

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463099

研究課題名(和文)顎関節炎の分子プロセスと分子標的治療薬研究

研究課題名(英文) Analysis of inflammatory network and molecularly-targeted therapy in temporomandibular joint inflammation

研究代表者

近藤 壽郎 (KONDOH, Toshiro)

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：70178416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：顎関節内障患者や変形性顎関節症患者では滑膜炎症状が認められる。本研究では、ヒト顎関節滑膜細胞(滑膜細胞)に炎症性サイトカインを作用させ、網羅的遺伝子発現解析および分子間相互作用/シグナリング・パスウェイ解析を行い、顎関節の炎症の分子プロセスの構築を行った。次に、炎症性サイトカイン刺激を加えた滑膜細胞に消炎鎮痛薬、炎症亢進に關与するシグナル分子の阻害薬を添加して関節炎に關与する分子の発現を測定した。その結果、多数の炎症性分子の発現減少が認められた。本研究の遂行は、新規病態関連因子の検索や新規治療薬の開発に有意義であると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Synovitis, an inflammatory disorder of the synovial membrane, frequently accompanies internal derangement and/or osteoarthritis in temporomandibular joint (TMJ) and has been suggested to be a key feature of intracapsular pathological conditions of TMJ. To identify inflammatory factors and signaling pathways associated with synovitis, we investigated the gene expression profiles and the signaling pathway analysis in TMJ synovial fibroblasts treated with inflammatory cytokines. Signaling pathway analysis indicated that the expressions of inflammatory factors were stimulated by NF- κ B and PAMK. Next, we investigated the effects of inhibitors of cyclooxygenase, NF- κ B, and PAMK. The expressions of inflammatory factors were decreased in synovial fibroblasts treated by those inhibitors. The approach used in this study may be useful for revealing the inflammatory networks and the effect of the anti-inflammatory drugs in the synovitis of the TMJ.

研究分野：口腔外科学

キーワード：顎関節 滑膜炎 顎関節滑膜細胞 網羅的遺伝子発現解析 シグナリング・パスウェイ解析 消炎鎮痛薬 阻害剤 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

顎関節は、咀嚼、開閉口など顎運動の支点となる関節であり、顎関節の運動障害や機能障害は、食事や会話に支障を来し、日常生活のクオリティーを著しく低下させる。顎関節症の治療には、非ステロイド系消炎鎮痛剤 (non-steroid anti-inflammatory drugs; NSAIDs) が用いられているが、薬剤選択基準、投与方法や投与基準のみならず、効果についても明確化されていないのが現状である。その理由の1つには、変形性顎関節症 (osteoarthritis; OA) や関節円板転位 (Internal derangement; ID) のような顎関節包内の病態 (顎関節内障など) と咀嚼筋や開口筋の筋痛が、顎関節症という傷病名で一括されていることにある。NSAIDsの薬効は、筋痛と顎関節内障とは一線を画して評価すべきでと考える。一方、関節リウマチ等では、分子標的治療薬が好成績を納めている。顎関節疾患でも分子標的治療薬が求められているが、そのためには、顎関節症の発症および進行機序についての分子生物学的研究が必要であるが、立ち後れているのが現状である。申請者は、新規の病態関連因子発見や、病態関連因子を標的とした治療薬の開発を視野に入れ、顎関節滑膜細胞のゲノミクス・プロテオミクス解析研究を計画した。

2. 研究の目的

(1) COX 阻害薬の効果

ヒト培養顎関節滑膜細胞に interleukin (IL)-1 β を作用させた *in vitro* 滑膜炎モデルに、非特異的 cyclooxygenase (COX) 阻害薬の Indomethacin (Ind) または COX2 阻害薬の Celecoxib (Cel) を作用させ、網羅的遺伝子発現解析、シグナリング・パスウェイ解析を行い、顎関節滑膜炎における COX 阻害薬の効果を検討する。

(2) 顎関節疾患における炎症の分子プロセス

顎関節疾患の分子標的治療のためには、顎関節疾患病態形成に関与する因子およびその相互作用を明らかにする必要があると考える。そこで、ヒト培養顎関節滑膜細胞に interleukin (IL)-1 β を始めとして、様々な炎症的刺激を加えて、網羅的遺伝子発現解析、シグナリング・パスウェイ解析を行い、炎症の分子プロセスの構築を行う。

