

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05552

研究課題名(和文) 下顎頭軟骨の特異性における抗酸化ストレス能のエピジェネティック制御

研究課題名(英文) Epigenetic control of the anti-oxidative stress tolerance in the specificity of the condylar cartilage

研究代表者

菅崎 弘幸 (Kanzaki, Hiroyuki)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：30333826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：関節軟骨は膝関節において体重を支持するなど圧縮力負荷に抵抗しやすいことが知られているが、いっぽう下顎頭軟骨は矯正歯科治療においてチンキャップなどの外力を負荷することでその成長を制御し顎変形の修正を行えるなどメカニカルストレス抵抗性が低い軟骨組織であることが知られている。本研究課題ではNrf2を介した抗酸化能がエピジェネティックに制御を受けて抗酸化ストレス耐性が低いと仮説を立て、その検証を遂行した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膝関節軟骨と下顎頭軟骨を比較することで、両者のメカニカルストレス耐性にエピジェネティックな抗酸化ストレス耐性制御が関連していることが明らかとなった。これは疾患耐性にエピゲノムが関連していることを示しており、学術的に大きな意義がある研究と思われる。

研究成果の概要(英文)：Articular cartilage is thought to exhibit tolerance against mechanical compression such as body weight loading on knee joint. On the other hand, mandibular condylar cartilage is sensitive to the mechanical loading. Orthodontic treatment uses this characteristics to modulate the growth at the mandibular condylar cartilage.

In this research project, we hypothesized that epigenetic control of the anti-oxidative stress tolerance via the transcription factor, Nrf2, in the specificity of the condylar cartilage. To clarify the issue, we utilized in vivo and in vitro experiment, and revealed the possible epigenetic control of the anti-oxidative stress tolerance in the specificity of the condylar cartilage.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：Nrf2 エピゲノム 軟骨 抗酸化酵素 酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節疾患は関節が運動において重要な役割を果たしていることから QOL への負のインパクトが大きく、超高齢社会の日本において、その予防・治療についての早急な研究対策が望まれている。顎顔面頭蓋領域においても顎関節疾患に伴い、開口障害・咀嚼障害・発音障害・不定愁訴などさまざまな心身症状を発症し QOL 低下が惹起される。

顎関節症は、顎関節の疼痛・顎運動異常などを徴候とする疾患であり、そのうち特に重篤な型(変形性顎関節症)では下顎頭軟骨の破壊・吸収・変性がみられる(顎関節症の症型分類 日本顎関節学 2001 年改定版)。一般的に顎関節症は若年者で好発するが、高齢者では若年者に比較して重症化しやすいことも知られている(慈恵医大誌 2012;127:41-8)。この高齢者での変形性顎関節症好発の原因として、大臼歯喪失による歯での咬合力支持が失われ顎関節への咬合力負荷が増大することが原因とする報告(日本骨形態計測学会雑誌, 2006;16(3):21-9)や、逆に機能低下が関連しているという報告(Arch Oral Biol. 2014;59(12):1368-1376)があり不明な点がまだ多いのが現状である。

関節軟骨は膝関節において体重を支持するなど圧縮力負荷に抵抗しやすいことが知られているが、いっぽう下顎頭軟骨は矯正歯科治療において外力を負荷することでその成長を制御し顎変形の修正を行えるなどメカニカルストレス抵抗性が低い軟骨組織であることが知られている(Am J Orthod Dentofacial Orthop. 1986;90(1):19-28, Semin Orthod. 1997;3(4):232-43,44-54)。また膝軟骨に過大なメカニカルストレスを負荷した場合、軟骨細胞において酸化ストレスが増加することで細胞障害が生じ軟骨破壊の病因となりうるということが報告されている(Biorheology. 2004;41(3-4):479-91, Biorheology. 2006;43(3-4):517-21, Curr Drug Targets. 2007;8(2):347-57)。したがってメカニカルストレス耐性が低い下顎頭軟骨では酸化ストレスによる細胞動態の改変が生じ、いっぽう圧縮力負荷に抵抗しやすい膝軟骨はその酸化ストレスへの耐性が高いことが示唆される。この膝関節と下顎頭軟骨のストレス抵抗性の相違を明らかにすることは、高齢者において好発する重篤な変形性顎関節症の病態を解明することにもつながり、高齢者の医療福祉、ならびに QOL 向上に大きく貢献するものと思われる。酸化ストレスは生体・細胞にとって障害因子として働くため、細胞は酸化ストレスへの防御機構として転写因子 Nrf2 を介した抗酸化ストレス酵素群発現誘導とそれらによる ROS 消去システムを兼ねそろえている(Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2007;47:89-116.)。

