

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：科研費若手B

研究期間： 2007 ~ 2008

課題番号：19791599

研究課題名（和文） 下顎頭軟骨に特異的に発現する遺伝子の機能解析

研究課題名（英文） Discovery of genes specifically expressed in mandibular condylar cartilage.

研究代表者 綿引淳一

(JUNICHI WATAHIKI)

研究者番号：60384351

研究成果の概要：

矯正臨床では成長発育途中の患者を治療対象とする機会が多い。下顎骨の量的な成長は下顎頭軟骨の増殖・添加に大きく影響を受けると考えられている。また、変形性顎関節症は、矯正臨床上しばしば認められ、矯正治療計画上でおおきな障害となる。しかしながら、顎関節における変形性関節症は四肢関節に見られる変形性関節症とはその性格が大きく異なる。以上のような、下顎頭軟骨は、矯正臨床で、非常に重要な部位であるにもかかわらず、その機能の詳細なメカニズムは明らかにされていない。

そこで我々は、下顎頭軟骨切片上からダイレクトに超微量な遺伝子発現を定量評価出来る硬組織 Laser Microdissection法を確立し、下顎頭における軟骨性成長の遺伝子発現プロファイルの観察を行ってきた (J Dent Res, 83:245-249, 2004.) (Orthodontic Waves, 62:201-206, 2003.)。

また、下顎頭軟骨は他の成長軟骨と同様に軟骨内骨化を行っている事はよく知られているが、組織学的な違いとして他の長管骨成長軟骨と異なり軟骨細胞の配列が不規則であり、外的環境変化に反応しやすい性質を持っている。しかし、下顎頭軟骨と他の長管骨成長軟骨との相違のメカニズムは明らかとなっていない。

本研究では下顎頭軟骨および他の長管骨成長・関節軟骨の遺伝子発現パターンを蛍光ディフュージョンディスプレイにて比較検討し候補遺伝子の探索を行った。その後、real time PCR,免疫染色,in situ hybridizationによって下顎頭軟骨において血管新生をコントロールしている Chondromodulin-I, Tenomodulinの発現パターンが下顎頭軟骨で特異的に異なる事を発見した。この結果は、下顎頭軟骨が他の長管骨成長軟骨や関節軟骨と異なる血管新生のコントロール機構を持ち、従来から云われてきた下顎頭軟骨の高い修復能を裏づける結果である可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,500,000	450,000	2,950,000

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・長管骨成長軟骨・長管骨関節軟骨・
Chondromodulin-I・Tenomodulin 1

1. 研究開始当初の背景

矯正臨床では成長発育途中の患者を治療対象とする機会が多い。下顎骨の量的な成長は下顎頭軟骨の増殖・添加に大きく影響を受けると考えられている。また、変形性顎関節症は、矯正臨床上市しばしば認められ、矯正治療計画上でおおきな障害となる。しかしながら、顎関節における変形性関節症は四肢関節に見られる変形性関節症とはその性格が大きく異なる。

以上のような、下顎頭軟骨は、矯正臨床上、非常に重要な部位であるにも関わらず、その機能の詳細なメカニズムは明らかにされていない。

軟骨細胞は、*in vivo*において分化段階の異なる軟骨細胞が規則正しく配列し最終的には骨組織に置換されて行く。しかし、軟骨細胞の培養系では*in vivo*を正確に再現する事が極めて困難なため軟骨性成長を研究する上で大きな障害となっていた。そこで我々は、下顎頭軟骨切片上からダイレクトに超微量な遺伝子発現を定量評価出来る硬組織 Laser Microdissection法を確立し、下顎頭における軟骨性成長の遺伝子発現プロファイルの観察を行ってきた。その結果、下顎頭軟骨および下顎骨の成長発育は咀嚼運動によって大きく影響を受け変化する事が分かった。また、その変化は従来考えられていた軟骨細胞の増殖よりむしろ石灰化の制御によるものであると示唆された (J Dent Res, 83:245-249, 2004.) (Orthodontic Waves, 62:201-206, 2003.)

また、下顎頭軟骨は他の成長軟骨と同様に軟骨内骨化を行っている事はよく知られているが、組織学的な違いとして他の長管骨成長軟骨と異なり軟骨細胞の配列が不規則であり、外的環境変化に反応しやすい性質を持っている。しかし、下顎頭軟骨と他の長管骨成長軟骨との相違のメカニズムは明らかとなっていない。

2. 研究の目的

下顎頭軟骨の特異性を解明し、下顎骨の成長発育のメカニズムおよび変形性顎関節症のメカニズムを解明する事を目的とする。

3. 研究の方法

蛍光ディファレンシャルディスプレイ法 (FDD法) およびlaser microdissection法によって、1週齢Ratの下顎頭軟骨と長管骨成長軟骨の遺伝子発現の差異を調べた。さらに、FDD法によって発現量の差が大きか