3. 研究の方法

(1) 滑膜細胞の分離・培養

顎関節内視鏡洗浄療法の時に採取した顎関節滑膜組織から out growth 法を用いてヒト顎関節滑膜細胞 (滑膜細胞) を分離し、初代および継代培養を行った。

(2) DNA マイクロアレイ解析

滑膜細胞を IL-1 β , TNF- α , または IL-17A で刺激後、RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出し、Affymetrix GeneChip HG

U133 Plus 2.0 Array または Agilent SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K v2 Microarray を用いて網羅的に遺伝子発現を測定した。発現解析は GeneSpring GX を用いた。

(3) 分子間相互作用/シグナリング・パスウェイ解析

網羅的遺伝子発現解析の結果、各種炎症的刺激によって滑膜細胞で発現変動の認められた遺伝子群を Ingenuity Knowledge Database にアップロードし、分子間相互作用/シグナリング・パスウェイ解析を行った。また、各 kinase 阻害薬によるタンパク質産生の阻害実験を行い、シグナリング伝達経路を検討した。

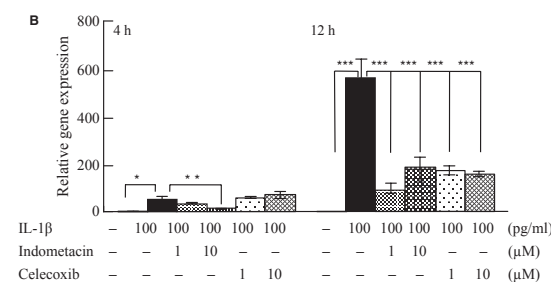
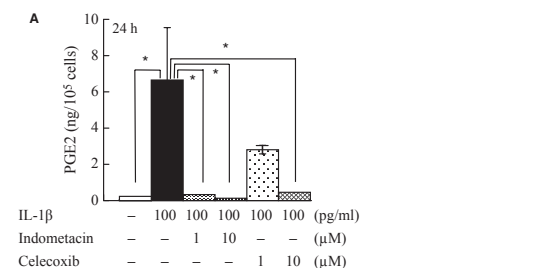
(4) 遺伝子発現およびタンパク質産生

遺伝子発現は、real-time PCR 法を用いて、タンパク質量は、ELISA 法を用いて測定した。

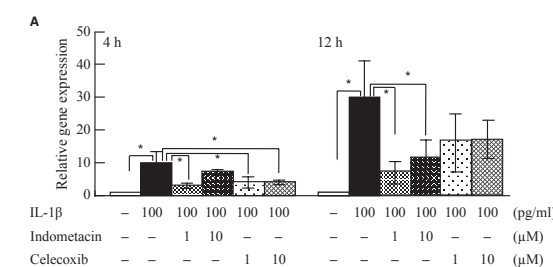
4. 研究成果

(1) COX 阻害薬の影響

滑膜細胞に IL-1 β , IL-1 β +Ind, IL-1+Cel を作用させて、PGE2 産生および COX2 遺伝子発現を測定した。



IL-1 β で上昇した PGE2 産生量は Ind および Cel によって減少した。また、COX 発現も IL-1 β で上昇し、Ind および Cel によって減少した。COX 阻害薬 COX の酵素活性阻害薬である。COX 遺伝子発現の減少は、オートクラインの PGE2 減少によると示唆された。



また、IL-18で上昇したIL-6遺伝子発現も、IndおよびCelによって減少した。

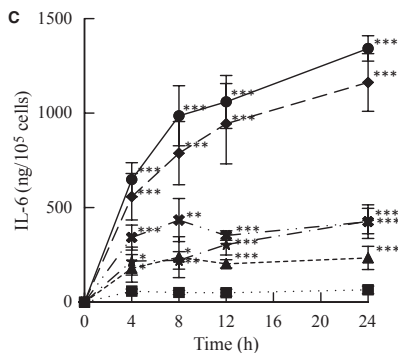
そこで、滑膜細胞にPGE2 receptorが発現しているのかを調べた。

Expression of EP receptor (EP1-4) genes in FLS by microarray.

