

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10215

研究課題名（和文）性ホルモンと機械的刺激による変形性顎関節症の病態発生機序の解明とその治療戦略

研究課題名（英文）Pathogenesis of temporomandibular joint osteoarthritis caused by sex hormones and mechanical stimulation and treatment strategy

研究代表者

石井 武展（Ishii, Takenobu）

東京歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：80433978

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：変形性顎関節症（TMJ-OA）は、雌雄ともに不正咬合や不良な補綴物による過剰な顎関節への負荷が原因の1つとして考えられた。雌においては卵巣摘出によりTMJ-OAが重篤化することから、17-エストラジオールの減少がTMJ-OAの重篤化に関与する。雄では精巣摘出により、TMJ-OAは重篤化するが雌ほどではない。雄の場合、副腎などでアロマトラーゼによりテストステロンが17-エストラジオールに変換されるためであり、この経路を遮断すると重篤なTMJ-OAを惹起する。これらの疾患特異的遺伝子候補として、関節頭軟骨細胞の破壊を誘導するangpt17と軟骨下骨での脆弱な石灰化を誘導するcar1を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の学術的意義は、変形性顎関節症（TMJ-OA）のリスクファクターとして過剰な顎関節への機械的刺激や性ホルモンの減弱が明らかとなった点である。また、変形性顎関節症の疾患特異的遺伝子候補としてangpt17やcar1が同定され、これらの過剰発現を抑制することがTMJ-OAの新規治療法の一助になることが解明された。本研究成果の社会的意義として、不正咬合が認められ性ホルモンバランスも崩れているにも関わらず、未治療の場合には歯科や婦人科などで精密検査を受けることを推奨する。本研究成果によるTMJ-OA発症機序の知見が広く周知されれば、専門領域での早期治療や創薬分野での応用が可能である。

研究成果の概要（英文）：Osteoarthritis of the temporomandibular joint (TMJ-OA) was considered as one of the causes of excessive load on the TMJ joint due to malocclusion and defective prosthetics in both males and females. In females, TMJ-OA became more severe after ovariectomy, indicating that a decrease in 17-estradiol was involved in the severity of TMJ-OA. In males, TMJ-OA becomes more severe with vasectomy, but not as severe as in females. In males, this is because testosterone is converted to 17-estradiol by aromatase in the adrenal glands and other organs, and blocking this pathway causes severe TMJ-OA. As candidates for such disease-specific genes, we found angpt17, which induces arthrodial chondrocyte destruction, and car1, which induces fragile calcification of the subchondral bone.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：変形性顎関節症 メカニカルストレス エストロゲン アンドロゲン angpt17 car1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

変形性顎関節症は、2013年に日本顎関節学会により提唱された顎関節症の病態分類の型に指定されており、根本的な治療法は明確に示されていない。本疾患は、関節全体に退行性変化と増殖性変化を起こすとされており、特発性あるいは進行性下顎頭吸収(ICR/PCR)は変形性顎関節症の一症状とされ明確に区別する定義はない。学術的背景として下顎頭吸収において、下顎頭軟骨に対する機械的刺激による破壊機序を解析した報告や、この疾患の特徴である性差を考慮した報告および機械的刺激と性ホルモン減少により惹起されるマウスを用いた実験の報告などが推測されている。しかしながら、10代と40代の女性に多いという2相性を示す点や下顎頭軟骨細胞層の破壊や骨吸収が変形性顎関節症でどのようなメカニズムで発生するのかについて、月経不順や閉経などライフステージに関連した性ホルモン分泌異常と下顎頭に対する機械的刺激の相互作用をその疾患感受性遺伝子を含め詳細に解析されていない。これらの機能解明と変形性顎関節症との関係を明らかにすることができれば変形性顎関節症の予防や治療に応用できる可能性があると考えた。

