

## 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 6 月 7 日現在

機関番号：15401  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23792429  
 研究課題名（和文）変形性顎関節症における COX-2 誘導性軟骨破壊機序の解明と消炎鎮痛薬治療の確立  
 研究課題名（英文）Investigation of the mechanism of cartilage destruction induced by COX-2 in temporomandibular joint osteoarthritis and establishment of anti-inflammatory drug treatment  
 研究代表者  
 丹根 由起（TANNE YUKI）  
 広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教  
 研究者番号：50526241

## 研究成果の概要（和文）：

ブタ下顎頭由来培養軟骨細胞に 10%機械的伸張刺激を負荷した結果、COX-2, MMP-1,3,9 遺伝子発現は有意に増加し、COX-2 選択的阻害剤（セレコキシブ）の添加により有意に抑制されることが明らかとなった。その一方、機械的伸張刺激によって減少した II 型コラーゲンおよびアグリカンは、セレコキシブの添加により回復したが、インドメタシンおよびアンフェナックナトリウム添加により有意な変化は認められなかった。したがって、セレコキシブは機械的負荷による軟骨破壊を抑制するだけでなく、軟骨基質産生を亢進することが明らかとなった。

## 研究成果の概要（英文）：

The excessive mechanical stress up-regulated COX-2 and MMP-1, 3, 9 in cultured chondrocyte derived from porcine condylar cartilage. Furthermore, the presence of Celecoxib decreased the gene expressions induced by mechanical stress. The presence of Celecoxib counteracted expressions of type II collagen, aggrecan mRNA, however, the treatment of Indomethacin and Andamfenac sodium had no effect on these gene expression. Celecoxib showed a protective effect on extracellular matrix turnover by attenuating the influence of excessive mechanical stress on chondrocytes.

## 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	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：歯科矯正学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：①変形性顎関節症②NSAID③薬学

## 1. 研究開始当初の背景

変形性顎関節症（TMJ-OA）の発症の多くが、関節円板の前方転位に引き続いて起こることから、下顎頭に加わる機械的負荷の増大や不均衡が TMJ-OA 発症の key factor と考えられている。したがって、TMJ-OA の治療法としては、過剰な負荷を可及的に除去することが重要であり、関節負荷の均一化を目的と

したスプリント療法の他、理学療法、関節腔洗浄療法などを単独使用あるいは併用することが推奨されている。さらに、関節疾患に対する炎症抑制や鎮痛に非ステロイド系消炎鎮痛薬（NSAIDs）の経口投与が有効と考えられ、顎関節痛の治療にも用いられているが、その使用に対するガイドラインはなく、薬剤選択基準、投与方法も明確に定められて

いない。しかし近年、顎関節症患者の疼痛に対する消炎鎮痛薬の診療ガイドラインが作成されたが、エビデンスとなった NSAIDs はいずれも本邦では顎関節痛の適応承認を受けていないなどの問題が残されている。本研究では、TMJ-OA 発症の key factor とされている過剰な機械的負荷による軟骨細胞の基質代謝への影響を *in vitro* *in vivo* 両レベルで明らかにするとともに、COX-2 選択的阻害剤（セレコキシブ）と顎関節痛に適応承認されている NSAIDs（インドメタシン、アンフェナックナトリウム）のかかわりと治療上の有効性について検証することを目的として本研究の立案に至った。

## 2. 研究の目的

TMJ-OA は、下顎頭軟骨の破壊や骨の変形、円板の穿孔などを主徴とする疾患であり、その主な発症要因として、関節表面に対する過剰な負荷が挙げられる。本研究では、顎関節への過剰な機械的負荷により引き起こされる下顎頭軟骨破壊に着目し、COX-2 選択的阻害剤と顎関節痛に適応承認されている NSAID の関わりと治療効果を解明することを目的とする。

