

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18781

研究課題名（和文）FAKと選択的オートファジーの相互作用の解明と変形性顎関節症治療への応用

研究課題名（英文）Investigation of the interaction between FAK and selective autophagy and Establishment of effective treatment for temporomandibular joint disorders with regulation of selective autophagy

研究代表者

矢野下 真 (Yanoshita, Makoto)

広島大学・医系科学研究科（歯）・助教

研究者番号：20823199

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）：オートファジーは細胞が有する不要物を分解するリサイクルシステムであり、生存に必須の機能である。オートファジーの機能が加齢とともに低下すると、多くのタンパク質が凝集し、最終的に細胞の変性、アポトーシスに至ると考えられている。顎関節軟骨は細胞増殖速度が遅く、細胞の恒常性と機能の維持のためオートファジーの役割が重要と推測される。本研究は変形性顎関節症とオートファジーの関連を明らかにすることを目的に行った。その結果変形性顎関節症ではオートファジーが低下することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で変形性顎関節症時にオートファジー機能を退化させる因子が特定され低下するメカニズムが解明された。変形性顎関節症においてオートファジーの低下を防ぐことで変形性顎関節症の新規治療法確立につながる可能性が示唆された。高齢者はオートファジーが低下していると報告されており、本研究の目的が達成されオートファジーが維持されれば、歯科領域疾患に留まらず、変形性膝関節症や関節リウマチなど、高齢者の関節疾患の予防および治療につながる可能性があり、医学的発展に影響を与えることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Autophagy is a recycling system that breaks down unwanted substances in cells and is an essential function for survival. It is thought that when the function of autophagy declines with aging, many proteins aggregate and eventually lead to cell degeneration and apoptosis. The cell growth rate of temporomandibular joint cartilage is slow, and it is speculated that the role of autophagy is important for maintaining cell homeostasis and function. The purpose of this study was to clarify the relationship between temporomandibular joint-osteoarthritis (TMJ-OA) and autophagy. As a result, it was clarified that autophagy decreased in TMJ-OA.

研究分野：矯正・小児系歯学

キーワード：変形性顎関節症 オートファジー 軟骨

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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を主兆候とする退行性疾患で、機械的負荷、加齢などの原因が複雑に絡んだ多因子性疾患であり、根治療法および予防法はない。申請者らは、TMJ-OAの主要因と考えられている過度な機械的負荷が、軟骨基質破壊を引き起こすメカニズムについて、細胞伸展装置および作製したラット TMJ-OA モデルを用い、インテグリンおよび FAK を介して炎症反応・軟骨破壊が惹起されることを解明した。

オートファジーは、細胞質内の不要物を分解することで様々な疾患を抑制する機構で、FAK との相互作用が報告されている。予備的検討において過度な機械的負荷によりオートファジー関連因子である LC3 の発現が抑制、Rubicon の発現が亢進されたことより、オートファジーは低下しており、異常タンパクの蓄積により軟骨破壊が引き起こされていると推測した。本研究は TMJ-OA における FAK と LC3 および Rubicon の関連について詳細な解析を行うとともに、オートファジーの維持が TMJ-OA における軟骨破壊に及ぼす影響についての検討を行う。

2. 研究の目的

TMJ-OA において、FAK を介した LC3 および Rubicon のオートファジー機能を解析することである。下顎頭軟骨に対する過度な機械的負荷時のオートファジー抑制メカニズムの解明、インテグリン-FAK シグナルを介した軟骨破壊とオートファジー関連因子との関係の解明、さらに過度な機械的負荷受容時の LC3 活性化および Rubicon 抑制による軟骨保護および修復作用について検討する。これらのメカニズムを制御することによる TMJ-OA の新規治療法確立を究極の目的とする。

3. 研究の方法

[実験 1] 過度な機械的負荷とオートファジー関連因子の網羅的解析

マイクロアレイ解析：ラット TMJ-OA モデルより下顎頭軟骨を単離後、今回申請するビーズ式組織・細胞破碎装置 FastPrep-24 5G (mpbio) により軟骨を粉碎し DNA を採取し、オートファジー関連因子について DNA マイクロアレイ解析を行う。

[実験 2] LC3 および Rubicon とインテグリン - FAK シグナルとの関連性の解明 (in vitro)

