

令和 4 年 5 月 19 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：20K18783

研究課題名(和文) ANGPTL2のMMPs誘導能による軟骨破壊メカニズムの解明とPCR治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of cartilage destruction mechanism of MMPs inducing ANGPTL2 and application to PCR treatment

研究代表者

高野 真実 (Takano, Mami)

広島大学・医系科学研究科(歯)・研究員

研究者番号：40846846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：In vitro実験系にて、ヒト軟骨細胞の培養に難航したため、滑膜細胞にて検討を行った。ANGPTL2の添加により、炎症性サイトカインおよび細胞外基質分解酵素において有意な発現の亢進を認めた。また、シグナル伝達経路についても発現の亢進が確認された。さらにLILRB2中和抗体によってJAK1およびJAK2の発現が、Integrin  $\alpha 5 \beta 1$ 中和抗体では、JAK1の発現の抑制が認められた。In vivo実験では、下顎頭の過度な圧迫によって、ANGPTL2の発現および受容体の発現は有意に亢進していた。しかし、ANGPTL2阻害剤の軟骨保護効果についての検証では有意な結果を得ることができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行性下顎頭吸収(Progressive Condylar Resorption：PCR)は、下顎頭の吸収を突発的かつ急速に生じる後天性疾患であり、下顎頭の吸収により、下顎枝高径の短縮を生じ、それに伴い著しい下顎骨の後退や重度の開咬を引き起こす。PCRの発症原因は不明で、根本的な治療法および予防法は無く、難治性疾患に認定されている。今回の研究結果により、下顎頭軟骨におけるANGPTL2の軟骨基質破壊メカニズムが、PCRの発症に影響している可能性および、ANGPTL2発現を制御することによりPCRを予防することができる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It was difficult to culture human chondrocytes, synovial cells were examined. ANGPTL2 upregulated Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  and LILRB2 expression. ANGPTL2 significantly upregulated the expression of inflammation-related factors. ANGPTL2 induced the phosphorylation of 3 subfamilies of MAPKs, NF- $\kappa$ B, and Akt. Anti-LILRB2 antibody suppressed the gene expression of inflammatory markers. Anti-LILRB2 antibody inhibited the phosphorylation of 3 subfamilies of MAPKs, NF- $\kappa$ B, and Akt. ANGPTL2 induced the phosphorylation of all types of JAKs. Anti-LILRB2 antibody suppressed the phosphorylation of JAK1, JAK2, and Tyk2, while it had no effect on JAK3 phosphorylation. In the rat TMJ compression model, the disorder of the cartilage layer structure, the disappearance of the chondrocytes, and the multilayer of synoviocytes, they occurs during the early stage of TMJ-OA. However, no significant results in the verification of the cartilage-protecting effect of the ANGPTL2 inhibitor.

研究分野：顎関節症

キーワード：PCR 滑膜細胞 ANGPTL2 LILRB2 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

進行性下顎頭吸収 (Progressive Condylar Resorption : PCR) は、下顎頭の吸収を突発的かつ急速に生じる後天性疾患である。下顎頭の吸収により、下顎枝高径の短縮を生じ、それに伴い著しい下顎骨の後退や重度の開咬を引き起こす。PCR の発症原因は不明で、根本的な治療法および予防法は無く、難治性疾患に認定されている。

アンジオポエチン様因子 (angiopoietin-like protein : ANGPTL) は、アンジオポエチン (angiopoietin : ANGPT) と構造上類似しているが、アンジオポエチンの特異的受容体である Tie1 や Tie2 とは結合しない 7 つの分泌型糖タンパク質として同定されており、脂質代謝、血管新生、炎症の発現および増悪など多様な機能を有している。その中でも Angiopoietin-like protein 2 (アンジオポエチン様因子 2 : ANGPTL2) は、過度な機械的負荷など様々な生体内のストレスにより発現異常を生じ、代謝性疾患や動脈硬化性疾患、がんなど様々な疾患の原因となるストレス応答性因子と考えられている。申請者らは、先行研究によって、ANGPTL2 が軟骨基質破壊を強力に誘導する性質を有していることを明らかとした。下顎頭軟骨における ANGPTL2 の軟骨基質破壊メカニズムが、PCR の発症に影響している可能性が考えられるものの、その詳細なメカニズムについては不明である。そこで軟骨における ANGPTL2 の軟骨破壊のメカニズムを解明するとともに、ANGPTL2 発現を制御することにより PCR を予防する新規治療法の確立を目指す本研究計画を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

