

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463076

研究課題名(和文)顎関節症の分子細胞レベルでの総合的診断システムの構築

研究課題名(英文) Development of comprehensive diagnostic system at the molecular cell level for temporomandibular joint disorders

研究代表者

三上 俊成 (Mikami, Toshinari)

岩手医科大学・歯学部・准教授

研究者番号：40405783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：日本で顎関節症は歯科三大疾患の一つで患者数が多い。診断のためにX線写真やMRIなどの画像検査を行うことが多いが、顎関節の構造が複雑なため正確な病態把握は難しかった。我々はこれまでに顎関節症の治療で関節洗浄治療を行った後の洗浄液中に含まれる細胞成分をcell block tissue array標本を作製して病理検査を行い、細胞レベルで顎関節部の病態を調べる検査方法を開発してきた。顎関節の病態をさらに詳しく調べるためには、分子細胞レベルで検査を行う必要がある。そこで本研究では、顎関節部の病態を遺伝子レベルで調べるための検査方法を検討し、一連の検査手技を確立した。

研究成果の概要(英文)：Temporomandibular joint (TMJ) disorder (TMD) is one of the three major dental diseases in Japan, and there are many patients with TMD. Although diagnostic imaging tests such as radiography and MRI are often performed, it is difficult to understand accurate disease condition because the structure of the TMJ is too complicated. We have examined the pathology of the TMJ at the cellular level by preparing a cell block tissue array specimen of cell components contained in the joint lavage fluid after treatment. In order to investigate the pathology of the TMJ more closely, it is necessary to examine at the molecular cell level. Therefore, in this study, we examined the examination method to investigate the condition of the TMJ at the gene level and established a series of examination techniques.

研究分野：病理学(口腔病理学)

キーワード：顎関節症 関節洗浄 遺伝子検査

1. 研究開始当初の背景

顎関節症は日本顎関節学会により ~ 型に症型分類され、同学会による「顎関節症診療に関するガイドライン」を参考として診断および治療が行われることが多い。すなわち、患者の口腔内診査や問診、触診に種々の画像検査(エックス線写真や磁気共鳴画像装置(MRI))を加え総合的に診断が行われる。しかし、顎関節は他の関節と比べて解剖学的に複雑な構造を有し、病態把握が難しい。そのため、症型の特定が困難な症例や疼痛の原因が明かでない症例も多い。また、結晶性関節炎や発症初期の滑膜軟骨腫症では石灰化物や軟骨が小さいため画像検査での検出が難しく、顎関節症と誤診されることも少なくない。

我々これまでに、治療に用いられた顎関節洗浄液を検体として用い、cell block tissue array(CBTA)標本を作製し、関節腔内に含まれている細胞成分について病理組織学的に調べる検査方法を確立した。それにより、顎関節症の症型分類に加えて、慢性炎症、急性炎症、急性および慢性炎症の移行期、変形性関節症の疑い、初期滑膜軟骨腫症の診断が可能であった。しかし、さらに詳細な診断のためには、分子細胞レベルで顎関節症の病態を調べるのが重要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、顎関節洗浄液の細胞成分と液体成分の同時分析方法を確立し、画像所見と臨床所見を併せた顎関節症の総合的診断システムを構築する、in vitro において顎関節症の各症状の発症機序について分子細胞学的に解明する、本研究で得られた顎関節症の総合的診断システムの臨床応用へ向けた準備を行う、以上の3点を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 検体採取

当初、研究分担者(口腔外科)が顎関節症患者から顎関節洗浄液を検体として採取する予定であった。しかし、諸事情(異動、長期出張、退職など)により十分な関節洗浄液の採取が困難となった。そこで、顎骨内に生じた嚢胞性疾患で生検を行った患者の嚢胞内容液を関節洗浄液にみため、液状検体の分子レベルでの検査方法の開発に利用可能かを予備実験で調べた後、本実験に用いた。

