

平成22年 3 月 31日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19592318
 研究課題名 (和文) 顎関節内障に関連する病態因子のゲノミクスおよび
 プロテオミクス研究
 研究課題名 (英文) Studies of genomics and proteomics for pathologic factors
 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

研究成果の概要 (和文)：顎関節内障病態形成に関与する因子の検索を目的として、ヒト培養顎関節滑膜細胞に interleukin (IL)-1 β および tumor necrosis factor (TNF)- α を作用させる in vitro 滑膜炎モデルを用いて、網羅的に遺伝子発現量およびタンパク質産生量を解析した。また、in vivo ラット顎関節滑膜炎モデルを作製し、マイクロアレイ解析で候補にあがった病態関連因子を検証した。病態形成に関与する因子の検索は新規の診断および治療の開発に有意義である。

研究成果の概要 (英文)：Synovitis that often accompanies intracapsular pathologic conditions is characterized by chronic inflammatory changes in the temporomandibular joint (TMJ). We have investigated of IL-1 β or TNF- α -responsive genes in synoviocytes for putative genes associated with the synovitis using microarray analysis because IL-1 β and TNF- α elevated in synovial fluids obtained from TMJ with pathologic conditions. Then, the protein levels of IL-1 β or TNF- α -responsive factors have been investigated in synovitis models in vitro and in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：顎関節内障, 顎関節滑膜細胞, GeneChip 解析, Antibody Array,
 Chemokine, interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α

1. 研究開始当初の背景

近年、全ヒトゲノムの解読も終わり、ポスト・ゲノム研究が進行し、各疾患の分子標的治療法が期待されている。しかし、顎関節内障の治療は痛みの軽減や開口障害の回復を目

的とした対症療法が主体である。滑液解析から発症および病態形成に関与する因子も報告されているが、分子生物学的研究は立ち後れている。そこで、顎関節内障の分子生物学的研究推進のため、培養顎関節滑膜細胞系で病

態関連因子を網羅的に解析後、パスウェイ解析で分子間相互作用を明らかにする。

2. 研究の目的

(1) 顎関節内障病態のゲノミクス研究

顎関節内障病態関連遺伝子の検索を目的に、顎関節内障患者由来滑膜細胞(滑膜細胞)に顎関節内障患者滑液で上昇しているIL-1 β またはTNF- α を作用させ、GeneChip解析を行う。

(2) 顎関節内障病態のプロテオミクス研究

顎関節内障病態関連物質の検索を目的に、滑膜細胞にIL-1 β またはTNF- α 刺激を行い、antibody array解析等でタンパク質を測定する。

(3) in vivo 顎関節滑膜炎モデルでの検証

GeneChip解析やantibody array解析の結果、顎関節病態関連因子として候補に上がったものが、in vivoでも発現上昇しているか検証を行う。

3. 研究の方法

(1) 顎関節滑膜細胞の分離・培養

関節鏡視下洗浄療法の際に採取した顎関節滑膜組織から、out growth法にてヒト顎関節滑膜細胞を分離し、培養を行った。

(2) GeneChip解析

滑膜細胞にIL-1 β またはTNF- α 刺激を行い、total RNAを抽出後、in vitro transcriptionを行い、GeneChipへhybridizeした。洗浄・染色後、蛍光強度をスキャナーで測定した。GeneSpringを用いて、遺伝子発現解析を行った。

(3) 経時的発現量の測定

遺伝子発現の経時変化はRT-PCR, real time-PCRを用いて、タンパク質の産生量の経時変化はELISA法を用いて測定した。

(4) Pathway Analysis

Ingenuity Pathway Knowledge Databaseを用いて、発現変動が認められた因子の分子間相互作用を調べた。

(5) Antibody Array

滑膜細胞にTNF- α 刺激を行い、培養上清を採取し、antibody array (RayBio, chemokine array)にhybridizeし、通法に従い、X線フィルムに感光した。Pheretix 2D Evolutionを用いてスポットを定量した。

(6) 顎関節滑膜炎モデルラットの作製

Lewisラットの顎関節腔内にIL-1 β を注入し、24時間後組織学的に観察した。対照は顎関節腔内に生理食塩水を注入した。

(7) 組織学的検索

実験終了後、灌流固定を行い、顎関節はホルマリン固定、蟻酸による脱灰を行った。パラフィン包埋後、薄切切片を作製し、Hematoxylin-Eosin染色を行った。また、Histofin SAB-PO kitを用いて免疫組織化学染色を行った。