ANGPTL2 は軟骨に対する機械的負荷により発現亢進し、また様々な経路を介したオートクライン作用も加わり、PCR といった軟骨変性疾患における軟骨分解の中心的因子である可能性が考えられる。本研究は下顎頭軟骨における ANGPTL2 の有する JAK-STAT シグナルを介した MMPs 分泌亢進メカニズムを解明することを目的とする。さらに ANGPTL2 阻害剤の PCR 治療薬としての有効性を検証する。これらの結果をさらに発展させ、特定された PCR 発症に関与するマーカー、サイトカインを利用し、採血および採尿といった簡便な手段で PCR の有無や発症リスクの可否を客観的に判定する検査法・診断法の確立へと繋げたいと考える。

## 3. 研究の方法

### 1) 軟骨細胞における ANGPTL2 添加の影響について

実験には 13 週齢 Wister 系ラットの下顎頭より単離培養した軟骨細胞を用いる。軟骨細胞に対する ANGPTL2 の影響について、炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , COX-2)、細胞外基質分解酵素 (MMP3 および MMP13) について、定量 PCR による遺伝子解析および western blot 解析を行う。また、その時に活性化されるシグナル伝達経路 (FAK, ERK, Akt, NF- $\kappa$ B, JAK および STAT) についても western blot 解析にて検討を行う。

### 2) 下顎頭軟骨における ANGPTL2 の局所投与の影響

ANGPTL2 を 13 週齢 Wistar 系ラットの顎関節に局所投与を行う。下顎頭の組織切片を

作製し、HE 染色、トルイジンブルー染色、サフラニン O 染色を行い、軟骨組織の構造破壊を観察する。また ANGPTL2、炎症性サイトカイン(IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , COX-2)、基質分解酵素(MMP-3 および MMP-13)、軟骨基質構成タンパク(Collagen Type II, X および Aggrecan)の免疫染色を行い、発現強度、部位を検討する。さらに X 線写真およびマイクロ CT を用いて、下顎頭形態を三次元的に解析する。全ての実験は、ANGPTL2 投与群と、非投与群を作製し、両群の違いを考察する。

### 3) ラット顎関節症モデルにおける ANGPTL2 阻害剤の軟骨保護効果について

ラット顎関節症モデルを用いて顎関節部に ANGPTL2 阻害剤をシリンジにて局所投与し、ANGPTL2、炎症性サイトカイン、細胞外基質分解酵素、および軟骨基質構成タンパクの免疫染色を行い、ANGPTL2 阻害剤の抗炎症効果、軟骨保護作用を免疫組織学的に検討する。実験 2、3 いずれも、投与後数日おきに顎関節を回収し、経時的变化を観察する。

## 4. 研究成果

In vitro 実験系にて、ANGPTL2 の添加が軟骨細胞に及ぼす影響について検討を行ったが、ヒト軟骨細胞の培養に難航し、結果を得ることができなかつたため、滑膜細胞にて検討を行った。ANGPTL2 の添加により、炎症性サイトカイン、細胞外基質分解酵素について定量 PCR による遺伝子解析および western blot 解析を行ったところ、全ての炎症性サイトカインおよび細胞外基質分解酵素において有意な発現の亢進を認めた。また、その時に活性化されるシグナル伝達経路(FAK, ERK, Akt, NF- $\kappa$ B および JAK)についても定量 western blot 解析にて発現の亢進が確認された。ANGPTL2 の滑膜細胞における JAK/STAT シグナル伝達経路の解析のため LILRB2 中和抗体および Integrin $\alpha$ 5 $\beta$ 1 中和抗体を添加し、検討を行ったところ、LILRB2 中和抗体では JAK1 および JAK2 の発現の抑制が認められた。また、Integrin $\alpha$ 5 $\beta$ 1 中和抗体では、JAK1 の発現の抑制が認められた。in vivo 実験においては、13 週齢 Wister 系顎関節症モデルラットを用いて ANGPTL2 および細胞外基質分解酵素タンパクの下顎頭軟骨における発現を確認するため、免疫染色を行った。下顎頭への咬合挙上装置による過度な圧迫によって、下顎頭軟骨での ANGPTL2 の発現および受容体の発現は有意に亢進していた。しかし、ANGPTL2 阻害剤の軟骨保護効果についての検証では有意な結果を得ることができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

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、谷本 幸太郎
2. 発表標題 LILRB2中和抗体は滑膜細胞においてANGPTL2により誘導された炎症を抑制する
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

〔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
---------	---------