(2) CBTA 標本の作製と染色

採取した液状検体をホルマリン固定した後、遠心により細胞成分を回収し、1%アルギン酸ナトリウムおよび1M塩化カルシウムを添加してゲル化させた。凝固物を包埋力セットに入れて脱水、パラフィン浸透した後、パラフィン包埋を行い薄切して cell block tissue array 標本を作製した。薄切切片は通法により HE 染色を行った。

(3) 酵素免疫吸着測定法(ELISA)による液状検体中の炎症性サイトカイン濃度測定

炎症の病態をタンパクレベルで判定することが可能か、インターロイキン(IL)-6濃度を ELISA 法で定量して調べた。この際、液状検体採取後にタンパク成分が変性するのを防ぐために、採取後直ちにプロテアーゼインヒビターを添加した。

(4) パラフィン包埋切片からの total RNA 抽出と次世代シーケンスによるトランスクリプトーム解析

病態をさらに遺伝子レベルで解析する技術開発のため、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)試料から 4 μm 厚の薄切切片を約 10 枚用意し、キシレンで脱パラ後に AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen)を用いて total RNA を抽出した。抽出した RNA は分光光度計(Nanodrop)と Agilent 2100 Bioanalyzer で遺伝子の断片化等を調べ、解析可能かどうか品質検定を行った。

品質検定に合格した Total RNA はイルミナ社 TruSeq RNA Access Sample Prep Kit を用いて標準プロトコルに従い、下記の要領でシーケンス用ライブラリ調整を行った。

- (a) RNA 断片化
- (b) 逆転写/2nd鎖 cDNA 合成
- (c) 3'A 付加
- (d) アダプターライゲーション
- (e) 1st PCR 増幅
- (f) 1st ハイブリダイゼーション
- (g) 1st キャプチャー
- (h) 2nd ハイブリダイゼーション
- (i) 2nd キャプチャー
- (j) 2nd 増幅

引き続き、次世代シーケンサー-HiSeq を使用し、下記の条件でシーケンス解析を行った。RNA-Seq

解析方法: Paired End

読み取り塩基長: 100 塩基/1 リード

取得データ数: 2,500 万リードペア (5,000 万リード) /1 検体

取得データ量: 5Gb/1 検体

(5) データ解析

Linux OS 上で遺伝子解析用ソフト (PRINSEQ, TopHat, Bowtie, SAMtools, Cufflinks 等)を用い、データ解析を行った。ヒト参照塩基配列には hg19 を用いた。

(6) 次世代シーケンスのためのデータ解析用オペレーションシステム(OS)の開発

次世代シーケンスを用いることで3万以上の mRNA 発現量を網羅的に調べることが可能となる。次世代シーケンスでは遺伝子の塩基配列データのみが得られるため、遺伝子発現について解釈するためにはデータ解析が必要となる。しかし、データ解析ソフトは非常に高額であり、制約も多い。一方、フリーソフトを組み合わせる場合は自由

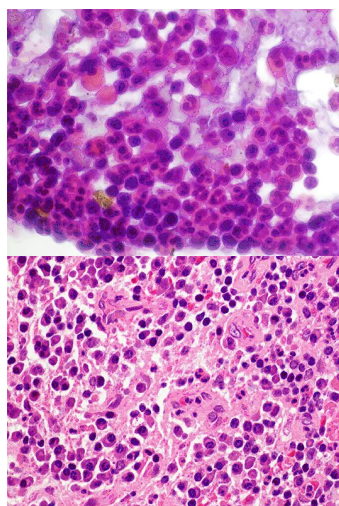
度が高いが、Linux OS 上でのデータ解析環境の構築は専門知識を要する。そこで、必要な解析用ソフトが OS と同時にインストールされる、次世代シーケンスのデータ解析に特化した OS を開発し、研究目的で自由にダウンロードできるようにウェブ上で公開した。

(7) 一連の研究結果をもとに口腔外科の臨床歯科医師（研究分担者）と協力し、顎関節洗浄液による「分子細胞レベルでの総合的診断システム」について考え、実際に本検査法を顎関節症検査に臨床応用する場合に起こりうる問題点についても考慮して実際の導入に向けた検討を行った。

