

## 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 24 年 6 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22792053

研究課題名（和文） 変形性顎関節症における軟骨破壊の分子生物学的解析：HIF-1 活性化の機序の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of chondrocyte apoptosis in temporomandibular joint - osteoarthritis; clarification of the hypoxia-inducible factor-1

研究代表者

白倉 麻耶（Shirakura Maya）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・特任助教

研究者番号：70549013

研究成果の概要（和文）：機械的負荷を与えながら 1%、5%、10%、15%、常酸素分圧下で細胞を培養し HIF-1 活性化を検討した。その結果、負荷を与えない場合には 1%酸素分圧下でのみ HIF-1 活性化が認められたのに対し、負荷群では全ての分圧下で有意に HIF-1 活性が上昇する傾向が認められた。さらに HIF-1 関連遺伝子、破骨細胞関連遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR を用いて検討したところ、1%、5%の両条件下で機械刺激による遺伝子発現増強が認められた。

研究成果の概要（英文）：Giving mechanical stress, the cells were cultured under 1%, 5%, 10%, 15% pO<sub>2</sub>, and normoxic condition and HIF-1 activity was analyzed. As a result, HIF-1 was observed only under 1% pO<sub>2</sub> condition without loading. On the other hand, HIF-1 tended to increase under every condition with loading. Furthermore the activation of HIF-1 was evaluated by a real-time RT-PCR analysis for HIF-1 target genes and osteoclast-relating genes. As a result, mechanical stimuli strikingly increased these genes expression under 1% and 5% pO<sub>2</sub>.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 矯正・小児系歯学

キーワード：歯科矯正学

## 1. 研究開始当初の背景

Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) は低酸素下で発現する転写因子であり、がんや心疾患などの身近な疾患の発症・進行に重要な働きをしていることが報告されている。近年、変形性関節症において軟骨部位に HIF-1 $\alpha$  の発現が認められることが注目されている。

一方で、歯科臨床においてしばしば見られ

る顎関節症のうち、変形性顎関節症 (temporomandibular joint-osteoarthritis) (以下 TMJ-OA) は下顎頭への異常な負荷もしくは過剰な負荷が顎関節構成要素を障害する圧迫力となり、表層軟骨の変性や骨吸収を引き起こすことが報告されている。多因子的な要素が強い疾患であるが、その中で、特に以下のことに注目した。

1. Tanaka ら (2005) は、強制開口による顎関節への持続的な負荷が下顎頭軟骨の退行性変化や隣接する軟骨下骨における血管内皮新生因子 vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現が誘導されることを報告した。

2. 近年軟骨の恒常性維持や変形性関節症 (osteoarthritis) (以下 OA) の病態変化に、低酸素刺激と hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) が重要な役割を果たしている可能性が報告された (Pfander and Gelse, 2007)。

3. HIF-1 $\alpha$  は低酸素刺激で活性化される転写因子として知られており、VEGF を誘導し、血管新生を促進することで創傷の治癒や緩和に働くことが知られている。

4. 低酸素刺激以外にも、炎症反応において発現する TNF- $\alpha$  やメカニカルストレスが軟骨における HIF-1 $\alpha$  の発現を誘導することが報告された (Albina et al., 2001; Pufe et al., 2004)。

5. ラットを用いた TMJ-OA モデルにおいて下顎頭への負荷日数に比例して下顎頭成熟軟骨層に HIF-1 $\alpha$  が発現すること、低酸素下培養軟骨細胞において、成熟期に値する軟骨細胞に HIF-1 $\alpha$  が発現し、VEGF を始めとする HIF-1 $\alpha$  標的遺伝子の発現および破骨細胞関連遺伝子のうち破骨細胞分化抑制遺伝子 osteoprotegerin (OPG) の発現抑制が引き起こされることが示され、HIF-1 $\alpha$  と TMJ-OA との関連性が示唆された。

