

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03896

研究課題名（和文）代謝リプログラミングを標的とした顎関節軟骨破壊性疾患に対する革新的アプローチ

研究課題名（英文）A Novel Approach Targeting Metabolic Reprogramming for the Treatment of Destructive Temporomandibular Joint Cartilage Diseases

研究代表者

犬伏 俊博（INUBUSHI, TOSHIHIRO）

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：30550941

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究より、膝関節軟骨において、Tmem2は広範に発現しており、OA初期において関節軟骨表層でTmem2の発現が増加していることが明らかとなった。Tmem2欠失OAモデルマウスではOAが有意に進行することが明らかとなった。Tmem2欠失によるHAの蓄積は、関節軟骨において保護的に作用するわけではなく、むしろ破壊的に作用する可能性が示唆された。本研究結果より、Tmem2によるHAの適切な分解・合成が関節軟骨の恒常性維持に重要であり、HA調整機構の破綻がOA発症や病態悪化に関係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

本研究結果より、Tmem2が顎関節軟骨破壊性疾患の発症・進行機序解明ならびに新規治療法開発において新たな分子標的となることが期待でき、大きな意義を有している。また、HAの低分子化は膝関節OA、癌、難聴肺線維症や皮膚炎などの病態とも関わっており、本研究で得られた知見はこれらの疾患の病態解明や治療法開発へも応用可能であり、高い創造性を有しており、その学術的意義は非常に高い。

研究成果の概要（英文）：In this study, it has been shown that Tmem2 is broadly expressed in knee cartilage, and that its expression increases in the superficial layer of articular cartilage in the early stages of osteoarthritis (OA). It has also been demonstrated that OA progresses significantly in Tmem2 knockout OA model mice. The accumulation of hyaluronic acid (HA) due to the loss of Tmem2 does not act protectively in articular cartilage, but rather may have a destructive effect. The results of this study suggest that the appropriate degradation and synthesis of HA by Tmem2 is important for the maintenance of homeostasis in articular cartilage, and that the disruption of HA regulatory mechanisms is associated with the onset and exacerbation of OA.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：ヒアルロン酸 Tmem2 変形性関節症

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

顎関節軟骨破壊性疾患は歯科治療による咬合機能の回復は困難であり、病態解明による予防・治療法の開発に対する社会的ニーズは非常に高い。近年、細胞が特殊な環境に適応するためのエネルギー代謝機能の転換(代謝リプログラミング)が変形性関節症における軟骨細胞の活性低下と関連していることが分かってきた。最新の知見から、軟骨細胞の代謝リプログラミングが、顎関節軟骨破壊性疾患の発症・進行に関わっている可能性がある。そこで本研究では、代謝リプログラミングが顎関節軟骨破壊の発症・進行にどのように関わっているかを検討するとともに、代謝リプログラミングを標的とした予防・治療法開発の可能性について検討することとした。

2. 研究の目的

関節においてHAが低分子化される分解機序を明確にし、HAの低分子化が軟骨細胞の代謝リプログラミングを介して顎関節軟骨の破壊を引き起こすメカニズムを解明するとともに、HA低分子化の抑制が関節軟骨破壊の発症や進行に与える影響を明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

実験動物の作製：動物実験はすべて大阪大学動物実験委員会及び大阪大学遺伝子組実験の承認を得て行った(動物実験承認番号：動歯-30-008-0, 遺伝子組み換え実験承認番号：04263, 04315)。Tmem2 flox および TMEM2-Flag ノックインマウスを使用した^{34,36}。Col2a1Cre^{ERT2}マウス(東京大学、斎藤琢先生より分与)をTmem2 flox/flox と交配し、Col2a1-Cre^{ERT2};Tmem2 flox/+ を作製した。また、タモキシフェン(Sigma-Aldrich, USA)をコーン油(Sigma-Aldrich, USA)で溶解し、100 µg/mlのタモキシフェン溶液を作製し、8週齢Tmem2 flox/floxマウスにタモキシフェン溶液を5日間連続腹腔内投与(200 µl/回)し、軟骨特異的Tmem2欠失マウスを作製した。

