

授与番号 甲第 342 号

### 論文内容の要旨

Adenosine 5'-triphosphate strengthens receptor tyrosine kinase-mediated suppression of fibrogenic activity in fibroblast-like synoviocytes derived from mouse temporomandibular joints possibly through P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, and P2Y<sub>13</sub> purinergic receptors

—アデノシン三リン酸(ATP)はマウス顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞の受容体型チロシンキナーゼにより誘導される線維産生能抑制効果をP2Y<sub>2</sub>、P2Y<sub>4</sub>、およびP2Y<sub>13</sub>受容体を介して増強する—  
(松本識野、横田聖司、客本齊子、帖佐直幸、佐藤和朗)

(岩手医科大学歯学雑誌 第45巻、第1号 令和2年4月 掲載予定)

まつもと しまきの  
松本 識野

### I. 研究目的

変形性顎関節症(temporomandibular joint-osteoarthritis: TMJ-OA)は、軟骨変性、滑膜炎などの症状を呈し、顎関節の機能障害を引き起こす。また、顎関節周囲の線維組織の過度の形成が顎関節運動を制限する可能性があるとして報告されている。

我々は以前、関節周囲滑膜細胞が産生するとの報告のある線維芽細胞成長因子(FGF-1)および表皮成長因子(EGF)が線維芽細胞様滑膜細胞(FLS)において、MAPキナーゼ依存的に線維形成マーカーである $\alpha$ -SMAおよびI型コラーゲンの発現を抑制することを実証し報告した。しかし、FLS細胞において、損傷関連分子パターン(DAMPs)に属する細胞外ヌクレオチドがFGF-1およびEGF受容体を介した線維産生能力抑制効果にどのように影響するかは不明のままである。そこで、FLS細胞において受容体型チロシンキナーゼにより誘導される線維産生マーカーの発現抑制効果にATPがどのように影響を及ぼすかについてシグナル伝達機構に着目して調査した。

### II. 研究方法

間葉系幹細胞(MSC)は、さまざまな種類のP2XおよびP2Y受容体を発現することが知られている。マウス骨髄由来のMSCをポジティブコントロールとして、マウス顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞(fibroblast-like synoviocytes: FLSs)におけるP2XおよびP2Y受容体の発現についてqRT-PCR法を用いて調査した。加えて、細胞外ヌクレオチドATPがFLS細胞におけるFGF-1およびEGF受容体を介した線維産生能力抑制効果に与える影響について、線維産生マーカーである $\alpha$ -SMAの発現に着目してqRT-PCR法を用いて調査した。

### III. 研究成績

(1)FLS細胞において、P2X受容体のうちP2X<sub>3</sub>、P2X<sub>7</sub>の発現が強く認められた。(2)FLS細胞において、P2Y受容体のうちP2Y<sub>2</sub>、P2Y<sub>4</sub>、P2Y<sub>12</sub>、P2Y<sub>13</sub>、P2Y<sub>14</sub>の発現が強く認められた。(3)アデノシン三リン酸(ATP)は、単独では線維形成マーカーである $\alpha$ -SMAのmRNA発現を有意に抑制した。さらに、

ATP は FGF-1 と EGF による  $\alpha$ -SMA の mRNA 発現抑制効果を増強した。また、非加水分解性の ATP 類似体(ATP $\gamma$ S)においても同様に、 $\alpha$ -SMA の mRNA 発現が有意に抑制された。(4) P2Y<sub>12</sub>および P2Y<sub>13</sub>アゴニストであるアデノシン二リン酸(ADP)は、FLS 細胞における受容体型チロシンキナーゼ(RTK)リガンド誘導性の線維形成活性抑制を増強した。(5) P2Y<sub>2</sub>および P2Y<sub>4</sub>アゴニストであるウリジン三リン酸(UTP) は、FLS 細胞における RTK リガンド誘導性の線維形成活性抑制を増強した。

