

# 論 文 要 旨

下顎頭表層培養細胞における  
機械的負荷とエストロゲンの影響

令和 5 年 度  
北海道医療大学大学院歯学研究科

土田 仁

## 【緒論】

変形性顎関節症 (TMJ-OA) は、下顎頭の関節組織の破壊と骨変化を特徴とする退行性病変であり、治療が困難な疾患である。下顎頭軟骨は細胞外マトリックスに富み、関節に加わる伸展力や圧縮力に対する粘弾性と摩擦力に対する潤滑機能を有している。しかし、顎関節関節面への機械的負荷が生理的限界を超えると、関節軟骨の代謝バランスが乱れ、変性や破壊が生じると考えられている。

一方、TMJ-OA における疫学的調査では女性に多く発症することが報告されており、TMJ-OA 患者の血中エストロゲン濃度は TMJ-OA 病態と相関することも明らかにされている。したがって、エストロゲンが TMJ-OA の病因に関与していることが示唆される。しかし、関節軟骨におけるエストロゲンの効果は、有益な保護効果があると報告しているものも在れば、有害な軟骨の破壊や変性をきたす効果を報告しているものも在り、エストロゲンの効果は一貫しておらず、そのメカニズムは未だ不明である。

近年の分子生物学的手法の進歩により、変形性膝関節症 (knee-OA) におけるいくつかの重要な遺伝子やバイオマーカーが明らかになっているが、膝関節と顎関節ではエストロゲン関連受容体の種類、量、組成、および構造に違いがあり、機械的負荷に対する抵抗性や分子制御経路の違いも考えられる。また、OA に関する研究は knee-OA に焦点を当てているものがほとんどで、TMJ-OA ではほとんど研究が行われていない。

そこで本研究では、ラット下顎頭表層培養細胞における機械的負荷とエストロゲンの影響を明らかにすることを目的とし、TMJ-OA の発症と関係がある遺伝子を網羅的に解析した。

## 【材料と方法】

### 1. ラット初代下顎頭表層培養細胞の調製

8 週齢の Wistar 系雌性ラットから下顎頭を採取した。細胞は Out growth 法により単離し、初代下顎頭表層培養細胞とした。

### 2. 機械的負荷とエストロゲンの添加

下顎頭表層培養細胞に  $10.0 \text{ g/cm}^2$  の連続した圧縮力および  $10^{-6} \text{ mol/L}$  ( $1.0 \text{ }\mu\text{M}$ ) のエストロゲンの添加をそれぞれ単独または同時に行い、実験群を荷重群、荷重エストロゲン群、エストロゲン群、対象群の 4 群 ( $n=3$ ) とした。

### 3. RNA-seq 解析

各群における下顎頭表層培養細胞は培養 3 時間後に回収し、total RNA を抽出し、RNA-seq を行った ( $n=3$ ) 。

### 4. タンパク質間相互作用 (Protein-Protein Interaction : PPI) 解析とハブ遺伝子の特定

オンライン PPI 構築ツール STRING を用いて、PPI ネットワークを構築し、MCODE クラスタ解析を行った。さらに、Cytoscape (ver3.9.1) の CytoHubba を使用して、Maximal Clique Centrality (MCC 法) を用いてハブ遺伝子の特定を行った。

## 5. qRT-PCR (Quantitative reverse transcription PCR) 解析

qRT-PCR 解析では、RNA-seq と同一の手法を用いて total RNA の抽出を用いた。得られた cDNA は SYBR Green PCR のプロトコールに従い実施した。 $\beta$ -actin (内的標準) と各遺伝子に対する primer を作製し、mRNA 発現の定量を行った (n=6)。

## 6. Western blotting 解析

COL1A1, COL3A1, LAMC1, LAMB1 におけるタンパク質発現を検証した (n=6)。解析には ImageJ ソフトウェアを用いた。

## 7. 統計学的処理

各実験により得られた値は、Mann-Whitney U 検定および Tukey 法により解析した。 $P$  値は  $P < 0.05$  を\* ,  $P < 0.01$  を\*\*として示し、 $P < 0.05$  を統計学的有意差ありとした。

### 【結果と考察】

#### 1. ハブ遺伝子の特定

PPI 解析により、collagen type I alpha 1 chain (COL1A1), collagen type III alpha 1chain (COL3A1), collagen type IV alpha 1 chain (COL4A1), collagen type V alpha 1 chain (COL5A1), collagen type IV alpha 2 chain (COL4A2), collagen type IV alpha 5 chain (COL4A5), laminin subunit gamma 1 (LAMC1), heparan sulfate proteoglycan 2 (HSPG2), laminin subunit beta 1 (LAMB1), laminin subunit alpha 3 (LAMA3) の 10 個のハブ遺伝子を特定した。

## 2. ハブ遺伝子における機械的負荷の影響

下顎頭表層培養細胞における機械的負荷により基質タンパク分解酵素である ( matrix metalloproteinase ) MMP ファミリーや a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motifs (ADAMTS) ファミリーの遺伝子発現は増加した。また、対照群に対する荷重群で、COL1A1, COL3A1, COL4A1, COL4A2, COL5A1, COL4A5, LAMC1, LAMB1, LAMA3 の mRNA 発現は減少した。以上の結果から、下顎頭表層培養細胞における機械的負荷が細胞外マトリックスおよび細胞周囲マトリックスの合成を阻害させることにより機械的特性が失われる可能性が示唆された。

## 3. ハブ遺伝子におけるエストロゲンの影響

対照群に対する荷重群では、MMP ファミリーと ADAMTS ファミリーの遺伝子発現が増加した。対照群に対するエストロゲン群では、いくつかの MMP ファミリーと ADAMTS ファミリーの遺伝子発現の増加を認めた。中でも、MMP13 や ADAMTS5 はどちらも有意に増加した。対照群に対するエストロゲン群では COL3A1, COL4A1, COL4A2, COL4A5, LAMC1, LAMB1 の mRNA 発現が減少した。これらの結果から、下顎頭表層培養細胞におけるエストロゲンの影響は、機械的負荷と同様に、細胞外マトリックスおよび細胞周囲マトリックスの合成を阻害させる可能性が示唆された。

## 4. ハブ遺伝子における機械的負荷とエストロゲンの影響

荷重群に対する荷重エストロゲン群では、COL1A1, COL3A1, COL4A1, COL4A2, COL5A1, COL4A5, LAMC1, LAMB1, LAMA3 の mRNA 発現が増加した。機械的負荷とエストロゲンの両者が合わさると細胞外マトリックスお

よび細胞周囲マトリックスの合成阻害が抑制されると考えられる。また、COL1A1 と COL3A1, LAMC1, LAMB1 のタンパク質発現も mRNA 発現と同様な傾向を示したことから、COL1A1, COL3A1, LAMC1, LAMB1 は下顎頭表層培養細胞における機械的負荷とエストロゲンと関係がある遺伝子である可能性が示唆された。

### 【結論】

下顎頭表層培養細胞における機械的負荷とエストロゲン添加は、それぞれ基質タンパク分解酵素の遺伝子発現を増加させ、細胞外マトリックスおよび細胞周囲マトリックスの合成を阻害することが示された。しかし、機械的負荷とエストロゲン添加を同時に行うと基質タンパク分解酵素の遺伝子発現は減少し、細胞外マトリックスおよび細胞周囲マトリックスの合成阻害を抑制することが明らかとなった。また、COL1A1, COL3A1, LAMC1, LAMB1 は下顎頭表層培養細胞における機械的負荷とエストロゲンに関係する遺伝子であることが示され、TMJ-OA の発症に関連する可能性があると考えられた。