

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：33703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20573

研究課題名(和文)変形性顎関節症における幹細胞の局在と顎関節修復機構の解明

研究課題名(英文)Localization of stem cells in osteoarthritis of the temporomandibular and joint repair mechanism

研究代表者

安田 忠司 (Yasuda, Tadashi)

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号：00410473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：老化促進マウス(SAM)のうち変形性顎関節症を自然発症するSAMP8を供試しBrdU(5-bromo-2'-deoxyuridine)を一定期間投与することにより顎関節部にラベルを保持し続けた細胞(LRCs)の局在を調べた結果、関節包、靭帯関節円板に局在した。間葉系幹細胞マーカーであるSTRO-1、CD146抗体を用い蛍光免疫二重染色を施しLRCsとするのを確認した。SAMP8の顎関節は軟骨表面が粗造になり下顎頭の形態変化を認めた。また下顎枝の長さが対照群であるSAMR1と比較し減少した。顎関節症モデルより、STRO-1、CD146抗体陽性細胞とLRCsは対照群と比較し有意に減少した。

研究成果の概要(英文)：Senescence-Accelerated Mouse mice (SAM), SAMP 8 spontaneously develops osteoarthritis of the osteoarthritis, and the divided cells are labeled by administering BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) for a certain period, After examining the localization of cells (LRCs) that kept labels in the temporomandibular joint after the administration period (2, 3 months), it was localized in joint capsule and ligament joint disc. In addition, it was confirmed that fluorescent immuno double staining was carried out using LRCs using the mesenchymal stem cell marker STRO-1, CD 146 antibody. In the temporomandibular joint of SAMP 8, the cartilage surface roughened and morphology of the mandibular head was observed. The length of the mandibular branch decreased as compared with the control group SAMR1. From the TMJ model, STRO-1, CD 146 antibody-positive cells and LRCs significantly decreased compared with the control group.

研究分野：顎関節疾患

キーワード：顎関節 幹細胞 老化促進マウス

1. 研究開始当初の背景

応募者はこれまで顎関節の成長発育、機能維持に関わる研究を続けこれまでに軟骨細胞特異的インディアンヘッジホッグ(Ihh)ノックアウトマウスの下顎頭の形態変化を解剖組織学、組織形態計測学および骨・軟骨関連遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法により検索した。その結果、成長期マウスにおいて Ihh は前肥大軟骨細胞層 (Ihh-expressing chondrocytes) に認められ、種々の細胞増殖に関与する PTHrP の発現が下顎頭軟骨表層部で検出されたが加齢に伴い Ihh と PTHrP の発現が減少し Histone H4C(細胞増殖マーカー)および Type collagen(幼若軟骨細胞マーカー)の発現も低下した。野生型にて Ihh は軟骨各層にシグナルを放出し、前軟骨細胞 (Chondroprecursors) で Sox9 (軟骨細胞分化誘導因子)、Runx2(骨芽細胞分化誘導因子)、Osterix(骨形成転写因子)の発現を制御していた。このノックアウトマウスは Ihh シグナルがみられずこれら各細胞層で通常発現が確認されている Aggrecan, Col1 も発現の減少があった。図 1 に Ihh が下顎頭軟骨各細胞層に影響する発現パターンを示す(業績 3)。また最近の応募者の研究はヘパラン硫酸(HS)の硫酸基修飾酵素である Glucosaminyl

N-deacetylase/N-sulfotransferase (NDST) の 1 つのアイソフォームである NDST1 の顎関節に与える影響について報告した。重度の表現型では頭蓋骨、下顎頭、下顎骨の形成はみられず、中等度の表現型では左側下顎頭の高さは減少しているものの右側下顎頭は欠損しており、下顎頭の growth plate は機能不全にあり表層(Polymorphic layer)は厚くなっており骨化の亢進がみられた。このように顎関節の成長、発達について研究を進めてきた。さらに発展させるために本研究では顎関節における組織幹細胞の探索と制御機構

を解明する。

2. 研究の目的

変形性顎関節症は加齢に伴う下顎頭軟骨細胞の細胞外環境の変化や過剰な生体力学的荷重などが誘因となり発症する。その病態には下顎頭軟骨細胞の変性が指摘されており、加齢的变化や軟骨変性に陥った軟骨組織ではプロテオグリカンなどの軟骨基質の産生が低下することが報告されている。応募者は、これまで顎関節の形態形成について報告した。さらにこれまでの研究を進展させるため本研究は損傷した顎関節の再生に重要であると考えられる組織幹細胞の探索と顎関節修復機構の解明をすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) マウス顎関節における組織幹細胞の局在の探索を胎生期ラベリング法を用いて組織学的に解析する。2) 顎関節症モデルによる顎関節の組織学的変化と組織幹細胞の動態を免疫染色を用いて解析する。3) 下顎頭軟骨部の損傷後の治癒過程の検討を器官培養をして免疫染色と *in situ* hybridization を用いて解析する。4) SDF-1 (stromal cell-derived factor-1)、BMP 刺激による顎関節損傷後の治癒過程を器官培養をして免疫染色と *in situ* hybridization を用いて解析する。

