

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06820

研究課題名(和文) 下顎頭軟骨初期形成を制御する因子の探求

研究課題名(英文) Investigation for factors regulating initial formation of mandibular condylar cartilage

研究代表者

柴田 俊一 (SHIBATA, Shunichi)

北海道医療大学・歯学部・客員教授

研究者番号：80187400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は下顎頭軟骨の初期形成に関連する特異的な因子を網羅的に検索し、下顎頭軟骨形成への役割を明らかにする事を目的として行われた。マウス胎仔でSox9発現前の変化が顕著な遺伝子の網羅的検索をマイクロアレイで検索した結果、多くの候補遺伝子が確認された。しかしながら細胞成長因子に関してはin vivoでの発現を検索したが十分な結果は得られなかった。そこでバックアップとして計画していた細胞外基質、特にsyndecan familyや小型ロイシン含有プロテオグリカンの発現パターンの検索などを行い、下顎頭軟骨に関連する論文を8報発表できた。したがって本研究は下顎頭軟骨研究の進捗に貢献できたと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

下顎頭軟骨は顎関節の一員で関節軟骨として働いているとともに、顎顔面の一つの成長中心であり成長軟骨としての性質も持っている。したがってその形成過程を検索することは発生学のみならず、口腔外科、小児歯科、歯科矯正科など歯科臨床にとっても非常に重要であるといえる。本研究では初めに下顎頭軟骨の初期形成に関連する因子の網羅的検索を行った。その後の解析で当初の目的に叶う決定的な因子は発見できなかったものの、形成過程に関連する細胞外基質成分の遺伝子解析を行った結果、下顎頭軟骨に関する論文を8報発表できた。以上のことから、本研究は下顎頭軟骨研究を通して臨床も含めた歯科医学の発展に貢献できたと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to search for specific factors involved in roles in the primary formation process of mandibular condylar cartilage. As the first project, we tried global analysis of mouse genes which showed remarkable changes of expression after Sox9 gene expression, and got several candid genes including growth and transcription factors. However, we could not get good results related to these factors in in vivo studies using the in situ hybridization method. Then we focused on changes of extracellular matrix related to the primary formation of mandibular condylar cartilage including syndecan family and small leucine-rich proteoglycans (SLRPs). This type of experiment had been planned as one of the back-up experiments. In practice, we could publish eight papers directly related to the mandibular condylar cartilage. Because of the above points, we are convinced that this study could be contributed to the progress of the research field of mandibular condylar cartilage.

研究分野：解剖学

キーワード：下顎頭軟骨 細胞外基質 遺伝子発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

下顎頭軟骨は関節軟骨と成長軟骨両者の性質を有し、顎関節の一員であるとともに顎顔面の一つの成長中心としても機能しているため、歯科臨床の見地からも非常に重要な構造物であることが知られていた。研究代表者は下顎頭軟骨は発生学的には代表的な「二次軟骨」に分類され、この軟骨が下顎骨の骨膜様組織から形成されること、軟骨の初期形成過程には Sox9 や Runx2 を初めとする骨・軟骨形成に関与する転写因子が関与することを明らかにしてきた。しかしながら一般的な転写因子の発現をさらに制御する因子については不明な状況であった。

2. 研究の目的

(1)本研究では転写因子等一般に知られている因子の発現をさらに制御する因子、すなわち下顎頭軟骨の初期形成に関連する本質的な因子を網羅的に検索し、候補分子の解析を通じてそれらの初期下顎頭軟骨形成への具体的な役割を明らかにするとともに、二次軟骨形成全体のメカニズムを明らかにする事を目的としていた。