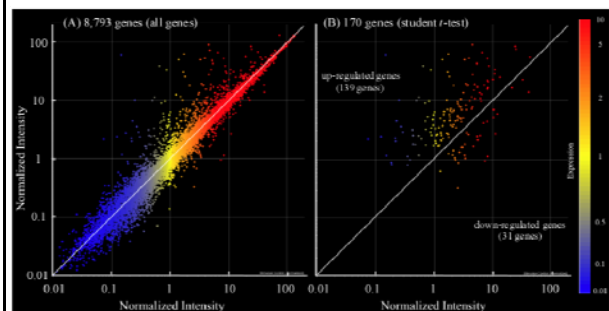
4. 研究成果

(1) IL-1 β による影響

① IL-1 β 刺激顎関節滑膜細胞の

遺伝子発現プロファイリング

顎関節滑膜細胞をIL-1 β で4時間刺激した時の遺伝子発現変動を調べた。顎関節内障患者5名から採取した滑膜細胞5例は、個別にGeneChipで発現量を測定し、student *t*-testを用いて発現変動のある遺伝子を検索した。



約8500遺伝子中IL-1 β によって有意に発現変動したのは170遺伝子で、発現上昇したのは139遺伝子、発現減少したのは31遺伝子であった。

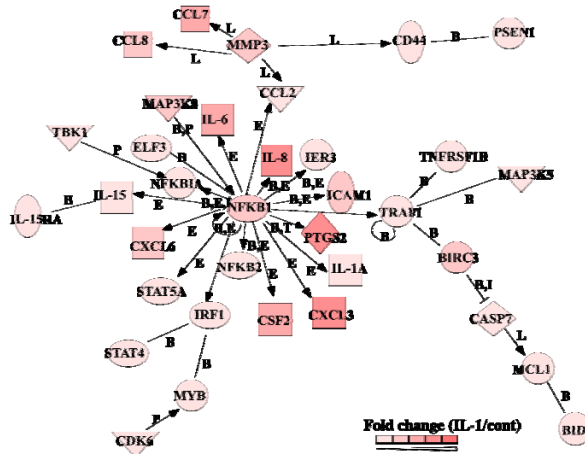
Up-regulated genes by treatment with IL-1 β

Rank*	Gene	Claccrank	Fold change# (IL-1 β /Control)	Gene title_Affy
1	CCL20	NM_004591	413.6	chemokine (C-C motif) ligand 20
2	CXCL3	NM_002090	60.8	chemokine (C-X-C motif) ligand 3
3	BCL2A1	NM_004049	43.0	BCL2-related protein A1
4	PTGS2	NM_000963	38.9	prostaglandin-endoperoxide synthase 2
5	CXCL2	M57731	36.3	chemokine (C-X-C motif) ligand 2
6	IL-8	AF043337	35.6	interleukin 8
7	CSF3	NM_000759	29.4	colony stimulating factor 3 (granulocyte)
8	CCL7	NM_006273	21.0	chemokine (C-C motif) ligand 7
9	IL-1B	M15330	20.5	interleukin 1, beta
10	IL-6	NM_000600	19.9	interleukin 6

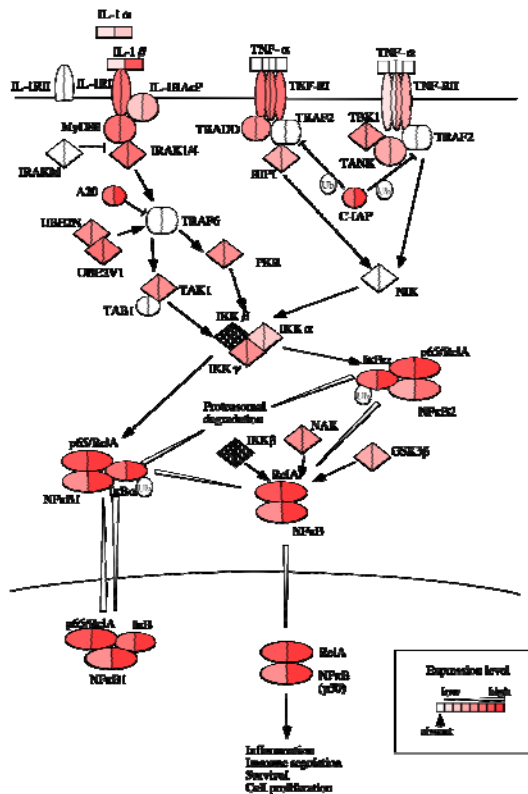
IL-1 β による発現上昇率の高いRank top 10の遺伝子を示した。Top 10にはchemokine遺伝子が多く認められた。