この問題を解決すべく、研究代表者らは顎関節・膝関節部の非脱灰組織切片から Laser capture microdissection (LCM)法を用いて関節軟骨各層の RNA を抽出し遺伝子発現を解析する手法を確立し、学会発表を何度か行ってきた。

研究代表者らは、下顎頭軟骨において Nrf2 がエピジェネティックな発現抑制を受けておりそれにより抗酸化ストレス酵素群が総じて低下し抗酸化ストレス耐性が下顎頭軟骨では低くなっているために下顎頭軟骨においてメカニカルストレス誘導性変形性関節症が発症するという研究仮説をたて、本研究課題ではその検証を動物実験・器官培養実験を用いて行うことを研究目的として研究を遂行した。

2. 研究の目的

本研究課題では仮説として「下顎頭軟骨において Nrf2 がエピジェネティックな発現抑制を受けておりそれにより抗酸化ストレス酵素群発現が総じて低下し抗酸化ストレス耐性が下顎頭軟骨では低くなっている」を想定し、次の3つを具体的な研究目標として設定し、その検証を動物実験・器官培養実験を用いて遂行した。

- 1) 下顎頭軟骨と他の軟骨での Nrf2 メチル化の比較
- 2) 上記メチル化・発現と関節破壊病態との関連解明。
- 3) 加齢下顎頭軟骨における Nrf2 活性化によるメカニカルストレス耐性向上の可否解明。

3. 研究の方法

- 1) 下顎頭軟骨と他の軟骨での Nrf2 メチル化の比較

はじめに下顎頭軟骨、脛骨関節軟骨、脛骨成長軟骨間のゲノム DNA メチル化について比較を行った。20 週齢の ICR 系雄性マウスについて下顎頭および脛骨の非脱灰凍結連続切片を作製し LCM 法を用いて各サンプルからゲノム DNA を採取し、Nrf2 プロモーター領域のうちメチル化の可能性が高い領域 (CpG アイランド) についてパイロシーケンス法によってメチル化の程度を測定した。また同領域に対して、パイサルファイト処理有無での high resolution melt (HRM) 法を用いてメチル化の程度についてパイロシーケンス法の数値を確認した。すなわち、Nrf2 プロモーター領域のうちメチル化の可能性が高い領域 (CpG アイランド) の上流と下流にプライマーを設定し、リアルタイム PCR 後の解離曲線採得について温度変化を通常よりも高分解で取得し、GC, AT の解離温の違いからメチル化の有無をメチル化 100%と 0%の標準試料を各割合で混合したものの解離曲線と比較することでサンプルのメチル化程度を調べる解析を遂行した。

- 2) 上記メチル化・発現と関節破壊病態との関連解明。

下顎頭軟骨、脛骨関節軟骨における遺伝子発現の相違を抗酸化酵素に着目して比較を行った。はじめに網羅的遺伝子発現解析を行った。すなわち ICR 系雄性マウスについて下顎頭および脛骨の非脱灰凍結連続切片を作製し LCM 法を用いて各サンプルから RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。つぎに発現に相違が見られた遺伝子について、リアルタイム RT-PCR を行い、発現の相違について確認を行った。解析遺伝子としては抗酸化ストレス酵素群発現制御マスターレギュレーターである Nrf2 ならびにその阻害因子である Keap1, Bach1, Bach2, そして Nrf2 によって転写制御を受けていることが知られている抗酸化ストレス酵素群 (HO1, GCS, G6PD, NQO) について解析を行った。

つぎに抗酸化酵素のタンパクレベルでの発現相違について、下顎頭軟骨、脛骨関節軟骨の組織切片を使用し、特異抗体を用いた免疫組織染色法にて解析を行った。

さらにこれら抗酸化酵素発現の相違が、各組織の酸化ストレスマーカー強度に違いを与えるかどうかについて、酸化ストレスマーカーである 8-OHdG を特異的に検出できる抗体を用いた免疫組織染色法にて解析を行った。

