

ヒト顎関節滑膜細胞の MCP および GRO 産生に対する
30 kDa フィブロネクチンフラグメントの影響

日本大学大学院松戸歯学部研究科歯学専攻

鈴木 麻由

(指導：近藤 壽郎 教授)

Effect of a 30 kDa fibronectin fragment on MCP and GRO production by human
temporomandibular joint synovial fibroblasts.

SUZUKI Mayu

Nihon University Graduate School of Dentistry at Matsudo,

Department of Oral and Maxillofacial Surgery

Abstract

An extracellular matrix metabolite has been shown to promote pathogenesis during chronic inflammation. Fibronectin is an extracellular matrix component in the synovium that is degraded by enzymes such as matrix metalloproteinase. Fibronectin fragments (30-200 kDa molecular weight) are associated with inflammatory conditions. In this study, we investigated the role of a 30 kDa fibronectin fragment in synovitis-induced pathology of the temporomandibular joint (TMJ). Synovial fibroblasts were prepared from TMJ synovium with internal derangement using the outgrowth method. Synovial fibroblasts were treated with the 30 kDa fibronectin fragment and gene expression was examined using a Real-time PCR method. The fibronectin fragment induced the expressions of monocyte chemoattractant protein (MCP) -1, -2, and -3 and growth-related oncogene (GRO) - α , - β , and - γ genes in synovial fibroblasts. MCP-1 and GRO- α protein levels were measured using ELISA and were found to be increased in media conditioned with synovial fibroblasts treated with the 30 kDa fibronectin fragment. Furthermore, experiments using signaling pathway inhibitors revealed that up-regulation of MCP-1 and GRO- α via NF κ B by the 30 kDa fibronectin fragment. MCP production mainly modulates monocyte/macrophage recruitment in multiple inflammatory diseases. GRO- α has been reported to be associated with leukocytes migration (mainly neutrophils), angiogenesis, and pathological pain. These results suggest that the 30 kDa fibronectin fragment is associated with inflammatory progression in TMJ.

緒言

顎関節滑膜は、側頭骨関節面、下顎頭関節面、ならびに関節円板関節面を除く顎関節腔内を被覆する組織である¹⁾。顎関節滑膜の表層には、線維芽細胞様細胞とマクロファージ様細胞が、表層下結合組織には線維芽細胞様細胞が存在している。線維芽細胞様細胞は滑液の産生や細胞外マトリックスの産生、マクロファージ様細胞は異物の除去などを行っているといわれている¹⁻³⁾。いずれの細胞も顎関節の恒常性の維持を行うとともに、炎症の病態形成にも重要な役割を担っていると考えられている。

顎関節において、比較的高頻度に発生する顎関節円板転位障害 (Internal derangement of the temporomandibular joint: 以下 ID) および変形性顎関節症 (osteoarthritis of the temporomandibular joint: 以下 OA-TMJ) の滑膜では、毛細血管の増生や炎症性細胞の浸潤といった滑膜炎所見が認められる^{4,5)}。また、ID および OA-TMJ 患者顎関節滑液中では、炎症性サイトカインである Interleukin-1 β (以下 IL-1 β)、tumor necrosis factor- α (以下 TNF- α) およびケモカインが検出されると報告されている^{6,7)}。ケモカインは、血球系細胞を炎症部位へ遊走させるサイトカインであり、CXC, CC, CX3C および C のサブファミリーが存在する⁸⁾。CC ケモカインは、モノサイトやリンパ球など単核球の遊走に関与しているといわれ、CXC ケモカインは好中球の活性化や血管新生に関与しているといわれている。顎関節包内の病態形成に炎症が関与していると示唆されている。しかし、これらの関節内炎症病態は非感染炎症とされており、ID 患者の滑膜炎の発症については不明な点も多い。

炎症は、様々な生体侵襲に対する生体防御反応であり、従来は病原性微生物の感染など、外的侵襲によってもたらされると考えられてきた。しかし近年、古くなった組織の分解産物や壊死細胞から放出される核酸などによっても炎症が惹起されることなどから、非感染性慢性炎症という概念が提唱されるようになった⁹⁾。この非感染性慢性炎症が、動脈硬化性疾患等の生活習慣病、関節リウマチ (以下 RA)、癌等の病態形成に関与することが示唆されている¹⁰⁾。整形外科領域では、細胞外基質の分解産物が炎症病態形成に関与するとの報告が

ある¹¹⁾.

フィブロネクチン (Fibronectin; 以下 FN) は代表的な接着性糖タンパク質で、滑膜組織をはじめとして様々な組織の細胞外基質として検出されている¹²⁾. 組織中の FN は、可溶性の二量体として分泌された後、細胞外マトリックスとして不溶性の多量体糖タンパク質として沈着する. FN は、FN 自身やコラーゲン、ヘパリン、フィブリン、そして細胞膜表面と結合する部位を持ち、細胞外基質の高分子会合体を構成している¹¹⁾. 代謝や炎症の過程で、FN は細胞外基質分解酵素によって 30 kDa, 45 kDa, 120 kDa のフィブロネクチンフラグメント (Fibronectin fragments; 以下 FN-F) に分解され、これら分解産物が内在性の起炎物質となる可能性が報告されている¹¹⁾. 変形性関節症 (以下 OA) 患者の滑液中からは高濃度の FN-F が検出されており¹³⁾, FN-F が OA や病態形成に関与すると報告されている¹⁴⁾. これらの FN-F のうち、30 kDa FN-F が最も軟骨細胞のコラゲナーゼ産生やマクロファージが炎症性サイトカインを上昇させたとの報告がある¹⁵⁻¹⁷⁾.

本研究では、細胞外基質分解産物が滑膜炎に関与する可能性があるのかを検討することを目的として、30 kDa FN-F を滑膜細胞に作用させ、モノサイト/マクロファージを遊走させる Monocyte chemotactic protein (以下 MCP) および好中球の活性化や血管新生に関与する Growth related oncogene (以下 GRO) の遺伝子発現やタンパク質産生を測定するとともに、30 kDa FN-F の MCP および GRO 発現におけるシグナル伝達経路を検討した.

材料および方法

1. ヒト顎関節滑膜細胞の培養

ID 患者の顎関節上関節腔鏡視下洗浄療法⁴⁾施行時に、残余検体の関節滑膜組織を得た。滑膜組織をメスで細分化し、35 mm ディッシュ内で out growth 法にて滑膜細胞を得た。培養は 10% Fetal bovine serum (以下 FBS) (Cell Culture Technologies 社製, Gravesano, スイス) および penicillin G 100 U/ml (明治製薬社製, 東京, 日本), kanamycin 100 µg/ml (明治社製), fungizone 250 ng/ml (Gibco 社製, NY, アメリカ) を含む Ham's F12 培地 (和光純薬工業株式会社製, 大阪, 日本) にて, 37°C, 5% CO₂ 条件下で行った。培地交換は 3 日ごとに行った。35 mm ディッシュ内でコンフルエント時を継代数初代とした。実験には継代数 6-9 代の細胞を用いた。本実験は日本大学松戸歯学部倫理委員会 (認証番号: EC17-15-039) の指針に従って行われ, インフォームドコンセントを行った患者 3 名から得た滑膜細胞を使用した。