インテグリン阻害剤および FAK 阻害剤が LC3 および Rubicon へ及ぼす影響

ラット下顎頭軟骨細胞を単離培養し実験に用いる。軟骨の炎症状態を再現するため、インテグリン阻害剤 Cilengitide (50 μ M) または FAK 阻害剤 Defactinib (10 μ M) 添加後、細胞伸展装置 (Flexer Strain Unit®) を用いて、過度な機械的負荷 (15 kPa、毎分 30 サイクル) を与え、LC3 および Rubicon の変化について、定量 PCR による遺伝子解析および タンパク発現の検討のための定量 western blot 解析を行う。

LC3 活性化、Rubicon 抑制がインテグリン -FAK シグナルへ及ぼす影響

ウィルスベクターを用いた LC3 過剰発現および Rubicon ノックダウン後、細胞伸展装置を用いて過度な機械的負荷を与える。その後インテグリンおよび FAK に与える影響についてシグナル伝達物質のリン酸化について定量 western blot 解析を行う。

[実験 3] LC3 活性化、Rubicon 抑制が下顎頭軟骨の抗炎症および保護・修復に与える影響

LC3 の活性化、Rubicon の抑制が基質分解酵素産生に与える影響 (in vitro)

ウィルスベクターによる LC3 過剰発現および Rubicon ノックダウン後、細胞伸展装置を用いて過度な機械的負荷を与える。過度な機械的負荷付与により IL-1 や MMP-13 などの炎症関連因子の発現が亢進することはすでに明らかとなっている。定量 PCR による遺伝子解析により、各種炎症系マーカー (IL-1 , MMP-1, 3, 13, ADAMTS-5) および軟骨基質構成タンパク (Type II , X コラーゲン、アグリカン) の定量 PCR および定量 western blot による解析を行う。

LC3 活性化、Rubicon 抑制が下顎頭軟骨に与える影響 (ex vivo、in vivo)

器官培養高負荷モデルを用いて、ウィルスベクターによる LC3 の過剰発現および Rubicon のノックダウンによる抗炎症作用および軟骨保護効果について定量 PCR、定量 western blot 解析および組織学的検討を行う。次に、TMJ-OA モデルを用いて検討を行う。経時的に顎関節を採取し組織切片を作製後、組織学的検討を行う。HE 染色、トルイジンブルー染色、サフラニン 0 染色および免疫染色 (上記各種炎症系マーカーおよび軟骨基質構成タンパク) を行い、抗炎症効果、軟骨保護作用を検討する。また、未固定新鮮非脱灰凍結切片を作製し、レーザーマイクロダイセクションにて、定量 PCR および定量 western blot 解析を行う。さらに、X 線写真、マイクロ CT にて下顎頭形態を三次元的に解析する。

4 . 研究成果

in vivo

13 週齢 wistar 系雄性ラットに対して咬合斜面板を装着し開口状態を維持することで顎関節に過度な機械的負荷を付与した。24 時間後下顎頭表層からメスを用いて、骨と軟骨の境界で切除し、下顎頭軟骨を採取した。RNA を抽出し炎症反応および基質分解酵素の遺伝子発現量の変化について定量 PCR 検討を行った。炎症マーカーである IL-1 、COX - 2、TNF— 、基質分解酵素である MMP-3、MMP-13 の遺伝子発現が有意に上昇し、炎症状態にあることを確認した。負荷 20 日後に、4 % パラホルムアルデヒドにて灌流固定を行った。次いで、下顎頭部を摘出し 4 % パラホルムアルデヒド固定液中に 24 時間浸漬した。下顎頭軟骨を含む組織片を 10 %エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 溶液中で約 8 週間脱灰した後、アルコールを用いて脱水し、パラフィンに包埋し組織切片を作成した。オートファジー関連因子のタンパク発現について免疫組織学的検討を行った。過度な機械的負荷がオートファジー促進因子である m-TOR、オートファジーの発現を表す LC3 およびオートファジー抑制因子である Rubicon に及ぼす影響について解析を行った。過度な機械的負荷により m-TOR および LC3 は有意に発現が低下し、Rubicon の発現は亢進した。また、オートファジーと密接な関係をもつ低酸素誘導因子 HIF-1 および 2 につても