		EP1	EP2	EP3	EP4
Intensity	Control	A	2.802 ± 1.215	A	0.620 ± 0.267
	IL-1 β	A	6.762 ± 3.078	A	1.519 ± 0.568
Fold	IL-1 β /control	(-)	2.653 ± 1.064	(-)	2.763 ± 1.379

N = 5; A, absent; Fold, average normalized intensity of IL-1 β -stimulated FLS/average normalized intensity of control FLS.

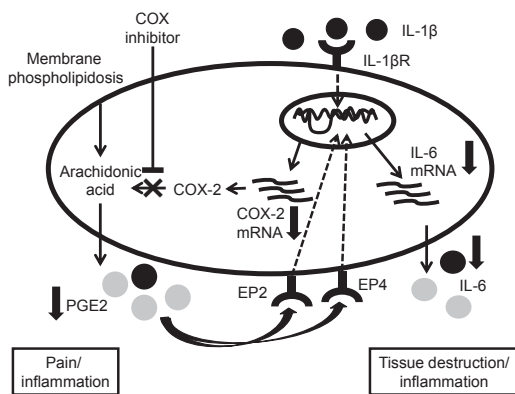
滑膜細胞では、PGE2 receptor EP1~EP4のうちEP2とEP4が発現していた。



Effect of EP agonists on IL-6 production. A-C show the results of different samples. The time course of IL-6 protein production in the conditioned medium of FLS was determined by an ELISA. The cells were cultured with or without PGE2 or EP receptor agonists, and were incubated for 4, 8, 12, or 24 h. ! None, _ PGE2, # EP1 agonist (ONO-DI-004), ◆ EP2 agonist (ONO-AE-259-1), ★ EP3 agonist (ONO-AE-248), 3 EP4 agonist (ONO-AE1-329), *P < 0.05, **P < 0.001, ***P < 0.005.

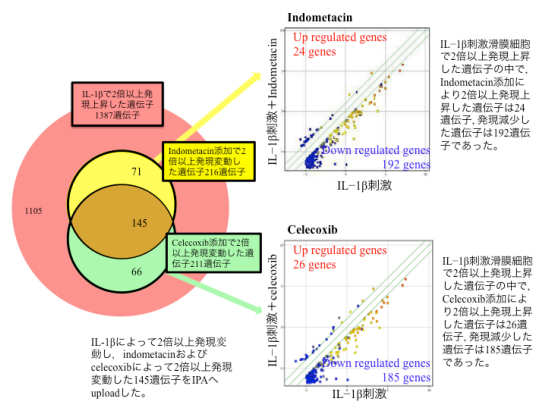
滑膜細胞にPGE2, EP1~4のagonistsを作用させてIL-6産生を測定したところ、IL-6産生量は、PGE2>EP2agonist>EP4agonist>EP3agonist>EP1agonistの順であった。

以上の結果から、COX阻害薬は、PGE2産生を抑制する竹ではなく、PGE2を介したIL-6等の炎症性因子の産生も抑制させることが明らかとなった。

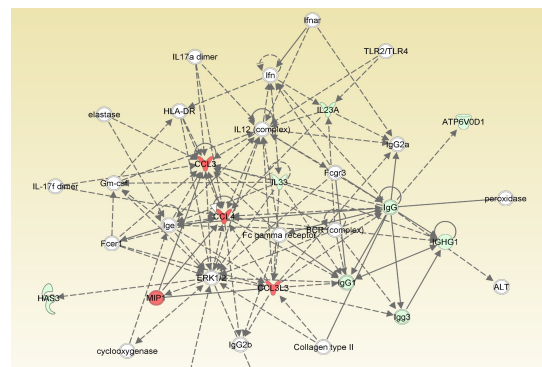


Effect of COX inhibitors on the levels of PGE2 and IL-6.