2. Total RNA の抽出

滑膜細胞を 100 mm ディッシュに 1×10^6 cells/well で播種し, コンフルエント確認後 2% FBS および抗菌薬を含む Ham's F12 培地に交換した。24 時間後, 無血清培地に交換し, 300 nM 30 kDa FN-F (Merck KGaA 社製, ダルムシュタット, ドイツ) を添加した。6, 12 および 24 時間後, RNeasy Mini Kit (Qiagen 社製, CA, アメリカ) を用いて Total RNA を抽出した。また, 無刺激の細胞からも Total RNA を抽出し control とした。Total RNA は実験に供するまで -80°C で保存した。

3. Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR)

Total RNA を 100 ng/ml に調整し, 2 µl を用いて, GeneAmp RNA PCR Kit (Thermo Fisher Scientific 社製, MA, アメリカ) を用いて cDNA を作製した。作製した cDNA 溶液 2 µl, TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific 社製) 10 µl, 滅菌精製水 7 µl およ

び CCL-2, -7, -8, CXCL-1, -2, -3&GAPDH の遺伝子に対するプローブセット (Taqman Gene Expression Assays; Thermo Fisher Scientific 社製) 20 μ M を 1 μ l 加え全量 20 μ l の PCR 溶液を作成した. QuantStudio 6 (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いて 95°C で 20 秒加熱後, 95°C 1 秒, 60°C 20 秒を 40 サイクル行い, PCR 産物を増幅した. 各遺伝子の mRNA 発現量は, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を control として $\Delta\Delta$ CT 法を用いて算出した¹⁸⁾.

4. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA 法によるタンパク質測定には, 滑膜細胞を 24 well plate に 5.0×10^4 cells/well で播種し, 24 時間後にコンフルエントを確認し, 2% FBS および抗菌薬を含む Ham's F12 培地に交換した. 24 時間後, 無血清培地に 300 nM 30 kDa FN-F を添加した. 8, 24 および 48 時間作用させた後, 各細胞培養上清を回収した. 培養上清は使用するまで -80°C で保存した. 培養上清中の CCL-2/MCP-1 および CXCL1/GRO- α タンパク質量は Human CCL-2/MCP-1 ELISA Kit (R&D 社製, MN, アメリカ) および CXCL1/GRO- α ELISA Kit (R&D 社製, MN, アメリカ) を用いて測定した. また, 細胞数は COULTER COUNTER (Beckman Coulter 社製, 東京, 日本) を用いて測定した.

5. Kinase 阻害薬実験

滑膜細胞を 24 well plate に 5.0×10^4 cells / well で播種し, 24 時間後にコンフルエントを確認し, 2% FBS および抗菌薬を含む Ham's F12 培地に交換した. 24 時間後, ERK1/2 阻害薬の PD98059 (40 μ M) (Enzo 社製), JNK1/2 阻害薬の SP600125 (10 μ M) (Enzo 社製), p38 阻害薬の SB203580 (10 μ M) (Enzo 社製), または NF κ B 阻害薬の ammonium pyrrolidinedithiocarbamate (APDC) (10 μ M) (Enzo 社製) をそれぞれ添加し, 15 分後に 300 nM 30 kDa FN-F を作用させた. また, interleukin-1 receptor-associated-kinase-1/4 (IRAK-1/4) 阻害薬

の IRAK-1/4 inhibitor (20 μ M) (Merck KGaA 社製), phosphoinositide 3-kinase (PI3K) 阻害薬の LY294002 (20 μ M) (Merck KGaA 社製), transforming growth factor- β -activated kinase1 (TAK1) 阻害薬の(5z)-7-oxozeaenol (1 μ M) (Merck KGaA 社製) または NF κ B kinase β subunit (IKK β) 阻害薬の PS-1145 (10 μ M) (Cayman Chemical 社製) をそれぞれ添加し, 30 分後, 300 nM 30 kDa FN-F を作用させた. FN-F 作用 24 時間後, 各細胞培養上清を回収した. 上清中の MCP-1 および GRO- α タンパク質量は Human CCL-2/MCP-1 ELISA Kit および CXCL1/GRO- α ELISA Kit を用いて測定した. 阻害剤の効果を阻害率とし, $100 - [(\text{阻害剤添加 } 30 \text{ kDa FN-F 刺激による MCP-1 および GRO-}\alpha \text{ タンパク質産生量} / 30 \text{ kDa FN-F 刺激による MCP-1 および GRO-}\alpha \text{ タンパク質産生量}) \times 100]$ で示した.

6. 統計解析

統計解析は ANOVA 解析を行った後, Student-Newman-Keuls (SNK) 法を用いて群間比較を行った.

結果

1. 滑膜細胞の遺伝子発現量の変動

(1) MCP の遺伝子発現

30 kDa FN-F 作用滑膜細胞における MCP-1, -2, -3 の経時的遺伝子発現を調べた. MCP-1 および MCP-3 遺伝子発現は, control に比べ, 30 kDa FN-F 作用後 6 時間の時, 有意に発現上昇が認められた(図 1a, c). また, MCP-2 遺伝子発現は, control に比べ, 30 kDa FN-F 作用後 24 時間の時, 有意に発現上昇が認められた(図 1b).

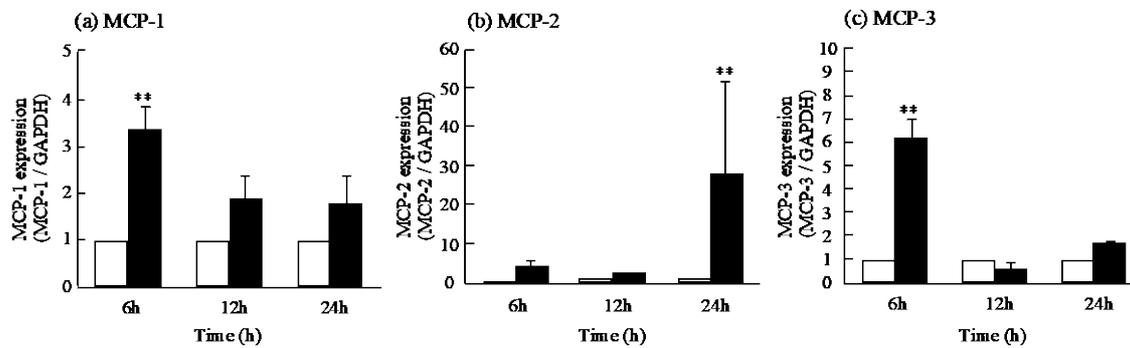


図1. MCP-1, -2, -3の経時的遺伝子発現

滑膜細胞に30 kDa FN-Fを6, 12および24時間作用させた時のMCP-1, 2, 3の遺伝子発現. ANOVA解析を行った後, Student-Newman-Keuls (SNK) 法を用いて群間比較を行い, 比較検討した. means \pm SD (n=4). ** $P < 0.01$.

