

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21390

研究課題名(和文)筋・腱・骨 複合組織再生へ向けた基礎的研究：動力機能を獲得するメカニズムの解明

研究課題名(英文)Developmental mechanism of muscle-tendon-bone complex in the craniofacial region.

研究代表者

山本 将仁 (Yamamoto, Masahito)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：90733767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：軟口蓋における口蓋腱膜、蝶形骨翼状突起、口蓋帆帳筋が滑車構造(筋-腱-骨複合体)をどのように形成するのかを明らかにするために本研究をおこなった。口蓋帆帳筋と口蓋腱膜はマウスの胎生16.5日においてはじめて結合し、この同時期に蝶形骨翼状突起は急成長し、同部における破骨細胞数も有意に増加した。以上より、口蓋帆帳筋と口蓋腱膜が結合する時期に、蝶形骨翼状突起が急成長することが分かった。したがって、筋と腱が結合することにより開始した筋収縮のメカニカルストレスが、骨の成長を促すことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was performed to investigate how the palatine aponeurosis, medial pterygoid process (MPP) of the sphenoid bone, and tensor veli palatini (TVP) muscle form the pulley: muscle-tendon-bone complex. At E14 and 14.5, ALP showed a reaction throughout the MPP. The col 11-positive area expanded until E16.5, but it was markedly reduced at E17. The TVP initially contacted with the palatine aponeurosis at E16.5. The major axis and width of the MPP and the number of TRAP-positive osteoclasts were significantly increased as the TVP and palatine aponeurosis joined. Therefore, in addition to the tissue units: muscle, tendon, and bone, the interaction in organogenesis promotes rapid growth of the pulley: muscle-tendon-bone complex.

研究分野：発生学

キーワード：筋-腱-骨複合体 頭部 マウス

1. 研究開始当初の背景

運動器とは、筋、骨、軟骨といった主要組織が腱・靭帯で強固に結びつくことによって動力機能を得るもので、これまで、筋、腱、骨、軟骨といった組織単体に対する研究は発生・再生の両面から強力に進められてきた。しかし、筋-腱-骨複合体の組織構築発生・分化メカニズムが長い間不明のままであったため、それら複数組織がいかに一つの機能的な組織を作り上げるかという命題に対して、未だ十分な仮説すら提示されていない。

顎顔面領域で舌や口腔底部、下顎周囲の腫瘍により下顎骨を切除した症例は、下顎の左右対称性が失われ、機能時にきわめて不安定な運動様相を呈する。現在、切除された下顎骨はチタンプレートと自家骨移植の併用などにより再建手術が行なわれているが、切離した筋と骨の再付着ができず、咀嚼機能障害などの術後合併症に悩む患者が後を絶たない。この問題を解決するために、顎顔面領域における筋付着部の再生に向けた筋-腱-骨複合体発生・組織構築メカニズムの基礎研究を進める必要がある。

2. 研究の目的

顎顔面領域に発生する筋、腱、骨組織がそれぞれ結合し、動力機能を得るメカニズムを解析する。

3. 研究の方法

(1) 組織連続切片による軟口蓋の形態学的観察

胎生(E)14~17日齢におけるマウス胎児を摘出後、通法に従いパラフィン包埋を行ない、5 μmの組織連続切片を作製した。それらの切片をアザン染色し、軟口蓋とそれを構成する筋、腱、骨原基の形態学的観察を行った。

(2) 免疫組織化学的染色およびALP酵素活性染色による軟口蓋を構成する運動器の組織構築過程

形態学的観察にて作製した組織連続切片の一部を用いて、口蓋帆帳筋ならびに蝶形骨翼状突起に対する免疫組織化学的染色を行なった。一次抗体には抗 desmin 抗体(Abcam, Cambridge, UK)、抗 Collagen Type II 抗体(Abcam)を用いた。二次抗体には、ABC キット(Funakoshi)を用い、Impact DAB(Funakoshi)により可視化した。また、ALP-staining kit (Primary Cell)により蝶形骨翼状突起のALP活性を観察した。