- 3) 加齢下顎頭軟骨における Nrf2 活性化によるメカニカルストレス耐性向上の可否解明。

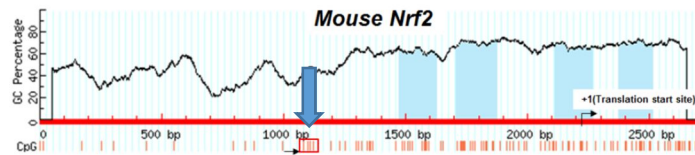
介入試験として、抗酸化ストレス酵素群のマスターレギュレーターである Nrf2 を下顎頭軟骨において特異的に活性化し、抗酸化ストレス酵素群発現を増強することで下顎頭軟骨のメカニカルストレス耐性を向上させられるかどうかを動物実験にて検証した。具体的にはマウス顎関節腔へ Nrf2 活性化材である dimethyl fumarate を局所注射し、変形性関節症の病態観察を行った。

4. 研究成果

- 1) 下顎頭軟骨と他の軟骨での Nrf2 メチル化の比較

パイロシーケンス法によるメチル化解析

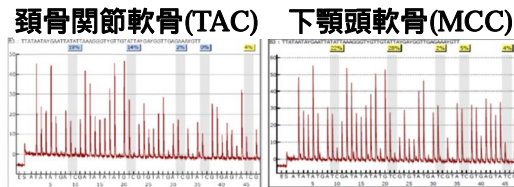
マウス Nrf2 ゲノム転写開始領域における、GC%および CpG 存在位置についてバイオインフォマティクス解析を行った。



右図のように、転写開始点から約 1kb 上流に CpG アイランドが存在するため、ここについてメチル化の程度を解析することとしました。

図 1 Nrf2 ゲノムプロモーター領域の CpG アイランド

PCR プライマーをこの領域をさむように設定し、CpG アイランド 5 箇所のメチル化程度についてパイロシーケンス解析を行った。



| | TAC | MCC |
|---|-----|-----|
| ① | 19% | 22% |
| ② | 14% | 28% |
| ③ | 2% | 2% |
| ④ | 0% | 5% |
| ⑤ | 4% | 4% |

各 CpG でメチル化の程度が異なっていること、同じ CpG 配列でも頸骨関節軟骨と下顎頭軟骨の間でメチル化の程度が異なること、下顎頭軟骨の方がよりメチル化されて

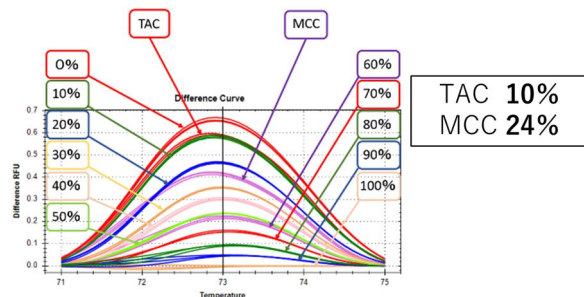
図 2 パイロシーケンス法による Nrf2 メチル化解析

いることが明らかとなった。

HRM 解析法によるメチル化解析

つぎに HRM 解析法を用いて、上記 5 箇所の CpG アイランドを含む塩基配列に対して、メチル化 100%と 0%の標準試料を各割合で混合したものの解離曲線と比較し、頸骨関節軟骨および下顎頭軟骨のメチル化の程度を解析した。

メチル化の程度は、頸骨関節軟骨で 10%、下顎頭軟骨で 24%であり、下顎頭軟骨の方がよりメチル化されていた。



以上 と の結果から、Nrf2 プロモーター領域は、頸骨関節軟骨と下顎頭軟骨でメチル化の程度に差が見られること、下顎頭軟骨の方がよりメチル化されていることが明らかとなった。

図 3 HRM 法による Nrf2 メチル化解析

2) 上記メチル化・発現と関節破壊病態との関連解明。

はじめに頸骨関節軟骨と下顎頭軟骨の網羅的遺伝子発現解析を行った。頸骨関節軟骨と下顎頭軟骨では多くの遺伝子に発現相違が見られた。その中でも、Nrf2・抗酸化酵素系に着目し、発現比較を行った。

