吸収・変形した軟骨を修復することは困難であり、再発する可能性も高いことより、歯科臨床において治療が困難な疾患の一つとされている。したがって、TMJ-OA における下顎頭軟骨破壊機序の解明とその進行に対する新規治療の開発が求められている。

近年、脂肪細胞より分泌される Angptl2 が脂肪組織における血管の炎症性病態や炎症性細胞の浸潤を惹起していることが明らかとなり、慢性炎症の key factor として注目されている。これまでの報告から、Angptl2 が OA 病態の進行に何らかの作用を及ぼしていることが推察されるが、TMJ-OA の病態に対する Angptl2 の詳細なメカニズムは未だ不明であり、国内外において全く報告がない。私たちはこれまで機械的負荷に着目し、生理的範囲を超えた機械的負荷が下顎頭軟骨破壊を引き起こすメカニズムについて解明してきた。過度な機械的負荷は、MAPK および NF κ B シグナル伝達経路を活性化することで、炎症性メディエーターの発現を亢進するが、その発現調節にインテグリン α 5 β 1 が関与していることが明らかとなった。インテグリン α 5 β 1 を介した Angptl2 の作用が報告されていることより、Angptl2 による軟骨基質代謝の調節機構にインテグリン α 5 β 1 が関与していると考え、本研究計画立案に至った。

2. 研究の目的

本研究は、慢性炎症の key factor である Angptl2 の TMJ-OA における下顎頭軟骨破壊への作用機序を解明し、Angptl2 不活性化による TMJ-OA の新規治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

まず、下顎頭由来軟骨細胞における軟骨基質代謝因子発現に対する Angptl2 の作用機序を解明するために、CRISPR-dCas9 活性化プラズミドを用いて Angptl2 の活性化および Angptl2 siRNA を遺伝子導入し発現抑制する。過度な機械的伸張刺激を負荷後、total RNA および蛋白を精製し、現有するサーマルサイクラー (Light cycler 350s) および近赤外蛍光イメージャー (Odyssey) を用いて、軟骨基質代謝因子 (MMPs, COX-2, Aggrecanase) 発現の検討を行う。培養上清中の PGE2 および Angptl2 活性について、ELISA 解析を行う。さらに、Angptl2 活性化および発現抑制後、NF- κ B および MAP キナーゼ (ERK, JNK, p38) 活性の変化を Western blot 法にて分析する。さらに、インテグリン a5b1 中和抗体を用いて、Angptl2 のシグナリング経路へのインテグリンの関与について検証する。

次に、Angptl2 がラット TMJ-OA モデルにおける下顎頭軟骨破壊に及ぼす影響について検討を行った。本研究では、6 週齢 Wistar 系雄性ラットに 10 日目より、一日一時間 30 mm の強制開口を 20 日間行い、TMJ-OA モデルを作製する。実験側にはリコンビナント Angptl2 を、コントロール側には生理食塩水を顎関節腔内投与し、比較検討を行う。30 日間の実験終了後、ラット頭部を摘出し、顎関節矢状面の組織切片を作製する。H-E 染色およびトルイジンブルー染色を行い、病理組織学的に検討する。また、インテグリン a5b1、Angptl2、TLL1 発現分布について免疫組織学的に検討する。

4. 研究成果

6 週齢雄性ラットの下顎頭軟骨層より軟骨細胞を採取、培養し、現有する培養細胞伸展機 (Flexercell Strain Unit) を用いて過度な機械的負荷 (15 kPa, 毎分 30 分) を与えた。培養軟骨細胞において、過度な機械的負荷により Angptl2 遺伝子発現は有意に増加した。さらに、Angptl2 過剰発現および siRNA による発現抑制が軟骨基質代謝因子発現に及ぼす影響について検討を行った。まず、CRISPR-dCas9 活性化プラズミドを用いて Angptl2 の活性化および Angptl2 siRNA を遺伝子導入し発現抑制した。過度な機械的伸張刺激を負荷後、軟骨基質代謝因子 (MMPs, COX-2, Aggrecanase) 発現の検討を行ったところ、Angptl2 過剰発現により MMP-3, 13, COX-2, Aggrecanase 発現の上昇が認められた。また、炎症性サイトカイン発現については、IL-1 β , TNF- α 発現が有意に上昇した。それに対し、siRNA による Angptl2 発現抑制は軟骨基質代謝因子および炎症性サイトカインの発現を抑制することが明らかとなった。さらに、リコンビナント Angptl2 を培養軟骨細胞に添加したところ濃度依存的に軟骨基質代謝因子および IL-1 β , TNF- α 発現が上昇することが明らかとなった。また、リコンビナント Angptl2 の最適濃度 1.0 μ g/ml と判断した。過度な機械的伸張刺激を負荷した状態で、CRISPR-dCas9 活性化プラズミドを用いて Angptl2 の活性化後、NF- κ B および MAP キナーゼ (ERK, JNK, p38) 活性への影響を Western blot 法にて分析を行った。ANGPTL2 の活性化 10 分後より 3 つの MAPK 全てのリン酸化が亢進し、10 分後より Akt のリン酸化が誘導された。さらに、20 分以降 NF- κ B のリン酸化は亢進することが明らかとなった。次に、インテグリン α 5 β 1 の Angptl2 経路への関与を検討するために、インテグリン α 5 β 1 中和抗体による炎症関連因子への影響について real-time PCR 解析および western blot 解析を行った。Integrin α 5 β 1 中和抗体添加によって、ANGPTL2 活性化後の ANGPTL2、IL-1 β 、TNF- α 、COX-2、ADAMTS-5、