#### IV. 考察及び結論

ATP は P2X<sub>1-7</sub>、P2Y<sub>1</sub>、P2Y<sub>2</sub>、P2Y<sub>4</sub>、P2Y<sub>11</sub>、および P2Y<sub>13</sub>に結合することが報告されている。今回、FLS 細胞において P2X<sub>3</sub>、P2X<sub>7</sub>、P2Y<sub>2</sub>、P2Y<sub>4</sub>、P2Y<sub>12</sub>、P2Y<sub>13</sub>、および P2Y<sub>14</sub>の発現が強く認められた。したがって、ATP による FLS 細胞の線維形成活性抑制は、P2X<sub>3</sub>、P2X<sub>7</sub>、P2Y<sub>2</sub>、P2Y<sub>4</sub>、または P2Y<sub>13</sub>を介して作用する可能性が示唆された。次いで、どの P2 受容体が ATP による  $\alpha$ -SMA の発現抑制効果を増強するかを決定付けるため、P2Y<sub>12</sub>および P2Y<sub>13</sub>のアゴニストである ADP と P2Y<sub>2</sub>および P2Y<sub>4</sub>のアゴニストである UTP の効果を調査した。ADP および UTP はいずれも単独で  $\alpha$ -SMA の発現を抑制し、RTK リガンドによる  $\alpha$ -SMA の発現抑制効果を増強した。さらに、P2X<sub>3</sub>および P2X<sub>7</sub>アンタゴニストでは  $\alpha$ -SMA の発現に対する ATP 誘導性の線維形成抑制効果は解除されなかった。以上のことから、FLS 細胞において ATP は P2Y<sub>2</sub>、P2Y<sub>4</sub>、または P2Y<sub>13</sub>を介して RTK リガンド誘導性の線維形成活性抑制効果を増強したことが示唆された。また、我々は以前に FLS 細胞において、FGF-1 および EGF による  $\alpha$ -SMA と I 型コラーゲンの発現抑制が、部分的に MEK/ERK を介していることを明らかとしている。今後、ATP が MEK/ERK 依存的に FLS 細胞の線維形成活性を抑制するかどうかについても明らかとする予定である。

今回我々は、TMJ-OA 関連の線維症の根底にある分子メカニズムを部分的に明らかにしたが、本研究成果は TMJ-OA 治療標的分子の特定に役立つものと期待される。加えて、FGF-1 および EGF は、TMJ-OA に伴う線維症を予防するための薬剤候補となる可能性が示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査	石崎 明	教授	(生化学講座 細胞情報科学分野)
副査	佐藤 和朗	教授	(口腔保健育成学講座 歯科矯正学分野)
副査	千葉 俊美	教授	(口腔医学講座 関連医学分野)

変形性顎関節症(temporomandibular joint-osteoarthritis: TMJ-OA)は、軟骨変性、滑膜炎などの症状を呈し、顎関節の機能障害を引き起こす。また、顎関節周囲の線維組織の過度の形成が顎関節運動を制限する可能性があることが報告されている。松本らは以前に、関節周囲滑膜細胞が産生する受容体型チロシンキナーゼ (RTK) リガンドとしての線維芽細胞成長因子 (FGF) -1および上皮成長因子 (EGF) が、マウス顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞 (FLS1) において、線維形成マーカーである  $\alpha$ -SMA およびI 型コラーゲンの発現をMAP キナーゼ依存的に抑制することを実証し報告した。

しかし、炎症性環境下で認められる損傷関連分子パターン（DAMPs）に属する細胞外ヌクレオチド（ATP）がFLS-1細胞におけるFGF-1 およびEGF 受容体を介した線維産生能力抑制効果にどのように影響するかは不明のままである。そこで、今回松本らは、本FLS 細胞において受容体型チロシンキナーゼにより誘導される線維産生マーカーの発現抑制効果にATP がどのように影響を及ぼすかについてシグナル伝達機構に着目して調査した。