(3) 軟口蓋の破骨細胞の分布

形態学的観察で作成した切片の一部を用いて、蝶形骨翼状突起内の破骨細胞の分布をTRAP-staining kit(Primary Cell)を用いることにより、経時的に観察した。

(4) 蝶形骨翼状突起の組織形態計測

IMAGE-PRO®PLUS (Media Cybernetics)を用いて、E14~17日の蝶形骨翼状突起の長径と幅径を経時的に計測した。

4. 研究成果

(1) 組織連続切片による軟口蓋の形態学的観察

E14日において、2次口蓋は癒合しておらず、左右の口蓋突起が舌上部にて水平に位置していた。翼状突起内側板は間葉細胞凝集として観察され、このすぐ外側には口蓋帆帳筋が認められた。しかしながら、口蓋腱膜は観察されなかった。E14.5日における口蓋突起は、癒合直前であった。この口蓋突起の伸長に伴い、口蓋帆帳筋は内側へ牽引されるように成長した。翼状突起の基部に骨様構造が観察された。E14日同様に口蓋腱膜は観察されなかった。

E15.5日において、はじめて口蓋突起は癒合した。軟口蓋正中では幼弱な間葉系細胞の凝集が出現した。翼状突起内側板では基部が石灰化し、中央部には肥大軟骨が現れた。また、口蓋帆帳筋が翼状突起内側板よりも内側に伸長した。

E16.5日において、軟口蓋中央より発生した口蓋腱膜が左右の口蓋帆帳筋に結合した。翼状突起内側板には、外面と内面に骨襟が出現した。さらに中央部における肥大軟骨の数が増加した。また口蓋腺がはじめて観察された。E17日において、口蓋腱膜はより明確に観察された。翼状突起は中央部の肥大軟骨が消失し、血液成分の豊富な初期の骨幹が形成された。軟骨細胞は下部にのみ観察された。

(2) 免疫組織化学的染色およびALP酵素活性染色による軟口蓋を構成する運動器の組織構築過程

① 口蓋帆帳筋と口蓋腱膜の付着過程

E15.5日では、desminは口蓋帆帳筋の筋線維全体に発現しており、特に筋の両端に集積していた。E16.5日において、口蓋帆帳筋の大きさは飛躍的に成長し、口蓋腱膜と口蓋帆帳筋が初めて接触した。口蓋腱膜が口蓋帆帳筋内へ陥入しており、筋線維全体に desmin の強い集積を認めた。

