

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19277

研究課題名（和文）顎関節滑膜細胞の破骨細胞誘導機構に着目した新たな変形性顎関節症治療戦略

研究課題名（英文）A novel therapeutic strategy for the temporomandibular joint osteoarthritis focusing on the osteoclast induction mechanism of temporomandibular joint synovial cells

研究代表者

横田 聖司 (Yokota, Seiji)

岩手医科大学・歯学部・講師

研究者番号：50802401

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）：FLS細胞においてRT-qPCR法により、P2Y1、P2Y12、およびP2Y13受容体のアゴニストであるADPがMCP-1/CCL2のmRNAレベルでの発現量を有意に促進することを明らかとした。さらに、P2Y13受容体のアンタゴニストであるMRS 2211をFLS細胞に作用させると、ADP誘導性MCP-1/CCL2の発現量が有意に減少した。ADPをFLS細胞に作用させるとERKのリン酸化が増強されることも確認された。また、ERKキナーゼとしてのMEK阻害剤であるU0126をFLS細胞に前投与すると、ADP誘導性のMCP-1/CCL2の発現量が有意に低下することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外ヌクレオチドの一種であるADPはMEK/ERK依存的にP2Y13受容体を介してFLS細胞におけるMCP-1/CCL2のmRNAレベルでの発現量を促進しその結果、顎関節周囲における炎症性細胞浸潤を引き起こすことが示唆された。以上の結果より、本研究は顎関節周囲炎の発症に関する分子メカニズムの部分的な解明に貢献し、TMJ-OAにおけるADP誘導性プリン作動性シグナル伝達経路を介する根本的な治療方法の確立に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction analysis revealed that the P2Y1, P2Y12, and P2Y13 purinergic receptor agonist adenosine 5'-diphosphate (ADP) significantly induces monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)/ C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2) expression in the FLS1 synovial cell line. In contrast, the uracil nucleotide UTP, which is a P2Y2 and P2Y4 agonist, has no significant effect on MCP-1/CCL2 production in FLS1 cells. In addition, the P2Y13 antagonist MRS 2211 considerably decreases the expression of ADP-induced MCP-1/CCL2, whereas ADP stimulation enhances extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation. Moreover, it was found that the mitogen-activated protein kinase/ERK kinase (MEK) inhibitor U0126 reduces ADP-induced MCP-1/CCL2 expression.

研究分野：生化学

キーワード：変形性顎関節症 P2Y受容体 細胞外ヌクレオチド ADP 顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞

1. 研究開始当初の背景

TMJ-OA 発症の原因として、重度の不正咬合や顎の非対称、咀嚼筋の過剰使用により顎関節に加わる過度の機械的ストレスやホルモンバランスなどが病因となりうると報告されているが、発症機構については不明な点が多い。TMJ-OA は滑膜組織の慢性炎症を伴う軟骨の変性、下顎頭の骨の空洞化や顎関節周囲の線維症などの症状を引き起こすことが知られている (J. Dent. Res., 87:296-307, 2008)。その中で、我々は線維症の発症機構には ROCK/actin/MRTF 経路が深く関わっており、その阻害剤である Y-27632 と CCG-100602 はこの細胞の異常な線維形成能を抑制するための治療薬としての可能性があることを報告した (Int. J. Mol. Med., 39:799-808, 2017)。しかし、その他の TMJ-OA の主要な症状としての軟骨や骨の変形についての発症機序については、現在まで不明なままである。とくに、顎関節部の軟骨・骨が変形する原因は、(1) マクロファージをはじめとした炎症性細胞が、顎関節部への機械的な侵害刺激等により惹起された無菌的炎症部位にホーミングし、(2) このマクロファージが顎関節部の炎症性環境下で破骨細胞に分化誘導される結果であると推測されるが、この顎関節局所での破骨細胞誘導機構について分子レベルで明らかにした例はない。

2. 研究の目的

(1) FLS 細胞による TMJ へのマクロファージホーミング誘導機構を解明する。

TMJ-OA に認められる炎症の多くは TMJ 組織損傷により壊死した細胞から放出されるダメージ関連分子パターン damage-associated molecular pattern (DAMPs) によって引き起こされる無菌性炎症と考えられるが、その分子メカニズムの詳細を解明した例はない。そこでまず、TMJ-OA で想定される DAMPs で FLS 細胞を刺激した際のマクロファージの走化性因子 (ケモカイン) の発現がどのように変化するかを明らかにしたい。