RT-qPCR法を用いた調査により、マウス顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞FLS1において、P2X<sub>3</sub>、P2X<sub>7</sub>、P2Y<sub>2</sub>、P2Y<sub>4</sub>、P2Y<sub>12</sub>、P2Y<sub>13</sub>、P2Y<sub>14</sub>の発現が強く認められた。また、アデノシン三リン酸（ATP）は、線維形成マーカーである $\alpha$ -SMAの発現を有意に抑制した。さらにATPは、FGF-1 とEGFによる $\alpha$ -SMAの発現抑制効果を増強した。加えて、P2Y<sub>12</sub> およびP2Y<sub>13</sub>アゴニストであるアデノシン二リン酸（ADP）は、FLS 細胞におけるFGF-1ならびにEGF誘導性の線維形成活性抑制を増強した。また、P2Y<sub>2</sub> およびP2Y<sub>4</sub> アゴニストであるウリジン三リン酸（UTP）は、FLS 細胞におけるFGF-1ならびにEGF誘導性の線維形成活性抑制を増強した。

ATP はP2X<sub>1-7</sub>、P2Y<sub>1</sub>、P2Y<sub>2</sub>、P2Y<sub>4</sub>、P2Y<sub>11</sub>、およびP2Y<sub>13</sub> に結合することが報告されている。今回、FLS 細胞においてP2X<sub>3</sub>、P2X<sub>7</sub>、P2Y<sub>2</sub>、P2Y<sub>4</sub>、P2Y<sub>12</sub>、P2Y<sub>13</sub>、およびP2Y<sub>14</sub> の発現が強く認められた。したがって、ATP によるFLS 細胞の線維形成活性抑制は、P2X<sub>3</sub>、P2X<sub>7</sub>、P2Y<sub>2</sub>、P2Y<sub>4</sub>、またはP2Y<sub>13</sub>を介して作用する可能性が示唆された。次いで、どのP2 受容体がATP による $\alpha$ -SMA の発現抑制効果を増強するかを決定付けるため、P2Y<sub>12</sub> およびP2Y<sub>13</sub> のアゴニストであるADP とP2Y<sub>2</sub> およびP2Y<sub>4</sub> のアゴニストであるUTP の効果を調査した。ADP およびUTP はいずれも単独で $\alpha$ -SMA の発現を抑制し、また、FGF-1やEGFによる $\alpha$ -SMA の発現抑制効果を増強した。さらに、P2X<sub>3</sub> およびP2X<sub>7</sub> アンタゴニストを投与しても、ATPによる $\alpha$ -SMA の発現抑制効果は解除されなかった。以上のことから、FLS 細胞においてATP はP2Y<sub>2</sub>、P2Y<sub>4</sub>、またはP2Y<sub>13</sub> を介してRTK リガンド誘導性の線維形成活性抑制効果を増強することが示唆された。

本研究成果により、TMJ-0Aで認められる炎症性線維症に対する治療法として、FGF-1やEGFの局所投与が有効であることが示唆された。加えて、このATPによる効果を媒介するプリン受容体が明らかとされたことより、今後この受容体の下流に存在する線維組織形成抑制シグナルを明らかにすることにより、TMJ-0Aに伴う線維症治療のための新たな分子標的薬の開発が期待される。

### 試験・試問の結果の要旨

最初に本論文の目的、概要について説明がなされた。次いで研究方法、結果ならびにその考察と臨床的意義、今後の研究展開について試問した結果、いずれも適切かつ明瞭な回答が得られた。また、今後の研究に対しても意欲的であり、学位に値する学識と研究能力を備えているものと判定した。