このように、これまでの実験で TMJ-OA において下顎頭軟骨に HIF-1 $\alpha$  が発現することが示された。

## 2. 研究の目的

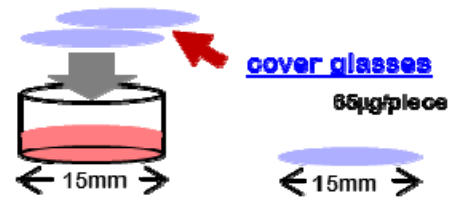
本研究では、変形性関節症の発症、進行における HIF-1 $\alpha$  の関与とその機序として考える機械刺激の関与の有無を明らかにし、そのメカニズムを検討することにより変形性顎関節症の発症機序の一部を解明し、臨床応用に結びつけることを最終的な目的とする。

## 3. 研究の方法

培養軟骨細胞およびラット下顎頭軟骨における HIF-1 $\alpha$  発現に及ぼす機械刺激の影響を分子生物学的に検討した。さらに、低酸素刺激、機械刺激の相互作用が軟骨細胞に及ぼす影響について分子生物学的に検討し、TMJ-OA における HIF-1 $\alpha$  発現機構の解明を行った。

培養細胞に機械刺激を与える方法として、今回我々は培養細胞に対し直接カバーガラスにより負荷をかけ、HIF-1 $\alpha$  の発現検討を行った。低酸素刺激としては 1%、5%、10%、15% の酸素分圧下で低酸素下培養を行った。HIF-1 $\alpha$  及び関連因子の発現検討には、ルシフェラーゼレポー

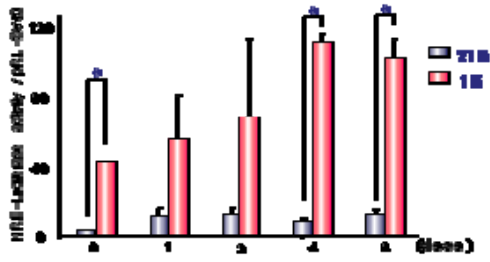
ターアッセイならびにリアルタイム RT-PCR 法を用いた。



- ▶ **Transient transfected hypoxia response element (HRE)-driven luciferase reporter assays**  
with 0, 1, 2, 4, 8 pieces/well of cover glasses
- ▶ **Real-time RT-PCR analyses for HIF-1-target genes (*DEC1, ADM, CA9*) or osteoclast-relating genes (*VEGF, BMP-2, PDGF, OPN*)**  
with 0, 1 pieces/well of cover glasses

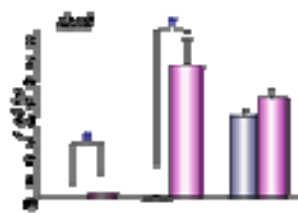
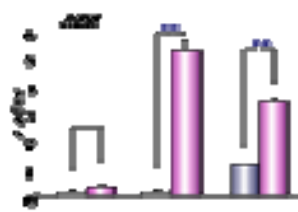
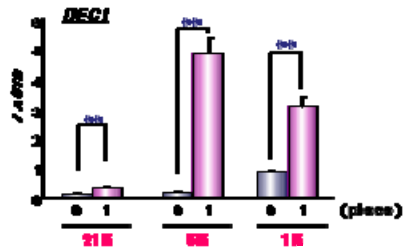
## 4. 研究成果

(1) 始めに機械刺激によるストレスの変形性顎関節症の発症・進行への影響を検討するため、骨芽細胞様細胞 Saos-2 に様々な荷重負荷を与え、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて HIF-1 $\alpha$  遺伝子発現を検討した。その結果、軽度の負荷を与えながら 1% ならびに常酸素分圧下で細胞を培養し HIF-1 $\alpha$  活性化を検討したところ、負荷を与えない場合では 1% 酸素分圧下でのみ HIF-1 $\alpha$  活性化が認められたのに対し、負荷を与えたものではコントロールと比較し、いずれの分圧下でも有意に HIF-1 $\alpha$  活性が上昇する傾向が認められた。



