

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：11401  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22592204  
 研究課題名（和文） 顎関節滑膜細胞における関節破壊に対するメカノトランスダクション機構の解明  
 研究課題名（英文） The elucidation of a mechanotransduction mechanism to the joint destruction in the temporomandibular joint synovial cell  
 研究代表者  
 高野 裕史（TAKANO HIROSHI）  
 秋田大学・医学部・助教  
 研究者番号：30282172

研究成果の概要（和文）： 本研究では、顎関節症の発症および進行に関与していると考えられるメカニカルストレスをヒト顎関節由来培養滑膜細胞へ加え、滑膜細胞内シグナルへの変換、すなわちメカノトランスダクションについてそのメカニズムの解明を試みた。東日本大震災の影響で培養細胞が死滅したため、十分なシグナル伝達の解明にはいたらなかったものの、培養滑膜細胞の圧縮刺激による破骨細胞の形成促進とそのメカニズムを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： In this study, the mechanical stress considered to participate in development of symptoms and advance of temporomandibular disorder was added to the human temporomandibular joint synovial cells, and the elucidation of the mechanotransduction mechanism in a synovial cell. Since the cultured cell became extinct under the influence of the Great East Japan Earthquake, although it did not result in the elucidation of sufficient signal transfer, promotion of formation and the mechanism of the osteoclast by compression stimulus of the synovial cells were clarified.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,220,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：メカニカルストレス、顎関節、メカノトランスダクション、培養滑膜細胞。破骨細胞、関節破壊

## 1. 研究開始当初の背景

顎関節症の病態解明に対する基礎的研究は、これまでに滑液の生化学的解析を中心に種々の炎症やそれに伴う免疫反応について多数の報告がなされてきた。近年では、分子細胞生物学的手法を用い、関節破壊、骨変形

等病態形成に関する研究やメカニカルストレスが病態形成に及ぼす影響などの研究が進んでいる。その中で申請者らは、顎関節症患者から採取した関節滑液中の細胞から骨吸収能を有する破骨細胞への分化、誘導に成功し、その誘導系は、滑膜細胞に支持されて

いることを報告した (Induction of osteoclast-like cells derived from the synovial lavage fluids of patients with temporomandibular joint disorders. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2007)。また、ヒト顎関節滑膜細胞の分離・培養に成功し、この細胞にメカニカルストレスを負荷すると、種々の炎症性メディエーターや破骨細胞誘導因子の遺伝子発現が上昇することを明らかにした。さらに、顎関節滑膜細胞への機械的圧縮ストレスが破骨細胞誘導を促進することによって、関節破壊を中心とした病態形成へ関与していることを明らかにした (Compressive mechanical stress promotes osteoclast formation through RANKL expression on synovial cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007)。これらの研究結果は、メカニカルストレスが顎関節症の発症や進行に深く関与していることを示唆するものであったが、顎関節滑膜細胞に加わる力学的刺激が関節破壊に対し、どのような影響を与えるか、受容、応答やその細胞内シグナル伝達・遺伝子発現について解析した研究はほとんど見あたらない。

## 2. 研究の目的

本研究では、顎関節症病態解明の一端として、ヒト顎関節由来培養滑膜細胞へのメカニカルストレスの滑膜細胞内シグナルへの変換、すなわちメカノトランスダクションについてそのメカニズムの解明を試みる。

## 3. 研究の方法

骨代謝やリモデリングは全身のおよび局所的制御により調節されており、局所においては、骨芽細胞/ストローマ細胞から分泌、産生されるサイトカインや成長因子がオートクリン、パラクリンに作用し、調節している。近年、サイトカインやプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) の作用により骨芽細胞/ストローマ細胞膜上に発現される破骨細胞分化因子(Receptor activator of NF- B ligand: RANKL) および同細胞より産生分泌される破骨細胞形成抑制因子(Osteoprotegerin: OPG)が同定され、RANKL と OPG 産生のバランスにより破骨細胞の形成が調節されることが明らかとなったことから、メカニカルストレス応答への関与が想定される遺伝子として初期応答遺伝子の *c-fos* と破骨細胞分化因子である RANKL に焦点を当て、それらの上流の遺伝子転写制御領域を解析する。すなわち顎関節培養滑膜細胞における細胞内シグナル分子である ERK (extracellular signal-regulated kinase) の細胞内局在、プロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 合成酵素遺伝子の発現、滑膜細胞がメカニカルストレスに応じて RANKL 産生や OPG 産生を変化させるかに着目し、その遺伝子発現と遺伝子発現変化をもたらす作用機序を検討する。それによってメカニカ

