

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 5 月 31 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成 22～24 年度

課題番号：22592227

研究課題名（和文） 関節滑膜細胞におよぼす伸展ストレスの影響；酸化ストレスと遺伝子発現の誘導

研究課題名（英文） The effect of the temporomandibular synovial cells by the mechanical stretch.

研究代表者

川上 哲司（KAWAKAMI TETSUJI）

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60254512

研究成果の概要（和文）：顎関節症は、炎症をともなう複合的疾患であり、主に関節滑膜に対する過剰な機械的ストレスが引き金となって発症するとされているが、その発症機構は仮説の域にとどまっている。本研究は、培養滑膜細胞を用いて、伸展負荷の細胞に対する影響を、活性酸素種の産生、炎症性メディエーター遺伝子の発現、DNA 傷害、転写因子の活性化といったレベルで検証することで、発症に関わる因子とそれらの相互作用を明らかにし、発症にいたる一連の過程の解明につなげた。

研究成果の概要（英文）：Temporomandibular disorders (TMD) show complex symptoms associated with inflammation, pain and degeneration of the peripheral tissues including synovium. Although it is believed that excessive mechanical stress on synovium causes development of TMD, the molecular mechanism by which mechanical stress triggers TMD has still remained unclear. In order to examine the effect of mechanical stress on synoviocytes, rabbit synovial cells were cyclically stretched in vitro. The stretch efficiently increased the gene expressions of cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and NF- κ B responsive reporter gene constructs. The results demonstrate that mechanical stress on synovial cells not only induces gene expressions of COX-2 and iNOS but also affects PAR synthesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
平成 23 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 24 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：滑膜細胞、顎関節、酸化ストレス、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

顎関節症の発症には、歯ぎしりや異常咬合といった異常なメカニカルストレスが関係するとされており、特に若い女性に発症しやすい。痛みをとまなう開口・咀嚼障害といったQOLの低下をきたすが、その多くは時間経過とともに自然寛解ないし治癒に至る。しかしながら、慢性化により咬合異常の整復、関節腔内の洗浄、関節鏡による外科的治療といった処置を必要とするケースも10%以上の割合で存在する。

顎関節症患者の関節腔滑液中には、一酸化窒素(NO), PGE₂, TNF α と言った炎症性メディエーターが検出されている。また、患者滑膜組織に、cyclooxygenase-2(COX-2)や inducible NO synthase (iNOS)の発現亢進が観察されることから、滑膜におけるiNOSおよびCOX-2の発現誘導が、NOやPGE₂を増加させ、これらが痛みや炎症惹起の原因となると推測されている。一方、申請者らは、患者滑液中にプロテオグリカンやタンパクの分解に関わるmatrix metalloproteinases (MMPs)、特にMMP-3が増加していることを報告した。COX-2やiNOS同様に、TNF α やMMP-3も転写調節因子NF κ Bにより発現亢進されることから、これら炎症や組織破壊に関わる因子の発現誘導におけるNF κ Bの重要な役割が示唆されたが、その直接的証明はなされてこなかった。

2. 研究の目的

顎関節症は、炎症をとまなう複合的疾患であり、主に関節滑膜に対する過剰な機械的ストレスが引き金となって発症するとされているが、その発症機構は仮説の域にとどまっている。本研究は、培養滑膜細胞を用いて、

伸展負荷の細胞に対する影響を、活性酸素種の産生、炎症性メディエーター遺伝子の発現、DNA 傷害、転写因子の活性化といったレベルで検証することで、発症に関わる因子とそれらの相互作用を明らかにし、発症にいたる一連の過程の解明につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

伸展ストレスによる関節滑膜細胞の炎症関連遺伝子の発現誘導にいたる全過程を解明するために、1年目は、変異ポリ ADP リボース合成酵素-1 (PARP-1)の強制発現もしくはノックダウンによるNF κ B活性化への影響を調べることで、ポリ ADP リボース (PAR) 合成とNF κ B活性化経路の関連性を明らかにする。また、PARP-1同様にNAD⁺を基質とするSIRT1のNF κ B活性化への関与について解析する。2年目は、伸展ストレスがなぜNF κ Bを介して炎症関連遺伝子の発現を誘導するのかという、根本的な問題点に踏み込む。そのため、伸展ストレスがミトコンドリアもしくは小胞体にとってストレス負荷になるのか、さらに、それら細胞内器官におけるラジカル産生が重要な役割を演じるのかについて、解析を進める。

(1) PARP-1, PAR 合成, SIRT1 およびNF κ Bの活性化の関連性について明らかにする。NF κ B活性化におけるポリ ADP リボース合成酵素-1 (PARP-1)およびポリ ADP リボース (PAR)の役割の解明

① 伸展ストレスにとまなう PAR 合成亢進機構について：活性酸素種消去剤存在下では、伸展ストレスにとまなう PAR 合成の亢進が抑制されることから、DNA 損傷が