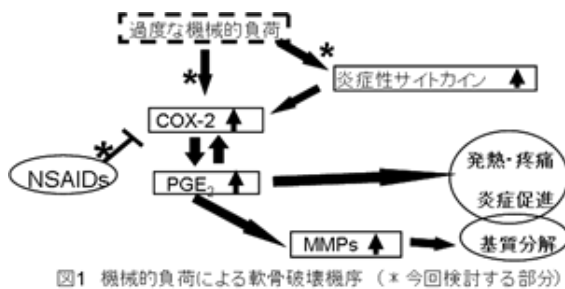


図1 機械的負荷による軟骨破壊機序 (\*今回検討する部分)

## 3. 研究の方法

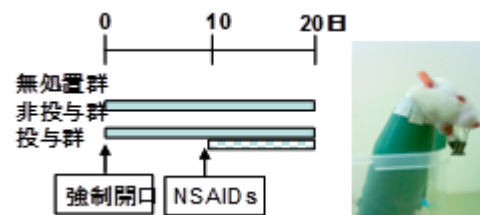
実験1では、ブタ下顎頭を無菌的に摘出し、振り子型摩擦試験機を用いて、関節表面に剪断応力を負荷し、COX-2 および各種サイトカインの発現を免疫組織学的に検討するとともに、負荷を加えた下顎頭軟骨層より軟骨細胞を採取し、COX-2 および各種サイトカインの発現を遺伝子および蛋白レベルで明らかにした。

実験2では、ブタ下顎頭軟骨層より軟骨細胞を採取、培養し、現有する培養細胞伸展機 (Flexercell Strain Unit) を用いて機械的伸張刺激を与える。これまでの我々の研究において、15kPa、毎分 30 サイクルの負荷条件で機械的伸張刺激を負荷した場合、ウサギ膝関節由来軟骨細胞において基質産生を減少させ、MMP 発現を誘導すること (Honda K. et al., Eur. J. Cell. Biol., 79: 601-609, 2000.)

が明らかとなった。本実験では、15kPa、毎分 30 サイクルの条件で機械的伸張刺激を負荷し、western blotting 法およびリアルタイム RT-PCR 法により細胞層における COX-2、MMPs (MMP-1, 3, 9, 13)、ヒアルロニダーゼの発現を検討した。また、培養上清中の PGE<sub>2</sub> 濃度については、現有のマイクロプレートリーダーを用いて ELISA 解析を行った。

実験3では、下顎頭由来培養軟骨細胞に対する機械的負荷による COX-2 の誘導および軟骨基質代謝に対する COX-2 選択的阻害剤 (セレコキシブ) および NSAIDs (インドメタシン、アンフェナックナトリウム) の影響について検討した。

実験4では、これまでの我々の研究により、ラットに一日一時間 30mm の強制開口を行うことで、ラット下顎頭における軟骨層の厚さの減少や、円板中央部の硝子化、圧迫部位での軟骨組織の壊死など変形性顎関節症様の変化を引き起こすことが明らかとなった (Tanaka E. et al, Histochem. Cell. Biol., 123: 275-281, 2005)。本実験では、6 週齢 Wistar 系雄性ラットを用い、一日一時間 30mm の強制開口を 20 日間行い、TMJ-OA モデルを作製した。実験群では、10 日間負荷を加えた後、セレコキシブ (0.1~3mg/kg)、インドメタシン (0.01~1 mg/kg)、アンフェナックナトリウム (0.01~1 mg/kg) を 10 日間 1 日 2 回経口投与し、非投与群および無処置群と比較検討を行った。20 日間の実験終了後、ラット頭部を摘出し、顎関節矢状面の組織切片を作製し、H-E 染色およびトルイジンブルー染色を行い、病理組織学的変化を観察する。さらに、COX-2 および MMPs (MMP-1, 3, 9, 13) の発現について免疫組織化学染色により検討を行う。



