

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792420

研究課題名（和文）変形性関節症軟骨におけるエストロゲン受容体を介した病的血管新生の制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of pathological angiogenesis by estrogen receptors in osteoarthritis chondrocytes.

研究代表者

細道 純 (HOSOMICHI JUN)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00420258

研究成果の概要（和文）：

顎関節円板細胞の細胞性格を特定し、顎関節症の一因とされる女性ホルモンに対する反応を検討した。雌性マウス顎関節円板細胞にテロメラーゼ遺伝子を導入し、不死化顎関節円板クローン細胞株を作製し、細胞性格を評価した。また、エストロゲン、リラキシン、プロゲステロンを添加した条件下での女性ホルモン受容体と MMP9/13 の発現量を生化学的に評価した。不死化顎関節円板クローン細胞は、細胞形態、増殖率、生化学的性質から、軟骨細胞様あるいは線維芽細胞様のいずれかの性質をもつものの 2 種類に分類され、2 種類のクローン細胞はエストロゲンとリラキシンに対して各々異なった反応を示し MMP9/13 を産生することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to immortalize and characterize TMJ disc cell clones, and to determine their responses to estrogen, relaxin and progesterone. TMJ disc cells from female mice were isolated, and immortalized by human telomerase reverse transcriptase. Clones demonstrating successful immortalization were characterized for fibroblast and chondrocyte markers. Chondrocyte-like and fibroblast-like disc clones show different baseline and hormone-stimulated expression profiles of ESRs, RXFPs and MMP9/13.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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・矯正・小児系歯学

キーワード：顎関節症、関節円板、女性ホルモン、軟骨様関節円板細胞、線維芽細胞様関節円板細胞

## 1. 研究開始当初の背景

日本における成人の顎関節症の罹患率は、男性では 9.9%、女性では 17.3%であることが臨床調査により報告された(Okabe Y et al., 2004)。顎関節症は、顎関節頭、顎関節窩、関節円板、滑膜の顎関節領域を含めた顎顔面部のさまざまな領域に臨床症状が現れる、多因子性複合疾患である。顎関節症は、男性より女性において、重篤な臨床症状が現れやすく、とりわけ妊娠適齢期においてその傾向は顕

著である(Von Korff M et al., 1988; LeResche L et al., 1997)。顎関節症の罹患率と症状の重症化において性差があることから、女性ホルモンが疾患の発症と進行に関わる可能性が考えられている。妊娠と出産に関わる女性ホルモンであるエストロゲンとリラキシンは、妊婦において関節部の弛緩を高めることがこれまで報告されており、顎関節の過大な弛緩は顎関節障害に関わるとされる(Calguneri M et al., 1982; LeResche L et al., 2005; Hirsch C et

al., 2008)。線維軟骨組織である顎関節円板は、関節機能に関わる重要な組織であり、顎関節疾患の増悪において顎関節円板の病的破壊が進行する。したがって、顎関節円板は、顎関節疾患の病態を解明する上で、重要な標的組織である。しかし、顎関節円板は顎関節疾患の病態の重要な鍵であるのに関わらず、組織を構成する細胞の種類や細胞性格について特定されていない。さらに、女性ホルモンに対する顎関節円板細胞の反応機構は、未だに不明である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、顎関節円板細胞の細胞性格を特定し、それらの女性ホルモンに対する反応機構について明らかにすることである。具体的には、第一に、マウス顎関節円板細胞の不死化細胞クローンを作製し、細胞のサブタイプとそれらの細胞性格を特定する。第二に、女性ホルモンであるエストロゲン、リラキシン、プロゲステロンに対する不死化顎関節円板細胞クローンの各サブタイプの細胞反応の違いについて分子細胞学的に検討する。

