

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17245

研究課題名（和文）下顎骨側方偏位の発現および改善に顎関節潤滑能が与える新規メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms of lubricating changes and recovery of mandibular condylar cartilage bone associated with lateral mandibular migration in growing rats.

研究代表者

池田 侑平（Ikeda, Yuhei）

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：50778511

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：成長期に発現する片側性臼歯部交叉咬合は、下顎骨側方偏位、すなわち顔面非対称を誘発し、機能面において顎顔面領域の正常な成長発育を阻害することが報告されている。本研究では、その下顎骨側方偏位の誘発および回復の機序について注目した。成長期ラットにおける顎関節機能障害モデル及び回復モデルを作成し、トルイジンブルー染色による顎関節の形態学的評価及び抗Ihh抗体をはじめとした免疫染色評価組を行うことにより、下顎骨側方偏位の誘発および回復の原因となる新たな経路を形態学的、組織学的観点から発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成長期の片側性臼歯部交叉咬合に起因し、下顎骨側方偏位が起こることはいくつか報告されているもののそのメカニズムにおいては解明されていなかった。また、成長期における片側性臼歯部交叉咬合を回復した場合、下顎骨にどのような影響を与えるかに関しても未だ解明されていなかった。本研究においてそこに着目し明らかにすることで、「成長期患者の歯科矯正治療による臼歯部交叉咬合改善が、下顎骨非対称を予防し、顎顔面領域の正常な成長発育への有効となりうるか」という治療の機序や意義の解明につながるため、小児歯科及び矯正歯科の範囲において大きな可能性をもたらすことが考えられた。

研究成果の概要（英文）：It has been reported that unilateral molar crossbite during growth induces lateral mandibular deviation, or facial asymmetry, and inhibits the normal growth and development of the maxillofacial region in terms of function. In this study, we focused on the mechanism of induction and recovery of lateral mandibular deviation. We developed a model of TMJ dysfunction and recovery in growing rats, and evaluated the morphology of the TMJ by toluidine blue staining and immunostaining with various antibodies, including anti-Ihh antibodies. We found a new pathway for the induction and recovery of lateral mandibular deviation from a morphological and histological point of view.

研究分野：矯正・小児系歯学

キーワード：下顎骨側方偏位 交叉咬合

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

片側性臼歯部交叉咬合は、不正咬合患者において約 8-22%の発症率を示す。その中でも歯の早期接触に誘導され、下顎骨側方偏位を引き起こす病態である機能的臼歯部交叉咬合は、成長期に多く生じる。そのため、片側性臼歯部交叉咬合に起因する下顎骨側方偏位のメカニズムを解明し、その予防法および治療法を考案することは重要な課題である。

片側性臼歯部交叉咬合は上下顎歯列弓幅径の水平的な不調和が原因であり偏位側下顎頭の成長を抑制することや、下顎枝の成長を抑制し、下顎骨の非対称な成長を惹起することが報告されている。また、片側性臼歯部交叉咬合は骨格性の顔面非対称だけではなく、機能面でも、顎関節症・顎顔面筋活動・咬合力・咀嚼筋の厚みや咀嚼サイクルなどに対する影響についても数多く報告されており、早期に片側性臼歯部交叉咬合を改善することが下顎骨、顎関節および周囲組織の正常な発育に関して極めて重要であると考えられる。