PARP-1の活性化の主因と考えるが、DNA損傷の証明は未実施である。そこで、DNA損傷の有無について、コメットアッセイ等によりDNA切断の有無を検証する。仮に、DNA切断非依存的にPAR合成亢進が起こると推測された場合、CTCF依存的PARP-1活性化経路の関与についても検討を加える。

- ② PARP-1ノックダウンの伸展ストレス依存性NF κ B活性化におよぼす効果について：ウサギ滑膜線維芽細胞に対する伸展ストレスは、NF κ B依存的COX-2およびiNOS発現誘導とともに、著明なPAR合成を亢進することを見いだした。他細胞を用いた実験系から、PARP-1はNF κ Bのコアクチベーターであるとする説が提唱されている。PARP-1siRNAによるPARP-1消失が、NF κ B活性化におよぼす効果を検討することで、NF κ B活性化経路とPARP-1間のクロストークの有無を明らかにする。仮に、PARP-1消失により、伸展ストレス依存性NF κ Bの活性化が抑制された場合、PARP-1各ドメインを欠損させた変異PARP-1を過剰発現させ、どのドメインがNF κ Bの活性化に必要なのかを明らかにする。
- ③ PAR合成の阻害もしくは分解亢進の伸展ストレス依存性NF κ B活性化におよぼす効果について：PARP-1の自己ポリADPリボシル化(PAR化)が、NF κ Bの活性化あるいは脱抑制に必須とする説がある。PAR阻害剤存在下、あるいはポリADPリボースグリコヒドラーゼ(PARG)の過剰発現下での、伸展ストレス依存性NF κ Bの活性化について検討を加える。また、DNA結合ドメイン欠損PARP-1遺伝子の過剰発現が、伸展ストレス依存性NF κ Bの活性化を抑制するののかについて検討する。

(2) SIRT1におけるNF \cdot Bの活性化の関連性について明らかにする。伸展ストレス依存性NF κ B活性化へのSIRT1の関与の解明

- ① 伸展ストレス依存性NF κ B活性化におけるSIRT1の抑制の可能性について：研究目的欄で述べたように、SIRT1はNF κ Bの活性化を抑える方向に作用する。PAR合成によるNAD⁺の大量消費は、NAD⁺を必要とするSIRT1の活性を低下させ、結果的にNF κ Bの阻害が解除される可能性が考えられる。SIRT1の強制発現が伸展ストレス依存性NF κ Bの活性化を負に制御するのか、又、PAR合成にともないSIRT1の活性が低下するののかについて、伸展前後のNF κ Bのアセチル化レベル、COX-2とiNOSの発現レベル等を指標に検討を加える。
- ② レスベラトロールによる伸展ストレス依存性COX-2、iNOS発現の抑制の可能性について：レスベラトロール(RSV)は、関節炎治療薬になりうる可能性が示唆されている。RSVは、SIRT1のアロステリック活性化因子でもあることから、本実験系において、その効果を検証する。

(3) PAR合成およびNF \cdot Bの活性化の関連性の解明に引き続き、伸展ストレスとPAR合成およびNF κ Bの活性化を連関させる機構について明らかにする。申請者らは、ラジカル化合物(Reactive oxygen species; ROSおよびReactive nitrogen species; RNS)の関与に着目しており、伸展ストレスにともなうROS/RNSの発生機構および、ラジカル化合物のPAR合成、NF κ Bの活性化以外への作用についても明らかにする。

- ① 伸展ストレスにともなうラジカル化合物の発生メカニズムの解明

伸展ストレスのミトコンドリア電子伝達系におよぼす効果について：ミトコンドリア電子伝達系は、通常においても電子の受け渡しの不備によりラジカルが産生しやすい主要な細胞内小器官である。伸展ストレスによる細胞各器官の損傷は、ATP の供給を必要とすることから、ラジカルの発生が増加すると推測される。あるいは、ミトコンドリア自体の損傷が、電子伝達系における電子の受け渡しを不能とし、ラジカルの発生が起こることも想定される。ミトコンドリア膜電位変化、ミトコンドリア指向性蛍光試薬の分布、伸展ストレス負荷細胞から精製したミトコンドリアの酸化的リン酸化能等を指標とし、伸展ストレスに伴うミトコンドリアの機能不全について検討する。

伸展ストレスの小胞体におよぼす効果について：外界からの刺激に応答して成熟に至らない不完全なタンパクが小胞体(ER)に蓄積することで、ER ストレスと呼ばれる現象が起こる。ER 内におけるタンパクの立体構造の構築の際に、分子内ジスルフィド結合が形成される過程で、電子の受け渡しが起こり、ROS が発生する。伸展ストレスは、ER に対するストレス負荷作用を示すことで、ROS の産生を亢進する可能性も考えられる。事実、ER ストレスは、NF κ B を活性化するという事実は、伸展ストレスによる NF κ B の活性化への ER ストレスの関与の可能性を示唆している。ER ストレスによる NF κ B 活性化の鍵は、IRE1 α (inositol-requiring 1 α) のリン酸化である。また、ER ストレスは、ER からの Ca²⁺ の放出を促すことから、これらを指標として、伸展ストレスが ER ストレスとなりうる可能性について解析する。また、ER から放出した Ca²⁺ は、ミトコンドリア内膜の脱分極を惹起し、ROS の産生を促す。