(2) FLS 細胞による破骨細胞誘導機構について明らかにする。

軟骨および骨の吸収や変形には破骨細胞の局所への出現が必須であるが、その前駆細胞である単球やマクロファージの増殖を強く促進する macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) の存在が骨吸収の程度に大きく関与するものと考えられている。しかし、M-CSF 単独では、マクロファージ系細胞を破骨細胞に分化・活性化させることはできず、FLS 細胞が M-CSF 以外の破骨細胞に分化・活性化因子を産生する可能性は高い。本研究により TMJ-OA における軟骨・骨変形症の発症機構について、FLS 細胞が発現する M-CSF をはじめとした液性因子ならびに接着因子を介した破骨細胞誘導機構の全容を解明したい。

3. 研究の方法

(1) 細胞外ヌクレオチドである ATP、ADP、UTP を作用させた際の FLS1 細胞におけるケモカインの一種である MCP-1/CCL2 の発現量を測定する。

FLS1 細胞を 7×10^4 /12-well で 24 時間培養し、その後 ATP (100 μ M)、ADP (100 μ M)、UTP (100 μ M) を 24 時間作用させる。作用後、ケモカインの一種である MCP-1/CCL2 の mRNA レベルでの発現量を RT-qPCR 法により測定する。

(2) P2Y1 受容体の阻害剤である MRS 2179、P2Y12 受容体の阻害剤である AR-C 66096、P2Y13 受容体の阻害剤である MRS 2211 を FLS1 細胞に前投与し、その後 ADP 刺激により上昇した MCP-1/CCL2 の mRNA レベルでの発現量の変化を測定する。

(1) と同様に FLS1 細胞を培養後、MRS 2179 (10、50、100 μ M)、AR-C 66096 (10、50、100 μ M)、MRS 2211 (10、50、100 μ M) を 30 分前に前投与しその後 ADP を 24 時間作用させる。作用後 (1) と同様に MCP-1/CCL2 の mRNA レベルでの発現量を RT-qPCR 法により測定する。

(3) FLS1 細胞に ADP を作用させた際のシグナル伝達経路を確認する。

FLS1 細胞を 1×10^6 /10cm で 24 時間培養し、その後 ADP (100 μ M) を 0 分、10 分、30 分、60 分、120 分作用させる。作用後、MAPK サブファミリーの一種である ERK1/2、p-38、JNK のリン酸化を WB 法により確認する。

また、ERK1/2 の阻害剤である U0126 (10 μ M) を 30 分前に前投与しその後 ADP を 30 分作用させる。MRS 2211 (100 μ M) も U0126 と同様に全投与しその後 ADP を 30 分作用させタンパク質を回収し WB 法により測定する。

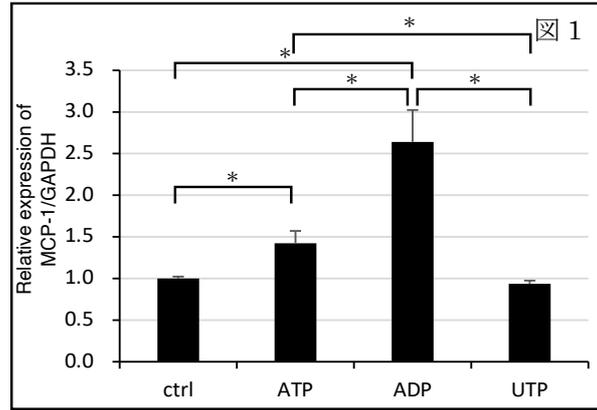
(4) U0126 を FLS1 細胞に前投与し、その後 ADP 刺激により上昇した MCP-1/CCL2 の mRNA レベルでの発現量の変化を確認する。

(2) と同様に FLS1 細胞を培養後、U0126 (10 μ M) を 30 分前に前投与しその後 ADP を 24 時間作用させる。作用後 (2) と同様に RT-qPCR 法にて MCP-1/CCL2 の発現量を測定する。また p-38 の阻害剤である SB203580 (10 μ M) においても同様の実験系にて測定を行う。