顎関節の関節軟骨は無血管・無神経の組織として知られており、長期間にわたって生理的機能を果たせる理由は、摩擦係数が非常に小さいことであると考えられ、その優れた潤滑機能は「流体潤滑」と「境界潤滑」により保たれている。流体潤滑は、摩擦面に加わる荷重に対して潤滑剤を形作る流体膜が圧力を支える潤滑様式である。この流体潤滑の重要な因子であるヒアルロン酸は、関節の滑液に高濃度に含まれており、潤滑剤や関節に加わる衝撃の吸収剤として働いている。一方、関節に与える負荷が一定量に増加すると、流体膜の破断を生じ、境界潤滑を生じる。この境界潤滑は、固体接触の界面に形成した潤滑剤の分子膜が摩擦面に加わる荷重を支える潤滑様式である。Proteoglycan 4 (PRG4) 遺伝子の産物であるルプリシンは、下顎頭表層軟骨細胞から分泌される滑液の主成分であり、滑膜関節の境界潤滑に関与する。Ihh は、骨端軟骨細胞の増殖および分化を調整する因子であり、下顎頭軟骨における機械的情報の細胞伝達メディエーターとして作用する。in situ ハイブリダイゼーションによって Ihh ノックアウトマウス顎関節においては、ルプリシン発現が増加することから、Ihh とルプリシンの関与が報告されている。また、ラット大腿骨関節にメカニカルストレスを与えると、関節頭の軟骨層においてルプリシン発現が増加し、RT-PCR を使用して PRG4 遺伝子発現解析した結果、TGF- β が同時に増加することから、TGF- β のルプリシンの発現調整への関与が報告されている。

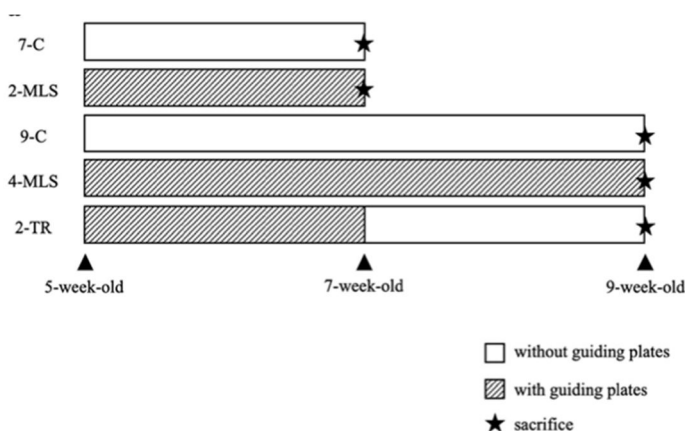
2. 研究の目的

成長期に発現する片側性臼歯部交叉咬合は、下顎骨側方偏位、すなわち顔面非対称を誘発し、機能面において顎顔面領域の正常な成長発育を阻害することが報告されている。近年われわれは、成長期ラットにおける顎関節機能障害モデルを作成し、顎関節潤滑機能に与える影響をルプリシンに着目して世界に先駆けて解明した。しかし、成長期の片側性臼歯部交叉咬合に起因する下顎骨側方偏位の誘発および回復の機序は未だ解明されていない。そこで本研究課題の具体的な目的は「成長期の片側性臼歯部交叉咬合の発現および改善が Indian hedgehog (Ihh) および Transforming growth factor (TGF- β) を介して、顎関節潤滑機能に関与するルプリシンの産生能変調を生じること、を示すことにより、下顎骨側方偏位の誘発および回復の原因となる新たな経路を形態学的・組織生化学的に解明する」こととした。

3. 研究の方法

5 週齢の Wistar 系雄性ラット (n=45) を用いた。7 週齢にて屠殺する群 (n=18) と 9 週齢にて屠殺する群 (n=27) に無作為に分けた。7 週齢にて屠殺する群をさらに対照群 (Control: 7-C 群, n=9) および偏位群 (Shift: 2-MLS 群, n=9) に分けた。9 週齢にて屠殺する群はさらに対照群 (Control: 7-C 群, n=9)、偏位群 (Shift: 2-MLS 群, n=9)、回復群 (Recovery: 2-TR 群, n=9) (Shift に分けた。(Fig.1)

(fig1)

