

学位論文題名

顎関節クローズド・ロック症例における
滑液中のマトリックスメタロプロテアーゼ活性の測定

学位論文内容の要旨

マトリックスメタロプロテアーゼ(matrix metalloproteinases: MMPs)は、細胞外基質を分解し、細胞の増殖や分化、運動性、形態形成、組織再生などを調節する酵素である。これらの酵素は、悪性腫瘍患者では腫瘍細胞から盛んに産生されることがや、慢性関節リウマチ患者では滑液中に高いレベルで検出されることから、腫瘍の浸潤や転移、関節破壊などの組織崩壊にも関与するものと考えられている。関節疾患と滑液中の MMPs との関連については、慢性関節リウマチや変形性関節症のような関節破壊性疾患の滑液中に、活性型 MMPs が高頻度で検出されることが知られている。顎関節においても、クローズド・ロック症例や変形性顎関節症の滑液中に、活性型 MMP-2, 3, 9 が検出されており、顎関節症における関節炎や骨破壊の指標として注目されてきている。しかし、これまでの報告では、MMPs 活性を定量測定し関節鏡視像や MR 像と比較したものはなく、臨床所見と比較したものがわずかに散見されるばかりで、クローズド・ロック症例における滑液中 MMPs 活性の関わりについては未だ十分な検討が行われていない。そこで、今回、MMP-2, 3, 9 活性を特異的に定量することが可能な活性測定システムを用いて、顎関節クローズド・ロック症例の滑液中 MMP-2, 3, 9 活性を測定し、これらの酵素活性と画像ならびに臨床所見、関節鏡視所見との関係について検討した。

対象は、MRI 検査を行い非復位性関節円板前方転位であることを確認したクローズド・ロック症例 54 名 58 関節である。そのうち、関節鏡視検査を行ったものは 16 名 16 関節で、対照として用いたボランティアは 6 名 6 関節である。

滑液中のタンパク量の定量には、Bradford 法を用いた Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad U.S.)を使用した。MMP-3 活性の測定には、ストロメリシン-1 (MMP-3) 活性測定キット YU-26001 (ヤガイ中央研究所, 山形) を、MMP-2, 9 活性の測定に

は、MMP-2, 9 activity assay system (Amersham Pharmacia, UK)を用いた。なお、MMP-2, 3, 9 活性の測定値については、基質 1 μ l を 1 分間で分解する酵素活性を 1 unit とし、タンパク当たりの比活性 (unit/mg protein) として算出した。

患者の臨床像については、年齢と性別、無痛最大開口量、関節痛を調査項目とし、関節痛では、開口時および咬合時、安静時における疼痛の程度を visual analog scale (VAS: 0-100)を用いて評価した。画像所見については、単純 X 線ならびにスライス幅 3mm の T1 強調矢状断面 MR 像により、関節円板の形態、骨の変化を診断し、MMPs 活性との関係を解析した。鏡視像については、滑膜炎や骨・軟骨の変化、癒着の有無や程度を診断し、滑膜炎や骨・軟骨変化、癒着を呈した関節の滑液中 MMP-2, 3, 9 活性と、対照としたボランティアの活性レベルとを比較することにより、これらの関節腔内病変と MMPs 活性との関係について解析した。

対象としたクローズド・ロック症例の MMP-2 活性レベルは、54.4~344.6 unit/mg protein(平均 146.0 unit/mg protein), MMP-3 では 0~0.097 unit/mg protein (平均 0.017 unit/mg protein), MMP-9 では 0~0.242 unit/mg protein (平均 0.468 unit/mg protein)であった。ボランティア 6 関節の MMP-2 活性レベルは、74.3~214.5 unit/mg protein(平均 141.4 unit/mg protein), MMP-3 では 0.015~0.024 unit/mg protein (平均 0.020 unit/mg protein), MMP-9 では 0.109~0.520 unit/mg protein (平均 0.226 unit/mg protein)であった。