(2) GRO の遺伝子発現

30 kDa FN-F 作用滑膜細胞における GRO- α , - β , - γ の経時的遺伝子発現を調べた。GRO- α 遺伝子発現は, control に比べ, 30 kDa FN-F 作用後 6, 12 および 24 時間の時, 有意に発現上昇が認められた (図 2a)。GRO- β 遺伝子発現は control に比べ, 30 kDa FN-F 作用後 12 および 24 時間で, 有意に発現上昇が認められた (図 2b)。また, GRO- γ 遺伝子発現は, control に比べ, 30 kDa FN-F 作用後 24 時間で, 有意に発現上昇が認められた (図 2c)。

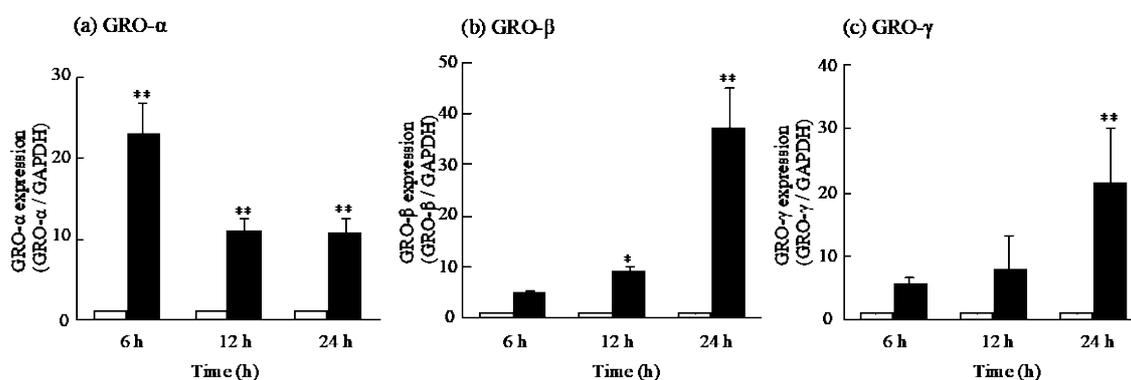


図2. GRO- α , - β , - γ の経時的遺伝子発現
滑膜細胞に30 kDa FN-Fを6, 12および24時間作用させた時のGRO- α , - β , - γ の遺伝子発現。ANOVA解析を行った後, Student-Newman-Keuls (SNK) 法を用いて群間比較を行い, 比較検討した。
means \pm SD (n=4). * P <0.05. ** P <0.01.

2. 培養上清中に含まれるケモカインタンパク質量の変動

(1) 上清中に含まれる MCP-1 タンパク質量

30 kDa FN-F 刺激による滑膜細胞の培養上清中に含まれる MCP-1 量を調べた。滑膜細胞培養上清中の MCP-1 タンパク質量は、control と比べ、30 kDa FN-F 作用後 24 および 48 時間の時、有意に上昇が認められた (図 3)。

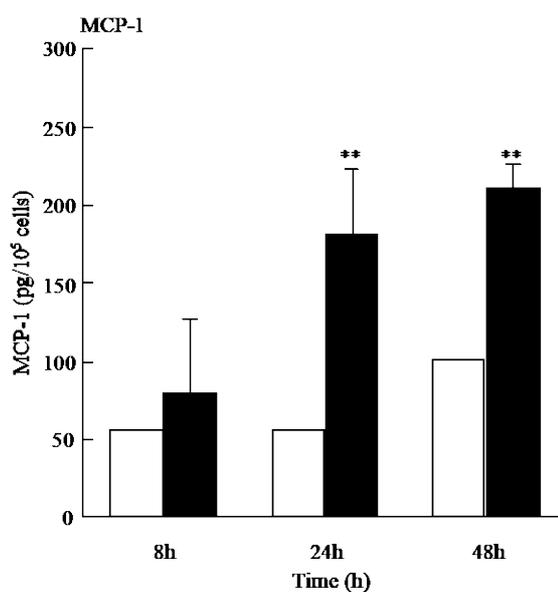


図3. 上清中に含まれるMCP-1量
滑膜細胞に30 kDa FN-Fを8, 24および48時間作用させた時の上清中に含まれるMCP-1量.
ANOVA解析を行った後、Student-Newman-Keuls (SNK) 法を用いて群間比較を行い、比較検討した。
mean ± SD (n=4). **P<0.01.

(2) 上清中に含まれる GRO- α タンパク質量

30 kDa FN-F 刺激による滑膜細胞の培養上清中に含まれる GRO- α 量を調べた。滑膜細胞培養上清中の GRO- α タンパク質量は, control と比べ, 30 kDa FN-F 作用後 24 および 48 時間の時, 有意に上昇が認められた (図 4)。

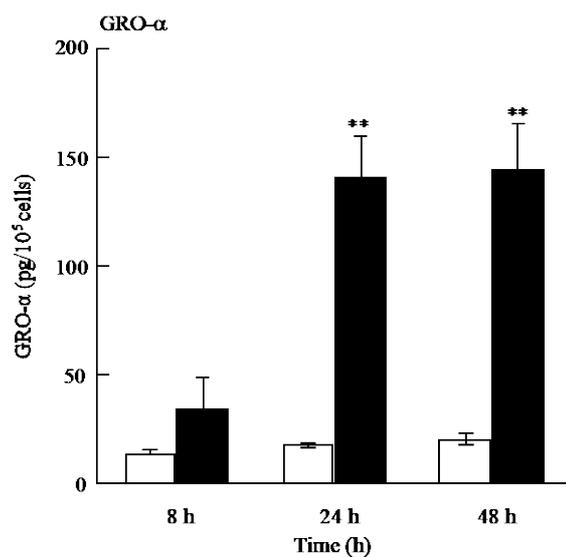


図4. 上清中に含まれるGRO- α 量

滑膜細胞に30 kDa FN-Fを8, 24および48時間作用させた時の上清中に含まれるGRO- α 量。

ANOVA解析を行った後, Student-Newman-Keuls (SNK) 法を用いて群間比較を行い, 比較検討した。
mean \pm SD (n=4). **P<0.01.

3. シグナル伝達阻害実験

(1) MCP-1 産生における 30 kDa FN-F のシグナル伝達経路

30 kDa FN-F 刺激により産生量が増加する MCP-1 タンパク質のシグナル伝達経路を調べた。MCP-1 産生量は、SP600125 および APDC 阻害薬によって有意な減少を認め、一方、PD98059 阻害薬では有意な産生量の上昇を認めた。NFκB 阻害薬である APDC 添加により MCP-1 産生量は 98.0%の阻害を認めた (図 5)。

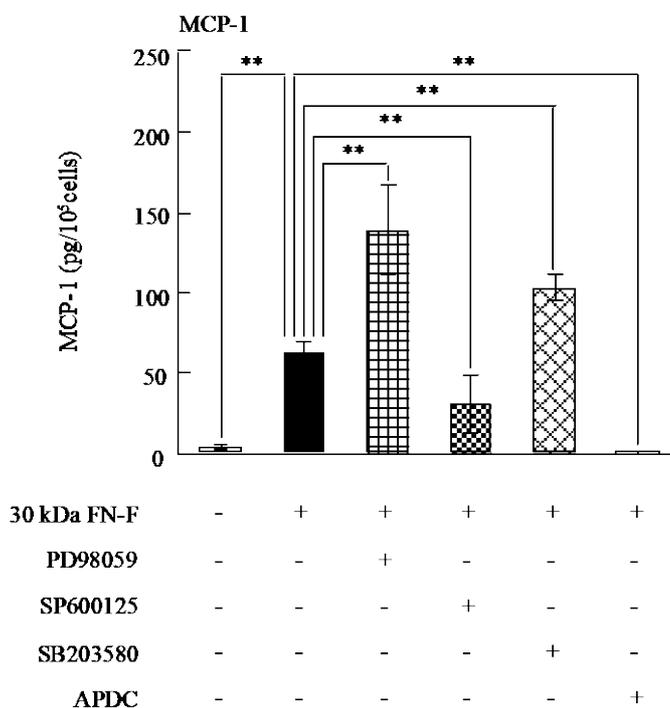


図5. MCP-1産生におけるキナーゼ阻害薬の影響

滑膜細胞に40 μM のPD98059, 10 μM のSP600125, 10 μM のSB203580および10 μM のAPDCをそれぞれ添加し, 15分間作用させた。その後, 30 kDa FN-Fを24時間作用させた時のMCP-1タンパク質産生量。ANOVA解析を行った後, Student-Newman-Keuls (SNK) 法を用いて群間比較を行い, 比較検討した。mean ± SD(n=4). **P<0.01.