(2) 候補遺伝子の解析がうまくいかない場合は、骨軟骨形成に関与する細胞外基質成分の遺伝子発現をバックアップの研究目的として設定した。

3. 研究の方法

(1)マウス下顎頭軟骨原基の形成は胎齢 13.5 日の Sox9 の発現誘導が契機となるので、それ以前の胎齢 13.0 日の下顎骨原基の遠心部位と発現後の胎齢 14.0 日の下顎頭軟骨原基を実体顕微鏡下で摘出し、それぞれから total RNA を抽出し、GeneArray Mouse 2.0 ST を用いた、網羅的遺伝子発現解析にて、両者間で遺伝子発現強度に差がある遺伝子をピックアップし、候補遺伝子とする。その後、データマイニングにて候補遺伝子からさらに転写因子あるいは成長因子とそのレセプターに焦点を絞り該当分子に注目する。下顎頭軟骨はアルカリホスファターゼ陽性の骨膜様組織から形成されるため、候補分子を選択する際にアルカリホスファターゼ活性との関連を考慮する。

(2)細胞外基質成分として骨、軟骨形成に関与すると言われているヘパラン硫酸プロテオグリカンである syndecan family や small leucine-rich proteoglycan (SLPGs)として知られる decorin, biglycan あるいは軟骨細胞分化に関連するとされる matrix metal protease (MMPs)の下顎頭軟骨形成における遺伝子発現を in situ hybridization 方法で検索する。

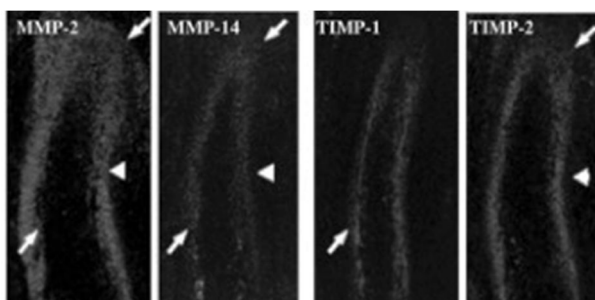
4. 研究成果

(1) Sox9 発現前後で顕著な発現変化を示す遺伝子の網羅的検索

マイクロアレイによる解析の結果、Sox9 発現後に 2 倍以上発現が増加した遺伝子が 40 種類以上検索された。特に成長因子と関連する IGFBP-7 に焦点を当て in situ hybridization 法で in vivo での発現を検索したが良好な結果は得られなかった。これは発現絶対量が低く、検出感度に至らないためと考えられた。

(2)下顎頭軟骨形成過程における MMP, TIMP の発現

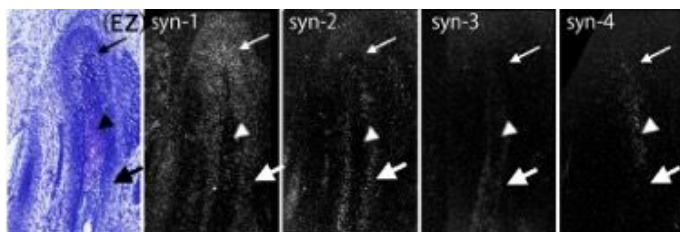
発現が増加した因子の一つに MMP-9 があった。これは骨、軟骨細胞分化に関連すると言われている Matrix metalloproteinase (MMP) の一つであり、この分子を含む MMP ファミリーと、そのインヒビターである TIMP ファミリーの下顎頭軟骨形成過程における遺伝子発現を in situ hybridization と Real time PCR で検索した。その結果、MMP-2 と TIMP-2 が下顎頭軟骨の軟骨膜の外層、MMP-14 と TIMP-1 はその内層に強く発現する事がわかり、これらの分子が初期下顎頭軟骨形成に深く関連している事が明らかになった。また MMP-9 はおもに破骨細胞に発現が認められ、軟骨形成後のモデリングに関連していると考えられた(参考文献 1)。