② Pathway 解析

IL-1 β によって発現変動したのは170遺伝子についてPathway解析を行った



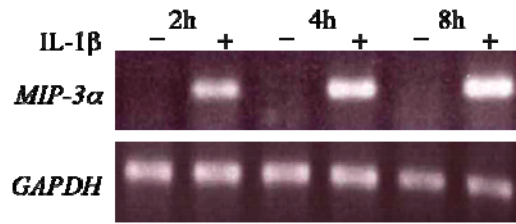
NF κ Bを中心とするnetworkが形成された。そこで、NF κ B signaling pathwayを調べた。



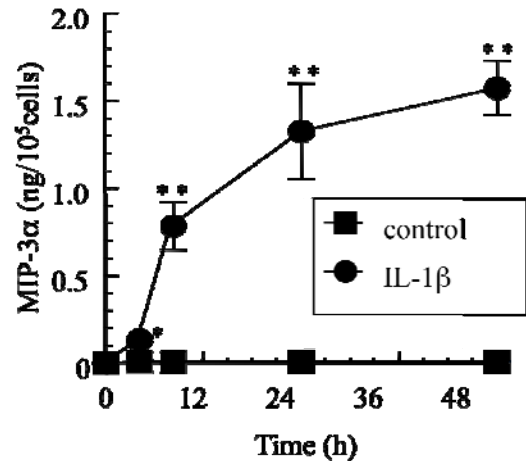
滑膜細胞はIL-1 β 刺激によりNF κ B signalingが亢進していることが認められた。

③ IL-1 β 刺激滑膜細胞におけるCCL20 (MIP3 α)発現変動

GeneChip解析の結果、最も発現上昇したのはCCL20 (MIP3 α)であった。そこで、CCL20について経時的な遺伝子発現およびタンパク質産生量を測定した。



IL-1 β 刺激8時間までCCL20 mRNA量は経時的に上昇した。



IL-1 β 刺激48時間まで培養上清中のCCL20タンパク質量は経時的に上昇した。

④ IL-1 β 刺激滑膜細胞におけるCOX遺伝子発現およびPGE2産生

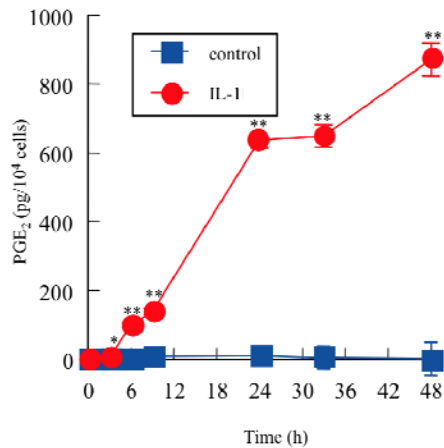
GeneChip解析の結果、発現上昇top 10にはいたっていたPTGS2 (cyclooxygenase-2; COX-2)について経時的な遺伝子発現およびPGE2産生量を測定した。

mRNA levels of COX-1 and COX-2 in synovial fibroblasts

Time (h)	FLS6		FLS7	
	COX-1 Fold (IL-1/control)	COX-2 Fold (IL-1/control)	COX-1 Fold (IL-1/control)	COX-2 Fold (IL-1/control)
2h	0.50	1.81	0.49	1.71
4h	1.39	42.42	1.52	23.71
8h	1.37	18.99	0.91	6.55