次に、NFκB 活性化経路で働くキナーゼ阻害薬の影響を調べた。その結果、MCP-1 産生量は、LY294002, (5z)-7-oxozeaenol および PS-1145 阻害薬によって有意な減少を認めた。IRAK-1/4 inhibitor では、減少傾向が認められたが有意差はなかった (図 6)。

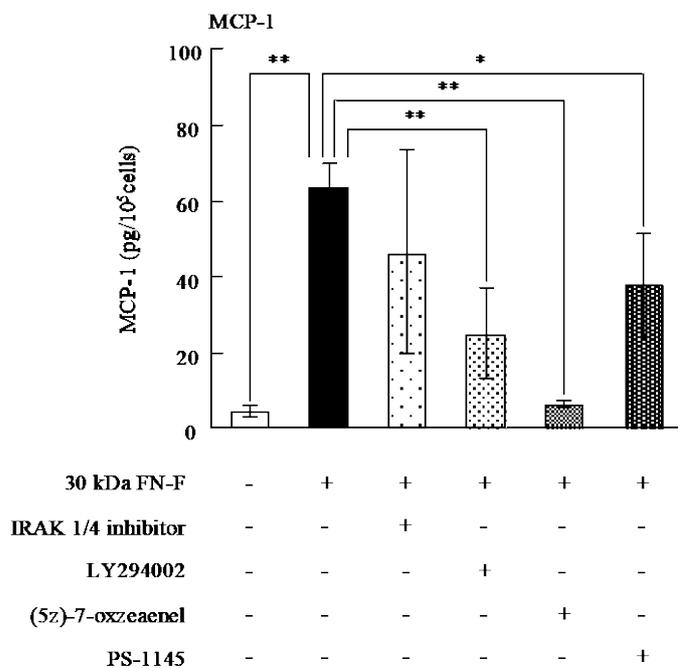


図6. MCP-1産生におけるキナーゼ阻害薬の影響

滑膜細胞に20 μM のIRAK-1/4 inhibitor, 20 μM のLY294002, 1μMの(5z)-7-oxozeaenol および10 μM のPS-1145をそれぞれ添加し, 30分間作用させた。その後, 30 kDa FN-Fを24時間作用させた時のGRO-αタンパク質産生量。ANOVA解析を行った後, Student-Newman-Keuls (SNK) 法を用いて群間比較を行い, 比較検討した。mean ± SD(n=4). *P<0.05. **P<0.01.

(2) GRO- α 産生における 30 kDa のシグナル伝達経路

30 kDa FN-F 刺激により産生量が増加する GRO- α タンパク質のシグナル伝達経路を調べた。GRO- α 産生量は, SP600125, SB203580 および APDC 阻害薬によって有意な減少を認められた。一方, PD98059 阻害薬によって有意な産生量の上昇を認めた。特に NF κ B 阻害薬である APDC 添加では, GRO- α 産生量は 99.8%阻害された (図 7)。

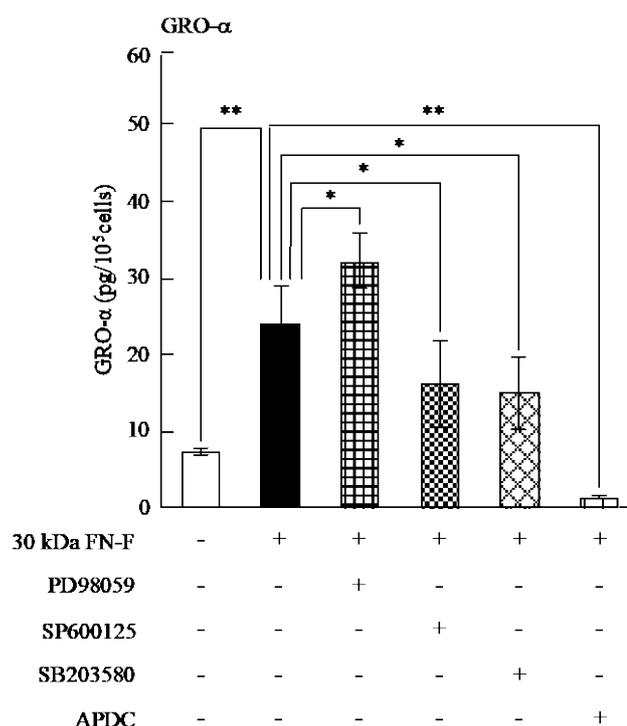


図7. GRO- α 産生におけるキナーゼ阻害薬の影響

滑膜細胞に40 μ M のPD98059, 10 μ M のSP600125, 10 μ M のSB203580および10 μ M のAPDC をそれぞれ添加し, 15分間作用させた。その後, 30 kDa FN-Fを24時間作用させた時のGRO- α タンパク質産生量。ANOVA解析を行った後, Student-Newman-Keuls (SNK) 法を用いて群間比較を行い, 比較検討した。mean \pm SD(n=4). *P<0.05. **P<0.01.

さらに、NFκB 活性化経路で働くキナーゼ阻害薬の影響を調べた。その結果、30 kDa FN-F 刺激によって増加した GRO-α 量は IRAK-1/4 inhibitor, LY294002, (5z)-7-oxozeaenol および PS-1145 のすべての阻害薬で有意な減少が認められた (図 8)。

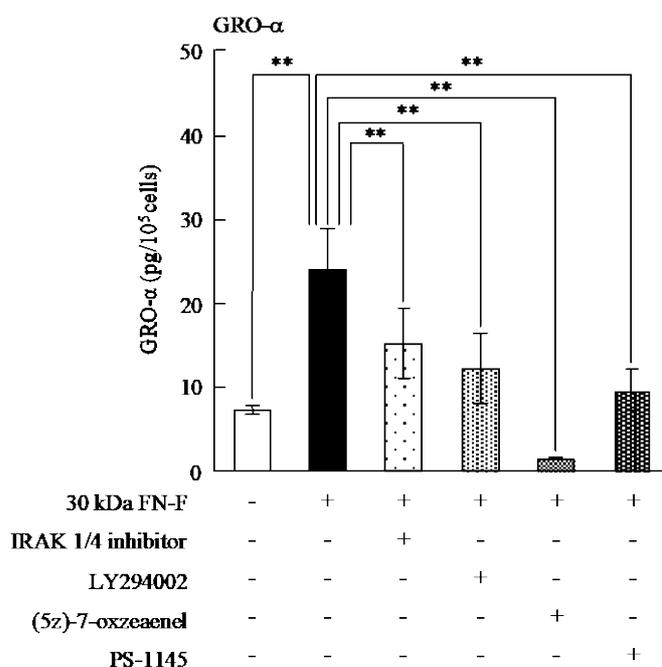


図8. GRO-α産生におけるキナーゼ阻害薬の影響

滑膜細胞に20 μMのIRAK-1/4 inhibitor, 20 μMのLY294002, 1 μMの(5z)-7-oxozeaenol および10 μMのPS-1145をそれぞれ添加し, 30分間作用させた。その後, 30 kDa FN-Fを24時間作用させた時のGRO-αタンパク質産生量。ANOVA解析を行った後, Student-Newman-Keuls (SNK) 法を用いて群間比較を行い, 比較検討した。mean ± SD(n=4). **P<0.01.

