

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861787

研究課題名(和文)三次元培養細胞への機械的刺激と高分子HAを用いた顎関節症の解明と新規治療法の確立

研究課題名(英文)Elucidation of the temporomandibular joint disease using a mechanical stimulus

研究代表者

光吉 智美 (MUTSUYOSHI, TOMOMI)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：00633687

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OAは下顎頭軟骨の吸収破壊を初期病変とする退行性疾患で、慢性の関節炎と下顎骨の変形に伴う咬合異常、顎機能障害、顔貌の不調和を引き起こす。顎関節OAの発症には、顎関節組織に対する過度な圧縮負荷が関与しているが未だ不明な点が多い。

そこで本研究では、顎関節OAの発症機序に着目し、ヒト軟骨・滑膜細胞に過度な機械的刺激を与えたときの高分子HAの存在/非存在が、遺伝子・タンパク発現変化に及ぼす影響の解明をした。その結果、過度な機械的伸張刺激負荷時の高分子HA添加は、潤滑機能蛋白SZPの遺伝子発現を増加させ、関節潤滑機能を改善させることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The temporomandibular joint osteoarthritis (TMJ-OA) is an inflammatory degenerative disease and that associated with the deformation of chronic arthritis, Mandible jaw dysfunction, and causing the disharmony of facial appearance. Articular cartilage exerts buffering and lubricating functions when mechanical stress is applied to the joint surfaces during movement. However, the interaction between TMJ-OA and excessive mechanical stress still remains unclear. In this study, we focused on the pathogenesis of TMJ-OA, and to investigate the effect of HMW-HA on the expression of PRG4 and signaling pathway in cultured human fibroblast-like synoviocytes (HFLS). In conclusion, interaction between PRG4 and HA in articular cartilage may be critical for proper lubricating function on the surface of articular cartilage. Additionally, the use of purified HMW-HA and PRG4 formulations may be useful for the treatment of advanced OA.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：変形性顎関節症 ヒアルロン酸 リモデリング 潤滑機能

1. 研究開始当初の背景

正常な顎関節では、下顎頭と下顎窩の間に関節円板が介在しており、これがクッションの役割を果たし、負荷に対する緩衝作用を発揮している。顎関節 OA は、下顎頭軟骨の吸収破壊を初期病変とする退行性疾患で、慢性の関節炎と下顎骨の変形に伴う咬合異常、顎機能障害、顔貌の不調和を引き起こす疾患である。顎関節 OA の発症には、顎関節組織に対する過度な圧縮負荷が関与しており、下顎頭に加わる機械的負荷が keyfactor と考えられているが、そのメカニズムについての詳細はいまだ不明な点が多い。一方で、生理的な条件下においても顎関節 OA が発症、進行する場合があることから、未知の因子が機械的負荷との相乗作用により軟骨破壊に関与しているものと推察される。下顎頭軟骨は、組織学的には細胞形態や線維走行により最表層、線維層、中間層、移行層の 4 層から構成され、最表層はサイトカインなどの様々な外的因子を防御するとともに、摩擦力やせん断応力に対する抵抗性を有しているが、いったん破壊を生じた場合、顎関節 OA にみられるような吸収や変形を呈した軟骨を修復することは困難である。また、病期期間も数か月から数年単位と長期に及び、再発の可能性も高いことから、歯科臨床において治療が困難な疾患と位置付けられている。

現在、一般関節における OA や慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) の治療と同様に、顎関節 OA においても高分子 HA の関節内投与が行われている (Peyron, 1993)。HA は、皮膚、軟骨、滑膜などの様々な組織に分布することが知られている代表的なグリコサミノグリカンであり、その分子構造は N-acetyl-D-glucosamine と D-glucuronic acid の二糖の繰り返しからなる単純な直鎖状構造で、コラーゲン、フィブロネクチ