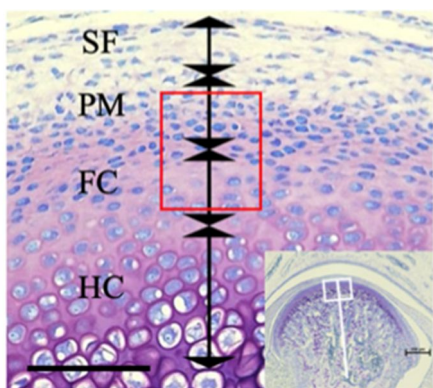


先行研究に基づいた装置を装着し、7週齢で14匹は装置を撤去し、回復群(Recovery : R群, n=7)とする。偏位装置はバンドマテリアル製の斜面板を用いてラットの下顎を左方へ偏位させ、斜面板は8%抱水クロラール麻酔下で上顎切歯部をリン酸エッチング処理後、光重合型レジンをを用いて装着する。左側を偏位側、右側を非偏位側とする。(fig.2)



(1) 組織学的評価

屠殺後、腹腔内麻酔下にて4%パラホルムアルデヒド溶液を用いて灌流固定した後、頭部を摘出し、同液中で一晩浸漬固定を行う。10%EDTA溶液を用いて8週間脱灰を行った後、パラフィン包埋し、5 μ 厚顎関節前頭断切片を作製した。中央部の切片に対して組織学的評価として、Toluidine blue染色切片において4層の軟骨細胞層の厚径をそれぞれ各群全てにおいて計測した。(fig.3)



(2) 免疫組織化学的解析

抗PRG4抗体, 抗Ihh抗体, 抗TGF- β 1抗体, 抗Matrix metalloproteinase 13 (MMP-13)抗体, および抗a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5 (ADAMTS-5)抗体の免疫組織化学染色を行い、単位面積あたりの数を計測した。

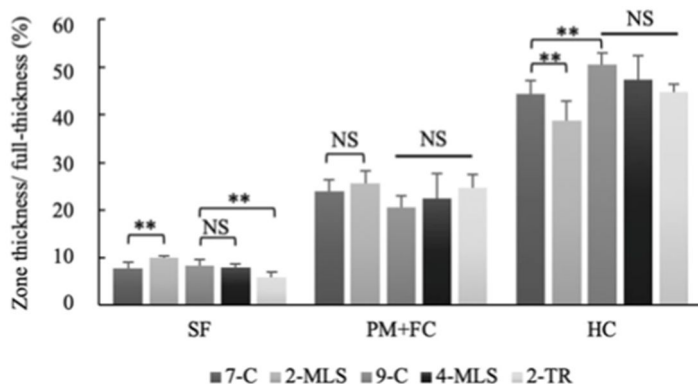
(3) Real-time PCR法およびタンパク質電気泳動法を用いた発現解析

Real-time PCR法によりmRNAレベルで、また、タンパク質電気泳動(Western blotting)法によりタンパク質レベルでの-actin, PRG4, Ihh, PTHrP及びTGF- β 1の組織内での発現量を生化学的に定量化する。