## 3. 研究の方法

### 【1.マウス顎関節円板細胞の不死化細胞クローンの作製】

12 週齢雌性マウスから顎関節円板を採取し、関節円板組織から関節円板細胞を分離した。初代培養細胞に、ヒト・テロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)cDNA 発現ベクターを導入し、薬剤耐性選択を経て、hTERT 発現ベクターの安定発現細胞クローンを作製した。ゲル電気泳動を用いて、テロメア・ラダー (テロメア伸長) の出現を確認し、Telomere repeat amplification protocol (TRAP) 法を用いて、クローン細胞における hTERT の酵素活性の上昇を確認した。

### 【2.不死化顎関節円板細胞クローンの細胞性格の特定】

確立された不死化クローン細胞は、以下の1)-3)の項目について、解析を行った。

- 1) 細胞形態
- 2) 細胞増殖率 (細胞増殖曲線)
- 3) 単層培養およびマイクロマス (凝集) 培養下における細胞性格の特定

以下の因子の発現について、定量 PCR による mRNA レベル、ウエスタンブロッティングおよび細胞免疫染色によるタンパク質レベルでの発現解析を行った。

#### ①軟骨細胞様マーカー:

Cartilage oligomeric matrix protein (COMP)、コラーゲン X

#### ②線維芽細胞様マーカー:

Vimentin、線維芽細胞特異タンパク-1(FSP-1)  
③コラーゲン I/II

### 【3.不死化顎関節円板細胞クローンの女性ホルモンに対する細胞反応】

エストロゲン (0.05ng/ml)、リラキシン (0.1ng/ml)またはプロゲステロン(10ng/ml)を添加した条件で、各顎関節円板クローン細胞を培養し、各々の条件において、エストロゲン受容体 ESR1/2、リラキシン受容体 Rxfp1/2、プロゲステロン受容体 PGR および PGRMC1、基質分解酵素 MMP9/13 の発現変化について、定量 PCR により mRNA レベルを、ウエスタンブロッティングによりタンパク質レベルを解析した。

## 4. 研究成果

【1. 不死化顎関節円板細胞クローンの確立】  
hTERT 発現ベクターを導入された 36 の顎関節円板細胞クローンのうち、4 クローン (クローン#1、#2、#6、#11) は、ゲル電気泳動においてテロメア・ラダーの出現 (テロメア伸長) が認められ、TRAP 法により高いテロメラーゼ活性が認められた。これらの 4 クローンは、継代数が 50 以上の条件であるのに関わらず、高いテロメラーゼの酵素活性とテロメア伸長を示したことから、不死化顎関節円板細胞クローンの作製に成功したことが示された。

### 【2. 不死化円板細胞クローンの細胞性格】

#### ①不死化顎関節円板細胞クローンの細胞形態および細胞増殖

不死化顎関節円板細胞クローンは、細胞の形態および増殖から、軟骨細胞様あるいは線維芽細胞様のいずれかの性質をもつものの 2 種類に分類された。クローン#2 と#6 は線維芽細胞様の形態、クローン#1 と#11 は軟骨細胞様の形態を示した。単層培養において、線維芽細胞様クローンは軟骨細胞様クローンと比較して、高い細胞増殖率を示した。

#### ②不死化顎関節円板クローン細胞の軟骨細胞様および線維芽細胞様の細胞性格

マイクロマス (凝集) 培養下にて、クローン#1 と#11 は、クローン#2 と#6 と比較して、軟骨細胞様マーカーである COMP (クローン#2、#6 の 3.5 倍) とコラーゲン X (クローン#2、#6 の 11 倍) の高い mRNA 発現レベルを示し、ウエスタンブロッティング法によりタンパク質レベルにおいても同様の傾向が認められた。培養クローン細胞の蛍光免疫染色により、COMP はクローン#1、#11 のみに発現が観察された。単層培養と 1 週間のマイクロマス培養を比較した結果、2 タイプの全てのクローンにおいて軟骨細胞様マーカーの発現量が増加するが、この傾向は、クローン#1 と#11 において顕著に認められた。