抗酸化酵素発現のマスターレギュレーターである Nrf2 の遺伝子発現は、頸骨関節軟骨と下顎頭軟骨で約 10 倍発現量に差が見られ、頸骨関節軟骨での発現が高かった。Nrf2 で転写制御されていることが知られている抗酸化酵素、HMOX-1、NQO、GCS、などの遺伝子発現も予想通り頸骨関節軟骨での発現が高かった。

| 遺伝子名 | 発現強度 | | 下顎頭軟骨に対する発現レシオ |
|--|---------|--------|----------------|
| | 頸骨関節軟骨 | 下顎頭軟骨 | |
| Nrf2 | 8657.7 | 810.8 | 10.7 |
| HMOX-1 | 1106.7 | 495.4 | 2.2 |
| NQO1 | 5180.5 | 268.6 | 19.3 |
| NQO2 | 6053.6 | 2520.6 | 2.4 |
| GCS | 3405.0 | 181.2 | 18.8 |
| Microsomal glutathione S-transferase 1 | 6691.8 | 18.1 | 370.0 |
| Glutathione S-transferase kappa 1 | 13314.3 | 5970.0 | 2.2 |
| Glucose-6-phosphate dehydrogenase X-linked | 11940.4 | 5037.7 | 2.4 |
| Peroxiredoxin 3 | 13491.1 | 2793.1 | 4.8 |
| Peroxiredoxin 4 | 110.5 | 21.0 | 5.3 |
| Peroxiredoxin 6 | 306.8 | 47.7 | 6.4 |

表 1 マイクロアレイ遺伝子発現解析

次にマイクロアレイで得られた遺伝子発現の相違を確認すべく、リアルタイム RT-PCR を行い、発現の相違について確認を行った。Nrf2 については頸骨関節軟骨での発現が下顎頭軟骨の約 6 倍、NQ01 については約 2 倍の発現差が見られる結果であった。

これらのことから、遺伝子レベルで、Nrf2 とその制御を受ける抗酸化酵素の発現が、頸骨関節軟骨に比較して下顎頭軟骨では低いことが明らかとなった。

さらにタンパクレベルでの発現相違について解析を行うべく、頸骨関節軟骨と下顎頭軟骨の組織切片を現在薄切中である。非脱灰凍結切片を粘着フィルム法で薄切しているため進行に遅れが見られるが、特異抗体を用いた免疫組織染色のプロトコールは確立しており、切片が出来次第解析を進める。

また、これら抗酸化酵素発現の相違が、各組織の酸化ストレスマーカー強度に違いを与えるかどうかについて、酸化ストレスマーカーである 8-OHdG を特異的に検出できる抗体を用いた免疫組織染色法にて解析を行う計画であるが、こちらに関しても組織切片の薄切が終了次第免疫染色・解析を進める。

3) 加齢下顎頭軟骨における Nrf2 活性化によるメカニカルストレス耐性向上の可否解明。

介入試験として、抗酸化ストレス酵素群のマスターレギュレーターである Nrf2 を下顎頭軟骨において特異的に活性化し、抗酸化ストレス酵素群発現を増強することで下顎頭軟骨のメカニカルストレス耐性を向上させられるかどうかを調べるべく、動物実験を遂行した。すなわちマウス顎関節腔へ Nrf2 活性化材である dimethyl fumarate を局所注射し、変形性関節症の病態を組織学的に検索する動物実験系である。