MMPs 活性レベルと臨床像との関係では、MMP-2, 3, 9 と年齢、性別、開口量、関節痛との間に有意な関連は認められなかった。MR 像との関係については、MMP-2, 3, 9 と円板形態、MMP-2, 3 と骨変化との間に有意な相関は認められなかったが、MMP-9 は骨変化を伴う関節滑液中に高く検出された ($p=.014$)。関節鏡視像との関係については、滑膜炎が進行したもの ($p=.012$)、骨・軟骨変化 ($p=.013$)、癒着を認めたもので ($p=.026$) MMP-9 活性レベルが上昇していたが、MMP-2, -3 との間には明らかな関連は認められなかった。これらの結果は、クローズド・ロック症例において、滑膜炎や骨・軟骨の破壊、癒着と関連して MMP-9 の酵素活性レベルが上昇することを示している。

MMPs はサイトカインや起炎物質などにより産生が調節されていることが知られており、関節においては関節炎が MMPs の産生を誘発する因子の一つであると考えられている。一方、産生された MMP-9 が活性化すると細胞外基質分解能を発揮することから、MMP-9 は関節炎により産生されるばかりでなく、関節炎を誘発ないし増悪させる因子ともなっているものと考えられる。本研究で、部分的な軽度の滑膜炎を呈した

ものにおいても MMP-9 活性に上昇傾向が認められたことから、クローズド・ロック症例においても、滑膜炎が生じたことにより MMP-9 が産生ならびに活性化されるものと考えられた。また、炎症の範囲が滑膜全体におよぶ高度の滑膜炎で MMP-9 活性が著明に上昇していたことから、MMP-9 は活性が上昇するに伴って滑膜を構成する細胞外基質を広い範囲で分解し、滑膜炎を増悪させるものと考えられた。

MMP-9 は、滑膜炎を生じた滑膜内の好中球やマクロファージから産生され、活性化するとプロテオグリカンやⅢ～Ⅴ型コラーゲンなどを分解し、線維軟骨を破壊することが知られている。本研究においても、MMP-9 活性は滑膜炎ならびに骨・軟骨の損傷が観察されたもので有意に上昇していたことから、MMP-9 は活性の上昇に伴って細胞外基質破壊能を発揮し、線維軟骨や骨の破壊に関与しているものと考えられた。

本研究において、MMP-9 活性が癒着を認めたもので上昇していたことから、この酵素が癒着の形成に何らかの役割を果たしている可能性があるものと考えられる。しかし、癒着が存在する関節には滑膜炎や骨・軟骨の変化を伴うものが少なくなく、癒着の存在するもので見かけ上 MMP-9 活性が上昇した可能性を否定できず、癒着の形成に関してこの酵素が直接的な役割を果たすか否かを明らかにすることはできなかった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

副 査 教 授 井 上 農 夫 男

学 位 論 文 題 名

顎関節クローズド・ロック症例における

滑液中のマトリックスメタロプロテアーゼ活性の測定

マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)は、細胞外基質を分解し、細胞の増殖や分化、運動性などを調節する酵素で、腫瘍の浸潤や転移、関節破壊などの組織崩壊にも関与するものと考えられている。関節疾患と滑液中のMMPsとの関連については、慢性関節リウマチのような関節破壊性疾患の滑液中に、活性型MMPsが高頻度で検出されることが知られている。顎関節においても、クローズド・ロック症例や変形性顎関節症の滑液中に、活性型MMP-2, 3, 9が検出されており、顎関節症における関節炎や骨破壊の指標として注目されてきている。しかし、これまでの報告では、MMPs活性を臨床所見と比較したものがわずかに散見されるばかりで、MMPs活性を定量測定し関節鏡視像やMR像と比較したものはない。本研究は、MMP-2, 3, 9活性を特異的に定量することが可能な活性測定システムを用いて、顎関節クローズド・ロック症例の滑液中MMP-2, 3, 9活性を定量的に測定し、これらの酵素活性と画像ならびに臨床所見、関節鏡視所見との関係について検討したものである。