クローン#1と#11において軟骨細胞様マーカーの高い発現レベルと対照的に、クローン#2と#6においては、クローン#1、#11と比較して、線維芽細胞様マーカーである Vimentin (クローン#1、#11の1.5倍)とFSP1 (クローン#1、#11の2.5倍)の高い mRNA 発現量が認められた。また、タンパク質レベルにおいても、mRNA レベルと同じ傾向が認められ、免疫染色により、FSP1はクローン#2、#6においてのみ発現が認められた。

### ③不死化クローン細胞のコラーゲン I および II の産生能

コラーゲン・アッセイにより各クローンのコラーゲン・タンパク質の産生能について検討した結果、クローン#2、#6と比較して、クローン#1、#11は、産生する総コラーゲン量の多いことが認められた。定量 PCR により、クローン#1と#11のコラーゲン II mRNA 発現量は、クローン#2、#6よりも2倍多かった。コラーゲン I に関しては、mRNA とタンパク質レベルともに、クローンの2タイプの違いが認められなかった。したがって、コラーゲン I に対するコラーゲン II の mRNA 発現量の比は、クローン#2、#6よりもクローン#1、#11において大きいことが示された。

## 【3. 女性ホルモンに対する顎関節円板細胞クローンの細胞反応】

### ①エストロゲン

軟骨細胞様クローンであるクローン#1、#11および線維芽細胞様クローンであるクローン#2、#6は、エストロゲン処理前、2種類のエストロゲン受容体 ESR1、ESR2 の mRNA 発現量に関して有意差は認められなかった。エストロゲン処理 (エストロゲン濃度 0.05 ng/ml) により、クローン#1、#11では、処理前と比較して ESR-1 (50倍)、ESR-2 (34.1倍)の mRNA 発現量が増加し、クローン#2、#6と比較して、ESR1、ESR2 の mRNA 発現量の増加が認められた。ウエスタンブロッティングを行い、タンパク質レベルでの ESR1、ESR2 の変化は mRNA レベルと同様であることが認められた。また、エストロゲン処理により、軟骨細胞様クローンであるクローン#1、#11における MMP9 (68.1倍)の mRNA 発現量は処理前と比較して有意に増加し、クローン#2、#6の mRNA 発現量の変化 (9.7倍)と比較しても、クローン#1、#11の MMP9 の mRNA レベルは増加した。ウエスタンブロッティングから、MMP9/13 の産生が促進されることが示された。

### ②リラキシン

リラキシン処理 (リラキシン濃度 0.1 ng/ml) は、mRNA レベルおよびタンパク質レベルにおいて、2種類のリラキシン受容体

RXFP1 と RXFP2 の発現量をクローン#2と#6において上昇させた。しかし、クローン#1、#11に対して、リラキシン処理は、RXFP1、RXFP2 の発現レベルに影響を与えなかった。リラキシン処理は、線維芽細胞様クローンであるクローン#2、#6の MM9、MMP13 の mRNA レベル及びタンパク質レベルの発現量を増加させ、リラキシン受容体と MMPs の発現変化に相関があることが示唆された。

### ③プロゲステロン

プロゲステロン処理 (プロゲステロン濃度 10ng/ml) は、2タイプのクローンに対してともに、プロゲステロン受容体のひとつである PGR の発現には影響しなかったが、PGRMC1 の発現レベルを上昇させ、MMP9 および MMP13 の発現レベルを減少させた。ウエスタンブロット法により、これらの mRNA 発現レベルの変化の結果はタンパク質レベルの変化と一致した。

### 【考察および結論】

本研究課題では、ヒト・テロメラーゼ遺伝子の強制発現により不死化顎関節円板クローン細胞を作製し、細胞形態、増殖率および生化学的性質から、顎関節円板細胞は軟骨細胞様あるいは線維芽細胞様のいずれかの性質をもつものの2種類に分類されることを明らかにした。さらに、女性ホルモンに対して、顎関節円板を構成する2種類の関節円板細胞はエストロゲンおよびリラキシンに対して、各々異なった反応を示し MMP9/13 を産生することが明らかになった。