4. 研究成果

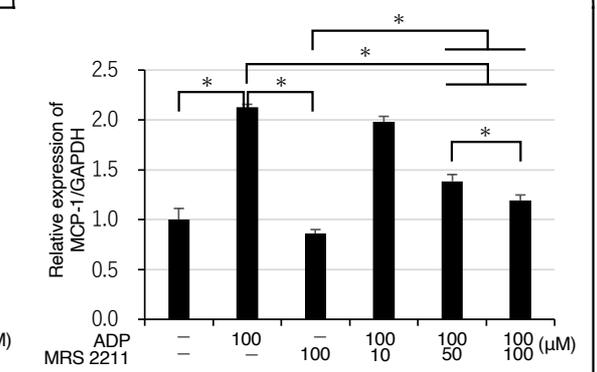
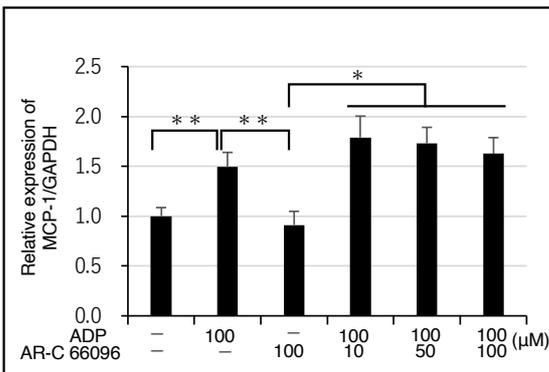
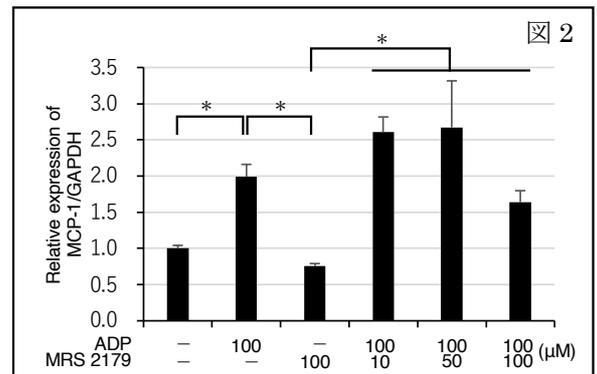
(1) 細胞外ヌクレオチドである ATP、ADP、UTP を作用させると FLS 細胞において ADP が MCP-1/CCL2 の mRNA レベルでの発現量が最も上昇する。

FLS1 細胞は各種 P2 受容体が存在し (Matsumoto *et al*, Dent J of Iwate Med Univ 45: 46-57, 2020.), 特に P2Y₁、P2Y₁₂、P2Y₁₃ 受容体のリガンドである細胞外ヌクレオチドの一種の ADP (100 μM) を作用させると局所の炎症反応を増悪するケモカインの一種である MCP-1/CCL2 の mRNA レベルでの発現量が上昇する (ATP を作用させると 1.57 倍上昇し、ADP を作用させると 2.31 倍上昇したが、UTP を作用させても発現量に影響を与えない) ことを確認した (図 1)。**P* < 0.01

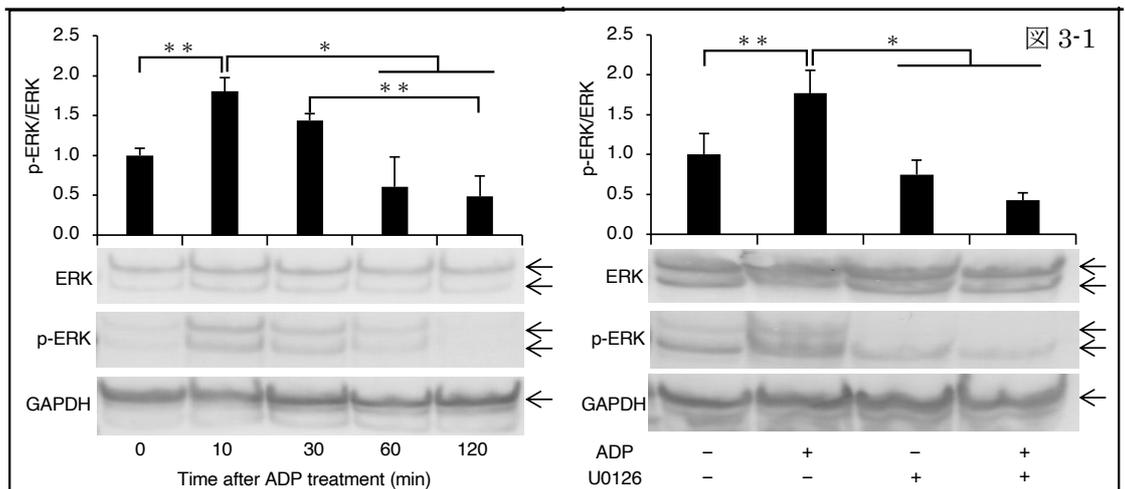


(2) P2Y₁₃ 受容体の阻害剤である MRS 2211 を作用させると FLS 細胞において ADP 刺激により上昇した MCP-1/CCL2 の mRNA レベルでの発現量が有意に抑制する。