考察

本研究では, 30 kDa FN-Fの顎関節炎症病態への影響を検討することを目的に, 滑膜細胞に30 kDa FN-Fを作用させ, モノサイト/マクロファージの遊走に関するケモカインであるMCPおよび, 好中球の活性化や血管新生に関するケモカインであるGROについて検討を行った。

MCPはCCケモカインであり, MCPの主たるレセプターはCCR2であると報告されている^{8, 19, 20}。CCR2は主にモノサイト/マクロファージに発現していることから, MCPはモノサイト/マクロファージの遊走および活性化に重要なケモカインとされている²⁰。活性化したマクロファージは, TNF-α等の炎症性サイトカイン, 細胞外基質分解酵素, 活性酸素等を産

生することから、過剰なマクロファージの遊走は、正常組織の破壊、炎症亢進を引き起こすことが報告されている^{21,22)}。自然免疫初期において、モノサイト/マクロファージの遊走および集積は、重要な役割を担う現象であるものの、炎症亢進や組織破壊を引き起こす可能性があることが示唆されている^{21,22)}。RA および OA 患者の滑液や滑膜組織からは高濃度の MCP が検出されること²³⁾、CD68 陽性のモノサイト/マクロファージの集積が観察されること²¹⁾から、MCP/CCR2 シグナルが関節炎症病態形成へ関与すると考えられている。本研究では、MCP グループである、MCP-1、MCP-2 および MCP-3 の遺伝子発現を調べた。MCP-1 および MCP-3 遺伝子発現は、30 kDa FN-F 作用後 6 時間後に、有意な上昇が認められた。一方、MCP-2 遺伝子発現は、30 kDa FN-F 作用後 24 時間後に、有意な上昇が認められた。FN-F 刺激した滑膜細胞では、マクロファージ²⁴⁾や軟骨細胞²⁵⁾と同様に数種の炎症性サイトカインの産生が上昇する(未公開データ)ことから、MCP-2 の遺伝子発現上昇には FN-F の直接的な影響のみならず、FN-F によって誘導された他の炎症性因子による positive feedback が加算された可能性が示唆された。

MCP-1 は、代表的な MCP であり、滑膜細胞では MCP-2 および MCP-3 に比べて、MCP-1 遺伝子発現が著しく高いこと、また、痛みのある ID または OA-TMJ 患者の滑液中では MCP-1 量が高値であることが報告されている²⁶⁾。さらに ID および OA-TMJ の滑膜組織で、モノサイト/マクロファージマーカーである CD68 の陽性細胞が増加していることが報告されている²⁷⁾。本研究において、滑膜細胞の培養上清中の MCP-1 タンパク質量は、30 kDa FN-F 刺激によって有意な上昇が認められた。したがって、臨床的に確認される顎関節滑液中の MCP-1 量の上昇や、ID および OA-TMJ の滑膜での CD68 陽性細胞の集積は、滑膜細胞が 30 kDa FN-F 等で刺激されたことによる MCP タンパク質の産生・分泌量の上昇が一つの起因となっている可能性が示唆された。

GRO は CXC ケモカインであり、GRO- α 、 β 、および γ は ELR モチーフ (Glu-Leu-Arg) の配列を有することから、血管新生を促進すると考えられている²⁸⁻³²⁾。特に GRO- α は、好中球の

遊走とリウマチ滑膜の血管新生に強く関連していると報告されており^{29, 33)}, 炎症部位に遊走した GRO は血管内皮細胞の CXCR2 を介して, 微小血管の形成に関与すると考えられている^{34, 35)}. 本研究では, 30 kDa FN-F 作用後 6 時間後に, GRO- α 遺伝子発現は, 有意に上昇が認められた. 一方, GRO- β および GRO- γ 遺伝子発現は, 30 kDa FN-F 作用後 24 時間で上昇が認められた. これらの時間的な差違から, GRO- β および GRO- γ の遺伝子発現上昇には FN-F の直接的な影響だけではなく, FN-F により誘導される他の炎症性因子による positive feedback が引き起こされた可能性が考えられた. 一方で, GRO- α 遺伝子発現は 30 kDa FN-F 刺激後短時間で上昇することから, 他の因子による positive feedback の影響を受けにくいものと考えられた. さらに, 滑膜細胞の培養上清中の GRO- α タンパク質量は 30kDa FN-F 刺激後, 24 および 48 時間で有意に上昇を認めたことにより, 滑膜細胞が FN-F 分解産物により刺激を受け, GRO- α を産生・分泌を促進していると考えられる. 最近の研究で GRO- α は, 神経細胞で発現している CXCR2 を介して侵害受容および中枢性感作を引き起こす³⁴⁾, また, 末梢炎症部位内の交感神経アミンとプロスタグランジンの放出を刺激することにより, 痛覚過敏に寄与するといわれている³⁷⁾. よって, GRO- α の増加は, 白血球の遊走と血管新生だけでなく, 炎症時の疼痛を引き起こす可能性も考えられた.

MCP-1 および GRO- α 発現は, NF κ B や MAPK を介しているとの報告があることから³⁸⁻⁴¹⁾, 30 kDa FN-F 刺激による滑膜細胞の MCP-1 および GRO- α 産生の亢進に関与するシグナル伝達経路を MAPK および NF κ B シグナル伝達の阻害薬の影響から調べることにした. その結果, 30 kDa FN-F によって産生上昇した MCP-1 は, JNK1/2 inhibitor (SP600125) および NF κ B inhibitor (APDC) によって有意な減少を認めた. また, GRO- α は, JNK1/2 inhibitor (SP600125), p38MAPK inhibitor (SB203580) および NF κ B inhibitor によって有意な減少を認めた. よって, 30 kDa FN-F 刺激による滑膜細胞の MCP-1 産生は JNK1/2 および NF κ B 活性化経路を, GRO- α 産生は JNK1/2, P38MAPK および NF κ B 活性化経路を介していることが示唆された. 特に, NF κ B inhibitor によって MCP-1 産生は, 98.0%, GRO- α 産生は 99.8%, それぞれ阻害されたこ

