

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25862017

研究課題名(和文)変形性顎関節症の軟骨破壊に対するエストロゲンの作用機序の解明と診断法への応用

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of action of estrogen on cartilage destruction of osteoarthritis and its application to diagnostic methods

研究代表者

麻川 由起(丹根由起)(Asakawa-Tanne, Yuki)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：50526241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：顎関節症は疫学的に女性に多く、顎関節症患者の血中エストロゲン濃度は、顎関節症を有していない患者と比較して有意に高いことが報告されている。さらに、変形性関節症患者の血中エストロゲン濃度は変形性関節症の病態と相関を示すことから、変形性関節症の病因にエストロゲンが深く関わっていることが示唆されてきた。本研究により、機械的伸張刺激を負荷した条件下での高濃度エストロゲンによるCox-2およびMMP-3発現上昇はエストロゲンレセプターER-NF-KBを介して亢進されていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Temporomandibular joint disease is epidemiologically more common in females, and blood estrogen concentrations in patients with temporomandibular disorder are reported to be significantly higher than those in patients without TMJ. Furthermore, since the blood estrogen concentration in patients with osteoarthritis correlates with the pathology of osteoarthritis, it has been suggested that estrogen is deeply involved in the pathogenesis of osteoarthritis. This study revealed that elevated expression of Cox-2 and MMP-3 by high concentration estrogen under conditions loaded with mechanical stretching stimulation is enhanced via the estrogen receptor ER-NF-KB.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：変形性顎関節症 下顎頭軟骨 エストロゲン

1. 研究開始当初の背景

変形性顎関節症 (TMJ-OA) により吸収・変性した関節軟骨を修復することは困難であり、再発する可能性も高いことより、歯科臨床において治療が困難な疾患のひとつとされている。

下顎頭軟骨は、プロテオグリカンやヒアルロン酸をはじめとする細胞外基質を豊富に含み、関節に加わる伸長力や圧縮力に対する粘弾性特性や摩擦力に対する潤滑機能を有している。しかしながら、生理的範囲を超えた過剰な機械的負荷が関節表面に加わると、関節軟骨における代謝の均衡が崩れ、変性や破壊が生じると考えられている。これまでの我々の研究により、持続的な圧縮力や伸長力がある一定の範囲を超えると、関節軟骨細胞において炎症性サイトカインの発現が誘導され、その結果、軟骨基質の主要な分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の産生が亢進することが明らかとなった。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、関節円板による負荷の干渉や潤滑機能が失われることによる下顎頭軟骨への機械的負荷の増大や不均衡が TMJ-OA の重要な発症要因と考えられている。しかし、生理的な条件下においても TMJ-OA が進行する可能性があることから、他の因子が機械的負荷と相乗的に軟骨破壊に関与しているものと推察される。

2. 研究の目的

顎関節症は疫学的に女性に多く、顎関節症患者の血中エストロゲン濃度は、顎関節症を有していない患者と比較して有意に高いことが報告されている。さらに、OA 患者の血中エストロゲン濃度は OA の病態と相関を示すことから、OA の病因にエストロゲンが深く関わっていることが示唆されてきた。エストロゲンは、エストロゲンレセプターと結合することにより機能を発現するが、エストロゲンレセプターには $ER\alpha$ と $ER\beta$ の二つのサブタイプが存在する。 $ER\alpha$ はラット顎関節での発現が確認されていることから、エストロゲンが顎関節において何らかの影響を及ぼすと考えられるが、さらに $ER\alpha$ の発現は TMJ-OA における疼痛との相関性を有してい

ることから、エストロゲンは $ER\alpha$ を介して OA 病態に関与していると推察される。しかしながら、TMJ-OA の発症過程におけるエストロゲンの作用について、詳細なメカニズムは未だ不明である。

そこで本研究では、エストロゲンに着目し、過剰な機械的負荷による下顎頭軟骨破壊の過程における影響とその作用機序について検証することにより、TMJ-OA リスクファクターに対する新規診断法および治療法の解明を目指した研究を行う。