ルストレスの直接作用における関節破壊の分子レベルでのメカニズムの解明を試みる。

- (1) 顎関節培養滑膜細胞における細胞内シグナル伝達に対するメカニカルストレスの影響を明らかにするため、上皮増殖因子 (EGF) で誘導される細胞内シグナル分子である ERK の細胞内局在を調べる。
- (2) 顎関節培養滑膜細胞における増殖に及ぼすメカニカルストレスの影響を明らかにするため増殖関連遺伝子 *c-fos* の発現を調べる。
- (3) 顎関節培養滑膜細胞におけるメカニカルストレスの変化で促進される PGE<sub>2</sub> 産生のメカニズムを明らかにするために、PGE<sub>2</sub> 合成酵素 cyclooxygenase (COX) 1 および COX2 の遺伝子発現を調べる。
- (4) RANKL 及び OPG の遺伝子発現に与えるメカニカルストレスの影響を検討するため、顎関節培養滑膜細胞の RANKL および OPG の遺伝子発現変化を調べる。

## 4. 研究成果

顎関節滑膜細胞の採取、単離とメカニカルストレスを加えた培養

### ① 滑膜細胞の採取と培養

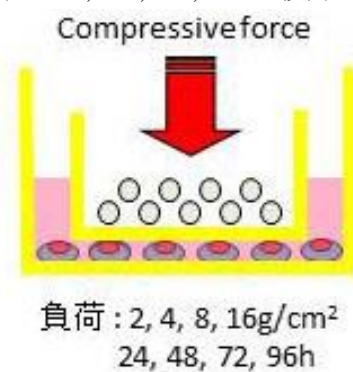
顎関節鏡視下手術、顎関節開放手術に際し得られた滑膜組織より滑膜細胞を単離、培養した。

採取した顎関節滑膜組織を培養し、Outgrowth してきた細胞を 5 継代培養。培養滑膜細胞として実験に使用。

### ② メカニカルストレスの負荷方法

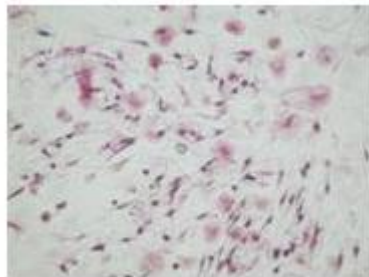
メカニカルストレス (機械的圧縮刺激) を培養滑膜細胞に加え、負荷方法を検討した。

細胞への圧縮刺激は、当教室で作製した圧縮培養システムを用いて行い、培養皿上で培養した細胞にガラスシャーレを置いて圧縮刺激を加えるが、ガラスシャーレの重量により圧縮強度のコントロールが可能である。今回は、圧縮刺激を 2g, 4g, 8g, 16g に設定し、刺激時間を 24h, 48h, 72h, 96h で検討した。

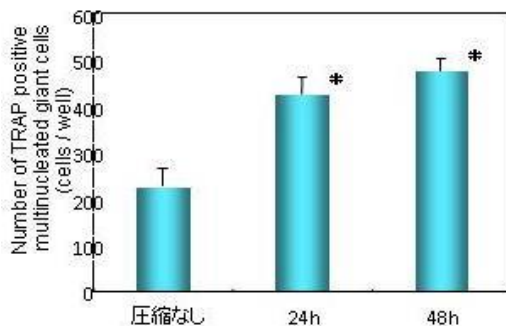


③ 圧縮刺激を加えた培養滑膜細胞の破骨細胞誘導支持能と破骨細胞誘導メカニズムの解析

健常人末梢血単球と培養滑膜細胞の共培養 (rhM-CSF、1, 25-(OH) 2D3添加) の際、上記の圧縮刺激を加え、破骨細胞誘導を試み、形成されたTRAP陽性多核巨細胞数を評価した。また、培養滑膜細胞に圧縮刺激を加えた際のRANKLの発現についてRT-PCR法を用い、評価した。その結果、培養滑膜細胞と健常人末梢血単球との共培養による破骨細胞誘導系では、圧縮刺激を加えることによってTRAP陽性の多核巨細胞形成数が有意に増加し、また、RANKL遺伝子発現は増強した。これらの結果から培養滑膜細胞は、圧縮刺激により



TRAP陽性多核巨細胞

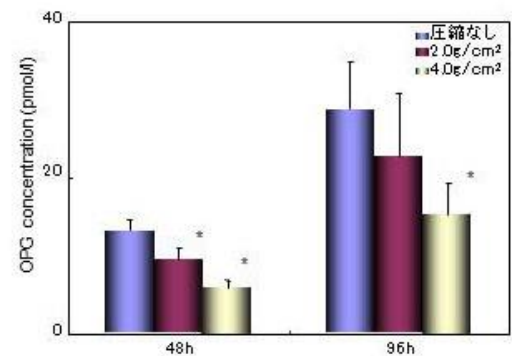
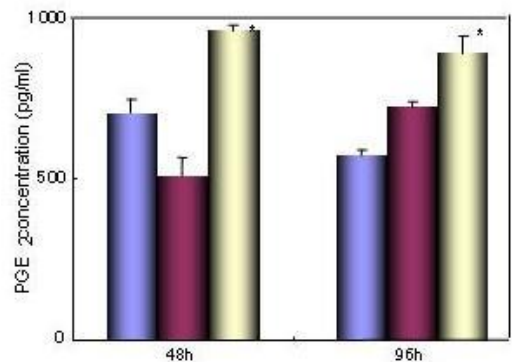
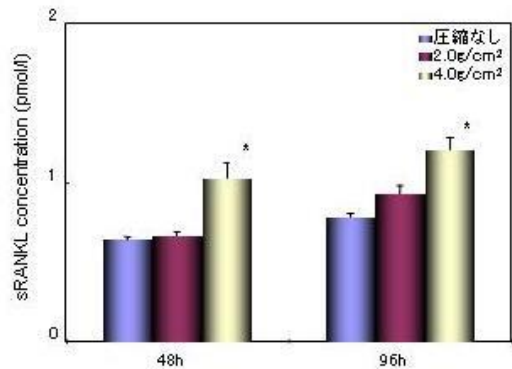