免疫組織化学染色を行ったところ発現の亢進が認められた。

ウィルスベクターの導入が奏功せずロックアウトによる検討を行うには至らなかった。

新たな TMJ-OA モデルを作製し検討を重ねた。関節円板を前方に転位させ、生体の TMJ-OA を模したモデルを作製し、オートファジーとの関連を検討した。顎関節部を明示し絹糸を用いて頬骨弓と関節円板を結紮することで前方転位を図る。新モデルは旧モデルと違い、生体と同様、長期間段階を経て変形が起きる特徴を有する。2、4、8、12 週間にてマイクロ CT による画像解析を行いながら飼育した後、灌流固定を行い、組織切片を作成した。ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色、サフラニン O 染色を行った。さらに LC-3、m-TOR、ULK1、ATG9、ATG14、Beclin1 および Rubicon について免疫組織化学染色を行った。弱い牽引力で転位させた群では転位 2 週間後に萎縮が観察された。一方、強い牽引力の場合、転位 1 週間後に萎縮が、転位 2 週間後に生体と同様に下顎頭前方部で骨棘が観察され骨のリモデリングが生じていると推察された。HE 染色において TMJ OA 群では正常な軟骨の層状構造が崩れており、線維細胞層での細胞数減少および増殖層における軟骨細胞の形態異常が認められた。また、サフラニン O 染色軟骨基質の染色性の低下が認められた。免疫組織染色では同モデルにおいても変形の進行とともに、オートファジーが抑制される結果となった。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yanoshita Makoto, Hirose Naoto, Sumi Chikako, Takano Mami, Nishiyama Sayuri, Tsuboi Eri, Onishi Azusa, Yamauchi Yuka, Asakawa Yuki, Ryo Kunimatsu, Tanimoto Kotaro	4. 巻 26
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 Diseases	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) 10.1111/odi.13494	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 Nishiyama Sayuri, Hirose Naoto, Yanoshita Makoto, Takano Mami, Kubo Naoki, Yamauchi Yuka, Onishi Azusa, Ito Shota, Sakata Shuzo, Kita Daiki, Asakawa-Tanne Yuki, Tanimoto Kotaro	4. 巻 -
2. 論文標題 ANGPTL2 Induces Synovial Inflammation via LILRB2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10753-020-01406-7	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 -

1. 著者名 Hirose Naoto, Okamoto Yuki, Yanoshita Makoto, Asakawa Yuki, Sumi Chikako, Takano Mami, Nishiyama Sayuri, Su Shao Ching, Mitsuyoshi Tomomi, Kunimatsu Ryo, Tanne Kazuo, Tanimoto Kotaro	4. 巻 44
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 Biology International	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) 10.1002/cbin.11293	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢野下真, 廣瀬尚人, 高野真実, 西山沙由理, 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, 西山沙由理, 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 西山沙由理, 廣瀬尚人, 矢野下真, 高野真実, 壺井英里, 久保尚毅, 大西梓, 山内優佳, 谷本幸太郎
2. 発表標題 LILRB2 は滑膜細胞において ANGPTL2 により誘導された炎症を制御する
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 久保尚毅, 粟田哲也, 廣瀬尚人, 矢野下真, 高野真美, 西山沙友理, 壺井英里, 北大樹, 大西梓, 山内優佳, 松永萌, 谷本幸太郎
2. 発表標題 エストロゲン投与の下顎骨成長への影響と軟骨における変化
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会大会・第5回国際会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢野下真, 廣瀬尚人, 西山沙由理, 大西梓, 山内優佳, 壺井英里, 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-k 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回一般社団法人日本顎関節学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 壺井英里, 廣瀬尚人, 麻川由起, 矢野下真, 大西梓, 高野真実, 西山沙由理, 久保尚毅, 北大樹, 谷本幸太郎
2. 発表標題 下顎頭の内軟骨性骨化におけるSemaphorin3Aの役割
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

1. 発表者名 坂田修三, 國松亮, 柄優至, 中谷文香, Putranti NAR., 矢野下真, 廣瀬尚人, 谷本幸太郎
2. 発表標題 ヒト初代培養軟骨細胞における炎症性サイトカインおよびマトリックスメタロプロテアーゼのIL-1 誘導性発現に対する高周波近赤外半導体レーザー照射の影響
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

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