次に、滑膜細胞にIL-18, IL-18+Ind, IL-1+Celを作用させて、網羅的遺伝子発現解析を行った。



IndまたはCelで発現変動した遺伝子についてSignalin pathway解析を行った。

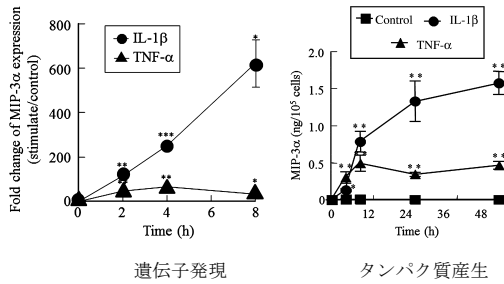


IL-18で発現上昇したIL-1, IL-23およびIL-33の炎症性サイトカインはCOX阻害薬によって発現減少を認めた。

(2) 顎関節疾患における炎症の分子プロセス
① IL-18およびTNF- α によるCCL20産生
IL-18およびTNF- α で4時間刺激した時の網羅的遺伝子発現を示す。

Rank	IL-1 β			TNF- α			IL-1 β +TNF- α		
	Gene	GenBank ID	Fold	Gene	GenBank ID	Fold	Gene	GenBank ID	Fold
1	CCL20	NM_004591	450.0	CCL20	NM_004591	322.2	CCL20	NM_004591	800.1
2	CXCL3	NM_002090	150.4	IL4	AF043157	70.7	GM-CSF	M11754	274.9
3	GM-CSF	M11754	107.4	GM-CSF	M11754	38.0	CXCL3	NM_002090	235.1
4	IL6	A034537	89.8	ICAM1	NM_001031	32.1	IL6	A034537	110.6
5	CXCL1	NM_001511	89.5	CXCL3	NM_002090	31.1	BCL2L1	NM_004049	114.6
6	CXCL2	M57731	50.1	CXCL10	NM_001565	27.8	CXCL1	NM_001511	75.3
7	IL6	NM_000600	40.1	BCL2L1	NM_004049	24.5	CXCL2	M57731	70.0
8	PTGS2	NM_000963	37.8	GCHI	NM_000161	21.9	PTGS2	NM_000963	63.7
9	BCL2L1	NM_004049	37.5	IL17RB	NM_018725	21.9	CXCL10	NM_001565	55.8
10	CXCL10	NM_001565	28.7	CXCL1	U84487	21.6	IL18	M15330	53.0
11	IL6	NM_000600	24.5	TNFAIP2	NM_006291	18.0	IL6	NM_000600	50.8
12	ICAM1	NM_000291	24.4	CXCL1	NM_001511	15.1	ICAM1	NM_000291	45.7
13	CXCL7	NM_006273	23.5	IL6	NM_000600	14.5	SERPINE2	NM_002275	38.5
14	CXCL8	A034800	20.5	CLEC2D	NM_013269	13.9	IL6	NM_000600	35.5
15	GCHI	NM_000161	19.4	IL6	NM_000600	13.9	MMP1	NM_002421	34.1
16	IL17RB	NM_018725	18.4	PTGS2	NM_000963	13.7	MMP3	NM_002422	32.5
17	CXCL6	NM_002993	16.1	CXCL2	M57731	13.3	IL6	NM_000600	29.5
18	IL18	M15330	15.4	GPR56	AL54808	12.9	IL17RB	NM_018725	27.4
19	MMP1	NM_000291	12.2	TNFAIP3	NM_006290	12.8	GCHI	NM_000161	27.4
20	TNFAIP2	NM_006291	12.1	CCL5	NM_002985	12.0	INHBA	M13436	22.2
21	CLEC2D	NM_013269	12.0	CDS3	NM_004233	11.8	CXCL8	A034800	21.4
22	LYN	A135412	11.2	M-CSF	M37435	9.4	MYB	NM_001575	20.1
24	CXCL1	U84487	11.1	SYT11	AF071504	8.8	CXCL6	NM_002993	19.7
24	MMP1	NM_000291	10.9	IL18R1	I65296	8.8	GPR56	AL54808	18.9
25	GOS2	NM_015714	10.9	NKX3-1	AF247704	8.7	CLEC2D	NM_013269	18.8
26	BIRC3	U12754	9.0	CXCL1	NM_006273	8.7	MAP3K8	NM_002584	17.5
27	M-CSF	M37435	9.0	MMP1	NM_002421	8.1	CCL5	NM_002985	16.9
28	TNFAIP3	NM_006290	9.0	CXCL1	NM_002991	8.1	G-CSF	NM_000759	15.9
29	MYB	NM_001575	8.4	MMP3	NM_002422	7.9	TNFAIP2	NM_006291	15.7
30	SYT11	AF071504	8.3	NEU1/ROG1	NM_006161	7.9	BIRC3	U12754	15.0
31	MAP3K8	NM_002584	8.1	BIRC3	U12754	7.9	ABSC1	NM_001657	14.6
32	HEP3	NM_001897	7.9	BEKRB1	NM_000710	7.6	GOS2	NM_015714	13.7
33	TNFRSF1B	NM_001066	7.8	TREM1	NM_005658	7.5	CXCL1	U84487	13.4
34	SERPINE2	NM_002275	7.6	ADORA2A	NM_000675	7.4	M-CSF	M37435	13.3
35	BEKRB1	NM_000710	7.5	SYCP1	X95854	7.3	CD88	NM_004233	13.2