4. 研究成果

(1) 関節組織におけるTmem2の発現パターンの解析

14週齢のTmem2-FLAGマウスの膝関節の矢状断組織切片を用いて、関節軟骨、成長板、滑膜でTmem2の発現の局在を観察した。Tmem2は関節軟骨層で発現しており、軟骨細胞の細胞膜上に発現していた(図1-A, B, C)。特に最表層や深層と比べ、タイドマークより上方の非石灰化軟骨層の軟骨細胞に多く発現していた(図1-A, B, C)。また、成長板軟骨では増殖軟骨層から肥大軟骨層にかけて広範な発現を認めた(図1-D, E)。また、HAを豊富に含む滑液を生成する滑膜では滑膜細胞周囲に発現を認め、半月板ではTmem2の発現は見られなかった(図1-F, G)。

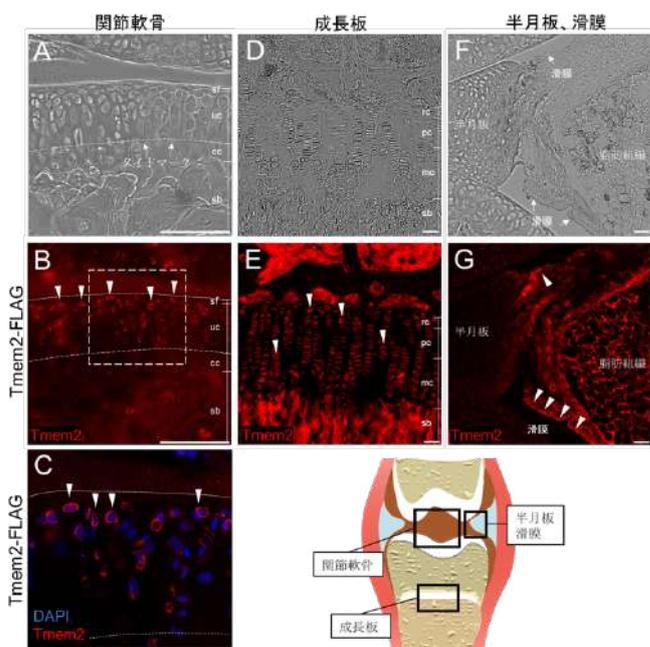


図1 膝関節におけるTmem2の局在の解析。(A-B) 14週齢のTmem2-FLAGマウスの関節軟骨の矢状断凍結切片の蛍光顕微鏡像(bar: 20 µm)。非石灰化軟骨層にTmem2の発現を認めた。白矢印はTmem2の強発現部位を示す。(sf: 最表層、uc: 非石灰化軟骨層、cc: 石灰化軟骨層、sb: 軟骨下骨層)。(C) 白点線で囲まれた領域の拡大像を示す。軟骨細胞の細胞膜上にTmem2の発現を認めた。(bar: 20 µm)。(D-E) 14週齢のTmem2-FLAGマウスの成長板軟骨の矢状断凍結切片の蛍光顕微鏡像(bar: 20 µm)。(rc: 静止軟骨層、pc: 増殖軟骨層、mc: 成熟軟骨層、sb: 軟骨下骨層)。増殖軟骨層から肥大軟骨層にかけてTmem2の広範な発現を認めた。白矢印はTmem2の強発現部位を示す。(F-G) 14週齢のTmem2-FLAGマウスの滑膜の矢状断凍結切片の蛍光顕微鏡像(bar: 20 µm)。滑膜でTmem2の発現を認めたが、半月板ではみられなかった。白矢印はTmem2の強発現部位を示す。

(2) OA モデルマウスにおける *Tmem2*、HA の発現の解析

本実験では、関節組織における *Tmem2* の生物学的機能や OA との関わりについて検討するために、7 週齢の *Tmem2*-FLAG マウスを用いて、外科的 OA 誘導法である Destabilization of Medial Meniscus (DMM) 手術を行い、OA モデルマウスを作製した。DMM 手術 8 週後に膝関節の矢状断凍結切片を作製し、関節軟骨における *Tmem2* および HA の発現を観察した。

Tmem2 は関節軟骨において、OA モデル群、非 OA 群の両方で発現していた (図 2-A, B, C, D)。OA モデル群では非石灰化軟骨層で発現が増加しており、より広範な発現が確認された。一方、*Tmem2* の強い発現がみられた非石灰化軟骨層で、HA の発現は減少していた (図 2-F, G, H, I, J, K)。また、定量 PCR の結果、OA モデル群において *Tmem2* の発現が有意に増加していた。また HA の発現は有意に低下していた (図 2-E)。これは OA の病態において関節軟骨表層で *Tmem2* の発現が増加し、HA の分解が活発に行われていることを示している (図 2-D, K)。