### 2. 研究の目的

変形性顎関節症は、10:1で女性に多い疾患とされており、10歳代と40歳代の2相性を持つ進行性下顎頭吸収を内包する疾患名である。しかしながら、なぜ女性に多く男性に少ないかなどの病態は十分に理解されていない。そのため、機械的刺激を下顎頭に加えた不正咬合および月経不順や更年期を想定した卵巣または精巣摘出マウスを用いて軟骨細胞層の破壊を再現できる変形性顎関節症モデルマウスを作製し、本疾患の病態を解析する。さらに予備実験で見出した変形性顎関節症の下顎頭で発現が亢進している *angpt17* と *car1* の2つの遺伝子についても、シグナル伝達経路を明らかにして変形性顎関節症の病態を包括的に理解することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス

雌雄共に性的に成熟している8週齢のC57BL/6Jマウスを使用した。8週齢の雌雄マウスをそれぞれ4つの群に分けた：コントロール群、性腺摘出(ORX,OVX)群、機械的刺激(MS)群、および性腺摘出(ORX,OVX)+MS群。すべての動物実験は、東京歯科大学の施設内動物管理使用委員会(承認番号：193106)の承認を得て実施した。性腺摘出術(ORX,OVX)は、8週齢のマウスに対し麻酔下で実施した。偽手術は、コントロールおよびMSグループのマウスで実行された。性腺摘出または偽手術の後1週間の回復期間後、動物に麻酔をかけ、金属板を歯科用コンポジットレジンにて基底部の厚みが2mmとなる様に上顎門歯後面に接着することにより、不均衡な咬合を誘発した。麻酔後、コントロールまたは性腺摘出群では装置を装着しなかった。雄に対するジヒドロテストロンから17 $\beta$ -エストラジオール合成に関与するアロマターゼの効果を遮断する群としてレトロゾールを有機溶媒にて希釈しALZET Pumpで用いて投与を行なった。アロマターゼ阻害薬を投与しないグループには生理食塩水をALZET Pumpを用いて投与した。雌雄共に最も変形性顎関節症の重篤化が認められる群に対して17 $\beta$ -エストラジオール補充(毎日0.03 $\mu$ gの17 $\beta$ -エストラジオール)投与群を設定した。

#### (2) 血清中の性ホルモン測定

顎下出血法により出血させ、凝固促進剤及び血清分離剤入りの微量採血管で血液を採取し、遠心分離により、血清を収集した。マウスの血清E2レベルを評価するために、ELISA法により17 $\beta$ -エストラジオールおよびジヒドロテストロン(DHT)を測定した。

### (3)組織化学的および免疫組織化学的染色

マウスの頭部を通常に従いパラフィン包埋した。サンプルの右側顎関節部を矢状断で薄切し(5μm厚) H-E 染色, サフラニン O 染色, TRAP 染色, 免疫組織化学を実施した。下顎頭の中央冠状部に対応する矢状切片で cartilage thickness 分析を行った。プロテオグリカンの面積は、サフラニン O 染色切片を使用して計算した。下顎頭軟骨におけるサフラニン O 陽性面積は、ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) を使用して、各群中央冠状部での、平方ミリメートル(mm<sup>2</sup>)あたりのサフラニン O 陽性領域の面積を測定し平均をとった。軟骨下骨における破骨細胞の分化を評価するために、TRAP 染色を行なった。平方ミリメートル(mm<sup>2</sup>)あたりの破骨細胞の総数をカウントした。免疫組織化学は、抗 MMP13 抗体、抗 ADAMTS5 抗体、抗 CAR1 抗体、抗 ANGPTL7 を一時的抗体として用いた。細胞核染色として Hoechst 33342、細胞骨格確認のための Actin 染色として Phalloidin を用いた。撮影は、共焦点レーザー顕微鏡を使用して実行された。