ン、プロテオグリカンなどとともに細胞外マトリックスの主要な構成成分として組織を構築している。関節では主として、滑膜線維芽細胞で HA 合成酵素 (hyaluronan synthase; HAS) により産生され、血管・滑膜関門を通過して滲出した液性成分と一緒に滑液を形成する。高分子 HA はステロイド治療にみられる副作用もなく、長期にわたり繰り返し使用可能であるため、安全な保存療法としても広く知られている。関節内に注入された高分子 HA は軟骨表面に沈着し、異化反応を引き起こす炎症性物質等の軟骨への侵入を阻止することが主な作用と考えられてきた (Yasuda, 2010)。しかし、この他にも抗炎症作用 (Williams *et al.*, 2003)、疼痛抑制作用 (Gotoh *et al.*, 1993)、軟骨変性抑制作用 (Kikuchi *et al.*, 1996)、滑膜増殖抑制作用、粘弾性の獲得 (Yokobori *et al.*, 1995) などの多くの機能を有することが明らかにされている。

我々の研究グループではこれまでに、二次元培養軟骨・滑膜細胞に対し繰り返し伸長刺激を加えることが、炎症性サイトカイン、基質分解酵素、HA 合成・分解酵素等の発現に影響を与えることを既に報告している (Tanimoto *et al.*, 2010, Kitamura *et al.*, 2010)。しかし、現有の培養細胞伸展装置 (Flexercell® Strain Unit) では、滑膜・軟骨細胞の伸長圧縮刺激の与え方や均等性に限界があるため、本研究では、より生体に近い状態の関節組織を再現するために、軟骨・滑膜細胞を三次元培養し、様々な条件の機械的刺激が細胞に与える影響を検討することとした。さらに、軟骨・滑膜細胞培養時に高分子 HA を添加したときの機械的刺激が、各種遺伝子およびタンパク発現にどのような変化を与えるかを検討することとした。また、動物実験では、ラット過開

口モデルを用いて、顎関節への高分子 HA 投与が関節組織のリモデリングに与える影響について、分子生物学的・組織学的に解明することとした。

本研究では、我々の研究グループにおけるこれまでの一連の研究成果を統括し、ヒトでの実用化を視野に入れた顎関節 OA に対する高分子 HA 投与の効果およびその作用機序を解明する。さらには、機械的刺激と高分子 HA が三次元培養軟骨・滑膜細胞、そしてラット過開口 OA モデルの関節組織に与える影響を解明することを究極の目標とした。

まず、ヒト軟骨・滑膜細胞を三次元培養し、繰り返し機械的刺激負荷を与えた時の炎症性サイトカイン、基質分解酵素、HA 合成・分解酵素等の遺伝子発現およびタンパク発現を解明する。また、機械的刺激負荷時の高分子 HA の存在/非存在が培養ヒト軟骨・滑膜細胞に与える影響を明らかにする。さらに、ラット過開口 OA モデルの顎関節内への高分子 HA 投与が軟骨・滑膜細胞の骨軟骨関連遺伝子や基質分解酵素、HA 合成・分解酵素の遺伝子およびタンパク発現に与える影響を明らかにすることで、機械的刺激と高分子 HA を加えることによる軟骨・滑膜細胞をはじめとした関節組織のリモデリングに及ぼす影響を検討する。

これまで臨床で行われてきた顎関節内への高分子 HA 投与を応用し、三次元培養細胞を用いた細胞実験、および独自のラット過開口 OA モデルを用いた動物実験で、機械的刺激と高分子 HA が、軟骨・滑膜細胞をはじめとする関節組織に及ぼす影響を評価することで、顎関節症に対して、関節組織のリモデリング機序を解明することを目的としているところに学術的な高い意義があると考えられる。さらに、顎関節内への高分子 HA 投与だけでなく、メカニカルストレスが加わることで、関節組織のリモデリング