とから、主として、MCP-1 および GRO- α 産生は NF κ B 活性化を介して行われているものと考えられた。

次に、NF κ B 活性化経路についてさらに詳細に検討するために、NF κ B 活性化経路で働くキナーゼの阻害薬を作用させ、その影響を検討した。30 kDa FN-F 刺激による MCP-1 および GRO- α 産生は、PI3K inhibitor (LY294002) によって阻害されたことから、PI3K を介していると考えられるが、更なる下流経路については今後詳細な検討が必要である。一方で、TAK1 inhibitor ((5z)-7-oxzeael) および IKK β inhibitor (PS-1145) によって MCP-1 および GRO- α の産生量の減少が認められることから、30 kDa FN-F による滑膜細胞の MCP-1 および GRO- α 産生は TAK1 および IKK β を介していると考えられ、IL-1 による NF κ B 活性化経路と類似することが示唆された。IL-1 Receptor (以下 IL-1R)/Toll Like Receptor (以下 TLR) の直下で働く IRAK-1/4 inhibitor では、MCP-1 産生は減少傾向がみられ、GRO- α 産生は減少を認めた。本論文においてデータ未公開ではあるが、FN-F 刺激滑膜細胞での IL-1 β のタンパク質産生量を測定したところ、検出限界以下であり確認できなかった。このことから、FN-F 刺激滑膜細胞での MCP-1 および GRO- α 産生量の増加は、少なくとも IL-1 β を介している可能性は低いと考えられることから、両者のタンパク質産生は TLR を介して、NF κ B が活性化されるシグナル伝達経路であることが示唆された。

TLR は病原体を認識する膜タンパク質で、病原体レセプターまたは病原体センサーなどと呼ばれる^{42, 43)}。ヒトの場合、TLR1 から TLR10 まであり、それぞれが異なった病原体成分を特異的に認識する⁴³⁾。TLR2/4 は細菌の膜成分であるリポタンパク質を認識するレセプターとして有名であるが、宿主の細胞外基質を分解してできた産物なども認識して NF κ B などの転写因子を活性化することが既に報告されている⁴²⁾。我々は以前、DNA マイクロアレイ解析の結果から、滑膜細胞から TLR-1,-2, -3, -4, -5 および、-6 を発現することを確認している(非公開データ)。TLR2/4 は IL-1R 同様に、IRAK-1/4 を介してシグナルを伝達することから⁸⁾、30 kDa FN-F のレセプターとして働いているかも知れない。滑膜細胞では、30 kDa FN-F に

よって、TLR-TAK1-IKK を介して NFκB が活性化することで、MCP-1 および GRO-α 産生が上昇する可能性が示唆された (図 9).

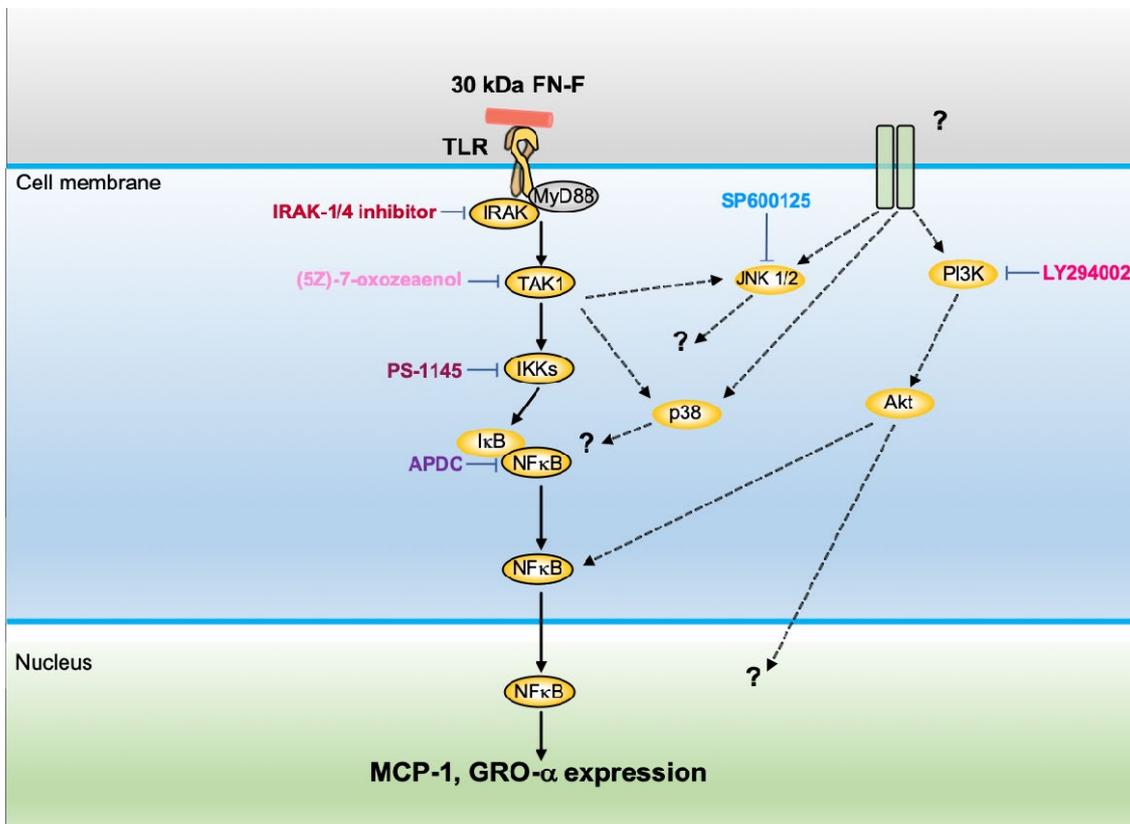


図9. 滑膜細胞における30 kDa FN-Fシグナル伝達経路の模式図

以上、本研究の総括として、30 kDa FN-Fは滑膜細胞の TLR を介して NFκB を活性化し、ケモカインである MCP-1 および GRO-α 産生を亢進させ、マクロファージや好中球の遊走を促進させると共に疼痛を誘発する。また、組織中に大量に遊走されたマクロファージは活性酸素を、好中球は Matrix metalloproteinase 等を産生することで、組織破壊を引き起こす可能性が示唆された (図 10).