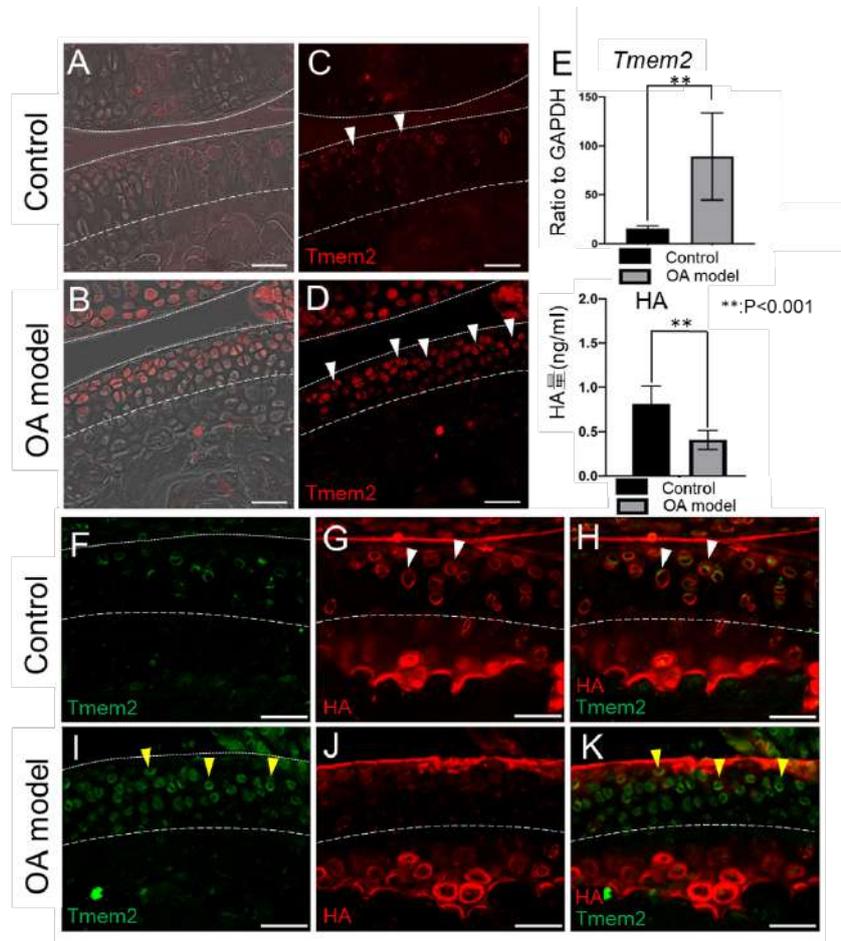


図 2 関節軟骨における OA による HA、*Tmem2* の発現の影響の解析。(A-D) DMM 手術 8 週後の関節軟骨の矢状断凍結切片の蛍光顕微鏡像 (bar: 20 μ m)。OA モデル群では非石灰化軟骨層で *Tmem2* の発現が増加していた。白矢印は *Tmem2* の強発現部位を示す。(E) 関節軟骨における *Tmem2* および HA の発現率。OA モデル群で *Tmem2* の発現率が有意に増加しており、反対に HA 量は有意に減少していた。(対照群 n=3、OA モデル群 n=3 ** : p<0.001。(F-K) DMM 手術 8 週後の関節軟骨の矢状断凍結切片の蛍光顕微鏡像 (bar: 20 μ m)。OA モデル群は非石灰化軟骨層で *Tmem2* の発現が増加していた。一方 HA の発現は減少していた。白矢印は HA の強発現部位を示す。黄矢印は *Tmem2* の強発現部位を示す。

(3) OA の進行度と *Tmem2* および HA の発現の解析

OA の進行度は関節軟骨の部位により差異があった。そこで、比較的 OA が進行している中等度以上の部位と、軽度の OA 部位を比較検討した。

OA が進行した部位では DAPI 染色で核の染色性が低下しており (図 3-A, B, D, E 白矢印)、軟骨細胞の変性や細胞死等が生じている可能性が示唆される。そのような部位では *Tmem2*、HA 双方の発現が低下していた。特に軽度 OA 部位で HA の発現がみられた最表層や非石灰化軟骨層で HA の発現が低下していた (図 3-C, F 白矢印)。OA の発症初期段階で *Tmem2* の発現は増加しており、OA が進行するにつれ *Tmem2* の発現は低下していた。