現在組織切片薄切中であり、薄切終了後に破骨細胞数、軟骨の厚み、軟骨下骨露出度、などを計測する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Hiroyuki Kanzaki, Yoshiki Nakamura | 4. 巻 60 |
| 2. 論文標題 Orthodontic tooth movement and HMGB1 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences | 6. 最初と最後の頁 49-53 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2018.03.002 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Katsumata, Yuta Kanzaki, Hiroyuki Honda, Yoshitomo Tanaka, Tomonari Yamaguchi, Yuuki Itohiya, Kanako Fukaya, Sari Miyamoto, Yutaka Narimiya, Tsuyoshi Wada, Satoshi Nakamura, Yoshiki | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Single Local Injection of Epigallocatechin Gallate-Modified Gelatin Attenuates Bone Resorption and Orthodontic Tooth Movement in Mice | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Polymers | 6. 最初と最後の頁 1384 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/polym10121384 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yamaguchi, Yuki Kanzaki, Hiroyuki Miyamoto, Yutaka Itohiya, Kanako Fukaya, Sari Katsumata, Yuuta Nakamura, Yoshiki | 4. 巻 121 |
| 2. 論文標題 Nutritional supplementation with myo-inositol in growing mice specifically augments mandibular endochondral growth | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Bone | 6. 最初と最後の頁 181-190 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bone.2019.01.020 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Kanzaki, Hiroyuki Wada, Satoshi Yamaguchi, Yuuki Katsumata, Yuta Itohiya, Kanako Fukaya, Sari Miyamoto, Yutaka Narimiya, Tsuyoshi Noda, Koji Nakamura, Yoshiki | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 Compression and tension variably alter Osteoprotegerin expression via miR-3198 in periodontal ligament cells | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 BMC Molecular and Cell Biology | 6. 最初と最後の頁 6 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12860-019-0187-2 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Fukaya S, Kanzaki H, Miyamoto Y, Yamaguchi Y, Nakamura Y. | 4. 巻 152(6) |
| 2. 論文標題 Possible alternative treatment for mandibular asymmetry by local unilateral igf-1 injection into the mandibular condylar cavity: Experimental study in mice. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics | 6. 最初と最後の頁 820-829 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajodo.2017.05.023 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Kanzaki H, Shinohara F, Itohiya K, Yamaguchi Y, Katsumata Y, Matsuzawa M, Fukaya S, Miyamoto Y, Wada S, Nakamura Y. | 4. 巻 31(2) |
| 2. 論文標題 RANKL induces bcl-2 nuclear import and attenuates nrf2-mediated antioxidant enzymes, thereby augmenting intracellular reactive oxygen species signaling and osteoclastogenesis in mice. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 The FASEB Journal | 6. 最初と最後の頁 781-792 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.2017.01600826R | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Miyamoto Y, Kanzaki H, Wada S, Tsuruoka S, Itohiya K, Kumagai K, Hamada Y, Nakamura Y. | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Asporin stably expressed in the surface layer of mandibular condylar cartilage and augmented in the deeper layer with age. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Bone reports | 6. 最初と最後の頁 41-50 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bonr.2017.07.002 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Narimiya T, Wada S, Kanzaki H, Ishikawa M, Tsuge A, Yamaguchi Y, Nakamura Y. | 4. 巻 52(5) |
| 2. 論文標題 Orthodontic tensile strain induces angiogenesis via type iv collagen degradation by matrix metalloproteinase-12. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Journal of periodontal research | 6. 最初と最後の頁 842-852 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jpre.12453 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Wada S, Kanzaki H, Narimiya T, Nakamura Y. | 4. 巻 6(4) |
| 2. 論文標題 Novel device for application of continuous mechanical tensile strain to mammalian cells. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Biology Open. | 6. 最初と最後の頁 518-524 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12 42/bio.023671 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Yamaguchi Y, Kanzaki H, Katsumata Y, Itohiya K, Fukaya S, Miyamoto Y, Narimiya T, Wada S, Nakamura Y. | 4. 巻 22(2) |
| 2. 論文標題 Dimethyl fumarate inhibits osteoclasts via attenuation of reactive oxygen species signalling by augmented antioxidation. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 J Cell Mol Med. | 6. 最初と最後の頁 1138-1147 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcmm.13367 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Narimiya Tsuyoshi, Kanzaki Hiroyuki, Yamaguchi Yuki, Wada Satoshi, Katsumata Yuta, Tanaka Ken, Tomonari Hiroshi | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Nrf2 activation in osteoblasts suppresses osteoclastogenesis via inhibiting IL-6 expression. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Bone Reports | 6. 最初と最後の頁 100228 ~ 100228 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bonr.2019.100228 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 勝又 裕太、菅崎 弘幸、宮本 豊、山口 祐希、中村 芳樹、友成 博 |
| 2. 発表標題 抗酸化ストレスのエピジェネティック制御における下顎頭軟骨の特異性 |
| 3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会学術大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔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 |
|-----------|---|-----------------------------------|----|
| 研究 分担者 | 宮本 豊 (Miyamoto Yutaka) (00633588) | 鶴見大学・歯学部・助教 (32710) | |
| 研究 分担者 | 中村 芳樹 (Nakamura Yoshiki) (10097321) | 鶴見大学・名誉教授・名誉教授 (32710) | |
| 研究 分担者 | 和田 悟史 (Wada Satoshi) (20581119) | 鶴見大学・歯学部・助教 (32710) | |