

平成 20 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (c)
 研究期間：2007-2008 年度
 課題番号：19592373
 研究課題名 (和文) 成長期における下顎頭軟骨と脛骨骨端軟骨の発現遺伝子の網羅的解析
 研究課題名 (英文) Gene expression profile of the cartilage of mandible and the growth palate of tibia during growth period
 研究代表者 中村 芳樹 (Nakamura Yoshiki)
 鶴見大学・歯学部・教授
 研究者番号：07592153

研究成果の概要：

今回、我々は下顎頭軟骨と長管骨の骨端軟骨には本質的な違いがあるのかを明らかにするために、両軟骨組織に発現している遺伝子を解析することを目的とした。すなわち、成長期にある下顎頭軟骨と長管骨骨端軟骨の発現遺伝子を網羅的に解析し、それぞれの発現遺伝子の違いを検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：下顎頭軟骨、脛骨骨端軟骨、遺伝子解析、網羅的解析、成長期

1. 研究開始当初の背景

歯科矯正学において顎顔面領域の成長発育の解明は重要な課題である。ことに下顎骨の成長は、上顎前突や下顎前突の治療における成長のコントロールの場としてきわめて重要であり、多くの研究がなされてきている。下顎骨の成長は下顎頭部の軟骨性成長とその他の骨膜性成長に区分されるが、成長のコントロールという観点からは、下顎骨の長さを直接左右する下顎頭の軟骨性成長が非常に重要となる。ところでこの下顎頭の成長の場は関節軟骨であり、通常の下顎骨の成長の場、すなわち骨端軟骨とは異なっており、下顎骨の成長の特殊性を示している。このことは、下顎骨の成長が口腔周囲の軟組織の成長に依存して2次的に成長するという説や、反

対に両者の軟骨構造の形態学的な類似性から、長管骨と同様に1次的に成長するという説があり、大きな隔りがある。従って、両者の違いを解明することは歯科矯正学にとって非常に重要な課題である。

2. 研究の目的

下顎頭軟骨組織と脛骨骨端軟骨組織の発現遺伝子の網羅的解析を行い、両者の違いについて解明する。

3. 研究の方法

5 週齢の ICR 系雄性マウスを頸椎脱臼にて屠

殺し、下顎骨と脛骨近心骨端を採取した。採取した組織片をそれぞれ O.C.T. Compound を用いて包埋し、液体窒素にて凍結固定を行い、各資料から 7 μ m の連続凍結切片を作製した。その後 laser capture microdissection 法 (PALM 社) を用いて軟骨細胞層を 3 層に分けて採取した。すなわち、脛骨では軟骨細胞層の表層から静止細胞層 (TR)、増殖軟骨細胞層 (TP)、肥大軟骨細胞層 (TH) に、下顎頭では線維細胞層 (CF)、増殖軟骨細胞層 (CP)、肥大軟骨細胞層 (CH) 分けて採取し、RNA を抽出し、microarray (Agilent Technologies, Whole Mouse microarray) にて遺伝子の網羅的解析を行った。

4. 研究成果

下顎頭線維軟骨層 (以下 CF) で発現した遺伝子で、脛骨静止細胞層 (以下 TR) の発現遺伝子より 5 倍以上発現した遺伝子は 1353 個で全体の約 3.0%、10 倍以上は 732 個で約 1.6% であった。

下顎頭増殖軟骨細胞層 (以下 CP) で脛骨増殖軟骨細胞層 (以下 TP) より 5 倍以上発現した遺伝子は 4547 個で全体の約 10.1%、10 倍以上は 2190 個で約 4.9% であった。

下顎頭肥大軟骨細胞層 (以下 CH) で脛骨骨端軟骨層 (以下 TH) より 5 倍以上発現した遺伝子は 7612 個で全体の約 16.9%、10 倍以上は 4462 個で約 9.9% であった。