4. 研究成果および考察

(1) 予備実験

既に他の研究目的で 2014 年 1 月から嚢胞内容液を採取しており、予備実験で過去の研究で用いた顎関節洗浄液と性状や炎症の程度を比較した。嚢胞内容液の方が細胞成分はやや多く含まれている場合もあったが、ほぼ同等であった。そこで、予備実験に用いた検体も含め、2014 年 1 月から 7 月に岩手医科大学歯科医療センターを訪れ、嚢胞あるいは嚢胞性腫瘍の臨床診断により生検を行った患者のべ 17 例（男性 10 例、女性 7 例、8～70 歳までの平均 48.2 例）を対象とし、液状検体（平均 0.5ml）を採取した。

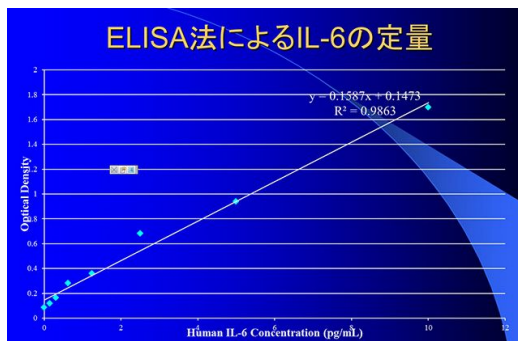


予備実験で関節洗浄液の CBTA 標本（上図）と嚢胞内容液の CBTA 標本（下図）を比較したところ、炎症を伴っている場合はいずれも同等な炎症細胞像を示した。また、17 例全てで炎症性細胞が観察可能で、顕

微鏡観察により好中球、リンパ球、形質細胞、好酸球などの同定が可能であった。以上より、関節洗浄液の分子レベルでの検査方法の開発において、嚢胞内容液は関節洗浄液のかわりに利用可能であると考えられた。

(2) ELISA 法による IL-6 の定量

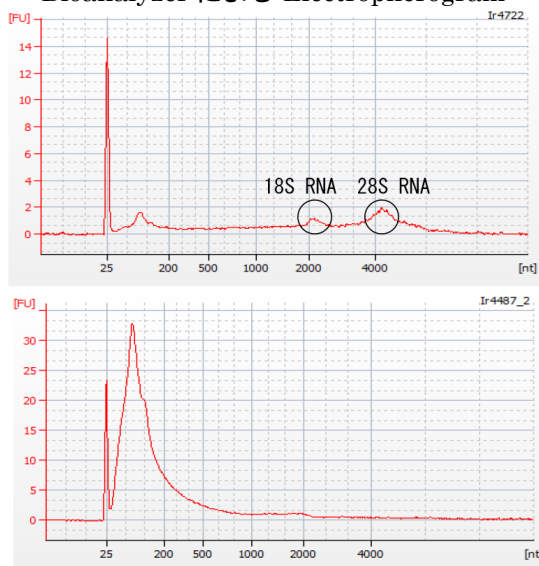
検体の粘性が低い場合には検量線を用いた ELISA 法で液体成分中の IL-6 濃度は定量可能であったが、粘性が高い場合には種々の程度に希釈しても計測が困難であった。顎関節洗浄液の液体成分でも高い粘性を伴う場合があることが分かっており、関節洗浄液中の細胞成分と液体成分の同時分析方法の確立は困難であると考えられた。



(3) FFPE 切片からの RNA 抽出

液体成分中の炎症性サイトカイン定量は粘性の高さから困難な症例があったため、FFPE 切片を用いて細胞性分注の RNA 発現解析が可能か検討した。6 例の FFPE 切片から抽出した total RNA 8 サンプルの品質検定を分光光度計（Nanodrop）と Agilent 2100 Bioanalyzer で行ったところ、抽出された RNA 量は 0.035～4.814 μg、平均 1.449 μg であった。また、200 ヌクレオチド以上の RNA 断片の割合を示す DV200 指標は 22～72%、平均 41.75% で、次世代シーケンスによる網羅的遺伝子解析が可能な 30% 以上は 4 例、30% 未満で解析不可だったものが 3 例、30% 以上だが収量不足で解析不可だったものが 1 例であった。