3. 研究の方法

実験 1、3 では、過度な伸展刺激を負荷したラット下顎頭由来培養軟骨細胞および下顎頭軟骨における COX-2, MMP, 炎症性サイトカイン発現に対するエストロゲンの影響について検討する。実験 2 では、下顎頭由来軟骨細胞におけるエストロゲンレセプターを介したエストロゲンの機能と細胞シグナリングとして NF- κ B 経路の活性化について検討する。実験 4 では、卵巣を摘出したラット TMJ-OA モデルを用いて、エストロゲンレセプターの局在を検証した後、エストロゲンの下顎頭軟骨破壊に対する影響を組織学的および遺伝子・蛋白レベルで明らかにする。さらに、エストロゲンレセプターを局所的にブロックし、下顎頭軟骨破壊に対する影響を検討する。

4. 研究成果

過度な伸展刺激を負荷したラット下顎頭由来培養軟骨細胞における軟骨基質代謝に対するエストロゲンの影響について検討を行った。

1. 培養軟骨細胞における COX-2, PGE2 および MMP 発現の解析

6 週齢雌性ラットの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た。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下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を明らかとしている。したがって、本実験では、0.001,

0.01, 0.1, 1, 10 M の 17 β -エストラジオール(E₂) 添加し、15kPa、毎分 30 サイクルの条件で機械的伸張刺激を負荷後、軟骨細胞層における COX-2、MMPs (MMP-1, 3, 9, 13)、ヒアルロニダーゼの遺伝子発現について検討した。また、細胞層より回収した蛋白より、Western blot 法にて蛋白発現の検討を行った。また、培養上清中の PGE₂ 濃度については、ELISA 解析を行った。0.01M 以上の高濃度 E₂ 添加により COX-2、MMPs (MMP-1,3,9) およびヒアルロニダーゼ発現が上昇することが明らかとなった。しかし、MMP-13 発現に影響は認められなかった。また、培養上清中の PGE₂ 濃度については、1 および 10M E₂ 添加において有意な増加を認めた。一方、0.1nM の E₂ を添加した場合、機械的刺激による COX-2 および MMP の発現上昇を抑制することが示された。

2. 培養軟骨細胞における炎症性サイトカイン発現の解析

各種濃度の E₂ 存在下あるいは非存在下で機械的伸張刺激を負荷し、培養軟骨細胞における炎症性サイトカインの発現について検討を行ったところ、IL-1 β 、IL-6、IL-8 は 0.01M E₂ の添加により発現が上昇し、濃度依存的に変化を認めた。

次に、過度な伸展刺激を負荷したラット下顎頭由来培養軟骨細胞におけるエストロゲンレセプターの発現とシグナル経路について検討を行った。

下顎頭由来培養軟骨細胞に 15 kPa の機械的伸張刺激を負荷し、エストロゲンレセプター (ER α) の発現レベルについて検討したところ、機械的伸張刺激により ER α 発現への影響は認められなかった。

下顎軟骨細胞を播種し、ER α のアンチセンスオリゴヌクレオチドを遺伝子導入し、ER α 発現が抑制されていることを確認した。さらに、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびタモキシフェン存在下/非存在下で機械

的伸張刺激を負荷したところ 0.01M 以上の E₂ による COX-2、MMP-3 発現の上昇を抑制することが明らかとなった。したがって、0.01M E₂ による COX-2 および MMP-3 発現には ER α が関与している可能性が考えられた。次に下顎頭軟骨細胞を播種し、E₂ 添加/非添加で機械的伸張刺激を負荷し、NF- κ B の活性の変化を ELISA 法および Western blot 法にて分析したところ、NF- κ B のリン酸化および活性の亢進が認められた。その一方、ER α の発現を抑制したところ、E₂ による NF- κ B の活性上昇は認められなかった。これらの結果から、機械的伸張刺激を負荷した条件下での高濃度 E₂ による Cox-2 および MMP-3 発現上昇は ER α -NF- κ B を介して亢進されている可能性が示唆された。