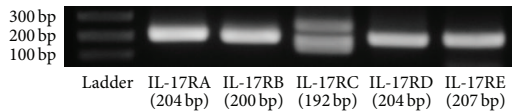
最も発現上昇率の高い遺伝子は、いずれの刺激でもCCL20(MIP-3a)であった。そこで経時的な遺伝子発現およびタンパク質産生を調べた。その結果、遺伝子発現およびタンパク質産生は経時的に上昇した。



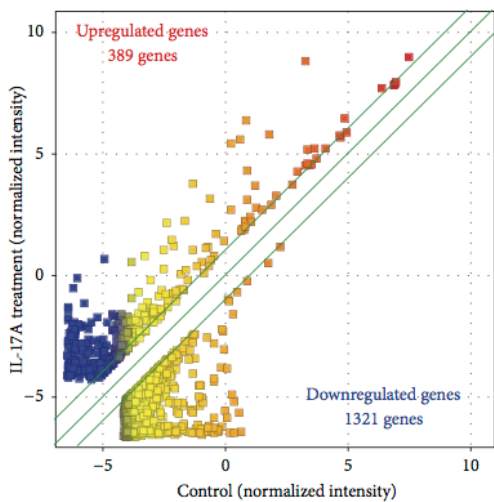
CCL20 (MIP-3α)は、リンパ球の1種である Th17 を遊走させることが報告されている。炎症組織中に遊走してきた Th17 は活性化し、IL-17 を産生する。近年 Th17/IL-17 は、関節リウマチや自己免疫疾患の病態形成に関与するといわれている。そこで、滑膜細胞に対する IL-17 の影響を調べることにした。

② IL-17 の影響

IL-17 ファミリーには、IL-17A (一般的 IL-17)、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E (IL-25)、IL-17F があり、IL-17 レセプターファミリーには IL-17RA から IL-17RE まで 5 種類ある。まず、滑膜細胞が IL-17 の影響をうけるのか、レセプターの発現を調べた。