Bioanalyzer による Electropherogram



上図は DV200 = 72 で RNA の断片化が最も少なく、下図は DV200 = 22 で RNA の断片化が最も進んでいたサンプルの品質結果である。RNA の断片化が進んでいる場合は 18S RNA と 28S RNA のピークがほとんど確認できなかった。

品質検定に合格した total RNA 4 検体をサンプル調整し、次世代シーケンスのトランスクリプトーム解析を行った。いずれも問題なくシーケンスデータが得られた。

(4) データ解析

次世代シーケンスで得られた塩基配列の RAW DATA の一部を以下に示す。

```

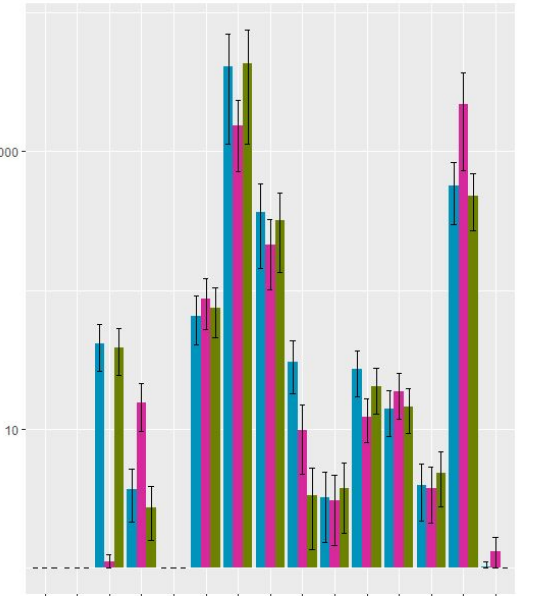
@SRR064286.1 HWI-EAS418:1:4:0:564 length=50
CACCCGCAAGACCTTAGCACANAGAAAGGNTCAACAANNTTNGGATCC
+SRR064286.1 HWI-EAS418:1:4:0:564 length=50
BCCBBB888B88B88B88B88B88B88B88B88B88B88B88B88B88
@SRR064286.2 HWI-EAS418:1:4:1:1841 length=50
GGGAAATGAGGAGCAGCTTTCAGGTANNTGTGACAACCTNCAGGTC
+SRR064286.2 HWI-EAS418:1:4:1:1841 length=50
BCA?=>B6<BABB?73=2+<5!/>B<326!!!:0?B060B=0B:!!?AA<=>A
@SRR064286.3 HWI-EAS418:1:4:1:1553 length=50
CTGGTGCTCCAGCGCTTGTGGGGTTCNGAGGGCAAGACTCNCCTTCC
+SRR064286.3 HWI-EAS418:1:4:1:1553 length=50
B88B>8888BAA=>4:6;55.!--7234;7!4<A<?/@=50A<!--BAABB
@SRR064286.4 HWI-EAS418:1:4:1:1708 length=50
CCAGGAGCCAGTGTACTACGANGTCTCAGTCAAGTTCAACGAGNAACACA
+SRR064286.4 HWI-EAS418:1:4:1:1708 length=50
B8CB00@BCBA<688888530!/3888633;8307AB@;?-;:157BA@9
@SRR064286.5 HWI-EAS418:1:4:1:884 length=50
CATCTCCCAAGACTAAACCAANGAACAAGTTGAATCTCTGAATNGACCAA
+SRR064286.5 HWI-EAS418:1:4:1:884 length=50
B8B8B8B8B8?29;77:3775!/=-1X/7-78B@;@CB8ABB>0!8A8BB@
@SRR064286.6 HWI-EAS418:1:4:1:887 length=50

```

引き続き、Linux OS 上でフリーの遺伝子解析ソフトを立ち上げ、

- クオリティコントロール (PRINSEQ)
- マッピング (TopHat, Bowtie, SAMtools)
- 発現定量 (Cufflinks)
- 発現比較 (Cuffdiff)
- 可視化 (CummeRbund)