FLS1 細胞に P2Y₁ 受容体の阻害剤である MRS2179 (10、50、100 μM) および P2Y₁₂ の阻害剤である ARC-66096 (10、50、100 μM) を前投与しても ADP 刺激による MCP-1/CCL2 の発現誘導効果に影響を与えなかったが、MRS 2211 の前投与すると ADP 刺激による MCP-1/CCL2 の発現誘導効果が阻害されることを確認した (図 2)。**P* < 0.01、***P* < 0.05



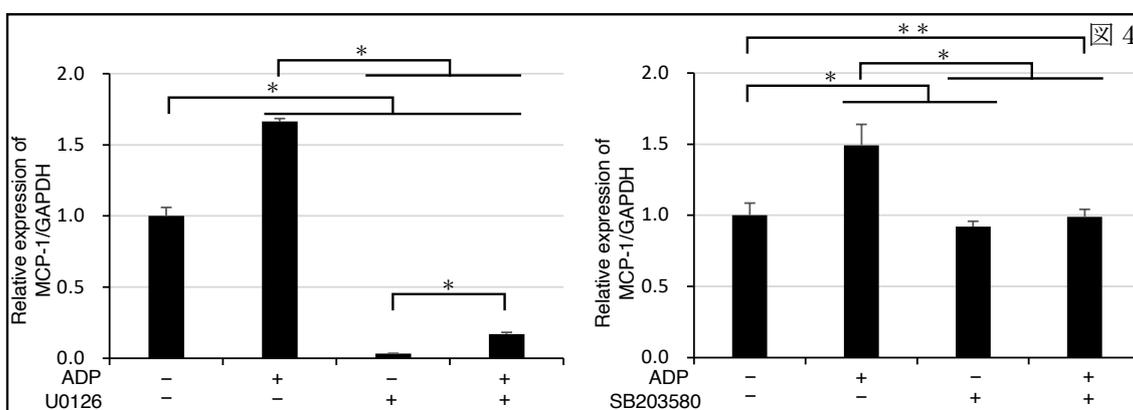
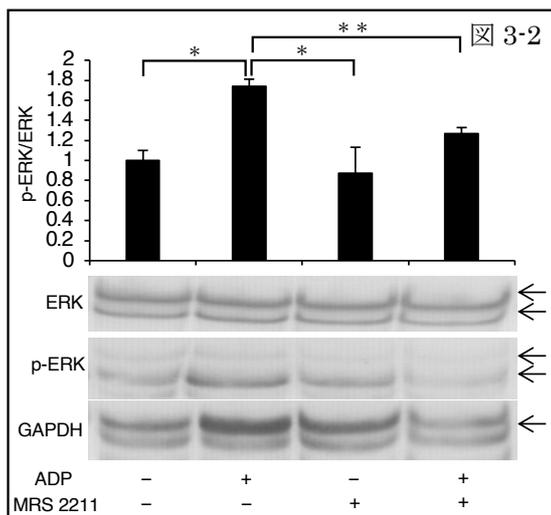
(3) ADP は FLS1 細胞において P2Y₁₃ 受容体を介して ERK1/2 のリン酸化を増強する。FLS1 細胞に ADP (100 μM) を作用させると 10 分をピークに MAPK のサブファミリーである ERK1/2 のリン酸化が増強され、さらに ERK1/2 の阻害剤である U0126 を前投与すると ADP 刺激により増強された ERK1/2 のリン酸化が抑制された (図 3-1)。しかし p-38 MAPK および SAPK/JNK のリン



酸化は確認できなかった（データ示さず）。また、MRS 2211 を前投与すると ADP 刺激により増強された ERK1/2 のリン酸化も抑制された（図 3-2）。* $P < 0.01$ 、** $P < 0.05$