30 kDa FN-F

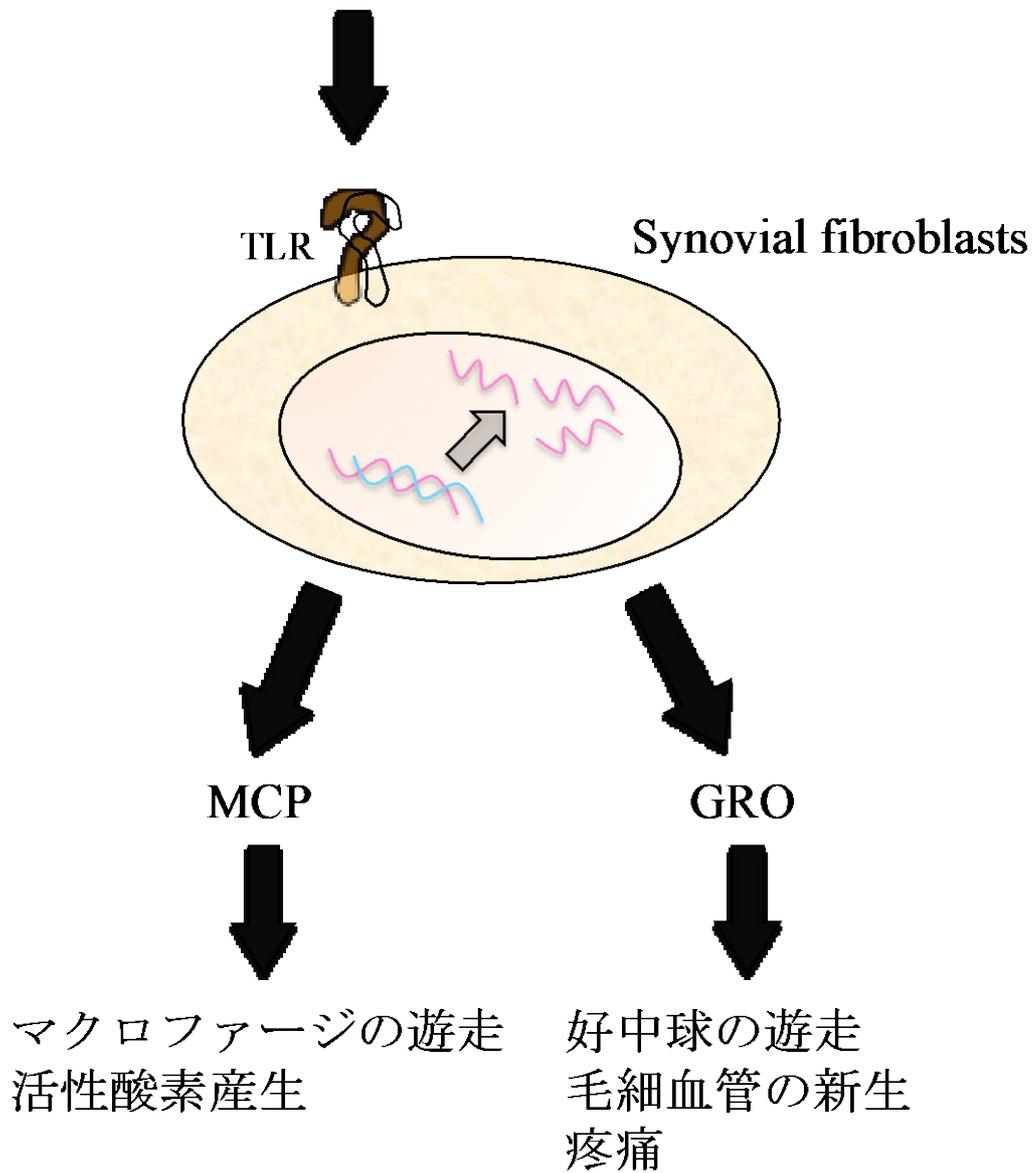


図10. 滑膜細胞における30 kDa FN-Fの影響

結語

本研究では顎関節の炎症病態関連因子の検索を目的とし、患者由来の滑膜細胞を 30 kDa FN-F で刺激することにより以下の結果を得た。

- 1) 刺激後 6 時間で, MCP-1 および MCP-3 遺伝子発現量の有意な上昇が認められた。一方, MCP-2 遺伝子発現量は, 刺激後 24 時間で有意な上昇を認めた。
- 2) 刺激後 6, 12 および 24 時間で, GRO- α 遺伝子発現量の有意な上昇を認めた。GRO- β 遺伝子発現量は 12 および 24 時間で有意な上昇を認めた。また, GRO- γ 遺伝子発現量では, 24 時間で発現上昇を認めた。
- 3) 滑膜細胞培養上清中の MCP-1 および GRO- α は, 刺激後 24 および 48 時間において, タンパク質産生量の有意な上昇を認めた。
- 4) FN-F 刺激により上昇した MCP-1 タンパク質の産生量は, JNK1/2 inhibitor および NF κ B inhibitor により有意に産生量の減少が認められた。特に NF κ B inhibitor で産生量が 98.0% の阻害されたことから, さらに本シグナル経路を検討した。その結果, MCP-1 産生は, PI3K inhibitor, TAK1 inhibitor および IKK inhibitor によって有意に減少した。
- 5) FN-F 刺激により上昇した GRO- α タンパク質の産生量は, p38 inhibitor および NF κ B inhibitor により産生量の減少を認めた。特に, NF κ B inhibitor により GRO- α 産生量が 99.8% 阻害されたため, NF κ B 経路のさらなる検討を行ったところ, GRO- α 産生は IRAK-1/4 inhibitor, PI3K inhibitor, TAK1 inhibitor および IKK inhibitor によって産生量の減少を認めた。

以上, 本研究の総括として, 30 kDa FN-F は滑膜細胞の TLR を介して NF κ B を活性化し, ケモカインである MCP-1 および GRO- α 産生を亢進させ, マクロファージや好中球の遊走を促進させると共に疼痛を誘発する。また, 組織中に大量に遊走されたマクロファージは活性酸素を, 好中球は Matrix metalloproteinase 等を産生し, 組織破壊を引き起こすことで, 顎関節炎症病態形成に関与する可能性が示唆された。

本論文は, 参考文献 1 「Effect of a 30 kDa fibronectin fragment on GRO production by human temporomandibular joint synovial fibroblasts」 International Journal of Oral-Medical Sciences 掲載予定および, 参考文献 2 「ヒト顎関節滑膜細胞の Monocyte chemotactic protein 産生に対するフィブロネクチンフラグメントの影響」 日本顎関節学会雑誌, 第 31 卷 1 号, 2019 をまとめたものである.

参考文献

- 1) Dijkgraaf LC, de Bont LG, Boering G, Liem RS: Structure of the normal synovial membrane of the temporomandibular joint: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg*, 54: 332-338, 1996.
- 2) Nozawa-Inoue K. Synovial Lining Cells in the Temporomandibular Joint. *J Oral Biosci*, 48: 198-209, 2006.
- 3) Nozawa-Inoue K, Amizuka N, Ikeda N, Suzuki A, Kawano Y, Maeda T: Synovial membrane in the temporomandibular joint -Its morphology, function and development. *Arch Histol Cytol*, 66: 289-306, 2003.
- 4) Kondoh T, Dolwick MF, Hamada Y, Seto K: Visually guided irrigation for patients with symptomatic internal derangement of the temporomandibular joint: a preliminary report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 95: 544-551, 2003.
- 5) Kardel R, Ulfgren AK, Reinholt F, Hamada Y, Holmlund A: Inflammatory cell and cytokine patterns in patients with chronic polyarthritis and temporomandibular joint involvement. *Acta Odontol Scand*, 64: 221-226, 2006.
- 6) Hamada Y, Kondoh T, Holmlund AB, Yamamoto M, Horie A, Saito T, Seto K, Sekiya H: Inflammatory cytokines correlated with clinical outcome of temporomandibular joint irrigation in patients with chronic closed lock. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 102: 596-601, 2006.
- 7) Kaneyama K, Segami N, Nishimura M, Suzuki T, Sato J: Importance of proinflammatory cytokines in synovial fluid from 121 joints with temporomandibular disorders. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 40: 418-423, 2002.