3. 過度な機械的伸展刺激を負荷したラット下顎頭軟骨の軟骨基質代謝にエストロゲンが及ぼす影響

ラット下顎頭軟骨を摘出し、Pufe ら(2004)の方法を参考にして、下顎頭の器官培養を行い、E₂ 添加/非添加で下顎頭軟骨に培養細胞伸縮機を用いて機械的伸展刺激を負荷後、縦断切片を作製した。顎関節矢状面の組織切片を作製し、トルイジンブルー染色を行い、病理組織学的に検討したところ、負荷群および E₂ 添加群において軟骨組織のトルイジンブルー染色性低下が認められたが、顕著な差は認められなかった。ER α の発現分布についても検討したところ、下顎頭軟骨の深層に最も多く発現が認められたが、負荷群および E₂ 添加群においても同様の発現分布が認められた。

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 3 件)

Asakawa-Tanne Y, Mitsuyoshi T, Kunimatsu R, Hirose N, Su S, Awada T, Tanne K,

Tanimoto K, Hyaluronan enhances proteoglycan4 expression in synovial cells, Medical Research Archives,5,2017, 1-16. DOI:

<http://dx.doi.org/10.18103/mra.v5i2.991>

Tanne K., Okamoto Y., Su S-C., Mitsuyoshi T., Asakawa-Tanne Y., Tanimoto K. Current status of temporomandibular joint disorders and the therapeutic system derived from a series of biomechanical, histological, and biochemical studies, APOS Trends in Orthodontics, Special Issue, 5(1), 2015, 4-21.

DOI: 10.4103/2321-1407.148014

Asakawa-Tanne Y., Su S, Kunimatsu R, Hirose N, Mitsuyoshi T, Okamoto Y, Tanaka E, Tanne K, Tanimoto K. Effects of enzymatic degradation after loading in temporomandibular joint, J Dent Res, 294(2),2015, 337-343.

DOI:10.1177/0022034514560588.

[学 会 発 表] (計 5 件)

軟骨細胞への過度な機械的負荷受容時の FAK 阻害剤 Defactinib の影響: 矢野下真, 廣瀬尚人, 岡本友希, 粟田哲也, 角千佳子, 高野真実, 麻川由起, 谷本幸太郎.: 第 29 回日本顎関節学会総会 (箱根), 2016 年 7 月 16,17 日

下顎頭軟骨における Semaphorin3A の役割について: 角千佳子, 廣瀬尚人, 岡本友希, 粟田哲也, 矢野下真, 高野真実, 麻川由起, 谷本幸太郎.: 第 29 回日本顎関節学会総会(箱根), 2016 年 7 月 16,17 日

Modulation of PRG4 expression by hyaluronan through CD44 receptor and ERK: Mitsuyoshi T., Tanimoto K., Tanne Y., Hirose N., Yoshioka M., Su S.C., Okamoto Y., Tanne K.: The 113th Annual Session of American Association of Orthodontists (Philadelphia, U.S.A.), 5/3-7, 2013

Effect of Celecoxib on extracellular matrix metabolism in condylar chondrocytes under

excessive mechanical stress: Su S.C., Tanimoto K., Tanne Y., Hirose N., Mitsuyoshi T., Tanne K.: The 26th Annual Meeting of the Japanese Society for the Temporomandibular Joint (Tokyo), 7/20-21, 2013.

ラット変形性顎関節症モデルにおけるメカノレセプターと炎症性メディエーターの発現について: 岡本友希, 谷本幸太郎, 丹根由起, 白倉麻耶, 廣瀬尚人, 光吉智美, 蘇少卿, 丹根一夫: 第 26 回日本顎関節学会総会 (東京), 2013 年 7 月 20 日-21 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

麻川 由起(丹根由起) ASAKAWA - TANNE, YUKI)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教
研究者番号: 50526241