

Estrogen and TMJ cellular elements

顎関節構成細胞に対するエストロゲンの作用

－骨吸収や炎症との関わりについて－

学位論文内容の要旨

【結言】

顎関節は下顎骨および側頭骨、関節円板、関節包などから構成される。骨表面は軟骨、関節円板表面は線維性組織からなり、それ以外の関節腔内面の表層は滑膜で覆われている。滑膜細胞は顕微鏡的観察によりマクロファージ様の A 細胞と線維芽細胞様の B 細胞に分類されており、関節腔内の滑液代謝や関節腔内での病変と非常に深いかわりが示唆されている。しかしその構造や機能についてはいまだ明らかにされていない。

顎関節症は男性よりも女性に高頻度に発症することが数多くの研究により報告されている。このことはエストロゲンなどの女性ホルモンが発症に関与していることをうかがわせる。エストロゲンはエストロゲン受容体 (ERs) に結合することによりその生理活性を発現し、男女を問わず標的組織の多様な生理的機能を制御している。ER は現在のところ ER α と ER β のサブユニットが明らかにされているが、顎関節における局在の詳細は明らかにされていない。また、エストロゲンは関節リウマチの発症において重要な役割を演じていることが知られているが、顎関節症との関連性に関しての報告はほとんどない。

本研究は顎関節を構成している細胞における ER の局在とともに、それらの細胞に対するエストロゲンの作用を明らかにすることを目的として行った。

【材料と方法】

マウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞、ヒト線維芽細胞様関節滑膜細胞 HFSL 細胞およびマウス軟骨細胞 ATDC5 細胞をそれぞれ A 細胞、B 細胞、関節軟骨細胞の代用として用いた。それぞれの細胞を通常により培養し、タンパク質ならびに全 RNA を抽出した。得られたタンパク質はその発現をウエスタンブロット法により、全 RNA はさらに cDNA を合成して RT-PCR 法により mRNA の発現を検討した。最初にこれらの細胞の ER α ならびに ER β の mRNA ならびにタンパク質発現について検討した。さらに、エストロゲンとして 10^{-11} M 17 β -エストラジオールをこれらの細胞に 1、3、6、12、24 時間作用させて、破骨細胞誘導因子 (RANKL)、破骨細胞形成抑制因子 (Osteoprotegerin; OPG)、RANKL 受容体 (RANK)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF/CSF-1) および M-CSF/CSF-1 受容体 (c-fms) mRNA の発現を分析した。

【結果】

今回用いたすべての細胞において ER α ならびに ER β mRNA の発現が認められた。一方、タンパク質

レベルでは RAW264.7 細胞においては ER α の発現は認められなかった。さらにこれらの細胞に 17- β -エストラジオールを作用させるとすべての細胞で ER β mRNA の発現は経時的に増加したが、ER α mRNA は変化しなかった。

ATDC5 細胞ならびに HFSL 細胞においては RANKL ならびに OPG mRNA の発現が認められたが、RAW264.7 細胞ではその発現は認められなかった。ATDC5 細胞ならびに HFSL 細胞に 17- β -エストラジオールを作用させると OPG mRNA の発現は経時的に増加したが、RANKL mRNA の発現は完全に消失した。また、破骨細胞に分化可能な RAW264.7 細胞に対してエストロゲンを作用させると RANK mRNA の発現が増加した。一方、すべての細胞に *c-fms* mRNA が発現していた。また、ATDC5 細胞と HFSL 細胞においては M-CSF/CSF-1 mRNA が発現していたが、RAW264.7 細胞ではその発現は認められなかった。さらにこれらの細胞における *c-fms* ならびに M-CSF/CSF-1 mRNA の発現はエストロゲンによりいずれも増加した。