TR で CF より 5 倍以上発現した遺伝子は 7264 個で全体の約 16.1%、10 倍以上は 4786 個で約 10.6% であった。

TP で CP より 5 倍以上発現した遺伝子は 4358 個で全体の約 9.7%、10 倍以上は 2752 個で約 6.1% であった。

TH で CH より 5 倍以上発現した遺伝子は 3007 個で全体の約 6.7%、10 倍以上は 1671 個で約 3.7% であった。

各細胞層に特徴的な遺伝子としては、Col II および Aggrecan は、静止細胞層 (線維細胞層)

と増殖軟骨細胞層の分化マーカーとして、また Col X や mmp は肥大軟骨細胞層の分化マーカーとして知られている。

sox9、sox5、sox6 は、それぞれ各層での分化を促進させる遺伝子だが、肥大軟骨細胞層でのみ、sox9 は抑制的に働くと考えられている。

Runx2 は、軟骨細胞の成熟を促進させる遺伝子であり、増殖軟骨細胞層および肥大軟骨細胞層で発現するとされている。

Ihh は、肥大軟骨細胞層に発現し、骨形成を促進させる。また、その negative feedback 機構として、Ihh は PTHrP を誘導し、軟骨細胞の分化を抑制するとされている。

VEGF は、肥大軟骨細胞層に発現し、骨形成時に血管侵入を亢進させる。

Gene Ontology

Gene Ontology の機能分類により、軟骨の成長に関わる遺伝子を検索した。

- Cartilage condensation
- Cartilage development
- Chondrocyte development
- Chondrocyte differentiation
- Positive regulation of Cell Proliferation
- Negative regulation of Cell Proliferation

静止細胞層では下顎頭軟骨に対して脛骨骨端軟骨で Endothelin1 が 113 倍、otraplin が 76 倍、Leukocyte cell derived chemotaxin1 が 53 倍、BMP8b が 19 倍、BMP7 が 16 倍、Hypoxia-inducible factor1a と BMP1a-Receptor、BMP1b-Receptor が 9 倍、Runx2 が 8 倍、Chordin-like2 が 0.05 倍という発現差を示していた。Sox9、Sox5、Col2、Aggrecan、CTGF、BMP1、BMP2、BMP4、BMP5、BMP6、PTH1-Receptor には差はみられなかった。

増殖軟骨細胞層では BMP7 が 53 倍、AK041698 が 19 倍、BMP1a-Receptor が 0.05 倍だった。Sox5、Sox6、Col2、Col11、

Aggrecan、BMP1、BMP2、BMP3、BMP4、BMP5、BMP6、BMP8a、BMP8b、BMP1b-Receptor、Runx2、PTH1-Receptor に差はみられなかった。

肥大軟骨細胞層では Endothelin が 34 倍、BMP8a が 29 倍、Thyroid hormone α -Receptor が 19 倍、BMP1a-Receptor が 0.02 倍、Hypoxia-inducible factor1 α と Eukaryotic translation initiation factor2- α kinase3 が 0.01 倍だった。Sox9、Col2、Col11、Aggrecan、CTGF、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8b、BMP1b-Receptor に差はみられなかった。

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 9 件)

- ① Sekiya T, Nakamura Y, Oikawa T, et al.: Elimination of transverse dental compensation is critical for treatment of patients with severe facial asymmetry. Amer J Orthod & Dentofac Orthop. In press. 査読有
- ② Yamashita Y, Nakamura Y et al.: Evaluation of asymmetry of lip in orthognathic surgery patients. Amer J Orthod Dentfac Orthop. In press. 査読有
- ③ Yoshiki Nakamura, Yoshiaki Nomura, Chihiro Arai, Koji Noda, Takashi Oikawa¹, Kyotaro Kogure, Tadafumi Kawamoto, Nobuhiro Hanada : Laser capture microdissection of rat periodontal ligament for gene analysis. Biotechnic and Histochemistry, In press. 査読有
- ④ Nakamura Y, Ogino T, Hirashita A Orthodontic Treatment for Oral Rehabilitation after Multiple Maxillofacial Bone Fracture. Amer J Orthod & Dentofac Orthop 134:447-455、2008. 査