### (4)マイクロアレイ解析

実験開始 4 週間後のマウス下顎頭部から、RNA を抽出した。マイクロアレイ解析は、雌雄ともに骨・軟骨領域で変化の著しかった性腺摘出群とコントロール群を対象とし、関連遺伝子の網羅解析を行った。本研究では、予め予備実験として Angpt17 と Car1 遺伝子の発現が雌雄共通に変形性顎関節症群で発現が高く、この 2 つの遺伝子を疾患特異的遺伝子候補とした。

### (5)in vitro での過剰発現実験

angpt17 を過剰発現させた ATDC5 細胞株 と car1 を過剰発現させた MC3T3-E1 細胞株を樹立した。遺伝子導入には、Angpt17 および Car1 発現ベクタープラスミドを用い、エレクトロポレーション法により標的細胞に導入した。Car1 および Angpt17 遺伝子が過剰発現していることを確認するために、qRT-PCR による mRNA の定量評価および免疫組織化学染色によるタンパク質発現を確認した。

### (6)細胞培養

骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) および軟骨細胞-1 様細胞 (ATDC5) を、それぞれ 6 ウェルプレート / 1×10<sup>6</sup> 細胞および 48 ウェルプレート / 1×10<sup>5</sup> 2 細胞に播種した。MC3T3-E1 細胞は、培地が 80%コンフルエントに達した時点で、骨化培地に交換した。ALP 染色は 7 日目に、アリザリンレッド染色は 21 日目に実施した。プロテオグリカンの分泌を確認するため、ATDC5 細胞に対してマトリゲルを用いて 3 次元立体培養した。軟骨分化を促進し、生理的にミネラル化された細胞外マトリックスを作製した。21 日間培養後、アルシアンブルー染色およびサフラニン O 染色による色の変化を観察した。

### (7)統計分析

すべてのデータは、SPSS を用いて統計分析された。多重比較の場合は Tukey-Kramer test、2 群間の場合はスチューデント t 検定によって解析した。p 値<0.05 の差は、統計的に有意と見なされた。

## 4. 研究成果

### (1)性腺摘出による血清中の性ホルモン量について

精巣および卵巣摘出 (ORX および OVX) により血清中の性腺ホルモン量 (ジヒドロテストロン : DHT, 17 エストラジオール : E2) は著しく低下したことが明らかとなった。

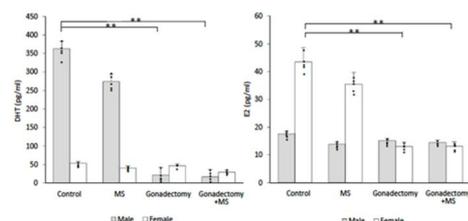


図1 血清中のDHTおよびE2量

## (2)雌雄マウスにおける下顎頭に対するメカニカルストレスと性ホルモンの影響

Control 群と比較して MS 群、OVX 群、MS+OVS 群で軟骨細胞層の厚みが減少した (図 2A-D,Q, 図 3A-D,Q)。軟骨細胞層直下の破骨細胞は、control 群と比較して OVX 群と MS 群は有意に多く、さらに MS+OVX 群で著しく破骨細胞が増加した (図 2E-H,R,図 3E-H,R)。プロテオグリカンの量は MS 群、MS+OVX 群で著しく減少し、OVX 単独では減少が僅かであった (図 2I-L,S, 図 3I-L,S, )。MMP13 は OVS 群と MS+OVX 群で著しく増加し、MS 単独だと発現は僅かであった (図 2M-P,T, 図 3M-P,T, )。

変形性顎関節症はすべての実験群で観察されたが、最も重篤な症状が観察されたのは、性腺摘出と下顎頭に機械的刺激を与えた群 (OVS+MS) であった。顎関節症はすべての実験群で観察されたが、最も重篤な症状が観察されたのは、性ホルモンと MS を減少させた群 (ORX+MS および OVS+MS) であった。これらの結果は、過剰な MS と減少した性ホルモンの複合効果を持つ新しい顎関節-OA マウスモデルの開発に成功したことを示している