4. 研究成果

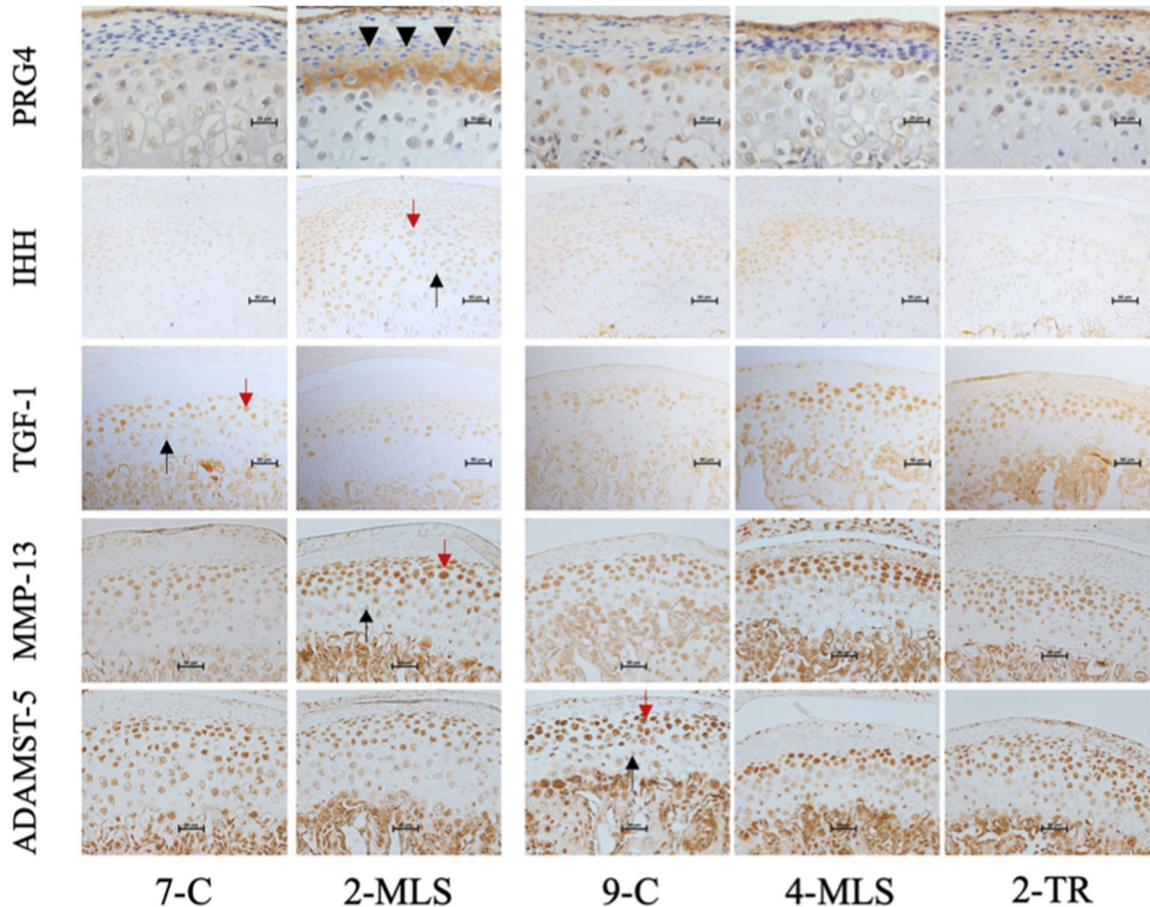
(1) 組織学的解析

2-MLS群において線維細胞層及び肥大軟骨細胞層が有意に増加した。4-MLS群においては線維細胞層及び肥大細胞層に有意差は認められなかった。(fig.4)



(2)免疫組織化学的解析

PRG4 の発現は主に線維細胞層で認められ、MLS を行なった全ての群でコントロール群より大きな発現が認められた。Ihh の発現は 2-MLS 群以外の増殖、成熟、肥大軟骨細胞層で認められた。TGF- β 1 IHC 陽性の軟骨細胞は、2-MLS 群で最初に減弱したが、4-MLS 群と 2-TR 群ではコントロールレベルまで回復した。MMP-13 の発現は、2-MLS 群で有意に認められた。9 週齢屠殺の 3 つグループ間では、有意な差は見られなかったが、9 週齢の対照群と MLS 群における MMP-13 発現は、7 週齢の対照群のそれよりも高かった。ADAMTS-5 の染色は、全ての軟骨細胞で検出された。統計的な差はないが、9 週齢の群では濃く染色されていることが確認された。(fig5)



(3) Real-time PCR 法およびタンパク質電気泳動法を用いた発現解析

PRG4 mRNA の発現量は、2-MLS 群、4-MLS 群、2-TR 群でコントロール群に対し有意に大きかった。Ihh mRNA は、2-MLS 群では有意に大きく、また、MLS 期間が長いほど有意に発現が上昇した。2-TR 群では、Ihh mRNA は 2-MLS 群と同等程度に減少したが、コントロール群よりは大きな発現を示した。Ihh mRNA の上昇に加え、2-MLS、4-MLS 群は PTHrP mRNA の発現の上昇が認められた。2-TR 群では、PTHrP mRNA の発現は対照群と同等程度に減少した。2-MLS 群では、TGF- β 1 mRNA 発現が減少した。4-MLS 群では、MLS 期間が長くなるにつれて TGF- β 1 の発現は対照レベルまで上昇した。