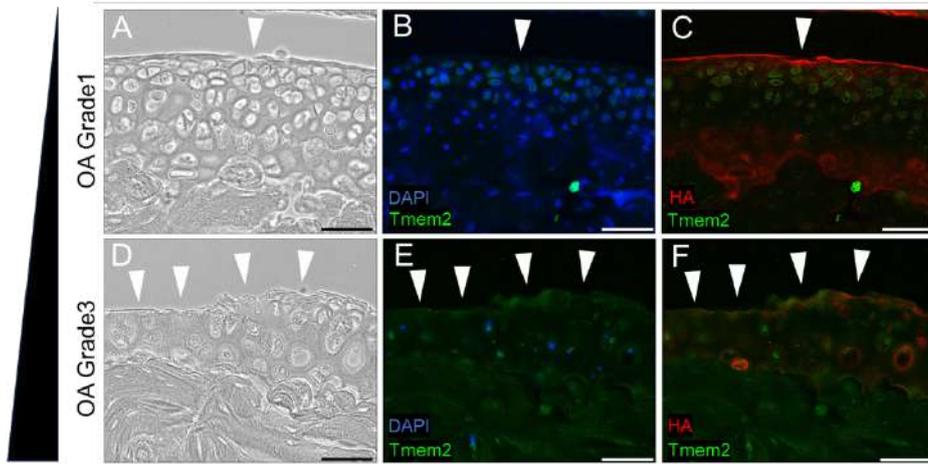
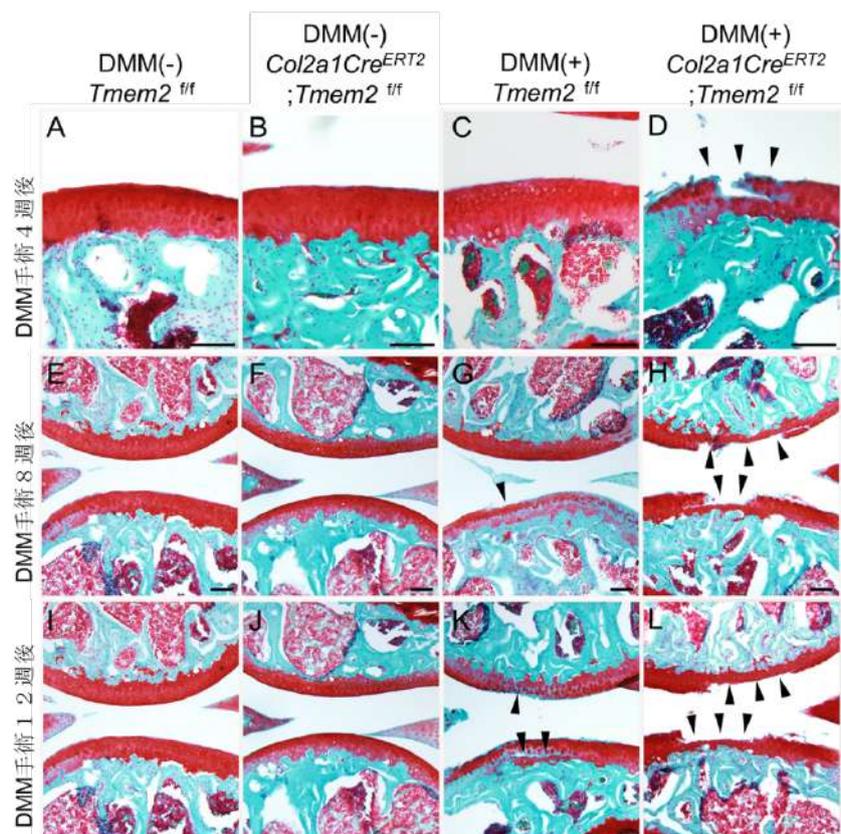


