

論文内容要旨

顎関節症におけるアンジオポエチン様因子 2
(ANGPTL2) が有する炎症促進メカニズムの解明

主指導教員：谷本 幸太郎教授

(医歯薬保健学研究科 歯科矯正学)

副指導教員：兼松 隆教授

(医歯薬保健学研究科 細胞分子薬理学)

副指導教員：加来 真人講師

(広島大学病院 歯科矯正科)

高野 真実

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

アンジオポエチン様因子 (Angiopoietin-like protein : ANGPTL) は、脂質代謝、血管新生および炎症発現および増悪を含む多様な機能を有することが明らかとなっている。7つの ANGPTL ファミリーのうち、ANGPTL2 は心臓、腎臓、肺、骨格筋および脂肪など様々な組織および細胞で発現しており、特に炎症性疾患においてその発現が上昇することにより、慢性炎症メディエーターと考えられている。ANGPTL2 は低酸素状態、代謝異常および小胞体ストレスにより発現が誘導され、さらに ANGPTL2 の発現には Calcineurin (CaN)/NFATc シグナルが関与することが報告されている。メカニカルストレス付与時にも同シグナルが活性化することが報告されている。しかし、軟骨の炎症における ANGPTL2 の機能および、軟骨における過度なメカニカルストレス付与時の CaN/NFATc シグナルの機能についての不明点が多い。そこで本研究では、軟骨細胞における ANGPTL2 の炎症メカニクスについて検証するとともに、過度な伸張刺激負荷時の CaN/NFATc シグナルの機能および CaN 阻害剤の効果を解明することを目的とする。

1. ATDC5 における軟骨分化マーカー、ANGPTL2 および ANGPTL2 の受容体の 1 つと考えられている Integrin $\alpha 5\beta 1$ の遺伝子発現を確認するため、軟骨分化誘導開始 0、7、10、14、17、20、24、27 日後に mRNA を抽出し、リアルタイム定量 PCR 解析を行った。また、ATDC5 における ANGPTL2 および Integrin $\alpha 5\beta 1$ のタンパク局在を確認するため、蛍光免疫染色を行った。
2. ANGPTL2 による炎症メカニクスを検討するため、リコンビナント ANGPTL2 添加 3 時間後に mRNA を抽出し、ANGPTL2、IL-1 β 、TNF- α 、COX-2、ADAMTS-5、MMP-3、MMP-13、Integrin $\alpha 5$ 、Integrin $\beta 1$ の遺伝子発現についてリアルタイム定量 PCR 解析を行った。また、リコンビナント ANGPTL2 添加後 0、5、10、20、60、120 分後の MAPKs、Akt、NF- κ B のリン酸化タンパク質について western blot 解析を行った。
3. ANGPTL2 と Integrin $\alpha 5\beta 1$ との関係を解明するため、Integrin $\alpha 5\beta 1$ 中和抗体を添加 12 時間後に、2. と同様に ANGPTL2 添加を行い、3 時間後に mRNA を抽出し、ANGPTL2、IL-1 β 、TNF- α 、COX-2、ADAMTS-5、MMP-3、MMP-13 の遺伝子発現についてリアルタイム定量 PCR 解析を行い、Integrin $\alpha 5\beta 1$ 中和抗体添加群・非添加群について各遺伝子発現量を比較検討した。また、Integrin $\alpha 5\beta 1$ 中和抗体を添加 12 時間後に、2. と同様に ANGPTL2 添加を行い、0、10、20 分後の MAPKs、Akt、NF- κ B のリン酸化タンパク質を Integrin $\alpha 5\beta 1$ 中和抗体添加群・非添加群について western blot 解析を用い比較検討した。
4. ATDC5 を軟骨分化誘導後、Flexcell Strain Unit®を用いて 10%の細胞伸展、毎分 30 サイクル(1 秒伸張/1 秒弛緩)の過度な周期的伸張刺激 (CTS) を負荷した。ANGPTL2 の遺伝子発現についてリアルタイム PCR 解析、および ANGPTL2、COX-2、MMP-13 のタンパク質について western blot 解析を行った。
5. ATDC5 における NFATc family の遺伝子発現を確認するため、軟骨分化 14 日後のリアルタイム PCR 解析を行い、4.と同様に 10%の CTS 負荷後 6、12 時間後の遺伝子発現量の変化についてリアルタイム PCR 解析を行った。

6. CTS 負荷時の炎症反応に対する FK506 の影響について検討するため、ATDC5 を軟骨分化開始 14 日後に FK506 (Sigma-Aldrich Japan; 50mM) を添加し、12 時間後より CTS を 6 時間付与した。CTS 非負荷群および FK506 添加・非添加群についてリアルタイム PCR 解析にて比較検討した。

これらの実験結果より、以下のことが明らかとなった。

1. TypeIIcollagen は分化開始 14 日後に、Aggrecan は 17 日後に、Type X collagen は 20 日後に、ANGPTL2 は分化 14 日後を最大として、遺伝子発現のピークが認められた。Integrin $\alpha 5$ の遺伝子発現は分化期間を通じてほぼ一定であったが、Integrin $\beta 1$ の遺伝子発現は分化 20 日以降減少傾向にあった。また、ANGPTL2 は ATDC5 の細胞質に、Integrin $\alpha 5 \beta 1$ は細胞表面において強く発現していることが確認された。

2. ANGPTL2 添加により、ANGPTL2、炎症関連因子および Integrin $\alpha 5 \beta 1$ は有意な遺伝子発現の亢進が認められた。また、ANGPTL2 の添加 10 分後より MAPK および Akt のリン酸化が亢進し、20 分以降 NF- κ B のリン酸化が亢進した。

3. Integrin $\alpha 5 \beta 1$ 中和抗体は、ANGPTL2 添加による IL-1 β 、TNF- α 、COX-2、ADAMTS-5、MMP-3 および MMP-13 の遺伝子発現の上昇を抑制した。また、Integrin $\alpha 5 \beta 1$ 中和抗体添加により、ANGPTL2 添加によって亢進した ERK、JNK、Akt のリン酸化は抑制され、NF- κ B、p38 のリン酸化はわずかに抑制された。

4. CTS 負荷 1 時間で ANGPTL2 遺伝子発現の有意な亢進が認められ、12 時間後まで持続した。また、CTS 負荷 24 時間後に ANGPTL2 および炎症関連因子のタンパク発現の亢進が認められた。

5. ATDC5 において、NFATc1、NFATc2 および NFATc4 と比較して、NFATc3 で有意に高い遺伝子発現を認めた。一方、NFATc1、NFATc3、NFATc4 において CTS 刺激によって遺伝子発現は有意に亢進したが、NFATc2 の遺伝子発現の変化は認められなかった。

6. CTS 刺激受容による ANGPTL2 および炎症関連因子の遺伝子発現の亢進は、FK506 の添加により有意に抑制された。

以上より、ANGPTL2 の Integrin $\alpha 5 \beta 1$ を通じた炎症惹起のメカニクスの一端が明らかとなった。また、軟骨細胞に対する CTS 刺激に伴う炎症に対する FK506 の抗炎症効果が確認された。