E16 下顎頭軟骨における MMP, TIMP の発現

(3) 下顎頭軟骨形成過程における syndecan family の発現

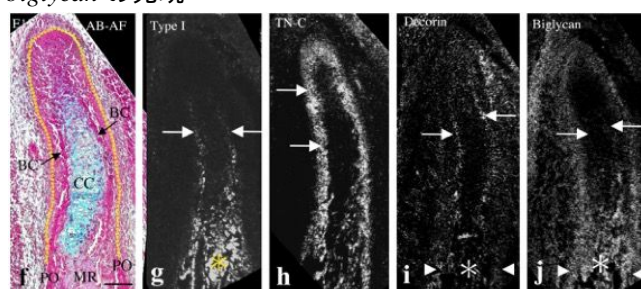
Syndecan family はヘパラン硫酸プロテオグリカンに分類され細胞膜に存在する分子で, syndecan1-4 がクロニングされている。これらの分子の遺伝子の下顎頭軟骨形成過程における発現を *in situ* hybridization と Real time PCR で検索した。その結果, *syndecan-1* は E14.0 の下顎頭軟骨原基および E15.0 の下顎頭軟骨形成後は軟骨膜と Embryonic zone に発現し、軟骨内では発現が低下する事、*syndecan-2* は主に感骨膜に発現する事が明らかとなった。一方、*syndecan-4* は形成された軟骨内に発現が認められ、形成が進むにつれ肥大軟骨細胞では発現が減少していた。また比較対象として脛骨発生過程におけるこれらの分子の遺伝子発現を検索したところ、下顎頭軟骨と同様な発現様式も見られたが、*syndecan-3* が肥大軟骨細胞に発現する等異なった発現様式も確認された。以上のことから syndecan family が下顎頭軟骨形成に重要な役割を演じている事が明らかとなった (参考論文 2)。



E15 下顎頭軟骨における *syndecan* family の発現

(4) 下顎頭軟骨形成過程における *decorin*, *biglycan* の発現

Decorin, biglycan は small leucine -rich proteoglycan (SLPGs)に分類される細胞外基質成分である。これらの分子の遺伝子の下顎頭軟骨形成過程における発現を *in situ* hybridization で検索した。その結果, *decorin* も *biglycan* も下顎頭軟骨周囲に形成される bone collar の骨芽細胞に強い発現が認められたが、その発現パターンは異なっていた。すなわち、*decorin* は *type I collagen* と同じ発現パターンを示し、形成初期の bone collar の骨芽細胞に発現が認められたのに対し、*biglycan* は少し形成が進んだ bone collar の骨芽細胞に発現が認められ、両者は bone collar 形成過程に関し異なった役割を演じていることが明らかとなった。また下顎頭軟骨下部の一次海綿質においても、同様に骨内膜側と骨膜側で異なった発現パターンを示した (参考文献 3)。



E16 下顎頭軟骨における *decorin*, *biglycan* の発現

形成過程に関し異なった役割を演じていることが明らかとなった。また下顎頭軟骨下部の一次海綿質においても、同様に骨内膜側と骨膜側で異なった発現パターンを示した (参考文献 3)。

