

授与番号	甲第 359 号
------	----------

論文内容の要旨

Hydrogen peroxide-induced oxidative stress promotes expression of CXCL15/Lungkine mRNA in a MEK/ERK-dependent manner in fibroblast-like synoviocytes derived from mouse temporomandibular joint

過酸化水素誘発酸化ストレスは、マウス顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞において、MEK/ERK 依存的に CXCL15/Lungkine mRNA の発現を促進する
(Journal of Oral Biosciences 令和 5 年掲載予定)

あさぬま かな
浅沼 莞奈

I. 研究目的

変形性顎関節症 (TMJ-OA) は、下顎頭の吸収や変形、顎関節周囲滑膜炎などの退行性病変を呈する炎症性疾患である。一般的に炎症組織では、酸化ストレスが蓄積して炎症の増悪を助長するが、TMJ-OA における顎関節周囲滑膜炎では、酸化ストレスがどのような分子メカニズムで炎症反応を促進するのかわからない。本研究では、酸化ストレスが、マウス顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞株 (FLS1) におけるケモカインの発現にどのような影響を与えるかを調べた。

II. 研究方法

本実験は、酸化ストレスを引き起こす活性酸素種としての過酸化水素 (H_2O_2) を用いて行った。FLS1 細胞への H_2O_2 の投与による酸化ストレスの至適条件を設定するため、異なる濃度 (100 μM 、300 μM 、500 μM 、700 μM 、1000 μM) の H_2O_2 を作用させた際の細胞生存率を alamarBlue® 法にて調査した。この実験結果を踏まえ、FLS1 細胞に至適酸化ストレス濃度の H_2O_2 を投与することで、ケモカインの発現が誘導されるかどうかについて RT-qPCR 法を用いて調査した。また、 H_2O_2 がどのような細胞内シグナル伝達経路を利用してケモカインの発現を誘導するのかわからないについて、ウェスタンブロット法を用いて調査した。FLS1 細胞に H_2O_2 を作用させた際の細胞内の活性酸素種 (ROS) の発生について、ヒドロキシラジカル ($OH\cdot$) をターゲットとする蛍光マーカーを用いて、蛍光顕微鏡下で定量的に調査した。

III. 研究成績

(1) FLS1 細胞に 700 μM 以上の H_2O_2 を与えると、この細胞の生存率が有意に大きく低下した。(2) H_2O_2 (100–500 μM) は、CXCL15 mRNA の発現を濃度依存的に有意に増強した。(3) H_2O_2 (500 μM) を FLS-1 細胞に与えた後、ウェスタンブロット法にて、シグナル伝達分子のリン酸化についてタンパク質レベルで確認したところ、MAPK のサブファミリーである

ERK1/2、p38 MAPK および Akt のリン酸化が、有意に増強された。(4) MEK 阻害剤 U0126 (10 μ M) で FLS1 細胞を前処理すると、H₂O₂による CXCL15 mRNA の発現増強効果が、有意に抑制された。一方、p38 MAPK 阻害剤 SB203850 (10 μ M) や PI3K 阻害剤である LY294002 (10 μ M) による前処理では、H₂O₂誘導性の CXCL15 mRNA 発現増強効果は、影響を受けなかった。(5) H₂O₂ (500 μ M) は、FLS1 細胞における OH \cdot の産生を有意に増強した。(6) ROS 阻害剤 N-アセチル-L-システイン (5 mM) は、H₂O₂による ERK1/2 のリン酸化増強効果を部分的に抑制した。

IV. 考察及び結論

H₂O₂ 刺激により発生する酸化ストレスは、TMJ 由来線維芽細胞様滑膜細胞において、MEK/ERK 依存的に CXCL15 mRNA の発現を促進することが、強く示唆された。一般的に、CXCL15 は、好中球の走化性促進因子として知られている。このことから、酸化ストレス環境下の FLS-1 細胞が CXCL15 を分泌して好中球を顎関節周囲組織に動員することにより、TMJ-OA の発症に関わる可能性が示唆された。このように、TMJ-OA の発症に促進的に働くキ一分子の一つは、ERK1/2 である可能性が見出された。本研究成果は、今後の TMJ-OA 治療法開発のためのターゲット分子の解明に繋がるものとして期待される。

論文審査担当者

主査 千葉 俊美 教授（口腔医学講座 関連医学分野）
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 石崎 明 教授（生化学講座 細胞情報科学分野）

論文審査の結果の要旨

変形性顎関節症（TMJ-OA）は、下顎頭の吸収や変形、顎関節周囲滑膜炎などの退行性病変を呈する炎症性疾患である。一般的に炎症組織では、酸化ストレスが蓄積して炎症の増悪を助長するが、TMJ-OAにおける顎関節周囲滑膜炎では、酸化ストレスがどのような分子メカニズムで炎症反応を促進するのかわ不明である。本研究では、酸化ストレスが、マウス顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞株（FLS1）におけるケモカインの発現にどのような影響するのかを調べた。