## 4. 研究成果

実験1：剪断応力が下顎頭軟骨に及ぼす影響について COX-2 および IL-18 の発現を組織学的および遺伝子学的に検討を行った。1.4 kg の荷重下で 16 時間負荷をかけたところ、繊維層と軟骨層の間に IL-18 の発現の亢進が認められた。さらに、軟骨層において COX-2 の発現亢進が認められた。次に、負荷後に下

顎頭軟骨層より軟骨細胞を抽出し、COX-2の遺伝子発現について検討したところ、コントロール群と比較して有意に増加していることが明らかとなった。

実験2：軟骨基質代謝に対する機械的伸張刺激の影響について明らかにするためにブタ下顎頭由来培養軟骨細胞に伸展機を用いて10%機械的伸張刺激を負荷し、COX-2、MMP、PGE2発現について検討した。その結果、負荷開始1時間よりCOX-2遺伝子発現は有意に増加し、負荷開始6時間経過後もコントロール群と比較して有意に高い値を示した。MMP-1,3,9の遺伝子発現は、いずれも負荷開始6時間後に有意に増加を認めた。培養上清中のPGE2レベルは非負荷群と比較して高い値を示したものの、有意差は認めなかった。

実験3：さらに、下顎頭由来培養軟骨細胞に対する機械的伸張刺激によるCOX-2の誘導および軟骨基質代謝に対するCOX-2選択的阻害剤（セレコキシブ）の影響について検討を行った。機械的伸張刺激により増加したMMP-1,3発現はセレコキシブ添加により有意に抑制されることが明らかとなった。また、インドメタシンおよびアンフェナクナトリウム添加は、機械的伸張刺激によって増加したMMP-1,3遺伝子発現を有意に抑制することが示された(図1-A,B)。その一方、機械的伸張刺激によって減少したII型コラーゲン(図1-C)およびアグリカン(図1-D)は、セレコキシブの添加により回復したが、インドメタシンおよびアンフェナクナトリウム添加により有意な変化は認められなかった。したがって、セレコキシブは機械的負荷による軟骨破壊を抑制するだけでなく、軟骨基質産生を亢進することが明らかとなった。

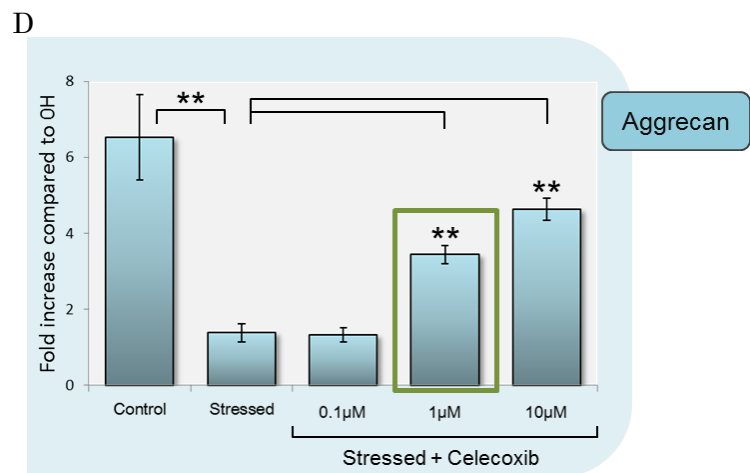
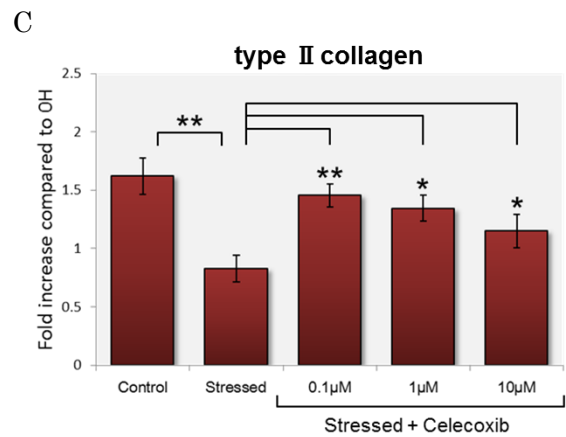
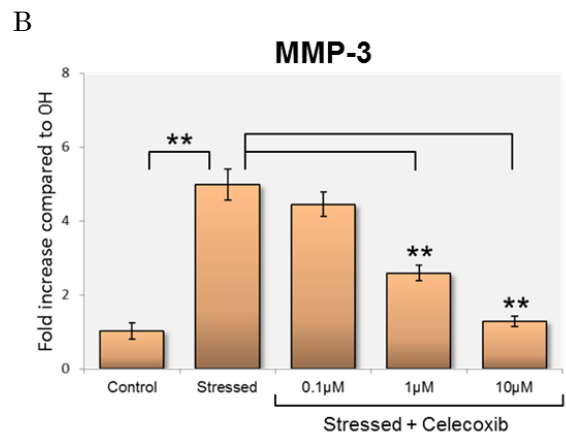
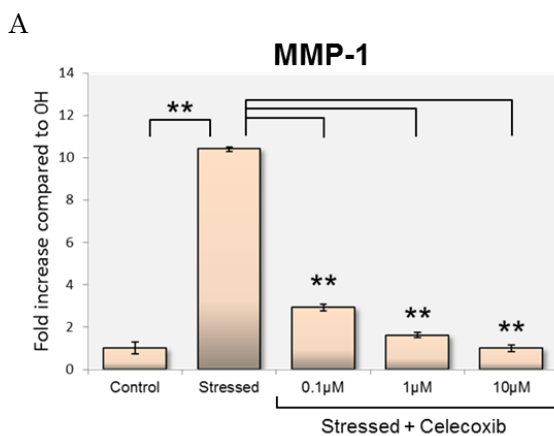


