

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791981

研究課題名(和文) ファイブロサイト (fibrocyte) に注目した顎関節病変発症機構の解明

研究課題名(英文) The role of fibrocytes in oral area diseases

## 研究代表者

衣斐 美歩 (IBI, MIHO)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：30609665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は顎関節の線維性癒着の発症原因における線維細胞(fibrocyte)の関与について明らかにすることを目的とした。

マウス生体内において線維細胞の顎関節病変部位への遊走過程をリアルタイムに観察するため、赤色蛍光強発現マウスから線維細胞の単離・培養とヨード酢酸ナトリウムのマウス顎関節部への投与による変形性顎関節炎発症モデルマウスの作製を試みた。さらに培養細胞実験を行い顎関節部位での炎症時周囲組織から産生される遊走因子によって線維細胞が患部に遊走される可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of our research is to clarify whether fibrocytes participate in fibrous adhesion in temporomandibular joint (TMJ). For in vivo imaging of fibrocytes homing to TMJ tissues, we isolated adhesive mononuclear cells containing fibrocytes from bone marrows of fluorescent transgenic mice and administered monosodium iodoacetate into the upper compartment of mouse TMJ in order to generate a mouse model of TMJ osteoarthritis. Moreover, we gained fibroblast-like cells from TMJ tissues and showed the possibility that fibrocytes were homed to inflamed TMJ sites by migratory factors secreted from TMJ tissues stimulated with inflammatory cytokines.

研究分野：口腔生化学 細胞生物学

キーワード：fibrocyte TMJ inflammatory cytokines

## 1. 研究開始当初の背景

顎関節症を含む顎関節・咀嚼筋の疾患あるいは障害は幅広い年代において自覚症状があり、重症化症例では疼痛や顎運動不全により日常生活に大きな影響を及ぼす。そのため低浸襲で患者自身の負担の少ない新しい原因療法の開発が期待されている。臓器の線維化は機能不全につながる大きな病態である。この病態に関与する細胞として線維細胞 (fibrocyte) と呼ばれる細胞が存在する。線維細胞はマクロファージと線維芽細胞の両方の性質をもつ骨髄由来白血球系細胞で、これまでに肺、腎臓および心臓などの線維化病変に対しては報告があるが、顎関節疾患についてはまだない。近年、リウマチ関節炎において活性化した線維細胞が病気の進行に影響を及ぼすことが報告されており<sup>①</sup>顎関節疾患においても関与している可能性は十分に考えられる。

### <引用文献>

①Galligan *et al.* Fibrocyte activation in Rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 2010; 49:640-651.

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、炎症や骨折などの損傷後におこる顎関節病変に対して、以下の2点である。

(1) 骨髄由来白血球系細胞である線維細胞が骨髄から末梢血を經由して患部に遊走し周囲組織からの環境因子刺激により分化・形質転換しながら顎関節での線維性病態に関与する。

(2) (1) の結果を受けて、線維細胞が顎関節疾患の新規治療標的細胞となる可能性を探索する。

## 3. 研究の方法

(1) 赤色蛍光強発現トランスジェニック (TG) マウスからの骨髄採取と FACS を用いた fibrocyte の単離・培養

赤色蛍光強発現 TG マウスの下肢脛骨および大腿骨から骨髄を採取し、血球系細胞分離用試薬を用いて単核細胞層を回収し、フィブロンネクチンコートした培養用シャーレに播種し培養する。一定期間培養後シャーレ底面に接着した細胞を再び収集し磁気ビーズ付きリンパ球・単球特異的抗体を用いてその中に含まれている Tcell, Bcell, 単球をそれぞれ除去する。その後さらに FACS により fibrocyte の指標とされている CD34, CD45, collagen typeI 陽性の細胞を選別する。

(2) 単離・培養した fibrocyte のアジュバンド誘導性リウマチ関節炎発症マウスへの移植と顎関節とその他の関節部位での動向観察

単離・培養した fibrocyte をマウス大腿骨骨髄へ移植し、リウマチ関節炎誘導試薬を顎関節の関節腔内に投与してリウマチ関節炎を発症させる。一定期間飼育後 IVIS<sup>®</sup> imaging system により顎関節部位での移植した fibrocyte の動向を観察する。また同部位の組織切片を作製、免疫染色を行い移植した fibrocyte がリウマチ関節炎部位に遊走されたことを確認する。