E17日において、口蓋腱膜は口蓋帆帳筋内まで存在しており、腱周囲およびその他の

筋線維に desmin が強く集積していた。

② 翼状突起内側板の発生と破骨細胞の出現

E14日において、翼状突起内側板は2型コ

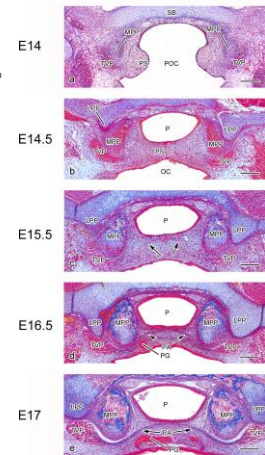


図1: 軟口蓋の発生

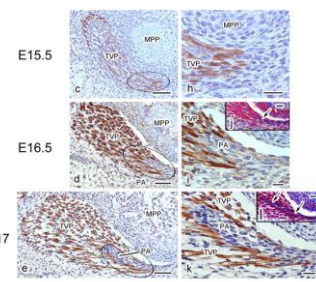


図2: 口蓋帆帳筋と口蓋腱膜の結合過程

ラーゲン、破骨細胞を発現していなかった。しかし ALP は内側板の幼弱な間葉細胞に強い反応を示した。E14.5 日において、内側板は初めて 2 型コラーゲンを発現した。ALP は内側板基部にある骨様構造の周囲に強い反応を示した。E15.5 日において、内側板は肥大軟骨周囲の ECM に 2 型コラーゲンを発現した。ALP は翼状突起下部の間葉細胞、将来骨嚢となる部位、肥大軟骨の核に強い反応を示した。一方、酒石酸フォスファターゼ陽性の破骨細胞は初めて内側板内部に発現した。E16.5 日において、内側板に最も多くの肥大軟骨が観察された。そのため肥大軟骨周囲の ECM が豊富であり、広範囲に 2 型コラーゲンが発現した。ALP は骨嚢の周囲に強い反応を示し、石灰化した翼状突起基部や肥大細胞の核にも若干の反応を示した。一方、破骨細胞は翼状突起中央部に限局して認められた。これらの破骨細胞は多核を示した。E17 日において、翼状突起の肥大軟骨は下部にのみ観察された。そのため 2 型コラーゲンの発現は翼状突起下部に限局していた。ALP は翼状突起内に形成された骨幹の周囲と下部に強く反応していた。破骨細胞は翼状突起骨幹部の肥大軟骨を貪食するため広く分布していた。これらの破骨細胞は多核であった。

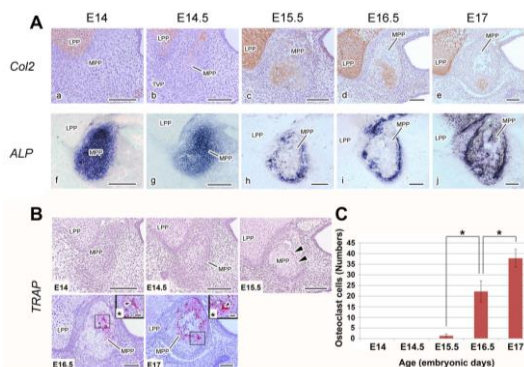


図 3: 翼状突起内側板の発生と破骨細胞の出現

(3) 蝶形骨翼状突起の組織形態計測

翼状突起内側板の長径は、E14 から 15.5 日までほとんど変化がなかった。しかしながら、E15.5 日から 16.5 日の間に有意に増加していた。一方幅径は、E14 日から 16.5 日まで緩やかに増加傾向を示していた。しかしながら、翼状突起内側板の幅径が E16.5 日から 17 日の間に急激に成長したことから、この 2 ステージでは有意に増加していた。

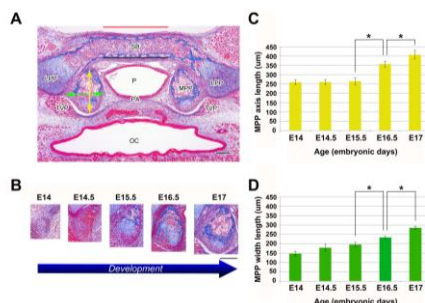


図 4: 蝶形骨翼状突起の組織形態計測

本研究により、口蓋帆帳筋と口蓋腱膜が結合する時期に、蝶形骨翼状突起が急成長することが分かった。したがって、筋と腱が結合することにより開始した筋収縮のメカニカルストレスが、骨の成長を促すことが示唆された。

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 1 件)

① Nara M, Kitamura K, Yamamoto M et al.
Developmental mechanism of muscle-tendon-bone complex in the fetal soft palate. Arch Oral Biol. (2017) 82:71-78.

[学会発表] (計 2 件)

① 山本 将仁 他
「下顎頭における外側翼突筋附着メカニズムの解明」第 105 回日本解剖学会関東支部学術大会 2017 年 11 月 18 日 東京歯科大学水道橋キャンパス

② 山本 将仁 他
「軟口蓋滑車構造形成における組織間作用の解明」第 122 回日本解剖学会・全国学術大会 2017 年 3 月 28 日 長崎大学坂本キャンパス

[図書] (計 0 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

山本将仁 (YAMAMOTO MASAHIITO)
東京歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：90733767

(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 ()