主査・副査から複数の質問があり、下記のような質疑応答が行われた。

**問：**今回、DAMPs の一つとしての ATP に注目して研究を進めているが、ATP 以外のヌクレオチドである ADP や UTP あるいは UDP などについても調査する必要があるのではないかと？

**答：**ATP は細胞内エネルギーを貯蔵する分子としても種々の細胞で幅広く利用される分子であるため、他のヌクレオチドと比較して圧倒的に多く細胞内に蓄積されている。このため、細胞が壊死し

た際は、ATP がその他のヌクレオチドよりも圧倒的に多く細胞外漏出することが知られており、一般的には細胞外漏出ヌクレオチドのうちの ATP が DAMPs として認識されている。

問：本学位研究論文では、FLS1 細胞において、その発現を調査していないプリン受容体 (P2X<sub>1</sub>や P2Y<sub>11</sub>) があるが、これらの未調査のプリン受容体が ATP による線維産生能力抑制効果を媒介する可能性はないか？

答：今回の論文で、発現未調査のプリン受容体 (P2X<sub>1</sub>や P2Y<sub>11</sub>) は、マウス遺伝子データベースに RT-qPCR 解析のための十分な塩基配列情報が認められず、それらの解析をすることができなかった。このため、これらのプリン受容体が、ATP による線維産生能力抑制効果を媒介する可能性は否定できない。

問：本研究では、「ATP が P2X<sub>3</sub>あるいは P2X<sub>7</sub>を介してその線維産生能力抑制シグナルを活性化することは考えられない」と結論づけているが、それを結論づけるためには本論文で実施されたアンタゴニストによる阻害実験のみでは十分な根拠になり得ないのではないか？何故ならば、一般的にアンタゴニストは似た構造の複数の受容体にも作用する場合があります、今回用いた P2X<sub>3</sub>あるいは P2X<sub>7</sub>に対するアンタゴニストが、これら以外の受容体の働きを阻害している可能性があるからである。

答：ご指摘の通りであり、「ATP が P2X<sub>3</sub>あるいは P2X<sub>7</sub>を介してその線維産生能力抑制シグナルを活性化することは考えられない」と結論づけるためには、siRNA の導入などによる特異的な P2X<sub>3</sub>あるいは P2X<sub>7</sub>のノックダウン実験が必要と考えている。実は、残念ながらこの FLS1 細胞は、siRNA やプラスミドなどの核酸導入がとても難しい細胞であることが確認されているため、今回はアンタゴニストを用いた実験のみでの検証となっている。

問：本研究論文では、FLS1 細胞において間葉系幹細胞 (MSC) よりもその発現量が多いプリン受容体 (P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>7</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, ならびに P2Y<sub>14</sub>) についてのみを対象として、これらの受容体が ATP による線維産生能力抑制効果を媒介するのかどうかについての調査をしている。しかし、FLS1 細胞において MSC と同程度に発現しているその他のプリン受容体が、ATP による線維産生能力抑制効果を媒介する可能性もあるのではないか？

答：ご指摘の通りであり、今後、今回調査対象とした以外のプリン受容体の働きについても、明確にする必要があると考えている。

問：本研究により、ATP による FLS1 細胞における線維産生能力抑制効果は、これまでに松本らが明らかとしている FGF-1 や EGF による MEK/ERK 依存的な細胞内シグナル伝達経路とは異なる細胞内シグナル伝達経路であることが明らかとされている。今後、この ATP により活性化される未知の細胞内シグナル伝達経路を同定するための方策としてどの様な方向性を考えているのか？

答：今回我々は、ATP が FLS1 細胞において P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, ならびに P2Y<sub>13</sub>を介してこの細胞の線維産生能力を抑制することを明らかとしている。P2Y 受容体は細胞膜 7 回貫通型受容体であるが、P2Y 受容体が活性化する細胞内シグナルはいずれも G タンパク質の活性化を要することが知られている。今後は、P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, ならびに P2Y<sub>13</sub>と共役する G タンパク質として知られる G<sub>q</sub>タンパク質ならびに G<sub>i</sub>タンパク質に着目して、これらの分子と相互作用を示す細胞内分子の同定をしたいと考えている。