(3) 顎関節部位での fibrocyte の分化・活性化における分子メカニズム (ケモカイン/ケモカイン受容体の同定など) の解明

fibrocyte はいくつかのケモカイン受容体を発現していることが報告されている<sup>①</sup>。マウスでは肺、皮膚、腎臓などにおいてそれぞれ特異的なケモカイン/ケモカイン受容体システムがありそれらが病態に関与していることが明らかにされているが、顎関節を含め関節部位には報告がない。従って実験方法 (2) により作製された顎関節部位組織切片からレーザーマイクロダイセクション装置を利用して顎関節部位に遊走された fibrocyte を回収する。回収した fibrocyte を用いてサイトカイン・ケモカインチップを行うことにより fibrocyte が顎関節機能障害を引き起こす原因となるモデル分子を選別する。これらの分子の遺伝子発現ベクターを構築し移植前の細胞に強制発現または siRNA などを利用した発現抑制などを行い fibrocyte が顎関節に遊走およびその後の分化・活性化のメカニズムについて明らかにする。

### <引用文献>

①Keeley *et al.* The role of fibrocytes in fibrotic diseases of the lungs and heart. *Fibrogenesis and Tissue Repair*, 2011; 4:2.

## 4. 研究成果

<研究の主な成果>

(1) 赤色蛍光強発現 TG マウスからの fibrocyte の単離・培養

研究当初計画した方法に則って赤色蛍光強発現マウスから骨髄を採取し密度勾配遠心分離試薬を用いて fibrocyte の単離を試みた。その結果、CD45, collagen type I 陽性で接着性細胞を確認することができた。ただし実際マウスに投与し生体内で観察できるだけの十分な量の細胞数を確保することが難しかった。そこで骨髄のほかにもこれまでに fibrocyte の単離が報告されている末梢血、脾臓それぞれについても報告されている方法に基づいて単離を行ったが骨髄の場合と同様の結果となった。(図1)

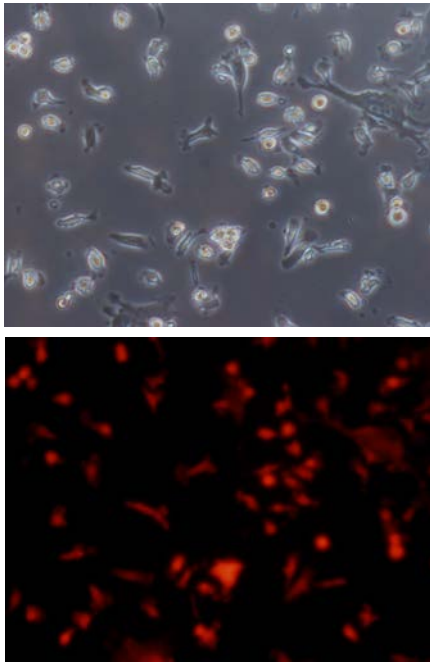


図1：赤色蛍光強発現マウス骨髄単核細胞由来接着性細胞の顕微鏡像（上：位相差像、下：蛍光像）

(2) 顎関節炎発症モデルマウスの作製と評価

計画を立案した当初はリウマチ関節炎誘導試薬を投与することで顎関節炎を発症させることを予定していたが、その後ラットにおいてヨード酢酸ナトリウムを顎関節の上関節腔に投与することによって、より簡便で効果的に変形性顎関節炎を惹起させる方法が報告された<sup>①</sup>。従って同様にヨード酢酸ナトリウム溶液をマウス顎関節腔に投与して変形性顎関節炎モデルマウスの作製を試みた。安定して顎関節炎を発症させるための至適投与試薬濃度の決定や確実に上関節腔内に試薬を投与する技術の確立に努めた。

<引用文献>

① Wang *et al.* Progression of Cartilage Degradation, Bone Resorption and Pain in Rat Temporomandibular Joint Osteoarthritis Induced by injection of Iodoacetate. PLoS One, 2012; 7(9):e45036.

(3) マウス顎関節周囲組織細胞の採取および培養

(1)、(2) の実験と並行して *in vitro* レベルにおいて顎関節部位での炎症時血球系細胞がどのようなメカニズムで遊走される後どのような影響を及ぼすのかについて検討を行った。初めにマウス顎関節周囲組織を採取しアウトグロース法にて細胞を獲得した。血球系細胞と区別するため、顎関節周囲組織は EGFP 強発現マウスの顎関節から採取した。採取した細胞を蛍光顕微鏡で観察したところどの

細胞も緑色の蛍光を発していることを確認した。(図2)採取した細胞の characterization をするため RT-qPCR 法にて I 型コラーゲン  $\alpha 1$ 、ビメンチンの mRNA 発現を確認したところ、マウス線維芽細胞株である NIH3T3 細胞よりも高い発現量を示した。従って得られた細胞は線維芽細胞様の性質をもつことが示唆された。

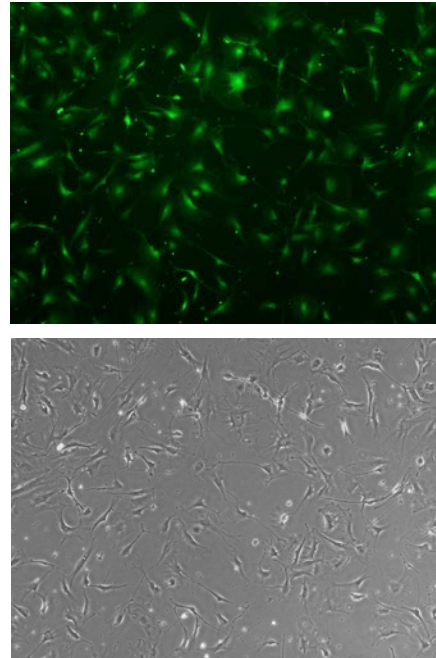


図2：EGFP マウス顎関節周囲組織から採取した細胞の顕微鏡像（上：位相差像 下：蛍光像）

(4) マウス顎関節周囲組織由来細胞の IL-1 $\beta$  刺激によるケモカイン産生と血球系細胞の遊走促進効果

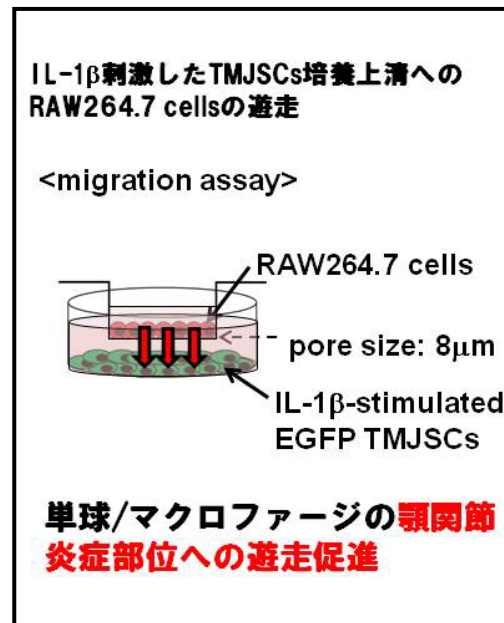


図3：IL-1 $\beta$  刺激した顎関節周囲組織由来細胞の培養上清に対する RAW264.7 cells の遊走能の評価

(3) で採取した細胞(TMJSCs)を炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ にて刺激し、その培養上清に対してマウス単球/マクロファージ系細胞株である RAW264.7 細胞を用い migration assay を行った。IL-1 $\beta$ 刺激後 24 h の培養上清への RAW264.7 cells の遊走能がコントロールと比較して促進されることが明らかとなった。(図 3)