や再生の向上を期待した機序の解明と、それに対する予防法、治療法を目指すところに独創性や新規性があり、臨床応用も視野に入れた重大な成果が得られると考えられ、歯科医学のみならず様々な医療の進歩に計り知れない大きな貢献を果たすものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、変形性顎関節症 (Osteoarthritis; OA) の発症機序ならびに顎関節の構造変化に着目し、機械的刺激とヒアルロン酸 (hyaluronic acid; HA) が軟骨・滑膜細胞に与える影響を解明するとともに、これらが関節組織のリモデリングに及ぼす影響を探索することを目的とする。さらに、軟骨・滑膜細胞培養時に高分子 HA を添加したときの機械的刺激が、各種遺伝子およびタンパク発現にどのような変化を与えるかを検討する。また、動物実験では、ラット過開口モデルを用いて、顎関節への高分子 HA 投与が関節組織のリモデリングに与える影響について分子生物学的・組織学的に解明する。これにより、ヒトでの実用化を視野に入れた顎関節 OA に対する高分子 HA 投与の効果およびその作用機序を解明する。

3. 研究の方法

機械的刺激による関節組織の遺伝子・タンパク発現変化に高分子 HA 投与が及ぼす影響の解明

ヒト軟骨・滑膜細胞を培養し、繰り返し機械的刺激負荷を与えた時の炎症性サイトカイン、基質分解酵素、HA 合成・分解酵素等の遺伝子発現およびタンパク発現を、RT-PCR 解析および Western blot 法による解析を行う。また、機械的刺激負荷時の高分子 HA の存在/非存在が培養ヒト軟骨・滑膜細胞に与える影響を明らかにする。

4. 研究成果

・ヒト軟骨・滑膜細胞への炎症状態再現にあたり前実験として、培養ヒト滑膜細胞への低分子HA添加がSZP遺伝子発現に及ぼす影響について検討を行った。その結果、SZP遺伝子発現はコントロール群と比較して、低分子HAの濃度が10、50、100 µg/mlいずれの濃度においても有意な低下を示した。また、培養ヒト滑膜細胞へのヒアルロニダーゼ処理により、SZP遺伝子発現はコントロール群と比較して、10、50、100 units/mlにおいて濃度依存的な有意な低下を示した。

さらに、培養ヒト滑膜細胞へのヒアルロニダーゼ処理後の高分子HA添加がSZP遺伝子発現に及ぼす影響について検討を行った結果、ヒアルロニダーゼ処理により濃度依存的に低下したSZP遺伝子発現は、その後の高分子HA添加により、10 units/mlで0.74倍から1.12倍へ、50 units/mlで0.3倍から0.37倍へと有意な増加を示したものの、100 units/mlでは0.22倍から0.17倍と有意差が認められなかった。

・過度な機械的伸張刺激による炎症性サイトカイン、基質分解酵素およびHA合成酵素の遺伝子発現の変化

培養ヒト滑膜細胞への過度な機械的伸張刺激により、炎症性サイトカインであるIL-1の遺伝子発現は、コントロール群と比較して3時間後に8.13倍に上昇し、その後減少を示した。一方で、軟骨基質のコラーゲン分解に関与するMMP-1の遺伝子発現は、コントロール群と比較して3、6、12、24時間後に有意な増加を示したものの、6時間後から12時間後へかけて大きな減少を示した。MMP-3の遺伝子発現は、コントロール群と比較して3、6、12時間後に有意な増加を示したが、12時間後から24時間後へかけて大きく減少した。同様に、MMP-13の遺伝子発現は、コントロール群

と比較して3時間後に有意な増加を認めたものの、その後コントロールレベルを超えて大きな減少を示した。

一方、HAS2の遺伝子発現はコントロール群と比較して、6時間後に増加傾向を示したものの、その後減少し、24時間後にはコントロール群より有意に小さな値を示した。また、HAS3の遺伝子発現はコントロール群と比較して、3、6、12時間後に2.76倍、24時間後に有意に大きい値を示した。