IL-1 β 刺激によりCOX-2 mRNA量は上昇が認められ、刺激4時間がピークであった。一方、COX-1 mRNA量は変わらなかった。

次に、COXによって産生されるProstaglandin E2 (PGE2)量について測定した。



滑膜細胞培養上清中の PGE₂ は IL-1 β 刺激時間に応じて上昇した。

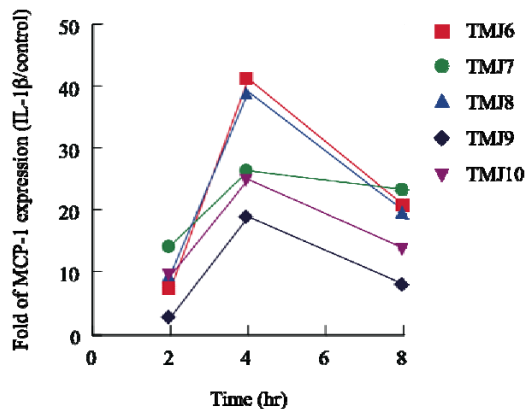
⑤ IL-1 β 刺激滑膜細胞における CCL2 (MCP-1) 発現変動

GeneChip 解析の結果, IL-1 β 刺激滑膜細胞で発現が高い遺伝子上位に, CCL2 (MCP-1) が認められた。

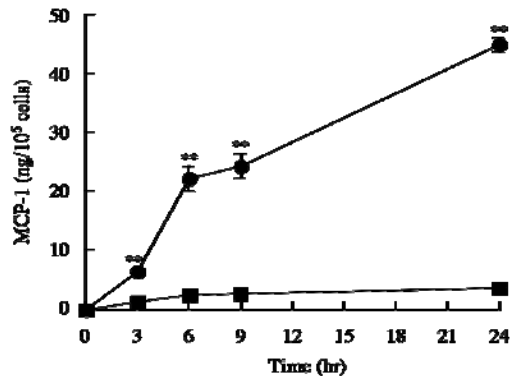
IL-1 β 刺激滑膜細胞で発現が高い遺伝子

Gene Symbol	GeneRank	Intensity of L-1 β -stimulated samples ^a	Tibia_Affy
(average \pm SD)			
IL6	NM_000800	82.4 \pm 10.9	interleukin 6 (inversinon, beta 2)
CCL2	S88738	84.5 \pm 14.1	chemokine (C-C motif) ligand 2
IRS3	NM_003897	74.9 \pm 18.6	insulin-like growth factor 3
TNFAIP2	NM_006291	66.0 \pm 3.8	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2
IL6	AF043337	61.7 \pm 10.8	interleukin 6
CCL20	NM_005911	59.8 \pm 14.6	chemokine (C-C motif) ligand 20
CD44	U03009	53.7 \pm 7.3	CD44 antigen
(Chemokine function an (beta blood group system)			
MMP3	NM_002422	53.1 \pm 20.4	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)
TNFAIP3	NM_006290	51.8 \pm 10.7	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3
CCL2	U57731	50.0 \pm 11.1	chemokine (C-C motif) ligand 2

CCL2 (MCP-1) について経時的な遺伝子発現量およびタンパク質産生量を測定した。

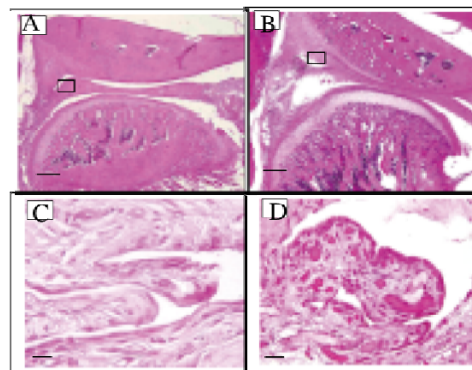


滑膜細胞 5 例いずれも IL-1 β 刺激 4 時間が CCL2 遺伝子発現のピークであった。



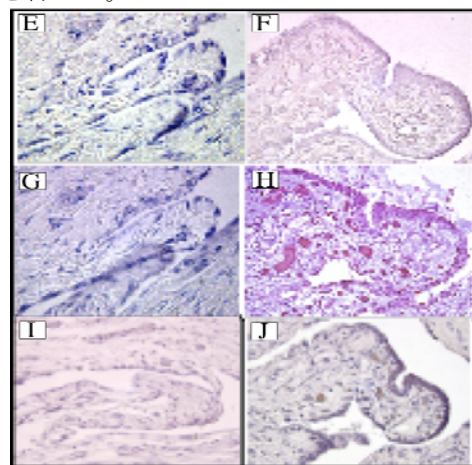
IL-1 β 刺激 24 時間まで培養上清中の CCL2 タンパク質量は経時的に上昇した

⑥ IL-1 β 誘導顎関節滑膜炎モデルラット 培養ヒト顎関節滑膜細胞を用いた invitro 滑膜炎モデルの結果が生体内でも起こるのかを調べるために, ラット顎関節腔内に IL-1 β を投与し, 顎関節部を組織学的に関節した。



HE 染色. A, C : control, B, D : IL-1 β IL-1 β を投与した顎関節滑膜部位では毛細血管の拡張, 滑膜表層の肥厚化等滑膜炎症状が認められた。