図3 OAの進行度とHA, Tmem2の発現の解析。(A-F) DMM手術8週後の関節軟骨の矢状断凍結切片の蛍光顕微鏡像 (bar: 20 μ m)。OAグレード1と比較し、OAグレード3とOA進行した関節軟骨では、細胞核の染色性が低下するとともに、Tmem2, HA双方の発現が減少していた。白矢印は関節軟骨表層が一部剥離している部位を示す。

(4) *Tmem2* の欠失によるOAへの影響

Tmem2 欠失マウスと対照群にDMM手術を行い、OAの病態を比較検討した。DMM手術を行ってからのタイムコースを3群(手術4週後、手術8週後、手術12週後)に分け、膝関節矢状断凍結切片を作成し、軟骨基質の変化や表層軟骨への影響を比較するために、サフラニン・ファストグリーン染色を行った。OAの進行度はOARSIグレードを用いて7段階で評価した³⁹。対照群では手術4週後でグレード1の軽度のOA所見が確認された(図4-C)。手術8週後でグレード2(図4-G 黒矢印)、手術12週後でグレード3のOA所見が確認された(図4-K 黒矢印)。DMM手術後の経過時間が進むにつれて、軟骨基質の変性や軟骨表層の剥離が重症化し、経時的にOAが進行した。一方、*Tmem2*欠失マウスでは、手術4週後で非石灰化軟骨層と石灰化軟骨層の境界で表層軟骨が一部剥離しており、グレード4までOAが有意に進行した(図4-D 黒矢印)。さらに手術8週後、手術12週後では、非石灰化軟骨層と石灰化軟骨層の境界部で軟骨基質が脱落するグレード5までOAが重症化した(図4-H, L 黒矢印)。

DMM手術4週後、8週後、12週後でOAの進行度を定量化した。3群とも、*Tmem2*欠失OAモデルマウスで軟骨基質の変性や表層軟骨の剥離が重症化し、OAが有意に進行した(図4-M, N, O)。



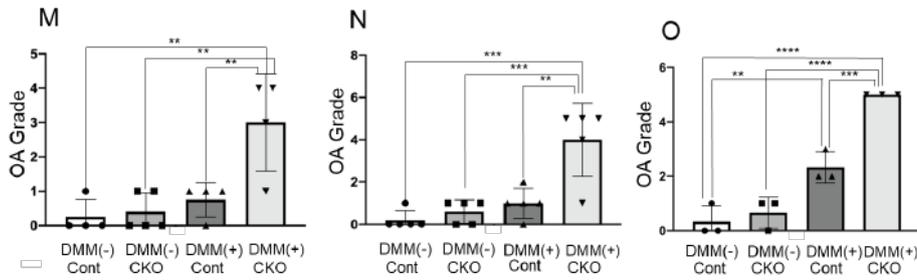


図4 *Tmem2* の欠失による OA への影響の解析。(A-D) DMM 手術 4 週後、8 週後、12 週後のマウス膝関節軟骨矢状断凍結切片のサフラニン・ファストグリーン染色像 (bar: 100 μ m)。DMM 手術 4 週後では、*Tmem2* 欠失マウスで非石灰化軟骨層と石灰化軟骨層の境界部で軟骨が一部剥離していた (D、黒矢印)。DMM 手術 8 週後と 12 週後では、DMM 手術を行った対照群マウスでもサフラニン 0 の染色性の低下や軟骨の裂溝などの OA 所見を認めた (G、K、黒矢印)。さらに、*Tmem2* 欠失マウスで非石灰化軟骨層と石灰化軟骨層の境界部で軟骨が完全に脱落しており (H、L、黒矢印)、OA が有意に進行した。(M-O) OARSI スコアを用いた OA 進行度の定量評価。非 OA 群 *Tmem2* 欠失マウスは対照群と比べ OA 進行度に有意差はなかった。OA モデル群 *Tmem2* 欠失マウスで優位に OA が進行した。(DMM 手術 4 週後 n=5 *:p<0.05、DMM 手術 8 週後 n=5 *:p<0.05、DMM 手術 12 週後 n=3 *:p<0.05)

(5) *Tmem2* 欠失軟骨細胞におけるアポトーシスの解析

Tmem2 の欠失が軟骨細胞の生存に影響するかを調べた。TUNEL 染色では、非 OA 群と比べ、OA モデル群の OA 部位で広範な発現をみとめた (図 5-A, B, C, D 白矢印)。また、TUNEL 陽性細胞数を観察した結果、OA モデル群の非石灰化軟骨層軟骨細胞で TUNEL 陽性細胞の割合が有意に増加していた (図 5-E)。