1. Takahashi M., Fujikawa K., Angamma R., Shibata S. An *in situ* hybridization study of *MMP-2*, *-9*, *-13*, *14*, *TIMP-1*, and *-2* mRNA in fetal mouse mandibular condylar cartilage as compared with limb bud cartilage. *Gene Expression Patterns* 32: 1-11, 2019.
2. Fujikawa K., Shibata S., Nakamura M. An *in situ* hybridization study of the *syndecan* family in the developing condylar cartilage of fetal mouse mandible. *Anatomical Record* 304: 559-569, 2021.
3. Randilini A., Fujikawa K., Shibata S. An *in situ* hybridization study of *decorin* and *biglycan* mRNA in mouse osteoblasts *in vivo*. *Anatomical Science International* 96:265-272, 2021.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shibata S, Takahashi M, Shibui T, Takechi M, Irie K	4. 巻 in press
2. 論文標題 An immunohistochemical study of matrix components in primary and secondary cartilages of embryonic chick skull	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2023.05.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Funato N	4. 巻 10
2. 論文標題 Craniofacial phenotypes and genetics of DiGeorge syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jdb10020018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujikawa K, Nonaka N, Wang X, Shibata S	4. 巻 97
2. 論文標題 An in situ hybridization study of syndecan family during the late stages of developing mouse molar tooth germ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anatomical Science International	6. 最初と最後の頁 358-368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12565-022-00647-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 柴田俊一	4. 巻 88
2. 論文標題 軟骨内骨化における肥大軟骨細胞の運命 - 特に下顎頭軟骨について -	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 口腔病学会雑誌	6. 最初と最後の頁 39 - 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Randilini A, Fujikawa K, Shibata S	4. 巻 96
2. 論文標題 An in situ hybridization study of decorin and biglycan mRNA in mouse osteoblasts in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anatomical Science International	6. 最初と最後の頁 265-272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12565-020-00588-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujikawa K, Shibata S, Nakamura M	4. 巻 304
2. 論文標題 An in situ hybridization study of the syndecan family in the developing condylar cartilage of fetal mouse mandible	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anatomical Record	6. 最初と最後の頁 559-569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ar.24483	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Randilini A, Fujikawa K, Shibata S.	4. 巻 64
2. 論文標題 Expression, localization and synthesis of small leucine-rich proteoglycans in developing mouse molar tooth germ	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Histochemistry	6. 最初と最後の頁 3092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4081/ejh.2020.3092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Funato N, Srivastava D, Shibata S, Yanagisawa H	4. 巻 99
2. 論文標題 TBX1 regulates chondrocyte maturation in the spheno-occipital synchondrosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 1182-1191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034520925080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shibata S, Amano H, Nagayama M, Takahashi M, Watanabe M, Tanaka M	4. 巻 95
2. 論文標題 Immunohistochemical and ultrastructural evaluation of matrix components in mandibular condylar cartilage in comparison with growth plate cartilage in cartilage calcification insufficient rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anatomical Science International	6. 最初と最後の頁 54-66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12565-019-00493-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shibata S, Takahashi M, Fujikawa K	4. 巻 302
2. 論文標題 Histochemical and ultrastructural study of developing gonial bone with reference to initial ossification of the malleus and reduction of Meckel's cartilage in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anatomical Record	6. 最初と最後の頁 1916-1933
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ar.24201	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi M, Fujikawa K, Angamma R, Shibata S	4. 巻 32
2. 論文標題 An in situ hybridization study of MMP-2, -9, -13, -14, TIMP-1, and -2 mRNA in fetal mouse mandibular condylar cartilage as comparing to limb bud cartilage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gene Expression Patterns	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gep.2019.02.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 柴田俊一、高橋昌己、渋井徹、入江一元
2. 発表標題 ニワトリ胚二次軟骨基質の免疫組織化学的研究
3. 学会等名 第 64 回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 船戸紀子、柴田俊一
2. 発表標題 転写因子 TBX1 は頭蓋底軟骨結合発生において RUNX2 下流シグナルを調節する
3. 学会等名 第 62 回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 崎山浩司、柴田俊一
2. 発表標題 アップデートシンポジウム 7 軟骨の発生と再生：基礎、臨床の立場から.
3. 学会等名 第 61 回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 アンガンマナ ランディリニ、柴田俊一
2. 発表標題 Expression of leucine rich proteoglycans (SLRPs) in developing mouse molar tooth germ
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田俊一、高橋将人.
2. 発表標題 マウス gonial bone 発生過程とつち骨初期骨化部位に関する観察
3. 学会等名 第 124 回日本解剖学会総会、全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋将人、藤川芳織、柴田俊一
2. 発表標題 一次および二次軟骨発生過程におけるMMPsおよびTIMPsの遺伝子発現パターンに関する研究
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会、全国学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	船戸 紀子 (FUNATO Noriko) (10376767)	東京医科歯科大学・統合研究機構・准教授 (12602)	
研究分担者	依田 浩子 (IDA Hiroko) (60293213)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	
研究分担者	藤川 芳織 (FUJIKAWA Kaoru) (60805943)	昭和大学・歯学部・助教 (32622)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------