

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17166

研究課題名（和文）顎関節症滑膜炎誘導機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism for inducing temporomandibular synovitis

研究代表者

小林 一彦（kobayashi, kazuhiko）

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：60802832

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は以下の3研究項目のもとに、in vivoでのエラスチン断片やIL-6による顎関節滑膜炎の誘導メカニズムを検証した。1；in vivoでのエラスチン断片による顎関節でのIL-6の産生誘導と顎関節OA様変化の観察 2；関節症自然発症マウスを用いた顎関節症の検証 3；腱、靭帯組織でIL-6を発現する遺伝子改変マウスでの顎関節病変の観察

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、in vivoにおいてもエラスチンの断裂や分解が初期や慢性炎症化の段階において顎関節の発症メカニズムが明らかになる点で特色がある。さらに、炎症性サイトカインがどのように滑膜炎や顎関節炎を誘導するのか明らかになる点で独創的である。

さらに、遺伝子改変マウスを用いた解析にて関節炎の誘導や増強でのIL-6の役割が明らかになり、いわゆる難治性の顎関節症の原因が明らかになる可能性ある点で特色がある。

研究成果の概要（英文）：This study verified the inducing mechanism of temporomandibular joint synovitis by elastin fragments and IL-6 in in vivo under the following three study items. 1; Induced production of IL-6 in the temporomandibular joint by elastin fragments at in vivo and observed temporomandibular joint OA-like changes. 2; Validation of temporomandibular disorders using spontaneous arthropathic mice. 3; Observations on Temporomandibular Joint Lesions in Genetically Modified Mice Expressing IL-6 in Tendons and Ligament Tissues.

研究分野：顎関節症

キーワード：顎関節 滑膜炎 エラスチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

顎関節滑膜組織は関節包の内壁を覆っており、線維芽細胞様の間質細胞とライニング細胞によって構成されている。これらは炎症メディエーター産生能を有するため、滑膜炎の進行において重要な役割を果たす。本来炎症は、異物や死んでしまった自分の細胞を排除して生体の恒常性を維持しようという反応である。細菌やウイルス等の異物が体の中に侵入しようとした時に、さまざまな細胞などの生体内成分がその排除に働いた結果が炎症性反応と考えられる。それらの反応の中には、予め体の中に用意されている直ちに働く成分による反応があり、ヒトには存在しない細菌やウイルスの構成成分を認識するセンサーが、あらかじめ体の中に存在する。細菌やウイルスの構成成分のことを PAMPs (pathogen-associated molecular patterns; 病原体関連分子パターン)、また PAMPs を認識するセンサーのことを PRRs (pattern-recognition receptors: パターン認識受容体) と総称している。

一方で、最近になってそれらの PRRs がもともと私たちの体の中にある成分にも反応することが明らかになってきた。そのような炎症を引き起こす体の中にある成分を DAMPs (damage-associated molecular patterns; ダメージ関連分子パターン) と総称している。組織がストレスにさらされたり、傷害された時にも、感染した時と同じようなイベントが起こる。そのような組織からは健康であれば組織内に隠れていた分子 (DAMPs) が放出される。それら DAMPs は免疫細胞の PRRs や特別な DAMPs 受容体に結合して、炎症性サイトカインの放出を促進したり、組織へ免疫系細胞を遊走させて、炎症を起こす (自然炎症)。その過程に関与する免疫系細胞も、樹状細胞やマクロファージのような抗原提示細胞、T 細胞や好中球など感染時とほぼ同様である。DAMPs は獲得免疫系も刺激し、自己免疫反応や組織修復にも関与する。最近の他の研究室から、脊柱管狭窄症においてエラスチンの分解産物が炎症性サイトカインの発現を亢進させ、脊柱管黄色靱帯の肥厚に関与していることが報告された (J connective tissue research 2012, 53: 407-14.)。この報告から、自己由来の結合組織の分解産物が、感染がほとんどない領域で炎症や破壊性病変を誘導している可能性が示唆された。顎関節関節包内で引き起こされる滑膜炎も、多くの場合非感染性の炎症である。したがって、顎関節滑膜炎は関節組織の適応能力を超えるような要因、例えば顎関節外傷や咀嚼システムの機能障害に起因する顎関節の過負荷によって産生された関節組織由来の分解産物が炎症を誘導している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