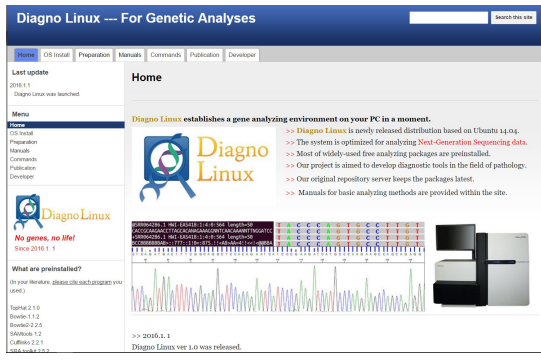
の順にデータ解析を行った。これにより、FFPE 切片から抽出した検体における mRNA 発現量を網羅的に算出することができ、そのための一連の解析ワークフローも完成させることができた。(可視化の一例)



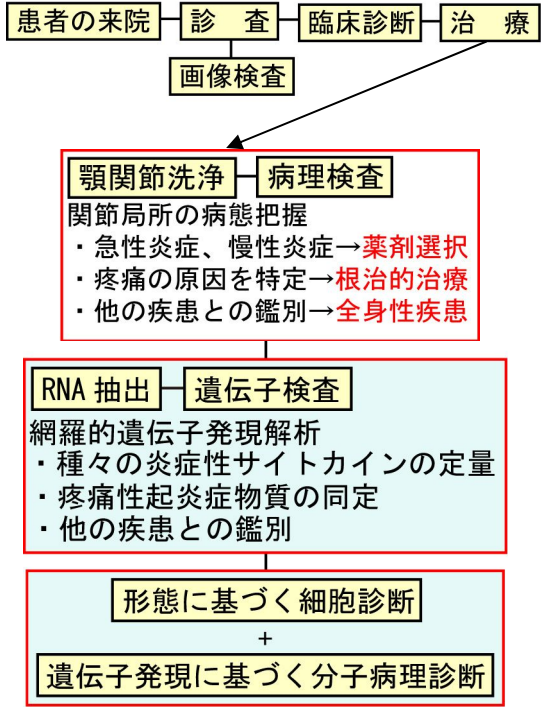
(5) DIAGNO Linux の開発

現在、次世代シーケンスで得られたデータを自前で解析するためには、高額な市販の解析ソフトを購入するか、Linux OS に種々の解析用フリーソフトをインストールし、index ファイル、アノテーションファイル、レファレンスファイル等をそれぞれ異なるデータベースから取得して読み込ませ、コンソール上でコマンドを入力しながら解析し、解析結果の最適化までの一連の解析ワークフローを自ら構築する必要がある。IT やバイオインフォマティクスの専門家でなければ敷居が高い作業である。遺伝子診断システム

を構築するためにはカスタマイズ不可能な市販の解析ソフトでは難しく、フリーソフトを適宜組み合わせる方がよい。そこで、我々が今回のデータ解析に使用した解析用フリーソフトを予めプレインストールした Ubuntu Linux ベースの DIAGNO Linux を、IT 企業の Pax Creation (東京都、目黒区) に受託してディストリビューションとしてまとめた。また、研究代表者が立ち上げた本研究のためのウェブサイトは無償公開し、自由に研究利用できるようにした。(http://www.diaglinux.com)



(6) 顎関節洗浄液による「分子細胞レベルでの総合的診断システム」の実際の導入に向けた検討、まとめ



研究代表者は平成 24 年～25 年度若手研究 B「関節洗浄液を用いた顎関節疾患のための病理診断システムの構築」で、関節洗浄液中に含まれる上関節腔内の細胞成分を調べることで顎関節局所の病態を把握し、臨床診断が同じ症例間でも、顎関節局所の病態は多用であることを明らかにし、その結果を踏まえて関節洗浄液中の細胞成分から顎関節症の診断を行うための一連の病理診断システム