③ RNS の PARP-1 と NF κ B に対する直接的作

用の解析

RNS による PARP-1、NF κ B の翻訳後修飾について：NO およびそれから派生する peroxynitrite (PN) は、それぞれ多様なタンパクを S-ニトロソ化およびニトロ化修飾することが知られている。これら修飾は、タンパク分子の機能の抑制、促進を導くとされており、PARP-1、NF κ B についてもこれら修飾のおよぼす効果についてそれぞれ相反する報告がなされている。申請者らは、伸展ストレスにともないニトロ化されたタンパクが増加することを観察している。伸展ストレスが、PARP-1 を S-ニトロソ化するのか、あるいはニトロ化するのかについて解析を行い、RNS の直接的作用について明らかにする。同様に、議論のある NF κ B についても、両翻訳後修飾の可能性およびそれによってもたらされる効果について検討する。

4. 研究成果

(1) 申請者らは、異常なメカニカルストレスが細胞に未知因子を産生させ、それが NF κ B の活性化を誘導し、結果的に炎症誘導因子の発現亢進を惹起するという仮説を立て、それを検証するために、培養系滑膜線維芽細胞を伸展負荷できる *in vitro* モデルシステムを構築した。本システムを用いることで、周期的伸展ストレスが、NF κ B の活性化、および NF κ B 依存的に COX-2 や iNOS の発現が亢進されること、さらに NO の産生増加が誘導されることを示した。

(2) この結果は、患者組織で観察される分子レベルでの現象を本システムで再現できることを示唆しており、本システムが顎関節症の発症モデル系として有用な道具であることを示している。構築した伸展負荷システムを用いて、滑膜において活性酸素はどのようにして発生しうるのか、また、生じた活性酸素は NF κ B の活性化にどのように関係する

のかについて究明した。活性酸素は細胞毒性を示すが、特に DNA に対する傷害が問題である。伸展ストレス負荷を与えた滑膜細胞では、ポリ ADP リボース合成酵素-1 (PARP-1) によるポリ ADP リボース (PAR) 合成が亢進すること、および活性酸素種除去剤により PAR 合成は抑えられることを明らかにした。DNA 損傷が起こると、PARP-1 は DNA 切断点に結合して過剰な PAR 合成を触媒することから、上記の結果は、伸展ストレス負荷により活性酸素種依存的に DNA 損傷が誘導されたことを強く示唆している。つまり、伸展ストレスにより活性酸素の発生が起こったと考えられるが、その機序については不明である。

(3) 本研究は、培養条件下で滑膜細胞に伸展負荷をかけることを可能にするシステムを用いることで、メカニカルストレスに対する細胞の応答を、分子レベルで解明しようとする点に特色があり、本研究を進展させることで、新たな治療戦略の構築を促進することが期待される。従来、顎関節症の研究においては、炎症性メディエーターに注目が集まっていたが、申請者らの研究から、DNA 損傷を介した応答経路も発動されている可能性が示唆された。従って、伸展ストレスにともなう活性酸素種の産生から NF κ B の活性化を介した COX-2 や iNOS 発現にいたる情報伝達経路、および活性酸素種依存の DNA 損傷が引き金となる PAR 合成経路の NF κ B 活性化へのクロストークの有無について明らかにすることが課題である。

(4) NAD⁺依存性脱アセチル酵素である SIRT1 は、NF κ B を脱アセチル化して、その転写活性を抑える。これに関連して、関節炎治療に有効である植物由来のレスベラトロール (RSV) は、NF κ B の活性化を抑制し、SIRT1 の正のアロステリック因子でもある。SIRT1 と PARP-1 は、ともに NAD⁺を基質とする。従って、

申請者らが見いだした伸展ストレスによる PAR 合成の亢進は、PARP-1 による NAD⁺の大量消費が間接的に SIRT1 機能を低下させ、結果的に NF κ B の活性化維持に寄与している可能性も考えられる。あるいは、伸展ストレスによる損傷の修復のために ATP が必要となり、結果ミトコンドリアでの電子伝達系が活発に活動し、その過程で逸脱した電子により活性酸素が発生し、それが DNA 損傷、あるいは NF κ B の活性化に結びつく可能性も考えられる。従って、これらの点についても、本研究において検討を加えることで、新たな治療法の開発の手がかりとしたい。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Morisugi T, Tanaka Y, Kawakami, Kirita T: Mechanical stretch enhance NF- κ B-dependent gene expression and poly (ADP-ribose) synthesis in synovial cells. The Journal of Biochemistry 147:633-644, 2010.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 哲司 (KAWAKMI TETUJI)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：60254512

(2) 研究分担者

田中 康春 (TANAKA YASUHARU)
琉球大学・医学部・教授
研究者番号：20124878

(3) 連携研究者

なし