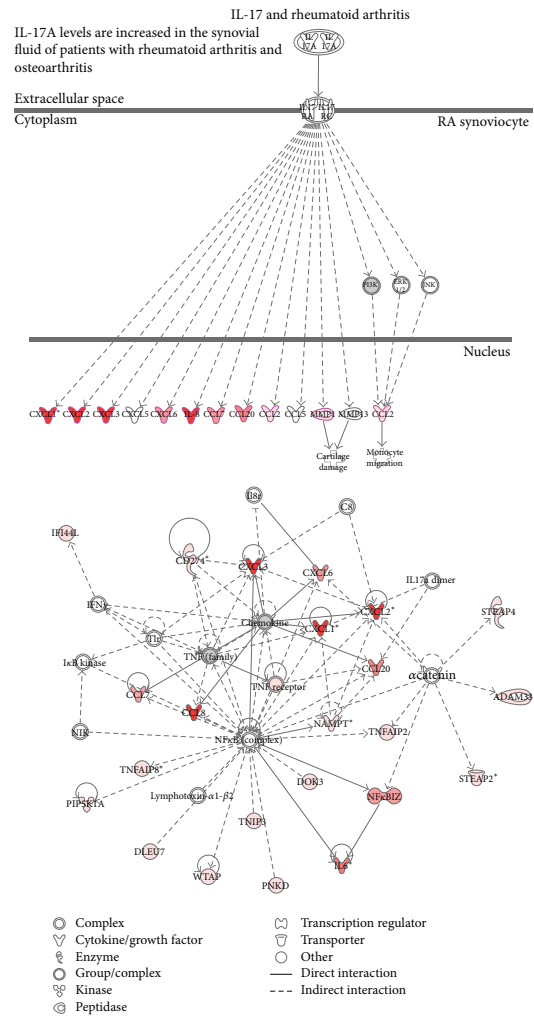


滑膜細胞は、すべての IL-17 レセプターを発現していた。代表的な IL-17 である IL-17A を滑膜細胞に作用させて、網羅的遺伝子発現解析を行った。

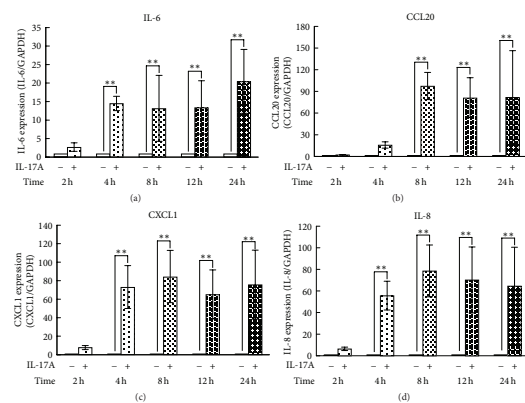


測定した 50,739 遺伝子中、滑膜細胞では 27,583 遺伝子が発現していた。IL-17A によって発現変動したのは 1,710 遺伝子で、上昇したのは 389 遺伝子、減少したのは 1,321 であった。

IL-17A によって発現変動した遺伝子を IPA にアップロードし、分子間相互作用・Signaling Pathway 解析を行った。

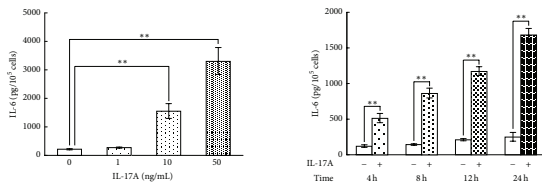


滑膜細胞に IL-17A を作用させると、IL-6 等の炎症性サイトカインおよびケモカイン発現が上昇した、これらの遺伝子発現上昇には、NFκB が関与していることが示唆された。次に、IL-6、CCL20、CXCL1、IL-8 (CXCL8) の経時的遺伝子発現を調べた。

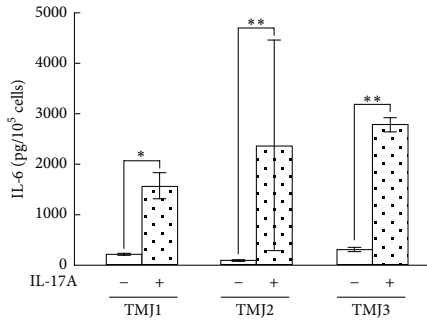


IL-6, CXCL1, IL-8 発現は、IL-17A 刺激後 4 時間でプラトーとなり、CCL20 発現は 8 時間でプラトーとなった。

IL-17A 刺激滑膜細胞の IL-6 タンパク質産生を測定した。

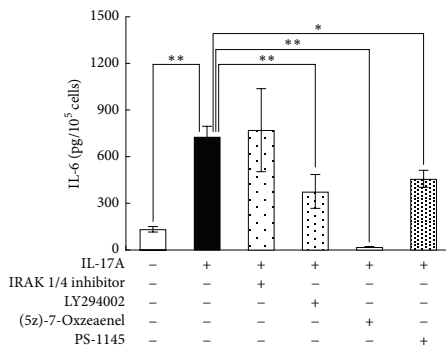


IL-17A 作用濃度および作用時間依存的に IL-6 産生は上昇した。



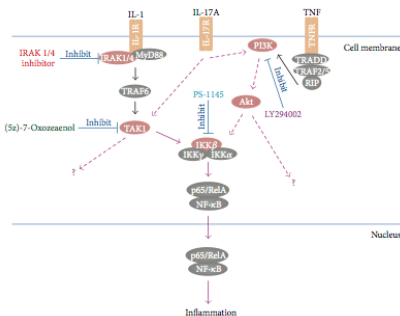
3名の患者から得た3例の滑膜細胞すべて IL-17A によって IL-6 産生は上昇した。

次に、滑膜細胞における IL-17A シグナル経路を検討した。Pathway 解析から IL-17A は主として NFκB を活性化することが示唆されている。そこで、IL-1 による NFκB 活性化経路に関する kinase の阻害剤による影響を調べた。