顎関節症とは、咀嚼筋の疼痛、関節雑音、開口障害ないし顎運動異常を主要症候とする慢性疾患群総括的診断名であり、その病態には咀嚼筋障害、関節包・靱帯障害、関節円板障害、変形性顎関節症 (OA) などが含まれている。そしてこれらの臨床症状をきたす原因の 1 つが顎関節滑膜炎である。顎関節滑膜炎は複数の炎症メディエーターを産生し、関節組織に炎症性変化を引き起こす。最近では、自己組織由来の分解産物が、脊柱管狭窄症や関節症で炎症や破壊性病変を誘導することが報告されている。これまで申請者は、in vitro でエラスチン分解産物が培養顎関節滑膜細胞で IL-6 を発現誘導することを報告した。しかしながら、in vivo でエラスチン断片が IL-6 産生を誘導し、滑膜炎を誘導し最終的に顎関節症の発症に関与しているかについては不明であり、本研究で明らかにしようとする。

3. 研究の方法

本研究は以下の 3 研究項目のもとに、in vivo でのエラスチン断片や IL-6 による顎関節滑膜炎の誘導メカニズムを検証する。

- (1) in vivo でのエラスチン断片による顎関節での IL-6 の産生誘導と顎関節 OA 様変化の観察
- (2) 関節症自然発症マウスを用いた顎関節症の検証
- (3) 腱、靱帯組織で IL-6 を発現する遺伝子改変マウスでの顎関節病変の観察

4. 研究成果

- (1) in vivo でのエラスチン断片による顎関節での IL-6 の産生誘導と顎関節 OA 様変化の観察

申請者はすでに、培養顎関節滑膜細胞を用いて in vitro でエラスチン断片が IL-6 の発現亢進を誘導することを報告しているが、さらに in vivo でのエラスチン分解と分解産物の役割を本研究で明らかにした。顎関節腔への穿刺と薬液の注入が可能な日本白色家兎を使用した。顎関節腔へ注入するエラスチン断片は申請者が in vitro の実験で使用した (Molecular Medicine Report, 2018, 16:3147-3154.) もの同一のエラスチン断片を用いた。ウサギの片側の顎関節に 50, 100, 250, 500ug/ml のエラスチン断片液を注入し、同一反対側顎関節に vehicle コントロールを注入した。エラスチン断片を注入後、1、2、4 週間それぞれの顎関節滑液を顎関節還流洗浄により回収し、IL-1、IL-6、TNF- α 濃度およびエラスチン分解活性をもつ MMP-12 濃度を ELISA 法により測定した。その結果から、in vivo においてエラスチン断片により誘導される炎症性サイトカインを明らかにした。さらに、関節包ごとウサギより摘出し、顎関節の OA 様変化をマイクロ CT にて解析した。その後、顎関節のパラフィン切片を作製し、軟骨と骨変化をアルシアンブルーおよびサフラニン染色にて観察した。また、免疫組織染色により、エラスチン、IL-1、IL-6、TNF- α 、MMP-12 の局在を検討した。

- (2) 関節症自然発症マウスを用いた顎関節症の検証

STR/1N は、高脂血症を示す STR/N (F29) よりまだら模様で膝関節変形を呈する個体として分

離された。STR/Ort は STR/1N より派生した 1 系統であり (Osteoarthritis Cartilage 2001, 9:85-91.), 欧米を中心に変形性膝関節症の基礎研究に用いられている。膝関節に異常がみられる 35 週齢を中心に顎関節を観察した。この結果から、軽度、中度、重度の顎関節症を観察できる週齢を決定した。それぞれの週齢のマウスの顎関節滑液を顎関節還流洗浄により回収し、エラスチン、IL-1、IL-6、TNF- α 、MMP-12 濃度を ELISA 法により測定した。得られた結果より、エラスチン分解と顎関節症の関連を検討した。さらに、顎関節のパラフィン切片を作製し、軟骨と骨変化をアルシアンブルーおよびサフラニン染色にて観察した。また、免疫組織染色により、エラスチン、IL-1、IL-6、TNF- α 、MMP-12 の局在を検討した。