さらに、培養ヒト滑膜細胞への過度な機械的伸張刺激により、SZP遺伝子発現はコントロール群と比較して有意な低下を示したものの、機械的伸張刺激負荷時の高分子HA添加により有意な増加を示した。

また、HAS2の遺伝子発現は、過度な機械的伸張刺激によりコントロール群と比較して有意な低下を示したものの、高分子HA添加時には有意な増加を認めた。一方、HAS3の遺伝子発現は、過度な機械的伸張刺激によりコントロール群と比較して有意な増加を示したものの、高分子HA添加時には有意な低下を認めた。

以上の結果より、ヒト滑膜細胞において、過度な機械的伸張刺激負荷あるいはヒアルロニダーゼ処理によりSZP遺伝子発現は低下したが、これに続く高分子HA添加によりSZP遺伝子発現が増加したことから、炎症時の関節腔内への高分子HAの投与は、高分子HA固有の流体潤滑機能の亢進のみならず、SZPが有する境界潤滑機能までも改善させる可能性が明らかとなった。また、滑膜細胞への過度な機械的伸張刺激負荷は、炎症性サイトカインおよび基質分解酵素の発現を上昇させるとともにSZP遺伝子発現を低下させることが明らかとなった。機械的伸張刺激負荷時の高分子HA添加は、SZP遺伝子発現を有意に増加させた。また、高分子HA合成酵素は増加し低分子HA合成酵素は減少することも示された。

このことから、今後の顎関節症の治療におけるHAおよびSZPの意義と重要性が強く示唆された。

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3件)

1. Asakawa-Tanne Yuki, Shao-Ching Su, Ryo Kunimatsu, Naoto Hirose, Tomomi Mitsuyoshi, Yuki Okamoto, Eiji Tanaka, Kazuo Tanne, Kotaro Tanimoto.

Effects of enzymatic degradation after loading in temporomandibular joint.

Journal of Dental Research, Feb;94(2):337-43.
doi: 10.2015 査読有り

2. Shao-Ching Su, Kotaro Tanimoto, Yuki Tanne, Ryo Kunimatsu, Naoto Hirose, Tomomi Mitsuyoshi, Yuki Okamoto, Kazuo Tanne. Celecoxib exerts protective effects on extracellular matrix metabolism of mandibular condylar chondrocytes under excessive mechanical stress. Osteoarthritis Cartilage. Jun;22(6):845-51. doi: 10.1016. 2014 査読有り

3. Iwabuchi Y, Tanimoto K, Tanne Y, Inubushi T, Kamiya T, Kunimatsu R, Hirose N, Mitsuyoshi T, Su S, Tanaka E, Tanne K.

Effects of low-intensity pulsed ultrasound on the expression of cyclooxygenase-2 in mandibular condylar chondrocytes.

J Oral Facial Pain Headache. Summer;28(3):261-8. doi: 10.11607, 2014 査読有り

〔学会発表〕(計3件)

1. Mitsuyoshi T et al. Effect of Low molecular hyaluronan on the expression of PRG4 through CD44 in synovial membrane cells. The 8th International Orthodontic Congress

2015/9/27-30 .England London

2. 光吉智美ら. ヒアルロン酸が滑膜細胞における CD44 受容体を介した Superficial zone protein 発現に及ぼす影響. 第28回日本顎関節学会総会・学術大会. 2015/7/4-5 日本.名古屋.

3. 光吉智美ら. 顎関節軟骨細胞に対する機械的伸展刺激がEP4受容体を介した基質分解に及ぼす影響. 第27回日本顎関節学会総会・学術大会. 2014/7/19-20 日本.福岡.

〔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〕
ホームページ等
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/orthod/reruit/research.html>

6. 研究組織
(1)研究代表者
光吉 智美(Mitsuyoshi, Tomomi)
広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号:00633687

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし