

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17341

研究課題名(和文)変形性関節症モデルマウスを用いた顎関節におけるAsporinの解析

研究課題名(英文)Analysis of asporin in mandibular condylar cartilage using osteoarthritis model mouse

研究代表者

宮本 豊 (Miyamoto, Yutaka)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：00633588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症の原因遺伝子であるAsporin遺伝子の発現を比較するためにRT-PCRを行った。その結果Asporin遺伝子の発現が経日的に上昇傾向にあること、またSTRマウスでは、ICRマウスと比較して、下顎頭軟骨および脛骨関節軟骨でAsporinの発現が強い傾向にあり、特に30週齢ではSTRマウスの方が有意に強発現していた。

Asporinの免疫組織化学染色を行った。先ほどのPCRの結果と同様Asporinの局在が経日的に強くみられ、またSTRマウスでは、ICRマウスと比較して、Asporinの局在が強くみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの顎関節症研究は臨床、画像診断および対症療法的治療を行うに留まっており、分子レベルでの原因解明は未だされていない。本研究結果によってAsporinが変形性関節症モデルマウスの顎関節に高いレベルで発現していたということは、Asporinは変形性顎関節症の原因となっている可能性が考えられる。本研究テーマは我々歯科の分野の視点から着想に至った先駆的研究であり、今後の関節軟骨研究のエビデンス構築の一助となることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：Asporin mRNA levels were analyzed using Real-time RT-PCR. Asporin mRNA highly expressed in STR/Ort mice and increased with age, especially 30 weeks.

Asporin localized in STR/Ort mice. Asporin signal intensity of immune-reactivity are also highly expressed in STR/Ort mice and increased with age.

研究分野：歯科矯正

キーワード：顎関節 変形性関節症 Asporin TGF- STRマウス RT-PCR IHC

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 変形性関節症 (Osteoarthritis : OA) は、膝、股、手などの様々な関節の疼痛や機能障害を引き起こす疾患である。罹患率は 5.8% と推定されており、関節疾患の中でも発症頻度の高い疾患である。近年、膝関節における OA (Knee OA) の原因遺伝子として、*asporin* が同定されている (Ikegawa et al. nature genetics. 2005)。*Asporin* は 2001 年、Lorenzo らと Henry らに発見され命名された細胞外基質タンパク質である。*Asporin* は SLRP (Small Leucine Rich Proteoglycan) ファミリーの一員であり、他の class SLRP メンバー (decorin と biglycan) と同じく TGF- β ファミリーと結合し、軟骨細胞の分化や組織再生、骨形成を負に制御し、組織の恒常性を維持している (図 1)。池川らの報告によると、*asporin* の N 末端側のアスパラギン酸の繰り返しコードする領域が 14 個保有しているアレルの場合、TGF- β との結合が強すぎるため、骨代謝のバランスが崩れ、変形性関節症の原因となると報告されている。

(2) 顎関節症 (TMD : temporomandibular disorders) は、顎関節の疼痛、関節雑音、開口障害ないし顎運動異常を主要徴候とする慢性疾患群の総括的診断名である。顎関節症の罹患率は非常に高く、非患者集団の 40 ~ 75% が顎関節症の他覚症状を有している。顎関節症はその病態によって ~ 型に分類される。その中で特に重篤なのは顎関節症 型 (変形性顎関節症) であり、下顎頭と関節結節の骨変化を伴う関節組織の破壊を特徴とする退行性関節障害と定義づけられる。この顎関節症の病態分類 (2013 年) と診断基準 (2014 年) は日本顎関節学会によって新たに改訂された。しかしこれらは臨床症状、画像所見から診断フローチャートに従い病態分類を行うに留まっており、分子レベルでの病因説明には至らず、治療法も確立されていないのが現状である。変形性顎関節症と Knee OA は、いずれも女性に多く、体重またはそれ相当の荷重を負担する関節に好発し、関節組織の破壊を引き起こす退行性関節疾患であることから、病態が類似している。しかし顎関節に着目し、下顎頭軟骨における *asporin* の発現や機能について解析が行われた研究はこれまでにない。

2. 研究の目的

本学が所有している OA モデルマウス (STR/Ort マウス) を用いて、下顎頭軟骨における *asporin* の発現とその機能を解析し、OA の原因遺伝子である *asporin* と変形性顎関節症との因果関係を明らかにすることである。