以上より、本研究では成長期ラットの MLS では、顎関節顆路軟骨の表層が肥厚し、PRG4 の発現が亢進することが明らかとなった。さらに、PTHrP/Ihh の発現は PRG4 の発現亢進と正の相関があり、一方、TGF- β 1 の発現は MLS の初期段階において逆の相関があった。本研究は、下顎骨の機能移動により Ihh/PTHrP シグナル発現がアップレギュレートされることを初めて証明するものである。2-MLS 群では MMP-13 の発現が有意に増加したが、MCC におけるマトリックス分解活性は観察されなかった。MCC の厚さ、細胞密度、細胞面積の変化と合わせると、MCC は機械的環境の変化に対応し、活発なりモデリングを行ったと推測される。また MLS が MCC に何らかの適応的变化を引き起こすことを証明し、初期段階でこの機械的刺激を除去することが、MCC を正常な状態に回復させるのに役立つ可能性があることを示した。下顎骨の機能的偏位によって引き起こされる MCC の適応的变化は、早期の治療によってほぼ回復する可能性があることを支持するものであった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wu Yang, Katarzyna Anna Podyma-Inoue, Ikuo Yonemitsu, Ippei Watari, Yuhei Ikeda, Xiyuan Guo, Tetsuro Watabe & Takashi Ono	4. 巻 -
2. 論文標題 Mechanoresponsive and lubricating changes of mandibular condylar cartilage associated with mandibular lateral shift and recovery in the growing rat.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Oral Investigations	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） 10.1007/s00784-020-03225-4	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 Guo Xiyuan, Watari Ippei, Ikeda Yuhei, Yang Wu, Ono Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Effect of functional lateral shift of the mandible on hyaluronic acid metabolism related to lubrication of temporomandibular joint in growing rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Orthodontics	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ejo/cjaa012	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 Shuji Oishi, Yuji Ishida, Tomonari Matsumura, Soma Kita, Tomomi Sakaguchi-Kuma, Toshihiro Imamura, Yuhei Ikeda, Ayako Kawabe, Makiko Okuzawa, Takashi Ono.	4. 巻 -
2. 論文標題 A cone-beam computed tomographic assessment of the proximity of the maxillary canine and posterior teeth to the maxillary sinus floor:	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Orthod Dentofacial Orthop	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） 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 Makiko Okuzawa, Yuji Ishida, Yuhei Ikeda, Toshihiro Imamura, Shuji Oishi, Soma Kita, Tomonari Matsumura, Tomomi Sakaguchi-Kuma, Takashi Ono.	4. 巻 -
2. 論文標題 Alveolar bone morphology in patients with a unilateral palatally displaced maxillary lateral incisor: a cone beam computed tomography study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Orthod Dentofacial Orthop	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） 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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 慶徳美怜
2. 発表標題 成長期ラットにおける鼻呼吸障害の回復をもたらす上下顎骨の形態学的変化とその最適時期の解明
3. 学会等名 日本矯正歯科学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 YANG Wu, YONEMITSU Ikuo, INOUE Katarzyna A., GUO Xiyuan, IKEDA Yuhei, WATARI Ippei, WATABE Tetsuro, ONO Takashi
2. 発表標題 Lateral-functional-shift of rat mandible: The interaction of proteoglycan-4 with IHH and TGF- 1 in condyle
3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥沢槿子、石田雄之、池田侑平、今村俊博、大石修史、松村智成、小野卓史
2. 発表標題 CBCTを用いた片側性上顎側切歯口蓋側転位症例における歯槽骨携帯の3次元的评价
3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会
4. 発表年 2018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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------