

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19276

研究課題名（和文）顎関節症における関節円板のコラーゲン発現機構の解明

研究課題名（英文）Collagen expression is influenced by mechanical stress in TMJ discs

研究代表者

中尾 友也（NAKAO, Yuya）

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：90733048

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：関節円板を構成する主要な細胞外マトリックスは、プロテオグリカン、コラーゲン、および弾性系線維であり、これらは組織の形態維持、機械的特性、脆弱性および病態変化（顎関節症）において重要な役割を担っている。本研究では、機械的刺激が関節円板のコラーゲンと弾性系線維にどのような影響を生じるかをin vivo実験とin vitro実験を用いて組織学的および分子生物学的に検討を行った。その結果、機械的刺激の増大によって組織学的変化および細胞外マトリックスの組成、特にコラーゲン・弾性系線維の変化を生じることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎関節症は、齲蝕、歯周病に次ぐ主要な歯科疾患であり、顎関節症患者の増加とその若年化傾向が歯科全体で問題となっているが、顎関節症の原因はいまだ不明な点が多い。本研究では、機械的刺激の増大によって関節円板の細胞外マトリックスの組成、特にコラーゲン・弾性系線維に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。本研究で得られた研究成果は、顎関節内障の発現の機序を解明するばかりでなく、顎関節症の治療の一助になるものと考えられるため、学術的および社会的意義が極めて高いものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The extracellular matrices of the TMJ discs are proteoglycans, collagen, and elastic fibers. They play important roles in the tissue morphology maintenance, mechanical properties, fragility, and TMD. In this study, we investigated histologically and molecularly how mechanical stimulation produces effects on collagen and elastic system fibers in TMJ discs. The results showed that increased mechanical stimulation caused histological changes and changes in the composition of the extracellular matrix, collagen, and elastic fibers.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：関節円板 機械的刺激 細胞外マトリックス コラーゲン 弾性系線維

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

顎関節症は、齲蝕、歯周病に次ぐ主要な歯科疾患であり、顎関節症患者の増加とその若年化傾向が歯科全体で問題となっている。しかし、齲蝕や歯周病とは異なり、顎関節症の原因はいまだ不明な点が多い。近年、顎関節症（顎関節内障）のような慢性疾患では、環境と宿主という2つの因子間における相互バランスの破綻によって発症するという考えが提唱され、環境要因としてパラファンクション、慢性的外傷、咬合異常などの機械的刺激関連の因子が指摘されている。もし顎関節への機械的刺激が宿主の抵抗閾値を超える状態が長期化した場合、顎関節内障を惹起する可能性が考えられるが、この点に関する基礎的知見は極めて乏しい。

一方、顎関節は、骨、軟骨、線維性結合組織、靭帯といった様々な結合組織から構成されている。これら結合組織に存在する細胞外マトリックスは、細胞の増殖・分化・遊走過程あるいは組織の機械的強度、病態変化と密接な関連性を有していることが知られている。中でも、コラーゲン（Ⅰ型、Ⅱ型、Ⅲ型）や弾性線維（フィブリリン、フィブリン-1、-2）は圧縮力・剪断応力に対する耐性を組織に付与しており、皮膚、靭帯、軟骨などの様々な結合組織においてプロテオグリカンとの相互作用も報告されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、機械的刺激に対する顎関節組織の反応特性を検討し、顎関節症、そのなかでも関節円板の変形を主徴とする顎関節内障の病態変化を解明することを目的とした。そのため、*in vivo*と*in vitro*実験系を用いて、顎関節の細胞外基質、特にコラーゲンと弾性線維に着目し、遺伝子発現、タンパク質発現、および局在の変化を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 【*in vivo* 実験】

#### 1) 顎関節への関節負荷

生後7週齢のWistar系雄性ラットを用いた。顎関節部への関節負荷を増大させるため、上顎切歯部にレジン製咬合板を装着し、咬合挙上による咬合改変モデルを作製した。実験期間は1、2、3および4週とし、装置未装着同週齢ラットを対照群として用いた。