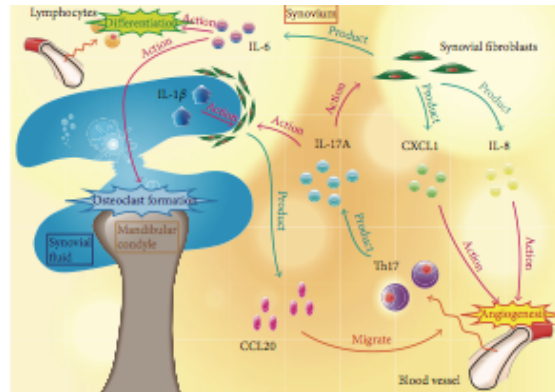
Interleukin-1 Receptor-Associated-Kinase-1/4 (IRAK-1/4) inhibitor, the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) inhibitor LY294002, the transforming growth factor-β-activated kinase 1 (TAK1) inhibitor (5z)-7-Oxozeaenol, the inhibitor of the NFκB kinase β subunit (IKKβ) inhibitor PS-1145 z

kinase 阻害剤を作用させ、IL-17A による IL-6 産生を測定した。IRAK 阻害剤の影響は認められなかったが、他の阻害剤によって IL-6 産生は減少した。よって、IL-17A の NFκB 活性化は、TAK1 より下流は IL-1 と同じ経路を介していると示唆された。



さらに、PI3K 阻害剤添加でも IL-6 産生は減少したことから、IL-17A は PI3K/AKT シグナルも介している可能性が死された。

(3) まとめ



顎関節 OA および ID 患者の滑液中では、IL-18 や TNF-α が検出されている。滑液中で上昇した IL-18 や TNF-α が滑膜細胞を刺激し、滑膜細胞は炎症性サイトカインおよびケモカイン発現を上昇させる。最も発現上昇した CCL20 (MIP-3α) は、Th17 を組織中へ遊走させ、遊走した Th17 は IL-17 を産生する。産生された IL-17 は滑膜細胞を刺激し、滑膜細胞は IL-6 等の炎症性サイトカインおよび CCL20 や IL-8 等のケモカインを産生し、さらに炎症性細胞の浸潤が誘発されるものと考えられる。このような炎症性の分子プロセスによって炎症が進行するものと示唆される。また、網羅的遺伝子発現解析から、IL-18 や TNF-α, IL-17 は MMP1 および MMP3 等の細胞外基質分解酵素の発現も上昇させる結果を得ている。炎症の進行に伴い、細胞外マトリックス分解酵素も産生され、組織分解も引き起こされると示唆される。

代表的な消炎鎮痛薬である COX 阻害薬は、滑膜細胞からの PGE2 産生を抑制するだけでなく、IL-6 や IL-8 産生も抑制した。これは、滑膜細胞自身が産生する PGE2 によって刺激され、IL-6 や IL-8 産生が上昇したが、PGE2 の減少に伴い IL-6 や IL-8 産生が減少したものと示唆される。この作用は、Ind および Cel いずれでも観察される。一方、網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、Ind と Cel で発現変動する遺伝子の多くは共通しているが、Ind または Cel のみで発現変動した遺伝子も認められた。今後は、Ind と Cel の違いについて検討する必要があると考える。

さらに、IL-18 や TNF-α, IL-17 による滑膜細胞からの IL-6 等の産生には、MAPKs や NFκB 活性化経路が関与している。これらのシグナル伝達経路で働くキナーゼ阻害薬は IL-6 等の炎症性サイトカイン産生を抑制することから、今後鎮痛消炎薬としての可能性も示唆される。しかし、そのためには、副作用についての研究が不可欠であろう。

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6件)

① Toshio Hattori, Naomi Ogura, Miwa Akutsu, Mutsumi Kawashima, Suguru Watanabe, Ko Ito, Toshirou Kondoh. Gene Expression Profiling of IL-17A-treated Synovial Fibroblasts from the Human Temporomandibular Joint. Mediators of Inflammation, 査読有, 2015:436067. doi: 10.1155/2015/436067.