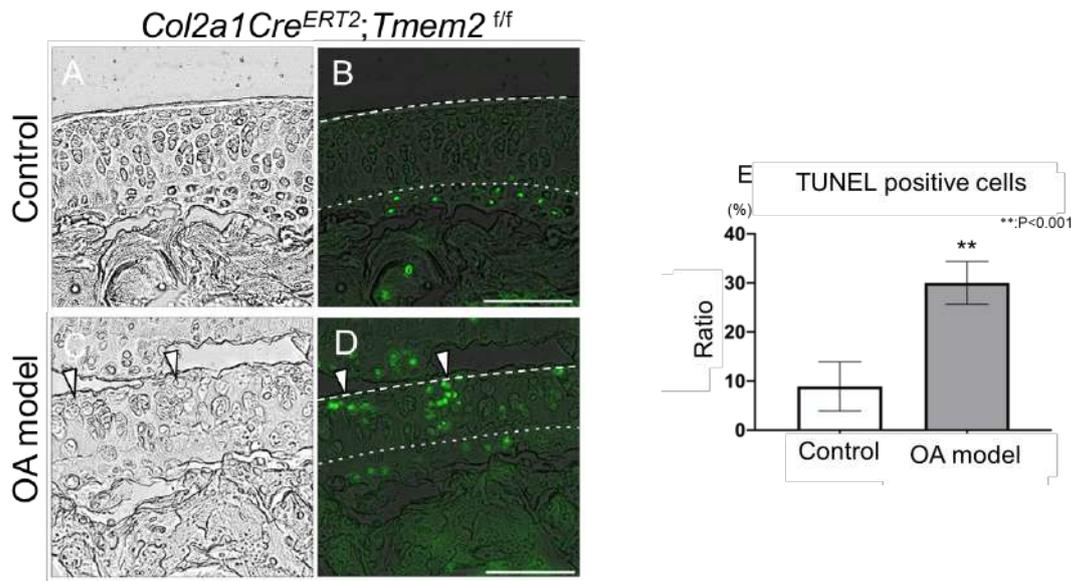


図5 *Tmem2* の欠失によるアポトーシスへの影響の解析。(A-D) DMM 手術 8 週後の膝関節軟骨の矢状断凍結切片の蛍光顕微鏡像 (bar: 100 μ m)。OA 部位でアポトーシスが亢進した (C、D、白矢印)。(E) 非石灰化軟骨層における TUNEL 陽性細胞率。*Tmem2* 欠失マウスにおいて非 OA 群と比較し、OA モデル群で非石灰化軟骨細胞層軟骨細胞における TUNEL 陽性細胞の割合が有意に増加した。(対照群 n=3、*Tmem2* 欠失マウス n=3 **:p<0.001)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Wu Y., Kurosaka H., Wang Q., Inubushi T., Nakatsugawa K., Kikuchi M., Ohara H., Tsujimoto T., Natsuyama S., Shida Y., Sandell L.L., Trainor P.A., Yamashiro T.	4. 巻 101
2. 論文標題 Retinoic Acid Deficiency Underlies the Etiology of Midfacial Defects	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 686 ~ 694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/00220345211062049	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 Kurosaka Hiroshi, Itoh Shinsuke, Morita Chisato, Tsujimoto Takayuki, Murata Yuka, Inubushi Toshihiro, Yamashiro Takashi	4. 巻 64
2. 論文標題 Development of dentition: From initiation to occlusion and related diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 159 ~ 164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2022.02.005	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 Inubushi Toshihiro, Nakanishi Yuichiro, Abe Makoto, Takahata Yoshifumi, Nishimura Riko, Kurosaka Hiroshi, Irie Fumitoshi, Yamashiro Takashi, Yamaguchi Yu	4. 巻 18
2. 論文標題 The cell surface hyaluronidase TMEM2 plays an essential role in mouse neural crest cell development and survival	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1009765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1009765	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 該当する
1. 著者名 Inubushi Toshihiro	4. 巻 np.
2. 論文標題 In Vitro Investigation of the Effects of the Hyaluronan-Rich Extracellular Matrix on Neural Crest Cell Migration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 n.p.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/64749	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 Li A., Sasaki J.I., Inubushi T., Abe G.L., Nor J.E., Yamashiro T., Imazato S.	4. 巻 102
2. 論文標題 Role of Heparan Sulfate in Vasculogenesis of Dental Pulp Stem Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 207 ~ 216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/00220345221130682	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 Ayuningtyas Nurina Febriyanti, Chea Chanbora, Ando Toshinori, Saninggar Karina Erda, Tanimoto Keiji, Inubushi Toshihiro, Maishi Nako, Hida Kyoko, Shindoh Masanobu, Miyauchi Mutsumi, Takata Takashi	4. 巻 15
2. 論文標題 Bovine Lactoferrin Suppresses Tumor Angiogenesis through NF- B Pathway Inhibition by Binding to TRAF6	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 165 ~ 165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics15010165	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 Chea Chanbora, Miyauchi Mutsumi, Inubushi Toshihiro, Okamoto Kana, Haing Sivmeng, Takata Takashi	4. 巻 15