読有

- ⑤ Nakamura Y, Noda K, Shimoda S, Oikawa T, Arai C, Nomura Y and Kawasaki K: Time-lapse observation of rat periodontal ligament during function and tooth movement using micro-computed tomography. European J Orthod 30: 320-326, 2008. 査読有
- ⑥ Katsumura S, Nishikawara F, Tamaki Y, Nakamura Y, Sato K, Nomura Y, Hanada N: A randomized controlled trial by the 3DS dental caries. Pediatric Dental Journal 17: 1-7, 2007. 査読有
- ⑦ Katsumura S, Nishikawara F, Tamaki Y, Yamada H, Nakamura Y, Sato K, Tsuge S, Nomura Y, Hanada N: "Evaluation of risk factors for dental caries from 6 to 8 years old children" Pediatric Dental Journal Vol.18, No.1, 2008. 査読有
- ⑧ 飛田康平、関谷利子、常盤肇、中村芳樹 : 骨格性下顎前突症における外科的矯正治療後の軟組織側貌の予測 .Orthodontic wave-Japanese Edition 66: 72-80, 2007. 査読有
- ⑨ Noda K, Nakamura Y, Shimpo S, Oikawa T, A new idea and method of tooth movement using a ratchet bracket.

European J Orthod. 29 : 225-231、2007.
査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

①中村芳樹、及川崇、野田晃司、平下斐雄：
ラット歯根膜細胞のlaser microdissectionに
よるm-RNAの解析、第46回歯科基礎医学
会。2007年9月23-25日、広島

②及川崇、中村芳樹その他：歯を移動した際
の発現遺伝子の解析、その1圧迫側歯根膜、
第66回日本矯正歯科学会。2007年9月
19-21日、大阪

③新井千博、中村芳樹、その他：歯を移動し
た際の発現遺伝子の解析、その2牽引側歯根
膜、第66回日本矯正歯科学会。2007年9
月19-21日、大阪

④Arai T, Nakamura Y. et al.:Microarray
analysis of the PDL during tooth
movement in rat, Japanese association for
Dental Research, 55th annual meeting.

⑤ Nakamura Y, Arai C. et al.:Time-lapse
observation of rat PDL during tooth
movement with micro-CT. 84 Congress of
the European Orthodontic Society. 2008 6
月10-14日 Lisbon, Portugal.

⑥ Noda K, Nakamura Y et al.: Changes in
rat periodontal ligament and its vascularity
by super elastic force. 84 Congress of the
European Orthodontic Society. 2008 6 月
10-14日 Lisbon, Portugal

⑦ Oikawa T, Nakamura Y et al.: Gene
expression profile of periodontal ligament
and gingival connective tissue. 84 Congress
of the European Orthodontic Society.
2008 6 月10-14日 Lisbon, Portugal

⑧Arai C, Nakamura Y et al.: Microarray

analysis of the PDL during tooth
movement. 84 Congress of the European
Orthodontic Society. 2008 6 月10-14日
Lisbon, Portugal

⑨ 宮本豊、中村芳樹他：成長期における下
顎頭軟骨と脛骨骨端軟骨の発現遺伝子の網
羅的解析、第67回日本矯正歯科学会大会。
2008年9月16-18日、千葉

⑩及川崇、中村芳樹、他：ラット歯根膜およ
び歯肉の結合組織の遺伝子発現の比較検討、
第67回日本矯正歯科学会大会。2008年
9月16-18日、千葉

⑪ 小暮杏太郎、野田晃司、中村芳樹 他：
断続的な矯正力を繰り返し用いたさいのラ
ット歯根膜組織の形態的变化の観察、
第67回日本矯正歯科学会。2008年9月
16-18日、千葉

6. 研究組織

(1) 研究代表者
中村 芳樹

(2) 研究分担者
野田 晃司
及川 崇

(3) 連携研究者
なし