② Naomi Ogura, Toshirou Kondoh. Molecular aspects in inflammatory events of temporomandibular joint: microarray-based identification of mediators. Japanese Dental Science Review, 査読有, 51 (1): 10-24, 2015. doi:10.1016/j.jdsr.2014.09.001

③ 阿久津美和, 河島 睦, 小倉直美, 服部俊夫, 山崎文恵, 伊藤 耕, 近藤壽郎. 抗体アレイを用いた TNF- α 刺激ヒト顎関節滑膜細胞のケモカイン産生解析. 日本顎関節学会雑誌, 査読有, 26 (2): 100-107, 2014. <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/gakukansetsu/char/ja>

④ Tsuyoshi Kishida, Naomi Ogura. Microarray analysis detection of signaling pathway responsive to IL-1b in synovial fibroblast from TMJ. International Journal of Oral-Medical Sciences. 査読有, 12 (1): 5-12, 2013. <http://www.mascat.nihon-u.ac.jp/labo/info/index.html>.

⑤ Kawashima M, Ogura N, Akutsu M, Ito K, Kondoh T. The anti-inflammatory effect of cyclooxygenase inhibitors in fibroblast-like synoviocytes from the human temporomandibular joint results from the suppression of PGE2 production. J Oral Pathol Med. 査読有, 42 (6): 499-506, 2013. doi: 10.1111/jop.12045.

⑥ Akutsu M, Ogura N, Ito K, Kawashima M, Kishida T, Kondoh T. Effects of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α on macrophage inflammatory protein-3 α production in synovial fibroblast-like cells from human temporomandibular joints. J Oral Pathol Med. 査読有, 42 (6): 491-498, 2013. doi: 10.1111/jop.12040.

[学会発表] (計10件)

① 渡邊 駿, 阿久津美和, 小倉直美, 河島睦, 服部俊夫, 矢野照雄, 伊藤 耕, 近藤壽郎. ヒト顎関節滑膜細胞の GM-CSF 産生における IL-1 β および TNF- α シグナル経路.

第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2015.10.18. 名古屋国際会議場 (愛知・名古屋).

② 服部俊夫, 小倉直美, 阿久津美和, 河島睦, 渡邊 駿, 矢野照雄, 伊藤 耕, 近藤壽郎. 顎関節滑膜細胞の IL-6 産生における IL-17 シグナル伝達. 第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2015.10.17. 名古屋国際会議場 (愛知・名古屋).

③ 矢野照雄, 小倉直美, 阿久津美和, 河島睦, 服部俊夫, 渡邊 駿, 伊藤 耕, 近藤壽郎. IL-1 β および COX 阻害薬を作用させた滑膜細胞の網羅的遺伝子発現解析. 第 28 回 (一社) 日本顎関節学会総会・学術大会, 2015.7.4.名古屋国際会議場 (愛知・名古屋).

④ Toshio Hattori, Naomi Ogura, Miwa Akutsu, Mutsumi Kawashima, Suguru Watanabe, Ko Ito, Toshirou Kondoh. Effects of interleukin-17 on cytokine production in fibroblast-like synoviocytes. 93rd General Session & Exhibition of The International Association for Dental Research, 2015.3.14. Boston (USA).

[図書] (計5件)

近藤壽郎. クインテッセンス出版, カラーアトラス 顎関節外科の手術手技. パンピングから関節鏡, 円板切除, 全置換術まで. 2016. p8-21, p107-112.

(1) 研究代表者

近藤 壽郎 (KONDOH, Toshirou)
日本大学・松戸歯学部・教授
研究者番号: 7 0 1 7 8 4 1 6

(2) 研究分担者

小倉 直美 (OGURA, Naomi)
日本大学・松戸歯学部・講師
研究者番号: 1 0 1 5 2 4 4 8

伊藤 耕 (ITO, Ko)
日本大学・松戸歯学部・講師
研究者番号: 2 0 4 1 9 7 5 8

(3) 研究協力者

阿久津 美和 (AKUTSU, Miwa)
日本大学・松戸歯学部・助教
研究者番号: 1 0 5 2 3 5 2 4

河島 睦 (KAWASHIMA, Mutsumi)
日本大学・松戸歯学部・助手 (専任扱)
研究者番号: 4 0 7 2 6 4 0 2 4

服部 俊夫 (HATTORI, Toshio)
日本大学・松戸歯学部・大学院生