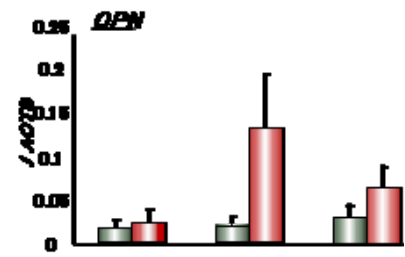
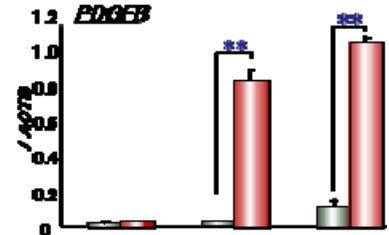
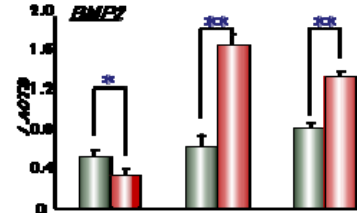
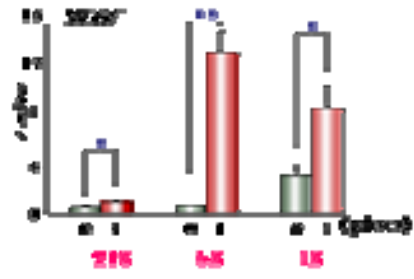
Cover glasses activated HRE-driven luciferase activities even in normoxia. Furthermore, hypoxic treatment enhanced those activities.

(2) 次にリアルタイム RT-PCRをもちいて HIF-1 関連遺伝子 DEC1, ADM, CA9 の発現検討を行った。その結果、図のように 1% 条件下で遺伝子発現増強が認められた。さらに、1%、5% のいずれの低酸素条件下でも機械刺激による遺伝子の発現増強が認められた。



The expressions were enhanced with a piece of glass even in normoxia, and increased in hypoxic conditions.

(3) 破骨細胞関連遺伝子 VEGF, BMP2, PDGF, OPN の発現を検討したところ、HIF-1 関連遺伝子と同様にして 1% 条件下で遺伝子発現増強が認められた。さらに、1%、5% のいずれの低酸素条件下でも機械刺激による遺伝子の発現増強が認められた。



A glass increased gene expressions in hypoxic conditions, even in 5% pO<sub>2</sub>, suggesting that those conditions might induce and recruit osteoclast via activation of relating genes.

以上の(1)～(3)の結果から、機械刺激により HIF-1 $\alpha$ が活性化されそれに伴う破骨細胞関連遺伝子の増強が骨吸収を引き起こしている可能性が示唆され、変形性顎関節症の発症機序に機械刺激と HIF-1 $\alpha$ 遺伝子発現が関係している可能性が示された。

#### 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)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Shirakura M Activation of the hypoxia-inducible factor-1 in overloaded temporomandibular joint, and induction of osteoclastogenesis. Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有, 393, 800-805, 2010

[学会発表] (計 7 件)

1. Shirakura M, Evaluation of the course work education employing cognitive behavior therapy, The 15th Ottawa Conference, 2012年3月9-13日, Kuala Lumpur, Malaysia

2. Shirakura M, Evaluation of the course work education employing cognitive behavior therapy, 4th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, 2011年10月9,10日, 広島

3. Shirakura M, Mechanisms of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in cartilage degradation by mechanical stress. The 59th Japanese Association for Dental Research(Hiroshima), 2011年10月8,9日, 広島

4. 白倉 麻耶, 著しく近心傾斜した埋伏下顎第二大臼歯の整直に関する一考察, 第54回中・四国矯正歯科学会大会, 2011年7月2,3日, 愛媛・松山

5. Shirakura M, Changes in lip-line in

asymmetric cases treated with one-jaw surgery, 87th Congress of the European Orthodontic Society, 19-23 June 2011, トルコ・イスタンブール

6. 白倉 麻耶, 顎矯正手術後にみられる下顎骨の位置変化の多様性, 第20回日本顎変形症学会総会, 2010年6月15,16日, 札幌(北海道)

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

白倉 麻耶 (Shirakura Maya)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・特任助教  
研究者番号 : 70549013

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :