

## 論文内容の要旨

ROCK/actin/MRTF signaling promotes the fibrogenic phenotype of fibroblast-like synoviocytes derived from the temporomandibular joint

ROCK/actin/MRTF シグナル伝達系は顎関節における顎関節滑膜細胞の線維化を促進する  
(International Journal of Molecular Medicine 平成 29 年 5 月 掲載予定)

よこた せいじ  
横田 聖司

### I. 研究目的

変形性顎関節症(temporomandibular joint-osteoarthritis: TMJ-OA)は、滑膜組織の慢性炎症を伴う軟骨の変性、骨の空洞化や線維症などの様々な症状を引き起こす。重度の不正咬合や顎の非対称、咀嚼筋の過剰使用により顎関節に加わる過度の機械的ストレスは、TMJ-OA 発症の際の病因となりうると報告されている。TMJ-OA の症状の一つである線維症の発症においては顎関節軟組織の構成成分である滑膜細胞による周囲組織の過度な線維化が顎関節運動の妨げになるものとして考えられるが、その線維化誘導を促進する細胞内シグナル伝達機構については不明な点が多い。そこで我々は、この細胞の異常な線維形成に関わる細胞内シグナル伝達機構について調査した。

### II. 研究方法

(1)マウス(C57BL/6J、♀、8 週齢)顎関節滑膜より採取した初代培養細胞に不死化遺伝子 SV40T 抗原を過剰発現させることにより、顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞株 fibroblast-like synoviocytes (FLS) cell line の樹立を試みた。(2)FLS 細胞の筋線維芽細胞(myofibroblasts: MFs)への分化に Rho-associated coiled-coil forming kinase (ROCK)/actin/myocardin -related transcription factor (MRTF)を介するシグナルがどのように影響するか免疫蛍光染色法や qRT-PCR 法を用いて調査した。

### III. 研究成績

(1)SV40LT を過剰発現するベクターを導入した FLS 細胞で、その発現を免疫蛍光染色により確認したところ、核内に SV40LT の発現が認められた。その結果、50 回の継代 (毎回 1:4 の継代比率) を超える FLS 細胞株 FLS1 の樹立に成功した。(2)FLS1 細胞は間葉系細胞マーカー vimentin や、MF マーカー  $\alpha$ -SMA や I 型コラーゲンの発現が陽性であった。また FLS1 細胞では、標準的な線維芽細胞 NIH3T3 と比べて MF マーカーの発現やアクチンフィラメント (filamentous actin: F-actin) の形成が顕著であった。(3)ROCK 阻害剤 Y-27632 ならびにアクチン重合阻害剤 Cytochalasin B (CytB)は F-actin 形成量を低下させると共に、 $\alpha$ -SMA 及び  $\text{colI}\alpha 1$  の mRNA の発現を有意に低下させた。また、CytB はまた FLS1 細胞の細胞生存率を低下させた。(4)MRTF 阻害剤 CCG-100602 は MRTF-A の核内への移行を阻害すると共に、 $\alpha$ -SMA 及び  $\text{colI}\alpha 1$  の mRNA の発現を有意に低下させた。(5)MF 分化阻害因子である線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor: FGF) -1 は、F-actin 形成量を低下させると共に、 $\alpha$ -SMA 及び  $\text{colI}\alpha 1$  の mRNA の発現を有意に低下させた。また、FGF-1 は FLS1 細胞の細胞生存率を有意に増加させた。

#### IV. 考察及び結論

FLS1 細胞は MF 分化誘導刺激の無い状況下でも MF 分化マーカーの発現が顕著であり、同時に F-actin の形成も顕著に認められた。一般的に、転写因子 MRTF は普段は細胞質中の球状アクチン (globular actin: G-actin) に結合・捕捉されておりその転写活性は抑制されているが、F-actin 形成時に G-actin より遊離され、その後核内に移行して MF マーカーの発現を誘導することが知られている。加えて ROCK は、F-actin の形成を促進して MRTF の核内への移行を誘導することにより、MF マーカーの発現を活性化することが知られている。これらのことから、FLS1 細胞では ROCK/actin/MRTF シグナル経路が持続的に活性化し、この細胞の MF への分化が誘導されている可能性が示唆された。実際に、ROCK 阻害剤 Y-27632、アクチン重合阻害剤 CytB、ならびに MRTF 阻害剤 CCG-100602 はこの細胞の MF への分化を抑制した。また、FGF-1 は、F-actin 形成量を低下させると共に、この細胞の MF への分化を抑制した。一方、これらの ROCK/actin/MRTF シグナル経路阻害物質のうち、CytB は FLS1 細胞の生存率を有意に低下させることから、MF マーカーの発現を特異的に抑制するものとは断言できなかった。これらの結果より、FLS1 細胞は ROCK/actin/MRTF シグナル経路の持続的な活性化により、この細胞の MF への分化を誘導・維持していることが強く示唆された。加えて、Y-27632 と CCG-100602 は顎関節周囲の線維症を抑制する薬剤に成りうる可能性が示唆された。それに反して FGF-1 は、MF マーカーの発現を特異的に抑制するが、局所の FLS 細胞数を増加させることにより線維症を増悪させる可能性があるため、顎関節周囲の線維症を抑制する薬剤としては不適當であることが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

#### 論文審査担当者

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

本研究では、マウス (C57BL/6J、8 週齢、メス) 顎関節滑膜より採取した顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞を用いて、変形性顎関節症 (temporomandibular joint-osteoarthritis: TMJ-OA) の症状の一つである線維症の異常な線維形成に関わる細胞内シグナル伝達機構について調査した。

不死化遺伝子 SV40T 抗原を過剰発現させた顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞株 fibroblast-like synoviocytes (FLS) cell line を樹立 (FLS1 細胞) した。その細胞の筋線維芽細胞 (myofibroblasts: MFs) への分化に Rho-associated coiled-coil forming kinase (ROCK)/actin/myocardin-related transcription factor (MRTF) を介するシグナル伝達系がどのように影響するか免疫蛍光染色法や qRT-PCR 法を用いて調査し、以下の研究結果を得た。

- 1) FLS1 細胞は間葉系細胞マーカーである vimentin、MF マーカーである  $\alpha$ -SMA や I 型コラーゲンの発現が陽性であった。また標準的な線維芽細胞 NIH3T3 と比べて MF マーカーの発現やアクチンフィラメント (filamentous actin: F-actin) の形成が顕著であった。
- 2) ROCK 阻害剤 Y-27632 ならびにアクチン重合阻害剤 Cytochalasin B (CytB) は F-actin 形成量を低下させると共に、 $\alpha$ -SMA 及び col1 $\alpha$ 1 の mRNA の発現を有意に低下させた。また CytB はまた FLS1 細胞の細胞生存率を低下させた。
- 3) MRTF 阻害剤 CCG-100602 は MRTF-A の核内への移行を阻害すると共に、 $\alpha$ -SMA 及び col1 $\alpha$ 1 の mRNA

の発現を有意に低下させた。

4) FGF-1 は、F-actin 形成量を低下させると共に、 $\alpha$ -SMA 及び col1 $\alpha$ 1 の mRNA の発現を有意に低下させた。また FLS1 細胞の細胞生存率を増加させた。

これらの結果より以下のような考察がなされた。

1) FLS1 細胞は ROCK/actin/MRTF シグナル経路の持続的な活性化により、この細胞の MF への分化を誘導・維持していることが示唆された。

2) Y-27632、CCG-100602 は TMJ-OA における線維症に対する有効な薬物となりうる可能性が示唆された。

3) CytB は、FLS1 細胞の MF マーカーの発現を抑制するが、この細胞の生存率を有意に低下させることから、MF への分化を特異的に抑制する薬物としての位置づけは確定し得なかった。

4) FGF-1 は、FLS1 細胞の MF マーカーの発現を特異的に抑制するが、MF 前駆細胞としての滑膜細胞を増殖させることにより線維症を増悪させる可能性があるため、TMJ-OA における線維症に対しての有効性については結論できなかった。

### 試験・試問結果の要旨

変形性顎関節症の病態治療解明の一助となるべく、顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞株を樹立しその細胞内シグナル伝達機構及びそれらに関与する阻害剤の FLS1 細胞に対する反応について諮問し、適切な回答を得た。学位に値する学識を有することを認めた。

**参考論文** なし