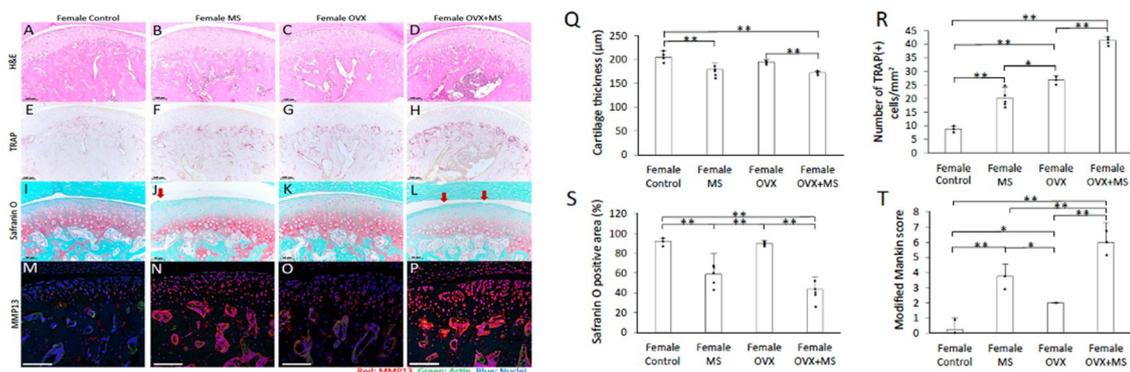


図 2 雌マウスにおける下顎頭に対する MS および OVS の影響について

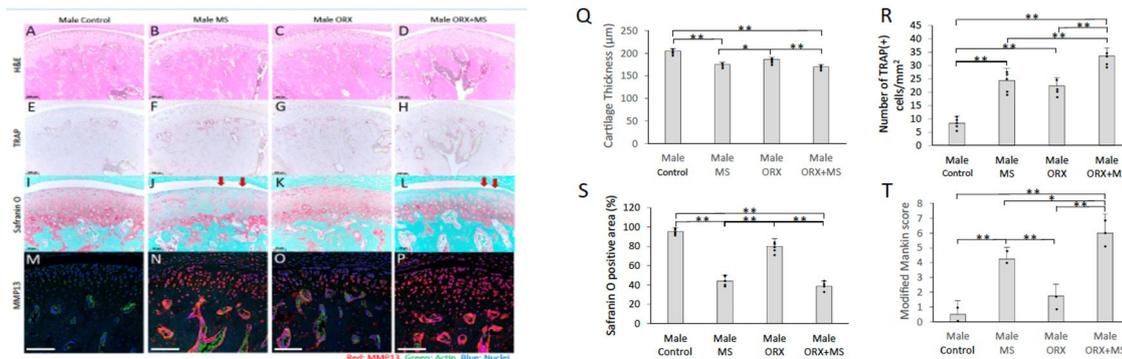


図 3 雄マウスにおける下顎頭に対する MS および OVS の影響について

## (3)雄マウスに対して MS を与え ORX さらにアロマターゼを遮断することによる影響について

雄性マウス下顎頭に対して機械的刺激および精巣摘出して変形性顎関節症は惹起されたが、さらにアロマターゼによる DTH から E2 合成阻害を行うと、より顕著に下顎頭軟骨の破壊が認められた。これは、DTH のみならず、副腎などにより合成される E2 が顎関節の保護に働くことを示唆する (図 4)。

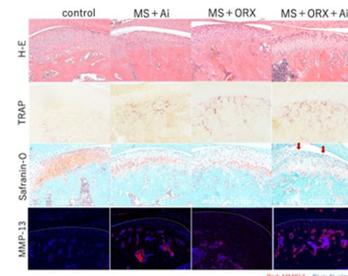


図 4 アロマターゼの遮断効果

## (4)疾患特異的遺伝子候補 angpt17 と car1 の変形性顎関節症との関わりについて

マイクロアレイ解析結果により、下顎頭の免疫組織学的染色を行い、実験群で発現が上昇した ANGPTL7 と CAR1 のタンパク発現と局在を調べた。ANGPTL7 は、OVX+MS 群と ORX+MS 群のそれ