(3) 腱、靭帯組織で IL-6 を発現する遺伝子改変マウスでの顎関節病変の観察

申請者のこれまで報告から、腱や靭帯に存在するエラスチンが分解、断裂し、この分解産物が誘導する IL-6 が顎関節滑膜炎や顎関節症の発症の 1 原因となっている可能性が予想されている。そこで、遺伝子改変技術により、腱や靭帯で IL-6 を発現するマウスを作製し、顎関節滑膜炎や顎関節症発症との関わりを検討した。腱や靭帯組織はほとんど膠原線維と弾性繊維からなる密平行線維性結合組織である。腱は骨と筋肉を繋ぎエラスチンよりコラーゲンが多く含まれるのに対し、靭帯では関節の動きに応じてコラーゲンやエラスチンの比率が異なる。テノモジュリン遺伝子は、軟骨と並んで毛細血管網に乏しい腱 (筋外膜等も含む) や靭帯に特異的な発現局在を示す (Biochem Biophys Res Commun 2001 280:1323-1327.)。テノモジュリンには、プロセッシングシグナル配列がないので、膜蛋白質として細胞表面を覆う形式で機能している。また、腱、靭帯の初期の分化マーカーとしてスクレラキス遺伝子が報告されている (Development 2001, 128:3855-66.)。スクレラキス遺伝子は前駆腱細胞や腱細胞で発現しているが、腱細胞だけでなく軟骨や骨芽細胞などの骨格系の細胞にも発現が検出される。一方、テノモジュリン遺伝子は成熟した腱・靭帯細胞においてのみ発現が検出される。これら、テノモジュリン遺伝子プロモーターまたはスクレラキス遺伝子プロモーターの制御下で Cre リコンビナーゼを発現する遺伝子改変マウスが国内の研究者により報告されている。

顎関節の腱、靭帯組織特異的に IL-6 を発現するマウスの作製：申請者の共同研究者は、Cre リコンビナーゼの活性により IL-6 を発現する遺伝子改変マウスを作製し報告しており、このマウスとテノモジュリン遺伝子プロモーターまたはスクレラキス遺伝子プロモーターの制御下で Cre リコンビナーゼを発現する遺伝子改変マウスとを交配することにより、顎関節の腱、靭帯組織特異的に IL-6 を発現するマウスを作製した。作製したマウス顎関節のパラフィン切片を作製し、顎関節の腱、靭帯組織特異的に IL-6 が発現しているかを免疫組織染色法にて確認した。また、テノモジュリン遺伝子プロモーターまたはスクレラキス遺伝子プロモーターの制御下で Cre リコンビナーゼを発現する遺伝子改変マウスと ROSA26 マウスと交配し、顎関節を X-gal で染色し、それぞれのプロモーターの組織特異性を確認した。

顎関節の腱、靭帯組織特異的に IL-6 を発現するマウスの観察：得られたマウスの顎関節をマイクロ CT にて経時的に観察し、顎関節に変化が出現する週齢を特定した。その週齢前後のマウスの顎関節滑液を顎関節還流洗浄により回収し、エラスチン、IL-1、IL-6、TNF- α 、MMP-12 濃度を ELISA 法により測定した。得られた結果より、エラスチン分解および IL-6 発現と顎関節症の関連を検討した。さらに、顎関節のパラフィン切片を作製し、軟骨と骨変化をアルシアンブルーおよびサフラニン染色にて観察した。また、免疫組織染色により、エラスチン、IL-1、IL-6、TNF- α 、MMP-12 の局在を検討した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----