RANKLの発現を増強させることにより破骨細胞の形成を促進させることが明らかとなった。

④ PGE2, sRANKL, OPG産生に対するメカニカルストレスの影響

メカニカルストレスの変化がPGE2, sRANKL, OPG2産生に及ぼす影響を明らかにするため、培養滑膜細胞に上記メカニカルストレスを加え培養し、培養上清中のPGE2, sRANKL, OPG2濃度をELISA法により測定した。その結果、PGE2, RANKLはメカニカルストレスを加えないcontrolに比べ、圧縮時間、圧縮刺激強度依存的にPGE2, RANKL産生は

増加したが、OPGはcontrolに比べ、圧縮時間、圧縮刺激強度依存的にOPG産生は減少した。



⑤ 外傷による下顎骨関節突起骨折の顎関節滑液中細胞の培養

受傷時に顎関節部に強いメカニカルストレスが加わる下顎骨関節突起骨折の顎関節滑液中細胞を培養 (rhM-CSF、1,25-(OH)2D3を添加) すると、多数のTRAP陽性の多核巨細胞が形成され、RT-PCRにてRANKL遺伝子発現は増強した。また、滑液中のM-CSF,PGE2,RANKL,OPG濃度をELISA法により測定するとcontrolに比べ、骨折群で有意にM-CSF,PGE2,RANKL濃度は上昇し、OPG濃度は有意に低下した。

これらの実験結果から、顎関節へのメカニカルストレスは、滑膜細胞における

RANK/RANKL/OPGシステムを介して、破骨細胞誘導の亢進による関節破壊およびリモデリングに関与することが明らかとなった。

本研究中に発生した、2011. 3. 11の東日本大震災時の停電にて培養に用いていたインキュベーターが機能せず、培養中細胞はすべて使用できなくなった。また、凍結保存していた細胞も温度上昇により、変化が生じたと思われ、その後の培養にて増殖能が著しく低下し、実験に使用できなくなったため、受傷時に顎関節部に強いメカニカルストレスが加わる下顎骨関節突起骨折の顎関節滑液中細胞も試料に加え、関節破壊、リモデリングとの関連を検討した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 高野裕史, 高橋 哲, 永井宏和, 中田 憲, 伊藤 悠, 福田雅幸 (2010) 機械的圧縮ストレスがヒト顎関節由来培養滑膜細胞へ及ぼす破骨細胞誘導メカニズムの解析. 第 23 回日本顎関節学会総会. 7 月, 東京
- ② 高野裕史, 高橋 哲, 永井宏和, 中田 憲, 伊藤 悠, 福田雅幸 (2010) ヒト顎関節由来培養滑膜細胞における機械的圧縮ストレスの RANKL 発現に及ぼす影響. 第 55 回 (社) 日本口腔外科学会総会. 10 月, 千葉
- ③ Hiroshi Takano, Tetsu Takahashi, Akira Nakata, Seiichi Kuwajima, Masayuki Fukuda (2011): Osteoclast-like cells derived from joint-infiltrating cells in synovial fluid of temporomandibular joint patients with condylar process fractures of mandible. The 2<sup>nd</sup> International and the 24<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for the Temporomandibular Joint, July, Hiroshima
- ④ 高野裕史, 高橋 哲, 中田 憲, 桑島 精一, 山崎雅人, 福田雅幸 (2012) メカニカルストレスによる顎関節滑膜細胞を介した骨代謝メカニズムの解析. 第 57 回 (社) 日本口腔外科学会総会, 横浜

※第 23 回日本顎関節学会総会・学術大会、The 2<sup>nd</sup> International and the 24<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for the Temporomandibular Joint では、優秀ポスター賞を受賞。

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高野 裕史 (TAKANO HIROSHI)  
秋田大学・医学部・助教  
研究者番号：30282172

##### (3) 連携研究者

福田 雅幸 (FUKUDA MASAYUKI)  
秋田大学・医学部・准教授  
研究者番号：20272049  
永井 宏和 (NAGAI HIROKAZU)  
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授  
研究者番号：50282190  
中田 憲 (NAKATA AKIRA)  
秋田大学・医学部・助教  
研究者番号：50400510