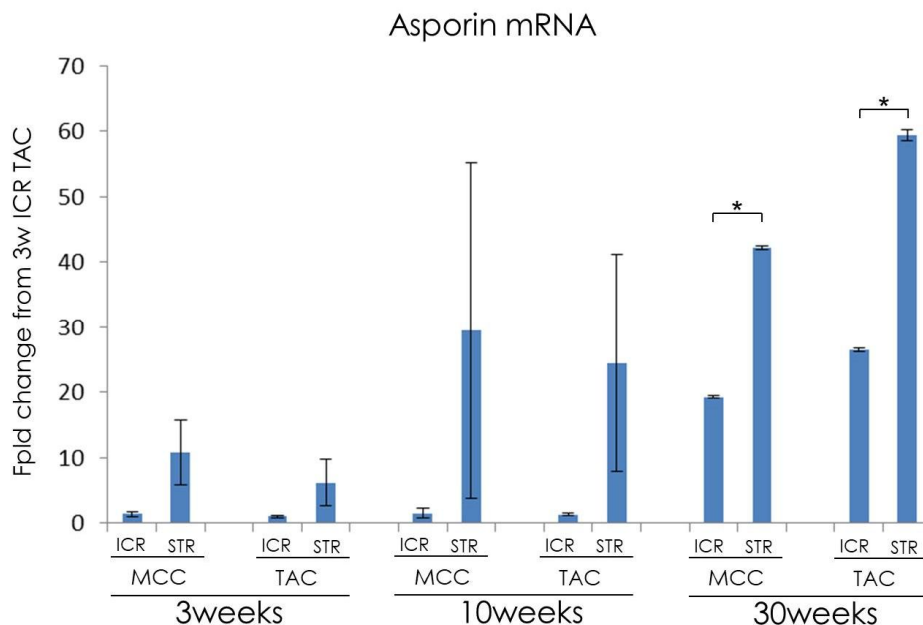
3. 研究の方法

STR/Ort マウスにおける *asporin* の発現解析を行う。

(1) RT-PCR 解析 : 30 週齢の雄性 STR/Ort マウスを用いる (control : ICR 雄性マウス)。下顎骨と脛骨近心骨端部を、液体窒素と凍結包埋用樹脂 (O.C.T. compound) を用いて凍結包埋固定する。5 μ m の連続凍結未固定非脱灰切片を作成する (LMD film)。RNase free 染色 kit による染色を行う (LCM staining kit)。各軟骨組織の分取を行う (laser capture microdissection)。Total RNA の精製を行う (RNeasy Micro kit)。GenomicDNA 分解、cDNA 合成を行う (iScript RT supermix)。Real-time RT-PCR 解析を行う (SYBR Premix Ex Taq)。

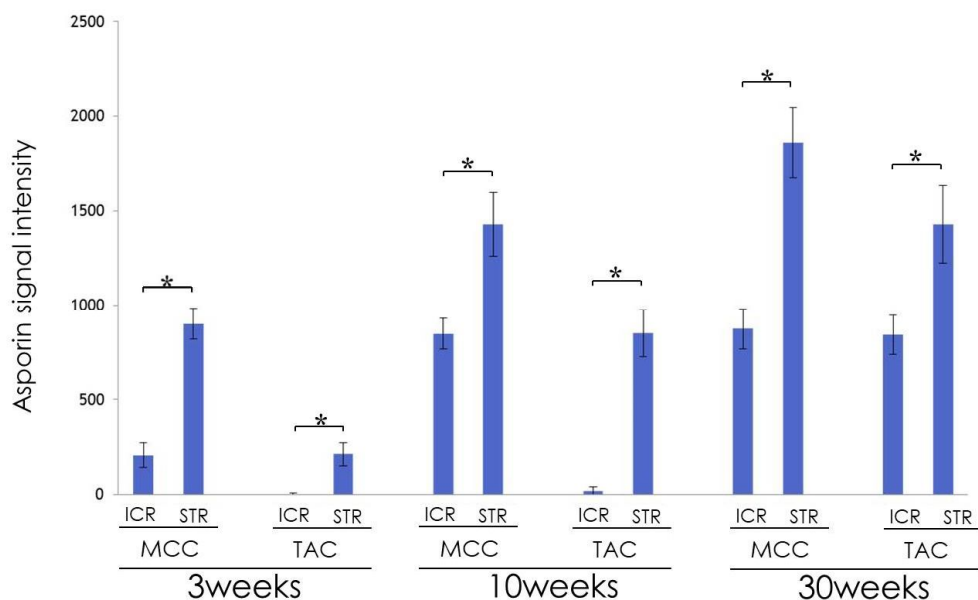
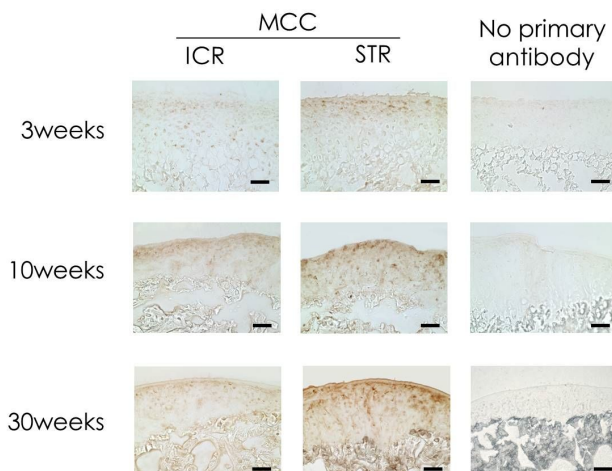
(2) 免疫組織化学染色 : 同切片を用いて、免疫組織化学染色による *asporin* タンパクの局在の観察を行う。1 次抗体 : anti-Asporin antibody, Acris。2 次抗体 : Vectastain ABC kit elite。DAB 染色 : Vector Impact DAB