(4) U0126 を作用させると FLS1 細胞において ADP 刺激による MCP-1/CCL2 の発現誘導効果が有意に阻害される。ERK キナーゼとしての MEK の阻害剤である U0126 を前投与すると、FLS1 細胞において ADP 刺激により mRNA レベルで上昇していた MCP-1/CCL2 の発現量が有意に阻害された。また、p-38 MAPK 阻害剤である SB203580 を前投与すると U0126 と同様に ADP 刺激による MCP-1/CCL2 の mRNA レベルでの発現誘導効果が有意に阻害された（図 4）。* $P < 0.01$ 、** $P < 0.05$

以上の結果より、顎関節周囲の炎症性疾患に伴ってネクローシスを起こした細胞から漏出する細胞外ヌクレオチドが、顎関節部の



MEK/ERK 依存的に滑膜細胞に作用して、ケモカイン MCP-1/CCL2 の産生を増強することにより、顎関節部への炎症性細胞のホーミングを誘導する可能性が示唆された。このことは、MEK/ERK 経路の遮断により、顎関節部の炎症を沈静化しうる可能性を示すものである。また、顎関節滑膜細胞において、産生誘導される MCP-1/CCL2 は、マクロファージのホーミングを促進することが知られており、顎関節部にホーミングした後のマクロファージが破骨細胞に分化して、顎関節部の軟骨や骨の吸収に働く可能性が示唆された。本研究成果により、TMJ-OA 根治療法開発のための分子生物学的基盤の一部が構築された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yokota Seiji, Chosa Naoyuki, Matsumoto Shikino, Satoh Kazuro, Ishisaki Akira	4. 巻 50
2. 論文標題 Extracellular adenosine 5'-diphosphate promotes MCP-1/CCL2 expression via the P2Y13 purinergic receptor/ERK signaling axis in temporomandibular joint-derived mouse fibroblast-like synoviocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 1595 ~ 1602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11033-022-08125-2	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 Asanuma Kanna, Yokota Seiji, Chosa Naoyuki, Kamo Masaharu, Ibi Miho, Mayama Hisayo, Iri Tarou, Satoh Kazuro, Ishisaki Akira	4. 巻 65
2. 論文標題 Hydrogen peroxide-induced oxidative stress promotes expression of CXCL15/Lungkine mRNA in a MEK/ERK-dependent manner in fibroblast-like synoviocytes derived from mouse temporomandibular joint	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 97 ~ 103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2022.12.002	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 Matsumoto Shikino, Yokota Seiji, Chosa Naoyuki, Kyakumoto Seiko, Kimura Hitomichi, Kamo Masaharu, Satoh Kazuro, Ishisaki Akira	4. 巻 20
2. 論文標題 Receptor tyrosine kinase ligands and inflammatory cytokines cooperatively suppress the fibrogenic activity in temporomandibular joint-derived fibroblast-like synoviocytes via mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 1967 ~ 1974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2020.8944	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浅沼莞奈、横田聖司、間山寿代、帖佐直幸、桑島幸紀、松本識野、阿部カレン、吉田弘法、衣斐美歩、加茂政晴、入江太郎、佐藤和朗、石崎明
2. 発表標題 酸化ストレスを介した顎関節周囲滑膜炎の発症メカニズムの解明
3. 学会等名 第60回 日本口腔外科学会北日本支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅沼莞奈、横田聖司、帖佐直幸、佐藤和朗、石崎明
2. 発表標題 Oxidative stress increased expression of CXCL15 mRNA via a MEK/ERK-dependent manner in fibroblast-like synoviocytes derived from mouse temporomandibular joint
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横田聖司、帖佐直幸、客本齊子、加茂政晴、石崎 明
2. 発表標題 顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞におけるADPのケモカイン発現への影響
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅沼莞奈、横田聖司、帖佐直幸、加茂政晴、松本識野、吉田弘法、桑島幸紀、間山寿代、佐藤和朗、石崎明
2. 発表標題 マウス顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞における酸化ストレスの影響によるケモカインの発現変化について
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅沼莞奈、横田聖司、帖佐直幸、松本識野、間山寿代、石崎明、佐藤和朗
2. 発表標題 酸化ストレスがマウス顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞におけるケモカインの発現に与える影響について
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横田聖司、帖佐直幸、松本識野、客本齋子、加茂政晴、石崎 明
2. 発表標題 顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞におけるケモカイン発現へのATPの影響
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本識野、横田聖司、帖佐直幸、菊池恵美子、木村仁迪、加茂政晴、佐藤和朗、石崎明
2. 発表標題 受容体チロシンキナーゼリガンドと炎症性サイトカインは相加的かつERK1/2依存的に顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞の線維組織産生能力を抑制する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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

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
---------	---------