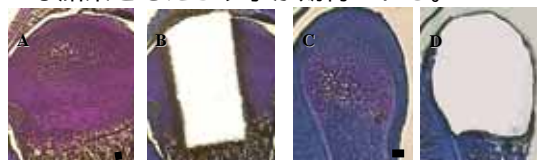
った候補遺伝子をRT-PCR,ならびにReal time PCR法、免疫組織学的検討、*in situ* hybridizationによる組織学的な発現局在の評価を行った。によってさらに正確な定量評価を行った。

4. 研究成果

下顎頭軟骨または長管骨成長軟骨に特異的に発現する遺伝子が新規遺伝子を含め複数発見された。軟骨組織における代表的な血管新生抑制因子であるChM-I(ChondromodulinI)は、下顎頭軟骨にはほとんど発現していなく、代わりに軟骨組織には従来報告が無かったChM-Iとホモロジーが高いTeM (Tenomodulin) が多く発現していた。

この事から、下顎頭軟骨が他の長管骨成長軟骨と異なる血管新生抑制のコントロールを持っている可能性が示唆された。

従来から下顎頭軟骨は他の長管骨成長軟骨と異なる性格を持っていると云われていたが、今回の我々の研究成果にて世界で初めて遺伝子発現レベルでの差異が明らかになった。今後、さらに本研究が進むことで、下顎骨の成長発育のメカニズムだけでなく変形性顎関節症の治療法に有用な結果をもたらす事が期待される。



Before Dissection After Before Dissection After
Fig. 1. Photomicrographs of laser-microdissected rat tibial cartilages and mandibular condylar stained with toluidine blue (TB). A, B: tibial cartilage (TB, X 50). Scale bars, 100 μm. C, D: mandibular condylar cartilage (TB, X 100) Scale bars, 50 μm.
A, C: before laser microdissection. B, D: after microdissection.

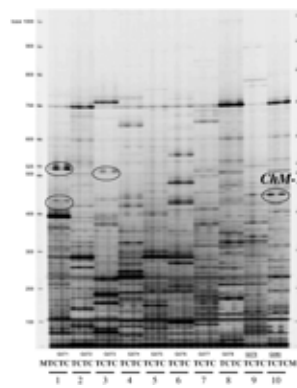


Fig. 2. Typical FDD gel. cDNAs were reverse-transcribed from mRNAs isolated from mandibular condylar cartilage (C) and tibial cartilage (T). FDD analysis used 10 different primer sets. DNA maker band sizes are indicated for estimation of the lengths of cDNA fragments (M). Some differentially expressed bands are indicated (oval).

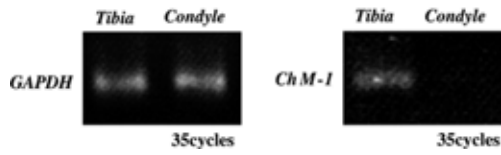


Fig. 3. *ChM-1* mRNA expression in tibial and mandibular condylar cartilages. The right panel shows *ChM-1* transcripts. The left panel shows glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) transcripts. Both tibial and condylar cartilages were microdissected from 1-wk-old SD rats. The *ChM-1* gene was present in tibial cartilage, but not in condylar cartilage.

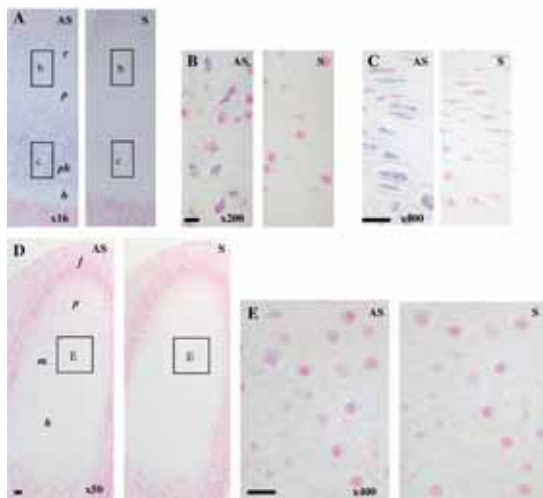


Fig. 4. Expression patterns of *ChM-1* mRNA by *in situ* hybridization. Localization of *ChM-1* mRNA in tibial (A-C) and condylar (D, E) cartilage in 1-wk-old rats. (A) *ChM-1* mRNA was detected from the resting chondrocyte cell layer to the prehypertrophic cell layer. (B) Higher magnification of the rectangular area (b) in A. (C) Higher magnification of the rectangular area (c) in (A). (D) *ChM-1* mRNA was not detected in any regions. (E) Higher magnification of the rectangular area (e) in D. Scale bars: 20 μ m.