4. 研究成果

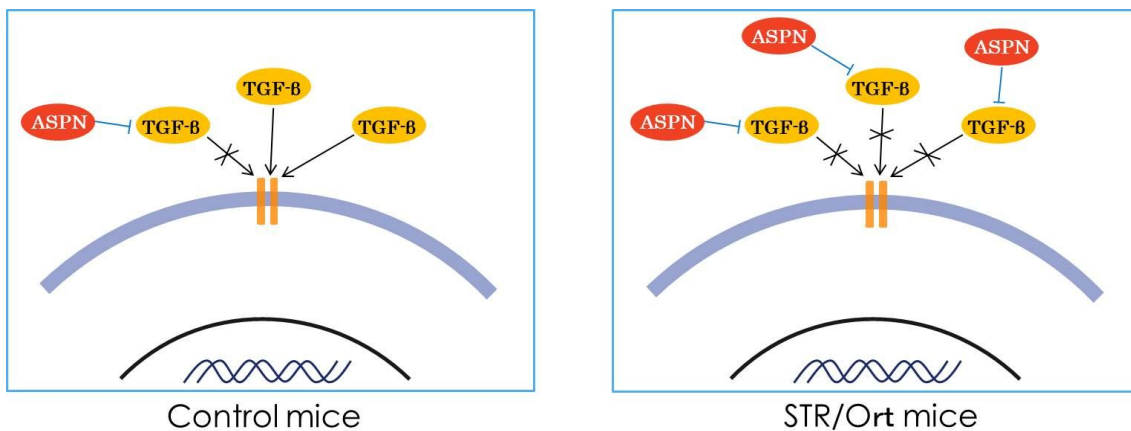


(1) Laser capture microdissection で分取した軟骨細胞から Total RNA を抽出し、CT法を用いて Real-time RT-PCR を行った。その結果 Asporin 遺伝子の発現が経日的に上昇傾向にあること、また STR マウスでは、ICR マウスと比較して、下顎頭軟骨および脛骨関節軟骨で Asporin の発現が強い傾向にあり、特に 30 週齢では STR マウスの方が有意に強発現していた。

(2) Asporin の免疫組織化学染色を行った。先ほどの PCR の結果と同様 Asporin の局在が経日的に強くみられ、また STR マウスでは、ICR マウスと比較して、Asporin の局在が強くみられた。



変形性関節症は STR/Ort マウスにおいて 30 週齢以降に発症し、Asporin は 3 週齢からすでに STR/Ort マウスにおいて強く発現していること、そして Asporin の発現は経日的に増加していることがわかった。これらの結果より、STR/Ort マウスは Asporin を強発現し、TGF- β シグナリングが強く抑制され、軟骨の再生能を低下させることにより、軟骨の破壊に関与しているのではないかと考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 宮本 豊、菅崎弘幸、和田悟史、糸日谷佳菜子、鶴岡紗吏、山口祐希、勝又裕太、熊谷賢一、濱田良樹、中村芳樹
2. 発表標題 変形性関節症自然発症マウスでは、関節病変発症前にAsporin発現が増強している
3. 学会等名 第35回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2017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
---------------------------	-----------------------	----