それぞれにおいて、雌雄の下顎頭軟骨に強い局在を示した（図 4A-H, a-h）。CAR1 は軟骨細胞直下の軟骨下層の石灰化骨部分に強発現を認めた（図 4I-P, i-p）。つまり、ANGPTL7 は性ホルモンが減少した状況下で機械的刺激がかかると軟骨細胞に発現し、CAR1 は性ホルモンが減少した状況下で機械的刺激がかかると軟骨下層の石灰化骨部分に発現することが証明された。

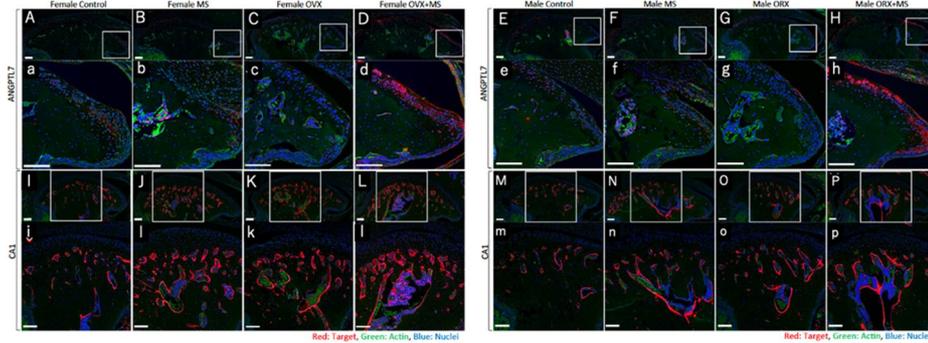


図 5 ANGPTL7 と CAR1 の下顎頭での発現と局在について

#### (5) MC3T3-E1 における car1 と ATDC5 における angpt17 の過剰発現株を用いた実験について

CAR1 は軟骨細胞下層の石灰化骨部分に発現することから MC3T3-E1 細胞に対して car1 遺伝子を過剰発現させた細胞と control 細胞の石灰化を比較検討した（図 6A）。car1 遺伝子を過剰発現した MC3T3-E1 細胞は、石灰化誘導しても control に対して石灰化が抑制された（図 6B）。つまり、car1 発現は軟骨細胞下層の脆弱な石灰化骨を誘導する。angpt17 は、軟骨細胞層に発現することから、ATDC5 細胞を用いて angpt17 遺伝子を過剰発現させた細胞と control 細胞のプロテオグリカン生成量を比較検討した（図 7A）。その結果、angpt17 が過剰発現すると、軟骨のプロテオグリカン量が減少し MMP13 に対する軟骨破壊や VEGF などによる血管新生による破壊につながると考えた（図 7B）。angpt17 または car1 の発現抑制が新規治療の標的として提案されることを示唆する。

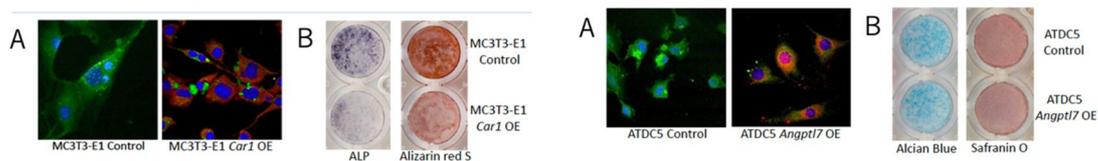
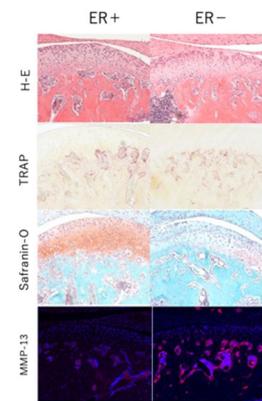