顎関節円板は、女性ホルモンであるエストロゲン、リラキシンおよびプロゲステロンの標的組織である (Kapila S et al, 2009a; Kapila S et al., 2009b; Wang W et al., 2009; Hashem G et al., 2006)。われわれの研究結果から、線維芽細胞様円板細胞クローンと軟骨細胞様円板細胞クローンはこれらのホルモンに対して異なった細胞反応を示したが、このことは、2タイプの顎関節円板細胞が、女性ホルモンが関わる関節円板の病的破壊において、多様な役割を果たす可能性が示唆された。以上のことから、本研究課題で確立された2タイプの顎関節円板細胞クローンは、その病態の解明を行う上で、顎関節疾患における顎関節円板細胞の細胞応答を解明する重要なリソースとなり、これまで不明であった顎関節円板クローン細胞について、われわれは国内外で初めて報告した。

## 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)

[雑誌論文] (計4件)

1. Shimizu Y, Hosomichi J, Kaneko S, Shibutani N, Ono T. Effect of sympathetic nervous activity on alveolar bone loss induced by occlusal hypofunction in rats. Arch Oral Biol. 2011;56:1404-11.
2. Kuroda Y, Yonemitsu I, Hosomichi J, Watari I, Takei M, Ishida Y, Ono T. Intermittent posterior displacement of the rat mandible in the growth period affects the condylar cancellous bone. Angle Orthod. 2011;81:975-82.
3. Usumi-Fujita R, Hosomichi J, Ono N, Shibutani N, Kaneko S, Shimizu Y, Ono T. Occlusal hypofunction causes periodontal atrophy and VEGF/VEGFR inhibition in tooth movement. Angle Orthod. 2013;83:48-56.
4. Shimizu Y, Ishida T, Hosomichi J, Kaneko S, Hatano K, Ono T. Soft diet causes greater alveolar osteopenia in the mandible than in the maxilla. Arch Oral Biol. 2013 *In press*.

[学会発表] (計 5 件)

1. Hosomichi J, Park Y, Kapila S. Immortalization and Characterization of Mouse Temporomandibular Joint (TMJ) Disc Cell Clones. The 2nd Asian Academic Congress for Temporomandibular Joint. 2011 年 7 月 23-24 日
2. Shimizu Y, Hosomichi J, Kaneko S, Shibutani N, Ono T.  $\beta$ -Adrenergic Receptor Antagonist Suppresses Occlusal Force Unloading-Induced Alveolar Bone Loss in Rats. The American Society for Bone and Mineral Research, 2011 Annual Meeting. 2011 年 9 月 16-20 日.
3. 白見 莉沙, 細道 純, 小野 法明, 渋谷直樹, 金香 佐和, 清水 康広, 小野 卓史. 咬合刺激低下は歯根膜血管新生の抑制を介して矯正学的な歯の移動に影響を与える. 第 70 回日本矯正歯科学会大会. 2011 年 10 月 17-20 日
4. Hosomichi J, Park Y, Kapila S. Immortalization and Characterization of Mouse Temporomandibular Joint Disc Cells, American Dental Association for Dental Research, 2012 AADR/CADR Annual Meeting. 2012 年 3 月 21-24 日
5. 細道 純, パク ヤング, カピラ スニル. 不死化顎関節円板クローン細胞はエストロゲン、リラキシンおよびプロゲステロンに対する反応性が異なる. 第 71 回日本矯正歯科学会大会. 2012 年 9 月 26-28 日

[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]

受賞歴

1. 日本矯正歯科学会第 71 回学術大会 学術優秀発表賞, 日本矯正歯科学会, 不死化顎関節円板クローン細胞はエストロゲン、リラキシンおよびプロゲステロンに対する反応性が異なる, 2012 年 9 月 28 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細道 純 (HOSOMICHI JUN)  
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教  
 研究者番号 : 00420258

(2) 研究分担者

( )  
 研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )  
 研究者番号 :