近年、ヒト顎関節滑膜細胞への IL-1 $\beta$ 刺激において遊走因子のひとつである MCP-1 の産生が増加することが報告されている<sup>①</sup>。そこで、今回採取したマウス顎関節由来細胞に IL-1 $\beta$ 刺激を行った際の MCP-1 の産生を RT-qPCR 法と ELISA 法にて解析したところ、有意に産生が亢進した。

MCP-1 に対するレセプターは CCR2 であり、fibrocyte においても発現していることが報告されているため、本研究の結果から顎関節での炎症時周囲組織からの産生が亢進される MCP-1 によって fibrocyte の遊走が促進される可能性は十分に示唆される。

<引用文献>

① Ogura *et al.* MCP-1 Production in Temporomandibular Joint inflammation. *Journal of Dental Research*, 2010; 89(10):1117-1122.

<得られた成果の国内外における位置づけとインパクト>

本研究成果により、炎症時 fibrocyte が MCP-1 の産生亢進により顎関節部位に遊走されることが予想される。これまでに他の臓器において fibrocyte は線維化に関与していることが報告されていることから、病的な顎関節の線維性形質変化の原因細胞の候補として挙げられる可能性は高い。さらなる解析が進めば fibrocyte を標的細胞とした新たな低侵襲治療法の確立にもつながる基礎研究として大変意義深い。

<今後の展望>

マウス骨髄単核細胞からの接着性細胞の獲得はできたが今後さらに精度の高い fibrocyte を単離する必要がある。また、顎関節部位へ到達後の fibrocyte の分化・活性化の分子メカニズムについても明らかにすることで新規顎関節疾患原因療法および治療薬の開発につながるものと確信できる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

(1) Saito D., Kyakumoto S., Chosa N., Ibi M., Takahashi N., Okubo N., Sawada S., Ishisaki A., and Kamo M. Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces epithelial-mesenchymal transition and integrin  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-mediated cell migration of HSC-4 human squamous cell carcinoma cells through Slug. *J. Biochem.* 153(3), 303~315, 2013. 査読あり

(2) Inoko A, Matsuyama M, Goto H, Ohmuro-Matsuyama Y, Ibi M., Hayashi Y, Kiyono T, Yonemura S, Urano T, Izawa I, and Inagaki M. Trichoplein and Aurora A block aberrant primary cilia assembly in proliferating cells. *J. Cell Biol.* 197(3), 391~405, 2012. 査読あり

(3) Takahashi M., Okubo N., Chosa N., Takahashi N., Ibi M., Kamo M., Mizuki H., Ishisaki A., and Kyakumoto S. Fibroblast growth factor-1-induced ERK1/2 signaling reciprocally regulates proliferation and smooth muscle cell differentiation of ligament-derived endothelial progenitor cell-like cells. *Int. J. Mol. Med.* 29, 357~367, 2012. 査読あり

(4) Yoshida M., Okubo N., Chosa N., Hasegawa T., Ibi M., Kamo M., Kyakumoto S., and Ishisaki A. TGF- $\beta$ -operated growth inhibition and translineage commitment into smooth muscle cells of periodontal ligament-derived endothelial progenitor cells through Smad- and p38 MAPK-dependent signals. *Int. J. Biol. Sci.* 8(7), 1062~1074, 2012. 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

(1) 衣斐美歩、堀江沙和、帖佐直幸、吉田茉莉子、加茂政晴、客本斉子、大塚正人、佐原資謹、藤村 朗、石崎 明 ファイブロサイトに注目した顎関節領域疾患発症機構の解明 第56回 歯科基礎医学会学術大会・総会 2014年9月25-27日 福岡国際会議場(福岡県、福岡市)

(2) 衣斐美歩、大久保直登、堀江沙和、帖佐直幸、吉田茉莉子、加茂政晴、客本斉子、大塚正人、佐原資謹、藤村 朗、石崎 明 ファイブロサイトに注目した口腔領域疾患発症機構の解明 第85回 日本生化学会大

会 2012 年 12 月 14-16 日 福岡国際会議場、  
マリンメッセ福岡（福岡県、福岡市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

衣斐 美歩 (IBI, Miho)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：30609665