図 6 骨芽細胞に car1 を過剰発現させた実験 図 7 軟骨細胞に angpt17 を過剰発現させた実験

#### (6) エストラジオール補充療法による変形性顎関節症の予防効果

下顎頭に MS および ORX または OVX を与えたマウスに対して E2 を補充したことにより、変形性顎関節症が予防できるかを評価した。その結果、精巣や卵巣が摘出され、さらに下顎頭に過剰な MS が与えられたとしても十分な量の E2 が補充されていた場合には、下顎頭の破壊的病理所見は認められなかった。これはすなわち、E2 の減少が変形性顎関節症の病因の一つであり、血清中の E2 のモニタリングは、変形性顎関節症の早期発見や治療標的になり得ることを示唆する。



## 結論

変形性顎関節症の病因の 1 つとして下顎頭にかかる過剰な機械的刺激と性ホルモンの減少が証明された。また、E2 補充療法による下顎頭保護効果が認められた。しかしながら、至適投与量については今後の検討課題となる。さらに、過剰な機械的刺激と性ホルモンの減少により発現する病因遺伝子候補として angpt17 と car1 を提案する。これらは新規治療の標的となりうることを示され、今後更なる解析が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ootake Tomohisa, Ishii Takenobu, Sueishi Kenji, Watanabe Akira, Ishizuyka Youichi, Amano Katsuhiko, Nagao Masashi, Nishimura Kazuaki, Nishii Yasushi	4. 巻 29
2. 論文標題 Effect of mechanical stress and deficiency of dihydrotestosterone or 17 $\beta$ -estradiol on Temporomandibular Joint Osteoarthritis in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Osteoarthritis and Cartilage	6. 最初と最後の頁 1575-1589
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 Nagai Kohei, Ishii Takenobu, Ohno Tatsukuni, Nishii Yasushi	4. 巻 12
2. 論文標題 Overload of the Temporomandibular Joints Accumulates T Cells in a Mouse Model of Rheumatoid Arthritis: A Morphological and Histological Evaluation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 753754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2021.753754	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 石井武展	4. 巻 56
2. 論文標題 性ホルモンと機械的刺激による変形性顎関節症の病態発生機序の解明とその治療戦略	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 58-61
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 無
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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 戸村拓真, 石井武展, 西井 康
2. 発表標題 テストステロン由来のエストロゲンによる顎関節保護効果について
3. 学会等名 東京歯科大学学会・例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戸村拓真, 石井武展, 西井 康
2. 発表標題 変形性顎関節炎に対するテストステロン由来の17 エストラジオールによる顎関節 への影響
3. 学会等名 創立90周年記念第81回東京矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戸村拓真, 石井武展, 笠原典夫, 西井 康
2. 発表標題 テストステロン由来のエストロゲンによる変形性顎関節症への影響
3. 学会等名 第81回日本矯正歯科学会学術大会&第9回日韓ジョイントシンポジウム(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永井航平, 石井武展, 西井 康
2. 発表標題 顎関節リウマチの骨、軟骨破壊に対する機械的刺激の影響について
3. 学会等名 第310回東京歯科大学学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井武展
2. 発表標題 変形性顎関節炎は性ホルモンと機械的刺激により惹起される
3. 学会等名 日本顎関節学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 坂本好昭	4. 発行年 2022年
2. 出版社 克誠堂出版	5. 総ページ数 280
3. 書名 コンパス顔面骨骨折の治療	

〔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	松永 智 (Matsunaga Satoshi)  (70453751)	東京歯科大学・歯学部・准教授  (32650)	骨構造解析の実施
研究分担者	中村 貴 (Nakamura Takashi)  (80431948)	東京歯科大学・歯学部・講師  (32650)	分子生物学的解析の実施
研究分担者	溝口 利英 (Mizoguchi Toshihide)  (90329475)	東京歯科大学・歯学部・教授  (32650)	組織生物学的解析の実施

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