図1 下顎頭由来培養軟骨細胞に対する機械的伸張刺激下でのセレコキシブがMMP-1,3 およびII型コラーゲン発現に及ぼす影響 (A: MMP-1, B: MMP-3, C: II型コラーゲン D:アグリカン)

実験 4 : in vivo 実験系では、6 週齢 Wistar 系雄性ラットを用い、一日一時間 30mm の強制開口を 20 日間行い、TMJ-OA モデルを作製した。実験群では、10 日間負荷を加えた後、セレコキシブ、インドメタシン、アンフェナクナトリウムを 10 日間 1 日 2 回経口投与し、非投与群および無処置群と比較検討を行なった。20 日間の実験終了後、ラット頭部を摘出し、顎関節矢状面の組織切片を作製し、免疫組織化学染色を行ったところ、セレコキシブ、インドメタシン、アンフェナクナトリウム経口投与群では、COX-2 および MMP-1, 3 の発現が減少していることが明らかになった。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

1. Tanne Yuki, Effect of Celecoxib on extracellular matrix metabolism in mandibular condyle chondrocytes under excessive mechanical stress, 8th Asian Pacific Orthodontic Conference 47th Indian Orthodontic Conference, 29 Nov-2 Dec 2012, NewDelhi, India

2. Su Shaoching, Effects of COX-2 inhibitor on the metabolism of extracellular matrix in stressed TMJ chondrocyte, The 45th Scientific Congress of Korean Association of Orthodontists 4th Joint Symposium of KAO and JOS, 1-3 Nov 2012, Seoul, Korea

3. Su Shaoching, The direct effect of high magnitude cyclic tensile stress on COX-2 and MMPs expressions in chondrocytes derived from mandibular condyle, 第 24 回一般社団法人日本顎関節学会総会・学術大会: 第 2 回アジア顎関節学会大会, 2011.07.23, 広島

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

丹根 由起 (TANNE YUKI)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教  
研究者番号 : 50526241

(2)研究分担者

( )

研究者番号 :

(3)連携研究者  
( )

研究者番号 :