を構築した。本研究ではさらに分子細胞レベルで関節洗浄液を解析することでより詳細な診断システムの構築を目的とした。

ELISA 法による液体成分中のタンパク分析は粘稠性が高い場合に困難であったため、洗浄液中の細胞から RNA を抽出して mRNA の網羅的遺伝子発現解析を行い、より詳細な検査のための技術開発を行った。

当初はこれまでに行ってきた研究と同様に実際の顎関節症患者から関節洗浄液を採取する予定であったが、分担研究者（口腔外科）が病棟担当となり、1年で外来担当へ戻ったがその後1年間の海外出張となった。さらに顎関節症を専門とする他の口腔外科医が退職し、十分な症例数の顎関節洗浄液を採取することは困難となった。関節洗浄液のかわりに嚢胞内容液を用いることで、ホルマリン固定した液状検体中の細胞から RNA を抽出して分子病理学的な解析を行う技術開発は行えたが、*in vitro* 研究は困難であった。本研究に使用可能な滑膜細胞を探したがヒト材料では関節炎を伴ったリュウマチ患者から採取した初代培養細胞しかなかった。マウスの正常滑膜細胞も入手可能であったが、タンパクや遺伝子解析に用いる抗体、プライマーなどの実験試薬を全て変更する必要があり、次世代シーケンスを行う場合には遺伝子の参照配列そのものも変更する必要があり、限られた研究期間内では難しかった。

一方、遺伝子検査の技術開発ではまとまった成果が得られた。ホルマリン固定試料では遺伝子の断片化が生じて遺伝子解析が困難となるが、実際にどの程度まで次世代シーケンスによる網羅的遺伝子発現解析が可能か検討できた。また、FFPE 試料から遺伝子を抽出してシーケンスを行い、さらにそれらのデータ解析フローを確立した。実際に本検査システムを完成させるためには、患者の関節洗浄液を用い、本研究で得られた解析方法を実践し、実際に病院での検査業務を行わなくてはならない。その際に必要な遺伝子解析用の Linux OS も開発でき、市販の解析ソフトを導入して継続的に使用するよりはかなり安価に、また一からフリーソフトを用いて遺伝子解析システムを構築するよりは容易に、診断システムのための遺伝子解析環境を構築できるようになった。病院業務内で歯科医師が、顎関節症患者の関節洗浄液から作製した CBTA 標本から RNA を抽出して分子病理学的診断を行えるようにするためには、最終的にコマンドラインではなくグラフィカルユーザーインターフェースで操作可能なものにし、さらに遺伝子解析結果にアノテーションを付加（意味づけ）する機能も実装しなくてはならない。

ホルマリン固定では遺伝子が断片化するが、非ホルマリン固定液である PAXgene Tissue Container を用いることで未固定の新鮮細胞（組織）と同様な遺伝子の抽出が可能となる。



左図
PAXgene
Tissue
Container
(QIAGEN)

本研究ではヒト組織を用いて PAXgene 固定を行い（RNA ではなく）DNA を抽出して品質検定を行い、エクソーム解析を行った。その結果、ホルマリン固定した試料よりも品質が高く、新鮮試料とほぼ同等の遺伝子解析結果が得られた。本研究ではエクソーム解析のためのデータ解析フローも構築したため、将来的には顎関節症患者において一遺伝子多型を調べて診断や治療に応用できるようになるかも知れない。しかし、PAXgene は2種類の液からなり、1液（固定）に2~24時間浸漬後、2液（安定化）へ交換する必要がある。溶液の順番を誤って間違えた場合、DNA の抽出は不可能であった（HE 染色、免疫染色は問題なく行えた。）また、container に含まれている各溶液量が少ないため、関節洗浄液をそのまま入れず、遠心して細胞成分のみを入れなくてはならない。これらの外来診療時に術者が行うのは難しく、スタッフ間の連携が重要になる。

今後は、以上の点を中心に「関節洗浄液を用いた顎関節疾患のための病理診断システム」の運用を検討していく。

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)

Bologna-Molina R, Takeda Y, Kuga T, Chosa N, Kitagawa M, Takata T, Ishisaki A, Mikami T. Expression of Wilms' tumor 1 (WT1) in ameloblastomas. *J Oral Sci*. 2016;58(3):407-13.