次に, GeneChip 解析で発現上昇が認められた COX-1, COX-2, MCP-1 の免疫組織化学染色を行った。



E, G, I: control, F, H, J: IL-1 β
E, F: COX-1, G, H: COX-2, I, J: MCP-1

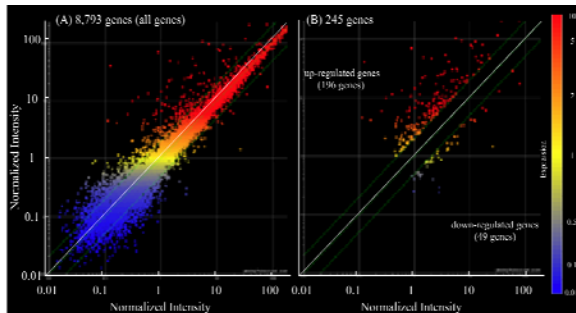
IL-1 β を投与した顎関節滑膜部位では、COX-1, COX-2, MCP-1 陽性細胞が認められた。生理食塩水を投与した control では COX-1 陽性細胞が確認されたが、COX-2, MCP-1 陽性細胞は認められなかった。

(2) TNF- α による影響

① TNF- α 刺激顎関節滑膜細胞の

遺伝子発現プロファイリング

顎関節滑膜細胞を TNF- α で 4 時間刺激した時の遺伝子発現変動を調べた。顎関節内障患者 3 名から得られた滑膜細胞 3 例は個別に GeneChip で発現量を測定し、発現解析は 3 例の平均値で行った。



約 8500 遺伝子中 TNF- α によって発現変動したのは 245 遺伝子で、発現上昇したのは 196 遺伝子、発現減少したのは 49 遺伝子であった。

Up-regulated genes by treatment with TNF- α

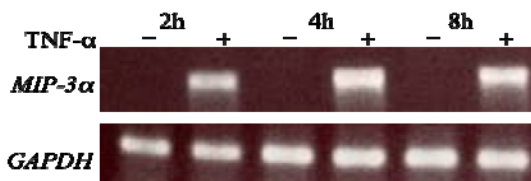
Rank*	Gene	Genebank	Fold change [#] (TNF- α /Control)	Gene title_Affy
1	CCL20	NM_004591	245.8	chemokine (C-C motif) ligand 20
2	CXCL8	AF043337	81.1	chemokine (C-X-C motif) ligand 8
3	IL-15	M11734	40.5	interleukin 15
4	ICAM1	NM_000201	33.9	intracellular adhesion molecule 1
5	CXCL3	NM_002090	32.9	chemokine (C-X-C motif) ligand 3
6	CXCL10	NM_001365	29.4	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
7	BCL2A1	NM_004049	25.8	BCL2-related protein A1
8	GCH1	NM_000161	23.2	GTP cyclohydrolase 1
9	NUDT9	NM_018725	23.1	Nudix typ motif 9
10	CX3CL1	U84487	22.8	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1

TNF- α による発現上昇率の高い rank top 10 の遺伝子を示した。Chemokine 遺伝子が多く認められた。

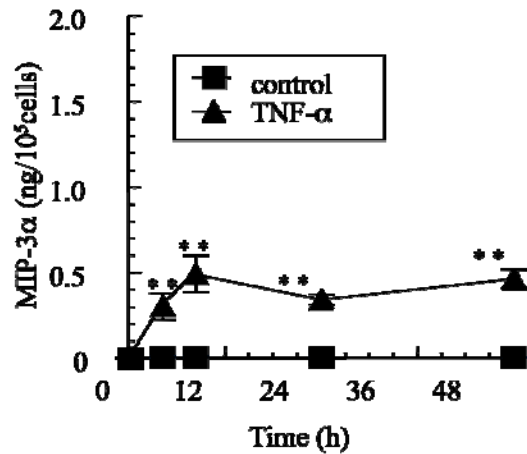
② TNF- α 刺激滑膜細胞における

CCL20 (MIP3 α) 発現変動

GeneChip 解析の結果、最も発現上昇した IL-1 β と同様に CCL20 (MIP3 α) であった。そこで、CCL20 の経時的な遺伝子発現およびタンパク質産生量を測定した。