MMP-3 および MMP-13 の遺伝子発現は抑制された。また、Integrin $\alpha 5\beta 1$ 中和抗体添加によって、ANGPTL2、COX-2、MMP-13 のタンパク質発現を抑制することが明らかとなった。さらに、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ 中和抗体によるシグナリング経路への影響を検討したところ、Integrin $\alpha 5\beta 1$ 中和抗体添加により、ANGPTL2 添加によって亢進した ERK、JNK、Akt のリン酸化は有意に抑制され、p38、NF- κ B のリン酸化はわずかに抑制された。

次に、Angptl2 がラット TMJ-OA モデルにおける下顎頭軟骨破壊に及ぼす影響について検証を行った。本研究では、6 週齢 Wistar 系雄性ラット に 10 日目より、一日一時間 30 mm の強制開口を 20 日間行い、TMJ-OA モデルを作製した。ラット TMJ-OA モデル下顎頭の組織変化を検討した結果、H-E 染色像ではラット軟骨層において層状構造の乱れや軟骨細胞の消失が認められた。また、サフラニン O 染色像では実験群のラット軟骨層においてサフラニン O 染色性の低下が認められた。さらにトルイジンブルー染色では軟骨組織のトルイジンブルー染色性低下が認められた。ラット TMJ-OA モデル実験側 にはリコンビナント Angptl2 を、コントロール側には生理食塩水を顎関節腔内投与し、比較検討を行ったところ、組織像には大きな変化は認められなかった。しかしながら、リコンビナント Angptl2 添加群では IL-1 β 、TNF- α 、COX-2、MMP-13 発現の亢進が認められた。Angptl2 が下顎頭軟骨において炎症関連因子を増加していることが明らかとなった。組織学的影響を検証するためには、Angptl2 の投与期間のさらなる検討が必要と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yanoshita M, Hirose N, Sumi C, Takano M, Nishiyama S, Tsuboi E, Onishi A, Yamauchi Y, Asakawa Y, Ryo K, Tanimoto K.	4. 巻 26(8)
2. 論文標題 FAK inhibition protects condylar cartilage under excessive mechanical stress.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Dis.	6. 最初と最後の頁 1736-1746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hirose N, Okamoto Y, Yanoshita M, Asakawa Y, Sumi C, Takano M, Nishiyama S, Su SC, Mitsuyoshi T, Kunimatsu R, Tanne K, Tanimoto K.	4. 巻 44(4)
2. 論文標題 Protective effects of cilengitide on inflammation in chondrocytes under excessive mechanical stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Biol Int.	6. 最初と最後の頁 966-974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takano M, Hirose N, Sumi C, Yanoshita M, Nishiyama S, Onishi A, Asakawa Y, Tanimoto K	4. 巻 13
2. 論文標題 ANGPTL2 Promotes Inflammation via Integrin 5 1 in Chondrocytes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cartilage	6. 最初と最後の頁 885-897
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1947603519878242	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sumi Chikako, Hirose Naoto, Yanoshita Makoto, Takano Mami, Nishiyama Sayuri, Okamoto Yuki, Asakawa Yuki, Tanimoto Kotaro	4. 巻 2018
2. 論文標題 Semaphorin 3A Inhibits Inflammation in Chondrocytes under Excessive Mechanical Stress	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mediators of Inflammation	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/5703651	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yanoshita Makoto, Hirose Naoto, Okamoto Yuki, Sumi Chikako, Takano Mami, Nishiyama Sayuri, Asakawa-Tanne Yuki, Horie Kayo, Onishi Azusa, Yamauchi Yuka, Mitsuyoshi Tomomi, Kunimatsu Ryo, Tanimoto Kotaro	4. 巻 41