- 8) Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Aragay A, del Real G, Martin AM, Vila-Coro AJ, et al: The Chemokine Monocyte Chemoattractant Protein 1 Triggers Janus Kinase 2 Activation and Tyrosine Phosphorylation of the CCR2B Receptor. *J Immunol*, 161: 805-813, 1998.
- 9) 引頭毅: 非感染性炎症を惹起するダメージ関連分子パターン(DAMP). *岐歯雑誌*, 44: 145-158, 2018.
- 10) 真鍋一郎: 慢性炎症と加齢関連疾患. *日老医誌*, 54: 105-113, 2017.
- 11) Barilla ML, Carsons SE: Fibronectin Fragments and Their Role in Inflammatory Arthritis. *Semin Arthritis Rheum*, 29: 252-265, 2000.
- 12) Hynes RO, Yamada KM: Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol*, 95: 369-377, 1982.
- 13) Xie DL, Meyers R, Homandberg GA: Fibronectin fragments in osteoarthritic synovial fluid. *J Rheumatol*, 19: 1448-1452, 1992.
- 14) Goldring MB: The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 43: 1916-1926, 2000.
- 15) Hwang HS, Choi MH, Kim HA: 29-kDa FN-f inhibited autophagy through modulating localization of HMGB1 in human articular chondrocytes. *BMB Rep*, 51: 508-513, 2018.
- 16) Hyun SH, Su JP, Eun JC, Mi HL, Hyun AK. Fibronectin fragment-induced expression of matrix metalloproteinases is mediated by MyD88-dependent TLR-2 signaling pathway in human chondrocytes. *Arthritis Res Ther*, 17, 2015, DOI 10.1186/s13075-015-0833-9.

- 17) Feghali K, Grenier D: Priming Effect of Fibronectin Fragments on the Macrophage Inflammatory Response: Potential Contribution to Periodontitis. *Inflammation*. 35: 1696-1705, 2012. DOI: 10.1007/s10753-012-9487-9.
- 18) Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25: 402-408, 2001.
- 19) Bonfield TL, Johna N, Malura A, Bamaa BP, CulveraDA, Mani S, et al: Elevated monocyte chemotactic proteins 1, 2, and 3 in pulmonary alveolar proteinosis are associated with chemokine receptor suppression. *Clin Immunol*, 114: 79-85, 2005.
- 20) Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE: Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overvie. *J Interferon Cytokine Res*, 29: 313-326, 2009.
- 21) Manfredini C, Paoella F, Gabusi E, Silvestri Y, Gambari L, Filardo G, et al: From osteoarthritic synovium to synovial-derived cells characterization: synovial macrophages are key effector cells. *Arthritis Res Ther*, 18, 2016. DOI: 10.1186/s13075-016-0983-4.
- 22) Moss ST, Hamilton JA: Proliferation of a subpopulation of human peripheral blood monocytes in the presence of colony stimulating factors may contribute to the inflammatory process in diseases such as rheumatoid arthritis. *Immunobiology*, 202: 18-25, 2000.
- 23) Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, Johnson B, Evanoff HL, Haines GK, et al: Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 90: 772-779, 1992.
- 24) Pulai JI, Chen H, Im HJ, Kumar S, Hanning C, Hegde PS, et al: NF-kappa B mediates the

stimulation of cytokine and chemokine expression by human articular chondrocytes in response to fibronectin fragments. *J Immunol*, 174: 5781-5788, 2005.

25) Kragstrup TW, Sohn DH, Lepus CM, Onuma K, Wang O, Robinson W, et al: Fibroblast-like synovial cell production of extra domain A fibronectin associates with inflammation in osteoarthritis. *BMC Rheumatol*, 46, 2019. DOI 10. 1186/s41927-019-0093-4.

26) Ogura N, Satoh K, Akutsu M, Tobe M, Kuyama K, Kuboyama N, et al: MCP-1 Production in Temporomandibular Joint Inflammation. *J Dent Res*, 89: 1117-1122, 2010.

27) Kardel R, Ulfgren AK, Reinholt FP, Holmlund A: Inflammatory cell and cytokine patterns in patients with painful clicking and osteoarthritis in the temporomandibular joint. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 32: 390-396, 2003.

28) Strieter RM, Polverini PJ, Kunkle SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Damme JV, Walz A, Marriott D, Chan SY, Rocznik S, Shanafelt AB: The Functional Role of the ELR Motif in CXC Chemokine-mediated Angiogenesis. *J. Biol. Chem*, 270: 27348-27357, 1995.

29) Erdem H, Pay S, Serdar M, Simsek I, Dinc A, Musabak U, Pekel A, Turan M: Different ELR (+) angiogenic CXC chemokine profiles in synovial fluid of patients with Behcet's disease, familial Mediterranean fever, rheumatoid arthritis, and osteoarthritis. *Rheumatol Int*, 26: 162-167, 2005.

30) Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, Strieter RM: CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol*, 68: 1-8, 2000.

31) Reich N, Beyer C, Gelse K, Akhmetshina A, Dees C, Zwerina J, Schett G, Distler O, Distler JHW: Microparticles stimulate angiogenesis by inducing ELR⁺ CXC-chemokines in synovial

fibroblasts. *J Cell Mol Med*, 15: 756-762, 2011.

32) Addison CL, Daniel TO, Burdick MD, Liu H, Ehlert JE, Xue YY, Buechi L, Walz A, Richmond A, Strieter RM: The CXC Chemokine Receptor 2, CXCR2, Is the Putative Receptor for ELR⁺ CXC Chemokine-Induced Angiogenic Activity. *J Immunol*, 165: 5269-5277, 2000.

33) Szekanecz Z, Pakozdi A, Szentpetery A, Besenyei T, Koch AE: Chemokines and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Front Biosci (EliteEd)*, 1: 44-51, 2009.

34) Xi L, Mokarram H, Syed MQ, Lixin L: Different microvascular permeability responses elicited by the CXC chemokines MIP-2 and KC during leukocyte recruitment: role of LSP1. *Biochem Biophys Res Commun*, 423: 484-489, 2012.

33) Szekanecz Z, Pakozdi A, Szentpetery A, Besenyei T, Koch AE: Chemokines and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Front Biosci (EliteEd)*, 1: 44-51, 2009.

35) Reutershan J, Morris MA, Burcin TL, Smith DF, Chang D, Saprito, Ley K: Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung, *J. Clin. Invest.* 116: 695–697, 2006.

36) Zhang ZJ, Cao DL, Zhang X, Ji RR, Gao YJ: Chemokine contribution to neuropathic pain: Respective induction of CXCL1 and CXCR2 in spinal cord astrocytes and neurons. *Pain*, 154: 2185-2197, 2013.

37) Cunha TM, Verri WA Jr, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH: A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 1755-1760, 2005.

- 38) Wendy L, Thompson LJ, Van E: Inflammatory cytokines stimulate the chemokines CCL2/MCP-1 and CCL7/MCP-7 through NF κ B and MAPK dependent pathways in rat astrocytes. *Brain Res*, 1287: 47-57, 2009.
- 39) Werle M, Schmal U, Hanna K, Kreuzer J: MCP-1 induce activation of MAP-kinase ERK, JNK and p38 MAPK in human endothelial cells. *Cardiovasc Res*, 56: 284-292, 2002.
- 40) Baston-Büst DM, Schanz A, Böddeker SJ, Altergot-Ahmad O, Krüssel JS, Rein D, Hess AP: CXCL1 expression in human decidua in vitro is mediated via the MAPK signalling cascade. *Cytokine*, 64: 79-85, 2013.
- 41) Xu J, Zhu MD, Zhang X, Tian H, Zhang JH, Wu XB, Gao YJ: NF κ B-mediated CXCL1 production in spinal cord astrocytes contributes to the maintenance of bone cancer pain in mice. *J Neuroinflammation*, 11, 2014. DOI: 10.1186/1742-2094-11-38.
- 42) Laura ON, Paola M, and Lee M. Wetzler: The role of TLR2 in infection and immunity. *Front Immunol*, 3, 2012. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00079.
- 43) Akira S: Toll-like Receptor Signaling. *J Biol Chem*, 278: 38105-38108, 2003.