【考察】

骨芽細胞や間質細胞などの支持細胞に発現する RANKL は破骨細胞前駆細胞に存在する RANK に結合して、破骨細胞の分化・活性化を促進する。OPG は RANK のデコイ受容体であり、真の受容体である RANK への結合を阻害する。エストロゲンは ATDC5 細胞ならびに HFSL 細胞における RANKL の発現を減少させ、OPG の発現を増加させたことから、破骨細胞の分化・活性化を阻害し、骨吸収を抑制すると考えられる。一方、エストロゲンは RAW264.7 細胞における RANK の発現を促進させた。この結果はエストロゲンによる RANKL 発現減少の補償機構として作用している可能性が考えられる。また、RAW264.7 細胞に ER α タンパク質が発現していないことから、エストロゲンによる RANK mRNA の発現の増加は ER β を介しているものと推測される。さらに、RAW264.7 細胞において ER α の mRNA は発現しているにもかかわらず、タンパク質の発現が認められないのはタンパク質合成過程で何らかの抑制が生じていることが推測される。

一方、M-CSF/CSF-1 のノックアウトマウスは破骨細胞形成抑制による大理石病を生ずることが知られている。また、破骨細胞前駆細胞に発現している *c-Fms* を介した M-CSF/CSF-1 のシグナルは RANK の発現を促進させることが報告されている。本研究においてエストロゲンを ATDC5 細胞と HFSL 細胞に作用させると M-CSF/CSF-1 の発現が増加し、さらに RAW264.7 細胞では RANK の発現が増加した。実際の関節腔においては軟骨細胞、A 細胞および B 細胞が共存しており、以上の結果から、女性においては B 細胞における RANK の発現がさらに増加していることが予想される。咬合異常や悪習癖などにより顎関節に加わる負荷が増大することによって局所の炎症が惹起され、RANKL の産生が増加すると関節腔内の破骨細胞が分化・活性化して骨破壊を生ずる可能性が示唆される。

M-CSF/CSF-1 は血球系幹細胞の増殖、延命の他に成熟マクロファージや顆粒球への分化に関与することが知られている。エストロゲンを作用させると軟骨細胞や線維芽細胞様滑膜細胞における M-CSF/CSF-1 の発現が増加することによりマクロファージのコロニー化を促進するものと考えられる。マクロファージは病原微生物の認識、異物の排除などに関与する免疫細胞であり、NO やインターロイキン 1 β (IL-1 β)、腫瘍壊死因子 α (TNF- α) などのサイトカイン、そしてマトリックスメタロプロテイン 9 (MMP-9) を始めとした基質分解酵素などの種々の因子を産生してこれらの多様な機能を司っている。マクロファージにより産生されるこれらの因子は病原微生物などの異物に障害を与えるばかりでなく、正常な周囲組織に対しても炎症などの有害な刺激を及ぼす。それ故、ストレスなどの他の要因が存在するとエストロゲンによるマクロファージのコロニー化は女性において滑膜炎などの顎関節病変を生じさせる一因となりうることが予想される。本研究においてはそれぞれの細胞を別々に培養して実験を行っ

たが、より in vivo に近い環境で検討するにはこれらの細胞を共存させて実験する必要がある。また、実際の顎関節腔ではこれらの細胞ばかりでなく、リンパ球などの他の細胞も存在しており、複雑な環境になっていることが予想される。さらなる研究により顎関節症が女性に多く発症する科学的な説明を試みることは顎関節症の予防と治療の新たな指針を提供することになると思われる。

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 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

Estrogen and TMJ cellular elements

顎関節構成細胞に対するエストロゲンの作用

－骨吸収や炎症との関わりについて－

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。審査論文の概要は、以下の通りである。

顎関節症は男性よりも女性に高頻度に発症する。このことはエストロゲンなどの女性ホルモンが発症に関与していることを伺わせるが、その詳細は明らかではない。エストロゲンはエストロゲン受容体 (ER) に結合することによりその生理活性を発現する。ER には ER α と ER β のサブユニットがあるが、顎関節における局在は明らかではない。本研究の目的は顎関節構成細胞における ER の局在と、それらの細胞に対するエストロゲンの作用を明らかにすることである。