2. 論文標題 Cyclic Tensile Strain Upregulates Pro-Inflammatory Cytokine Expression Via FAK-MAPK Signaling in Chondrocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 1621 ~ 1630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10753-018-0805-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanimoto Kotaro, Awada Tetsuya, Onishi Azusa, Kubo Naoki, Asakawa Yuki, Kunimatsu Ryo, Hirose Naoto	4. 巻 11
2. 論文標題 Characteristics of the Maxillofacial Morphology in Patients with Idiopathic Mandibular Condylar Resorption	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 952 ~ 952
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11040952	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 大西 梓、廣瀬尚人、麻川 由起、粟田 哲也、矢野下 真、高野 真実、山内 優佳、西山 沙由里、壺井 英里、久保 尚毅、谷本幸太郎
2. 発表標題 広島大学矯正歯科における過去5年間の顎関節症患者に関する統計調査
3. 学会等名 第33回日本顎関節学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Eri Tsuboi, Yuki Asakawa, Naoto Hirose, Makoto Yanoshita, Mami Takano, Sayuri Nishiyama, Naoki Kubo, Azusa Onishi, Yuka Yamauchi, Kotaro Tanimoto
2. 発表標題 Role of Semaphorin3A in endochondral ossification of mandibular condyle
3. 学会等名 第9回国際矯正歯科会議世界大会・第12回アジア太平洋矯正歯科学会・第79回日本矯正歯科学会学術大会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢野下 真、廣瀬尚人、高野真実、西山沙由里、壺井英里、大西 梓、山内 優佳、久保尚毅、麻川由起、谷本幸太郎
2. 発表標題 軟骨に対する過度な機械的負荷時のFAK-MAPKsカスケードによる炎症反応メカニズムの解明
3. 学会等名 第33回日本顎関節学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣瀬尚人、矢野下 真、高野真実、西山沙由里、大西 梓、久保 尚毅、麻川 由起、谷本幸太郎
2. 発表標題 セマフォリン3Aは軟骨において過度な機械的負荷による炎症発現を抑制する
3. 学会等名 第33回日本顎関節学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高野 真実、廣瀬尚人、矢野下 真、西山 沙由里、壺井 英里、大西 梓、山内 優佳、麻川 由起、谷本幸太郎
2. 発表標題 軟骨細胞におけるANGPTL2による炎症促進メカニズムの解明
3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会第7回日韓ジョイントミーティング(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野下 真、廣瀬 尚人、高野 真実、西山沙由理、大西 梓、山内 優佳、麻川 由起、谷本幸太郎
2. 発表標題 下顎頭軟骨への過度な圧迫負荷付与時のFAK阻害剤の抗炎症効果
3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会第7回日韓ジョイントミーティング(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野下 真、廣瀬尚人、角 千佳子、高野真実、西山沙由理、麻川由起、谷本幸太郎
2. 発表標題 下顎頭軟骨への過度な機械的負荷受容時のFAK阻害剤の抗炎症作用の検討
3. 学会等名 第57回広島県歯科医会 第102回広島大学歯学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 角 千佳子、廣瀬尚人、矢野下真、高野真実、西山沙由理、壺井英里、麻川由起、谷本幸太郎
2. 発表標題 軟骨細胞におけるSemaphorin3Aの役割－退行性関節疾患の新規治療薬を目指して
3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢野下 真、廣瀬尚人、西山沙由里、壺井英里、大西 梓、山内優佳、久保尚毅、北 大樹、麻川由起、谷本幸太郎
2. 発表標題 ヒト滑膜細胞においてレゾルピンD1はp-38, NF-kBおよびAKTシグナルを介して炎症反応を抑制する
3. 学会等名 第34回日本顎関節学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	谷本 幸太郎 (Tanimoto Kotaro) (20322240)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授 (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	國松 亮 (Kunimatsu Ryo) (40580915)	広島大学・医系科学研究科(歯)・准教授 (15401)	
研究分担者	廣瀬 尚人 (Hirose Naoto) (50611935)	広島大学・病院(歯)・講師 (15401)	
研究分担者	粟田 哲也 (Awada Tetsuya) (90758179)	広島大学・医系科学研究科(歯)・助教 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関