Kuga T, Sasaki M, Mikami T, Miake Y, Adachi J, Shimizu M, Saito Y, Koura M, Takeda Y, Matsuda J, Tomonaga T, Nakayama Y. FAM83H and casein kinase I regulate the organization of the keratin cytoskeleton and formation of desmosomes. *Sci Rep*. 2016 May 25;6:26557. doi: 10.1038/srep26557.

Mikami T, Miake Y, Bologna-Molina R, Takeda Y. Ultrastructural Analyses of Alveolar Bone in a Patient With Osteomyelitis Secondary to Osteopetrosis: A Review of the Literature. *J Oral*

Maxillofac Surg. 2016 Aug;74(8):1584-95.

Mikami T, Kurose A, Javed F, Takeda Y. Detection of Rare Variant of SS18-SSX1 Fusion Gene and Mutations of Important Cancer-Related Genes in Synovial Sarcoma of the Lip: Gene Analyses of a Case and Literature Review. J Oral Maxillofac Surg. 2015 Aug;73(8):1505-15.

〔学会発表〕(計9件)

(講演) 三上俊成: 次世代シーケンスを用いた遺伝子診断. ウルグアイ共和国大学大学院歯学研究科セミナー, 2016年3月2, 3日, ウルグアイ共和国, モンテビデオ

熊谷章子, 飯島伸, 青村知幸, 東海林理, 佐藤泰生, 三上俊成, 杉山芳樹: 外側翼突筋内に石灰化遊離体を認めた1例. 第28回顎関節学会学術大会, 2016年7月, 名古屋

青村知幸, 阿部亜希, 熊谷章子, 水城春美: IVROによる治療の17年後に開口障害が再発した顎関節症の治療経験. 第28回顎関節学会総会・学術大会, 2016年7月, 名古屋

大橋祐生, 熊谷章子, 三上俊成, 古屋出, 増田智幸, 星秀樹, 武田泰典, 杉山芳樹: 結核性顎部リンパ節炎の1例. 第60回日本口腔外科学会学術大会, 2015年10月, 名古屋

三上俊成, 武田泰典: 次世代シーケンスを用いたホルマリン固定パラフィン標本からの遺伝子診断に関する検討. 第40回岩手医科大学歯学会総会, 2014年12月, 盛岡

千葉高大, 青村知幸, 八木正篤, 古城慎太郎, 阿部亮輔, 山谷元気, 松本誠, 羽田朋弘, 熊谷章子, 水城春美, 武田泰典, 三上俊成: 嚢胞内容液を用いた低侵襲病理診断の実践. 第40回岩手医科大学歯学会総会, 2014年12月, 盛岡

三上俊成, 千葉高大, 青村知幸, 水城春美, 熊谷章子, 武田泰典: 嚢胞内容液の cell block tissue array 標本を用いた低侵襲病理診断方法の考察, 第25回日本臨床口腔病理学会, 2014年8月, 新潟

三上俊成, 水城春美, 武田泰典: 口腔領域原発の滑膜肉腫でみられた非定型部位における融合遺伝子の同定. 第77回岩手医科大学歯学会例会, 2014年7月, 盛岡

Mikami T, Mizuki H, Takeda Y.: Synovial sarcoma of the lip. 17th International Congress on Oral Pathology and Medicine, May 2014, Istanbul, Turkey

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.diagnolinux.com>

6. 研究組織

(1)研究代表者

三上 俊成 (MIKAMI, Toshinari)
岩手医科大学、歯学部、准教授
研究者番号: 40405783

(2)研究分担者

熊谷 章子 (KUMAGAI, Akiko)
岩手医科大学、歯学部、講師
研究者番号: 10286594

(3)連携研究者

なし()

研究者番号:

(4)研究協力者

なし()