実験には、顎関節滑膜を構成する A 細胞と B 細胞、および関節軟骨細胞それぞれの代用としてマウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞、ヒト線維芽細胞様関節滑膜細胞 HFSL 細胞およびマウス軟骨細胞 ATDC5 細胞を用いた。それぞれの細胞を通法により培養し、タンパク質ならびに全 RNA を抽出した。得られた全 RNA は cDNA を合成して RT-PCR 法により mRNA の発現を検索し、タンパク質の発現はウエスタンブロット法により検討した。

最初に ER α と ER β の発現を検討した。その結果、3 種類全ての細胞に ER α と ER β mRNA の発現が確認されたが、タンパク質レベルでは RAW264.7 細胞に ER α の発現は認められなかった。次に、破骨細胞誘導因子 (RANKL)、破骨細胞形成抑制因子 (Osteoprotegerin; OPG)、RANKL 受容体 (RANK)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF/CSF-1) および M-CSF/CSF-1 受容体 (*c-fms*) mRNA の発現を検討した。HFSL 細胞と ATDC5 細胞には RANKL と OPG mRNA が発現しており、エストロゲンにより OPG mRNA の発現は経時的に増加したが、RANKL mRNA の発現は逆に消失した。RAW264.7 細胞では RANK mRNA が発現しており、エストロゲンにより発現は増加した。全ての細胞に *c-fms* mRNA の発現が認められ、また HFSL 細胞と ATDC5 細胞では M-CSF/CSF-1 mRNA も発現していた。また、これらの細胞における *c-fms* ならびに

M-CSF/CSF-1 mRNA の発現はエストロゲンにより増加した。

骨芽細胞や間質細胞などに発現する RANKL は破骨細胞前駆細胞に存在する RANK に結合して、破骨細胞の分化・活性化を促進する。OPG は RANK のデコイ受容体であり、真の受容体である RANK への結合を阻害する。本研究において、エストロゲンが HFSL 細胞と ATDC5 細胞で RANKL の発現を減少させ、OPG の発現を増加させたことは、エストロゲンが破骨細胞の分化・活性化を阻害し、骨吸収を抑制することを示している。RAW264.7 細胞における RANK の発現促進は、エストロゲンによる RANKL の発現減少を補償するものと思われる。

マクロファージは病原微生物の認識や異物の排除などに関与する免疫細胞で、NO や IL-1 β , TNF- α など、種々の因子を産生してその多様な機能を司っている。これらの因子は病原微生物などに障害を与えるばかりでなく、慢性的あるいは過剰に産生された場合には、正常な周囲組織に対しても炎症などの有害な刺激を及ぼす。M-CSF/CSF-1 はマクロファージの分化を促進することから、本研究においてエストロゲンが HFSL 細胞や ATDC5 細胞で M-CSF/CSF-1 の発現を亢進し、RAW264.7 細胞で M-CSF/CSF-1 の受容体をコードする *c-fms* の発現を増加させたことは、実際の顎関節において、エストロゲンがマクロファージの分化や活性化を促進させることを示唆する。ストレスなど、他の要因が存在する場合に、エストロゲンによるマクロファージの分化・活性化が重なって、顎関節症を発症するものと考えられる。このように顎関節症の発症にエストロゲンが関わっていることが、本疾患が女性に好発する一因と考えられる。

10^{-11} M エストロゲンにより、すべての細胞で ER β mRNA の発現が経時的に増加したが、ER α mRNA には変化がみられなかったことから、エストロゲンの作用は ER β を介して行われるものと考えられた。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。

主な質問事項は、

- 1) RAW264.7 細胞の性格・特徴は、
- 2) エストロゲンの至適濃度は、
- 3) 顎関節症発症の分子メカニズム、
- 4) 顎関節を構成する細胞の特徴・機能は、等であった。

いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、エストロゲンが破骨細胞の分化・活性化を阻害することにより骨吸収を抑制すること、マクロファージの分化・活性化を促進することにより顎関節症の発症に関与すること、ならびにエストロゲンの作用は ER β を介して行なわれることを明らかにしたことが高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。