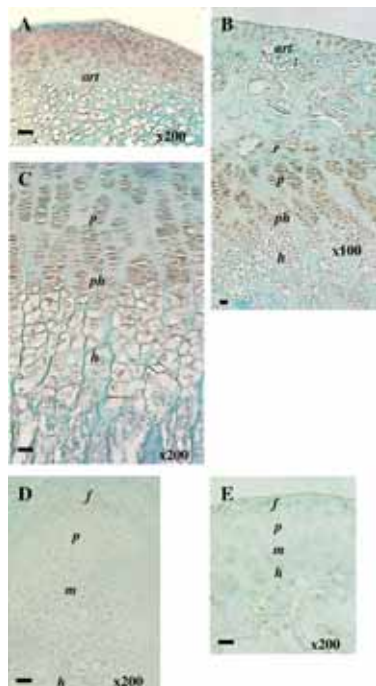


Fig. 5. Immunohistochemical localization of *ChM-1* in tibial cartilage (A-C) and condylar cartilage (D, E) in 1-wk (A, C, D) and 5-wk (B, E) rats counterstained with methyl green. In condylar cartilage, *ChM-1* was hardly present at both 1 and 5 wks. In tibial cartilage, *ChM-1* was strongly detected except in the hypertrophic layer both at 1 and 5 wks. r: resting layer, p: proliferative layer, ph: prehypertrophic layer, h: hypertrophic layer, f: fibrous layer, m: mature cell layer, art: articular cartilage. Scale bars: 20 μ m.

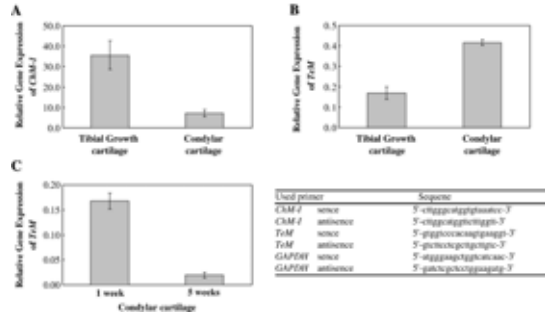


Fig. 6. Quantitative determination of gene expression in mandibular condylar cartilage and tibial growth cartilage using real time RT-PCR with SYBR green chemistry and laser microdissection.

Values are normalized against *GAPDH*. Data represent means \pm SEM from 3 experiments. (A) Expression of *ChM-1* in 1-wk-old rat tibial growth cartilages and mandibular condylar. (B) Expression of *TeM* in 1-wk-old rat tibial growth cartilages and mandibular condylar. (C) Expression of *TeM* in 1 and 5-wk-old rat condylar cartilage.

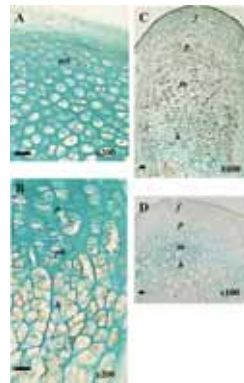


Fig. 7. Immunohistochemical localization of *TeM* in tibial cartilage (A, B) and condylar cartilage (C, D) in 1-wk (A, B, C) and 5-wk (D) old rats counterstained with methyl green. In condylar cartilage, *TeM* was detected except in fibrous layer at both 1 and 5 wks. In 1 wk tibial cartilage, *TeM* was only detected in the hypertrophic layer and a part of articular cartilage. Scale bars: 20 μ m.

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2件)

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

Junichi Watahiki, Tetsutaro Yamaguchi, Akiko Enomoto, Tarou Irie, Kumi Yoshie, Tetsuhiko Tachikawa and Koutaro Maki,

Identification of differentially expressed genes in mandibular condylar and tibial growth cartilages using laser microdissection and fluorescent differential display: Chondromodulin I (ChM-1) and tenomodulin (TeM) are differentially expressed in mandibular condylar and other growth cartilages.

BONE, 査読有り, Jun;42(6) 1053-60, 2008,

Akiko Enomoto, Junichi Watahiki, Tetsutarou Yamaguchi, Tarou Irie, Tetsuhiko Tachikawa, Koutarou Maki

Effects of mastication on mandibular growth evaluated by computed tomography (μ CT)

The European Journal of Orthodontics, 査読有り, 印刷中2008年1月 Accepted,

Orthod Craniofac Res. 査読有り, 6(4) 233-241, 2003.

〔学会発表〕(計1件)

榎本 明子、綿引 淳一、山口 徹太郎、入江 太朗、立川 哲彦、榎 宏太郎

The effect of mastication during mandibular growth. - 三次元形態計測及び遺伝子発現変化の観察 - *骨形態計測学会*, 査読有り, 長崎, 2007

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

綿引 淳一 (WATAHIKI JUNICHI)

研究者番号: 60384351

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者