申請者はこれまで顎関節の成長、発達に重要な役割をはたす分子についてそのメカニズムについて研究を行ってきた。本研究では顎関節における組織幹細胞の探索と顎関節修復機構を解明する。

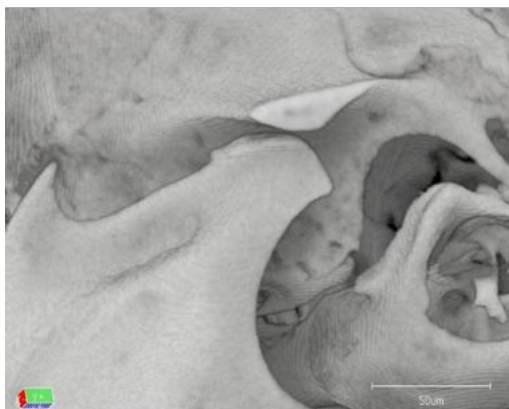
4. 研究成果

老化促進マウス(SAM)のうち変形性顎関節症を自然発症する SAMP8 を供試し BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine)を一定期間投与することにより分裂した細胞をラベルし、一定期間の無投与期間後(2, 3ヶ月)顎関節部にラベルを保持し続けた細胞(LRCs)の局在を調べた結果、関節包、靭帯関節円板に局在した。また間葉系幹細胞マーカーである STRO-1、

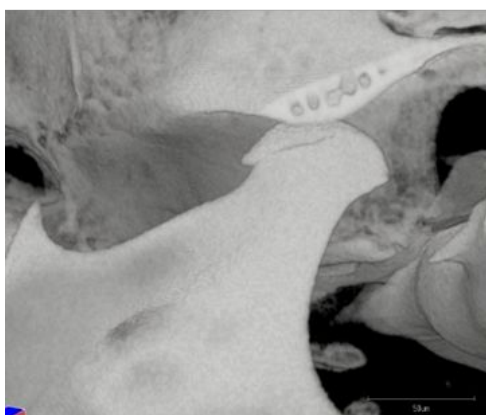
CD146 抗体を用い蛍光免疫二重染色を施し LRCs とするのを確認した。マイクロ CT の結果から SAMP8 の顎関節は軟骨表面が粗造になり下顎頭の形態変化を認めた。また下顎枝の長さが対照群である SAMR1 と比較し減少した。顎関節症モデルより、STRO-1、CD146 抗体陽性細胞と LRCs は対照群と比較し有意に減少した。以上の結果から変形性顎関節症の軟骨層は幹細胞が関与することが示唆された。

顎関節のマイクロ CT 像

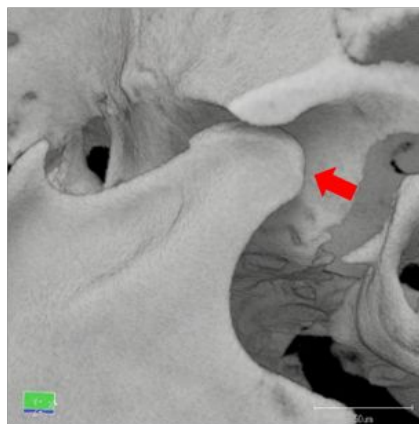
SAMR1 4M cont



SAMR1 4M milling



SAMP8 4M non treat



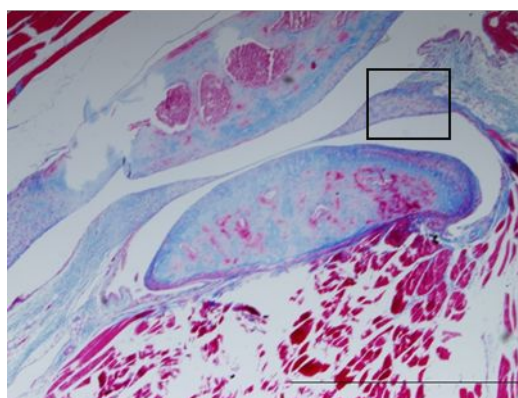
SAMP8 4M Milling



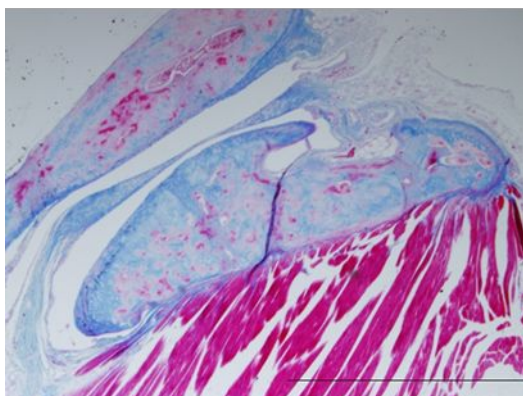
実験群である SAMP8 は関節頭の変形し形態変化を認めた。(矢印)

顎関節組織学的所見

SAMR1milling



SAMP8milling



実験群は対照群と比較し下顎頭の陥没を認めた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Tadashi Yasuda Takumi Sato

Muenke syndrome Mutation, FgfR3P244R, causes TMJ Defects The 5th Asian Academic Congress for TMJ 2017.10.15

〔図書〕(計 1 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田忠司 (YASUDA Tadashi)

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号: 00410473

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()