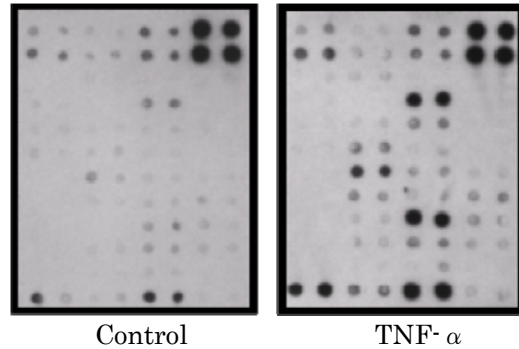
TNF- α 刺激 8 時間まで CCL20 mRNA 量は経時的に上昇した。



TNF- α 刺激 12 時間まで CCL20 タンパク質量は上昇し、48 時間までプラトーであった。CCL20 タンパク質産生量は、IL-1 β 刺激に比べて TNF- α 刺激ではは少なかった。

③ Antibody Array 解析

GeneChip 解析の結果、TNF- α 刺激で多数の chemokine 遺伝子が発現変動した。そこで、TNF- α 刺激した滑膜細胞の培養上清を採取し、Chemokine Antibody Array でタンパク質産生量を測定した。



スポットを定量化した。

	control	TNF- α	Fold change (TNF- α /control)
MIP-3 α (CCL20)	0.06	3.20	53.33
MCP-1 (CCL2)	45.38	102.39	2.26
RANTES (CCL5)	20.14	40.84	2.03
MCP-2 (CCL8)	1.47	1.65	1.12
IL-8 (CXCL8)	10.27	83.40	8.12
GRO α (CXCL1)	1.87	14.78	7.90
MDG (CXCL9)	0.19	3.13	16.47
IP-10 (CXCL10)	7.14	19.29	2.70
Fractalkine (CX3CL1)	22.55	24.78	1.10

TNF- α 刺激滑膜細胞では 9 種類の chemokine タンパク質産生量が増加していた。これらの chemokine は GeneChip 解析で遺伝子発現が上昇していた。

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 6 件)

- ① K. Satoh, N. Ogura, M. Akutsu, N. Kuboyama, K. Kuyama, H. Yamamoto, T. Kondoh, Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in IL-1 β -induced synovitis of the temporomandibular joint, J Oral Pathol Med. 査読有, 38:584-590, 2009.
- ② 阿久津美和, 小倉直美, 酒巻裕之, 戸邊真希子, 伊藤 耕, 安孫子宜光, 近藤壽郎, 顎関節内障患者滑膜細胞のTNF- α 刺激による遺伝子発現プロファイリング, 日本口腔外科学会雑誌, 査読有, 53 巻 9 号, 538-544, 2007.
- ③ N. Ogura, M. Akutsu, M. Tobe, H. Sakamaki, Y. Abiko, T. Kondoh, Microarray analysis of IL-1 β -stimulated chemokine genes in synovial fibroblasts from human TMJ, J Oral Pathol Med, 査読有, 36:223-228, 2007.

[学会発表] (計 11 件)

- ① 阿久津美和, 他 5 名, IL-1beta および TNF-alpha 刺激培養ヒト顎関節滑膜細胞における遺伝子発現量の比較検討, 日本口腔外科学会, 2009. 10. 9, 札幌.
- ② 小倉直美, 他 7 名, IL-1 β 刺激滑膜細胞の MCP-1 産生と炎症性細胞の滑膜組織への遊走, 日本口腔外科学会, 2008. 10. 20, 徳島.
- ③ 佐藤かおり, 他 5 名, IL-1 β 刺激顎関節滑膜炎モデルにおける IL-6 の発現, 歯科基礎医学会, 2008. 9. 25, 東京.
- ④ 佐藤かおり, 他 8 名, IL-1 β 刺激顎関節滑膜炎モデルにおける COX-2 の発現, 日本顎関節学会, 2008. 7. 27, 大阪.
- ⑤ 小倉直美, 他 5 名, IL-1 β 刺激ヒト顎関節滑膜細胞の NF κ B シグナリング関連因子の遺伝子発現, 日本顎関節学会, 2007. 7. 13, 仙台

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

安孫子 宜光 (ABIKO YOSHIMITSU)
日本大学・松戸歯学部・教授
研究者番号：70050086

小倉 直美 (OGURA NAOMI)
日本大学・松戸歯学部・講師
研究者番号：10152448

酒巻 裕之 (ABIKO YOSHIMITSU)
千葉県立保健医療大学・健康科学部・教授
研究者番号：70312048

伊藤 耕 (ABIKO YOSHIMITSU)
日本大学・松戸歯学部・助手
研究者番号：20419758