本実験は、酸化ストレスを引き起こす活性酸素種としての過酸化水素（ H_2O_2 ）を用いて行った。Reverse transcription quantitative-polymerase chain reaction（RT-qPCR）法を用いて、 H_2O_2 がどのようなケモカインの発現を誘導するのか、またウェスタンブロット法とシグナル分子阻害剤を用いて、 H_2O_2 がどのようなシグナル伝達経路を利用してケモカインの発現が誘導するのかを調査した。加えて、FLS1細胞に H_2O_2 を作用させた際の細胞内の活性酸素種（ROS）の発生について、ヒドロキシラジカル（ $OH\cdot$ ）をターゲットとする蛍光マーカーを用いて、蛍光顕微鏡下で定量的に調査した。また抗酸化作用を有するN-アセチル-L-システイン（NAC）が、 H_2O_2 誘導性のMEK/ERKの活性化にどのように影響するかを調査した。その結果、 H_2O_2 刺激により発生する酸化ストレスは、FLS1細胞において、MEK/ERK依存的にCXCL15 mRNAの発現を促進することが強く示唆された。

本研究により、TMJ-OAの発症において、酸化ストレス環境下のFLS1細胞がCXCL15を分泌して好中球を顎関節周囲組織に動員することにより、炎症反応を誘導する可能性が示唆された。加えて、TMJ-OAの発症に促進的に働くキー分子の一つは、ERK1/2である可能性が見出されたことから、今後のTMJ-OA治療法開発のためのターゲット分子の解明に繋がるものとして期待される。

試験・試問結果の要旨

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明した。

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：FLS1 細胞はどのような細胞か。

答：FLS1 細胞とは、横田らが樹立したマウス顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞である。マウス顎関節から滑膜組織を採取して、滑膜組織より分離した細胞に不死化遺伝子を導入することにより、マウス顎関節滑膜細胞株（FLS1 細胞）を樹立した。

問：NAC が有する酸化ストレス抑制効果の作用機序はどのようなものであるのか、また NAC は生体内でも生成されているのか。

答：NAC が細胞内に取り込まれると、還元型グルタチオン(GSH)へと変化する。この GSH がグルタチオンペルオキシターゼの補酵素として働くことで、 H_2O_2 を H_2O と O_2 へと無毒化することで、 H_2O_2 が $OH\cdot$ を生成するのを抑制する。NAC は生体内で生成することはできないが、現段階では、サプリメントとして使用していることが報告されている。

問：「抗酸化作用の強い薬剤を使用して ERK/MEK のリン酸化および CXCL15 を抑制することができるか」との説明があるが、具体的に NAC より強い抗酸化作用をもつのは何があるのか。

答：抗酸化作用が NAC よりも強力であるとの報告のあるメラトニンを使用して、今後の研究を行う予定である。メラトニンは NAC と比較して、細胞膜を通過しやすい特徴を有する。

問：MEK 阻害剤 U0126 は、臨床において変形性顎関節症の治療薬として用いることは可能か。

答：U0126 は、ERK の上流で働く MEK の阻害剤である。MEK 阻害剤は、様々な癌に対する増殖抑制効果があることから、単独および併用療法について臨床試験が進められているとの報告がある。しかし、癌細胞のみならず、正常細胞の増殖も抑制してしまうため、TMJ-OA に対する治療薬として用いるためには、局所で U0126 を徐放する性質のある Scaffold (単体) を併用する必要があると考えられる。

コメント：「NAC は H_2O_2 誘導性の ERK/MEK のリン酸化を一部抑制した」ことを示す実験結果は示されていたが、「NAC は H_2O_2 誘導性の CXCL15 の発現促進効果を抑制しなかった」ことを示す実験結果が示されていなかったが、プレゼンの際には示した方が良い。

答：ご指摘の通りであり、今後のプレゼンテーションの際には、ご指摘の通りに NAC による実験結果と U0126 による実験結果とを対比させて説明したい。

問：FLS1 細胞における CXCL15 以外の H_2O_2 誘導性の炎症性サイトカインやケモカインについても調べたか。

これまでの他の研究グループからの報告では、線維芽細胞や脂肪細胞においては、 H_2O_2 によ

る刺激により、炎症性サイトカイン IL-6 やケモカイン MCP-1 の発現増加が確認できたとの報告がある。しかし、FLS1 細胞への H₂O₂ による刺激では、これらの炎症性サイトカインやケモカインの発現増強効果は認められなかった。

問：蛍光顕微鏡による OH \cdot の検出方法について、どのようにしてモニターして定量化したのか、n 数についての説明を含めて詳しく教えてほしい。

答：キーエンス社オールインワン顕微鏡 BZ-X710 を用いて、OH \cdot をターゲットとする蛍光マーカーが発する赤色蛍光を観察し、同蛍光顕微鏡に付帯するセルカウントシステムを使用して、観察視野における赤色蛍光強度を計測して数値化した。コントロール群と H₂O₂ 作用群との赤色蛍光強度の比較をする際の視野数を 6 (n=6) とし、両群間の統計学的有意差検定には Student' s t-test を用いた。

問：この研究結果が変形性顎関節症の臨床的にどのように結びつくのか。

答：TMJ-OA における滑膜組織中の細胞では、H₂O₂ 誘導性の酸化ストレスが、MEK/ERK 細胞内シグナルを介して局所での CXCL15 の産生・分泌を誘導することにより、好中球を TMJ 周囲組織にリクルートして、過度の炎症反応を誘導することが示唆された。以上のことから、MEK/ERK 細胞内シグナル系を阻害する薬剤を局所投与することにより、TMJ-OA の過度の炎症反応が抑制されるのではないかと期待している。