2. 論文標題 Molecular Mechanisms of Inhibitory Effects of Bovine Lactoferrin on Invasion of Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 562 ~ 562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics15020562	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 Saeki Naoya, Inui-Yamamoto Chizuko, Kuraki Moe, Itoh Shousaku, Inubushi Toshihiro, Okamoto Motoki, Akiyama Shigehisa, Wakisaka Satoshi, Abe Makoto	4. 巻 128
2. 論文標題 Senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice exhibit reduced entoconid in the lower second molar	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 105172 ~ 105172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2021.105172	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 Yanagisawa Shunryou, Nagasaki Karin, Chea Chanbora, Ando Toshinori, Ayuningtyas Nurina Febriyanti, Inubushi Toshihiro, Ishikado Atsushi, Imanaka Hiromichi, Sugiyama Eiji, Takahashi Ichiro, Miyauchi Mutsumi, Takata Takashi	4. 巻 17
2. 論文標題 Oral administration of bovine lactoferrin suppresses the progression of rheumatoid arthritis in an SKG mouse model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0263254 ~ 0263254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0263254	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 Nakamura Eriko, Hata Kenji, Takahata Yoshifumi, Kurosaka Hiroshi, Abe Makoto, Abe Takaya, Kihara Miho, Komori Toshihisa, Kobayashi Sachi, Murakami Tomohiko, Inubushi Toshihiro, Yamashiro Takashi, Yamamoto Shiori, Akiyama Haruhiko, Kawaguchi Makoto, Sakata Nobuo, Nishimura Riko	4. 巻 4
2. 論文標題 Zfhx4 regulates endochondral ossification as the transcriptional platform of Osterix in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02793-9	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Nag, P., Inubushi, T., Murotani, T., Nakanishi, Y., Sasaki, J., Kurosaka, H., Imazato, S. and Yamashiro, T.
2. 発表標題 Epithelial-specific Tmem2 plays an essential role in enamel formation.
3. 学会等名 IADR/APR General Session & Exhibition.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 犬伏 俊博、森田 知里、白石 優季、草野 慎之介、中西 祐一郎、吉川 浩史、プリヤンカ ナグ、宇佐美 悠、豊澤 悟、山口 祐、山城 隆
2. 発表標題 ヒアルロン酸合成酵素の骨細胞特異的ノックアウトマウスの解析
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 侑加、犬伏 俊博、横山 美佳、草野 慎之介、谷川 千尋、山口 悠、山城 隆
2. 発表標題 頭蓋顎顔面の形態形成における硫酸イオンの取り込みの役割
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会
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	古郷 幹彦 (KOGO MIKIHICO) (20205371)	大阪大学・大学院歯学研究科・名誉教授 (14401)	
研究分担者	黒坂 寛 (KUROSAKA HIROSHI) (20509369)	大阪大学・大学院歯学研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	阿部 真士 (ABE MASATO) (40448105)	大阪大学・大学院歯学研究科・講師 (14401)	
研究分担者	佐々木 淳一 (SASAKI JUNICHI) (50530490)	大阪大学・大学院歯学研究科・講師 (14401)	
研究分担者	山城 隆 (YAMASHIRO TAKASHI) (70294428)	大阪大学・大学院歯学研究科・教授 (14401)	

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	宇佐美 悠 (USAMI YU) (80444579)	大阪大学・大学院歯学研究科・講師 (14401)	

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