対象は、MRI検査を行い非復位性関節円板前方転位であることを確認したクローズド・ロック症例54名58関節である。そのうち、関節鏡視検査を行ったものは16名16関節で、対照として用いたボランティアは6名6関節である。

滑液中のタンパク量の定量にはBio-Rad Protein Assay, MMP-3活性の測定にはストロメリシン-1 (MMP-3) 活性測定キットYU-26001, MMP-2, 9活性の測定にはMMP-2, 9 activity assay system を使用し、MMPs活性の測定値については、基質1 μ lを1分間で分解する酵素活性を1 unitとし、タンパク当たりの比活性として算出した。

患者の年齢と性別、無痛最大開口量、関節痛を調査項目とし、開口時および咬合時、安静時における疼痛の程度はvisual analog scaleで評価した。画像所見については、単純X線ならびにT1強調矢状断面MR像により、関節円板の形態、骨の変化を診断し、MMPs活性との関係を解析した。鏡視像については、滑膜炎や骨・軟骨の変化、癒着の有無や程度を診断し、滑膜炎や骨・軟骨変化、癒着を呈した関

節の滑液中MMP-2, 3, 9活性と、対照としたボランティアの活性レベルとを比較することにより、これらの関節腔内病変とMMPs活性との関係について解析した。

対象としたクローズド・ロック症例のMMP-2,3,9の活性レベルは、それぞれ54.4~344.6(平均146.0), 0~0.097(平均0.017), 0~0.242(平均0.468)unit/mg proteinで、ボランティア6関節では、74.3~214.5(平均141.4), 0.015~0.024(平均0.020), 0.109~0.520(平均0.226) unit/mg protein であった。

MMPs活性レベルと臨床像との関係では、MMP-2, 3, 9と年齢、性別、開口量、関節痛との間に有意な関連は認められなかった。MR像との関係では、MMP-2, 3, 9と円板形態、MMP-2, 3と骨変化との間に有意な相関はみられなかったが、MMP-9は骨変化を伴う関節滑液中に高く検出された($p=.014$)。関節鏡視像との関係では、滑膜炎が進行したもの($p=.012$)、骨・軟骨変化($p=.013$)、癒着を認めたもので($p=.026$)MMP-9活性レベルが上昇していたが、MMP-2, 3との間には明らかな関連はみられなかった。これらの結果は、クローズド・ロック症例において、滑膜炎や骨・軟骨の破壊、癒着と関連してMMP-9の酵素活性レベルが上昇することを示している。

これまでの研究からMMPsはサイトカインや起炎物質などにより産生が調節されていることが知られており、関節においては関節炎がMMPsの産生を誘発する因子の一つであると考えられている。一方、産生されたMMP-9が活性化すると細胞外基質分解能を発揮することから、MMP-9は関節炎により産生されるばかりでなく、関節炎の誘発ないし増悪因子でもあると考えられている。本研究で、部分的な軽度の滑膜炎を呈したものにおいてもMMP-9活性に上昇傾向が認められたことから、クローズド・ロック症例においても、滑膜炎が生じたことによりMMP-9が産生ならびに活性化されるものと考えられた。また、炎症の範囲が滑膜全体におよぶ高度の滑膜炎でMMP-9活性が著明に上昇していたことから、MMP-9は活性が上昇するに伴って滑膜を構成する細胞外基質を広い範囲で分解し、滑膜炎を増悪させるものと考えられた。

MMP-9は活性化するとプロテオグリカンやIII~IV型コラーゲンなどを分解し、線維軟骨を破壊することが知られている。本研究においても、MMP-9活性は滑膜炎ならびに骨・軟骨の損傷が観察されたもので有意に上昇していたことから、MMP-9活性の上昇に伴って細胞外基質破壊能を発揮し、線維軟骨や骨の破壊に関与しているものと考えられた。