#### 2) 組織学的観察と下顎頭軟骨における各細胞層厚径の計測

各実験期間終了後、顎関節部組織を取り出し、通常に従い厚さ7µmの連続切片を作製した。切片にはtoluidine blue (TB) 染色 (pH 4.1) を施し、顎関節部の組織学的観察を行った。また、関節円板における各細胞層の厚径と細胞数の計測を行った。

#### 3) 関節円板におけるDNA、GAG、collagen含有量の定量

各実験期間終了後、関節円板を採取した。組織からDNAを抽出するために、ホモジナイズし、パイン消化処理を24時間行った。その後、Hoechst法によるDNA含有量の定量を行った。GAG含有量はDimethylmethylene Blue (DMB) 法により定量した。

Collagenは採取した組織からhydroxyprolineを抽出し、定量した。

#### 4) 関節円板におけるproteoglycanおよびcollagenのmRNA発現量の定量

各実験期間終了後、採取した関節円板からtotal RNAを抽出し、RT法によりcDNAの調整を行った。Exonuclease probe (TaqMan® probe) を作製し、qPCR法によりproteoglycanとcollagen mRNA発現量を定量した。

## 【*in vitro* 実験】

### 1) 関節円板からの細胞の単離

生後 4 週齢の Wistar 系雄性ラットから関節円板を摘出し、アウトグロース法にて細胞を単離した。

### 2) 関節円板培養細胞への伸展刺激

得られた細胞をエラスティックチャンバーに  $1 \times 10^5$  cells/mL 播種し、2 日間間培養後セミコンフェルト状態を確認し、cell stretch system を使用して伸展刺激を付与した。

### 3) proteoglycan および collagen の mRNA 発現量の定量

各実験期間終了後、total RNA を抽出し、qPCR 法により proteoglycan と collagen mRNA 発現量を定量した。

## 4. 研究成果

*In vivo* 実験による組織学的観察では、関節円板の厚径が実験群の前方肥厚部で減少し、とくに 21 日以降で有意な減少が認められた。中央狭窄部では、対照群と実験群を比較して変化はなかった。後方肥厚部では、顕著な増加がみられた。下顎頭部の組織学的所見は、実験群において線維層の肥厚、未分化間葉系細胞層の細胞密度の減少、および軟骨細胞層の肥厚が確認された。なお、実験群の顎関節部において炎症所見は観察されなかった。関節円板における DNA 含有量は、実験期間を通して、対照群と実験群の間に有意差は認められなかったが、GAG 量は、対照群と比べ、拳上後 14 日以降で有意に増加した。関節円板における各 proteoglycan の mRNA 発現は、biglycan では 14 日以降、decorin では 28 日、versican では 21 日以降、および condroadherin では 14 日以降で、対照群と比較して有意に高い値を示した。

*In vitro* 実験では、versican、aggrecan、fibromodulin、Ⅱ型コラーゲンは増加し、Lumican、decorin、Tropoelastin、Ⅰ型コラーゲンは減少した。

以上のことから、成長期ラットの関節円板では、生力学環境変化により形態変化を生じることが明らかとなった。さらにこの形態変化は、proteoglycan やコラーゲンなどの細胞外基質の量的変化によるものと考えられた。また、関節円板培養細胞に伸展刺激を加えるとコラーゲンをはじめとする細胞外基質の組成の変化が生じることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 尾立卓弥、中尾友也、細矢明宏、飯嶋雅弘。	4. 巻 39(1)
2. 論文標題 顎関節への荷重負荷がラット下顎頭軟骨の基質タンパク質発現に与える影響	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 北海道医療大学歯学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1-10
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawamura Naohiko, Nakao Yuya, Ishikawa Rina, Tsuchida Dai, Iijima Masahiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Degradation and Biocompatibility of AZ31 Magnesium Alloy Implants In Vitro and In Vivo: A Micro-Computed Tomography Study in Rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 473 ~ 473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma13020473	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 山口 優、櫻尾治奈、中尾友也、飯嶋雅弘	4. 巻 38
2. 論文標題 関節荷重が成長期ラット下顎頭軟骨の細胞外基質mRNA発現に及ぼす影響	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 北海道医療大学歯学雑誌	6. 最初と最後の頁 9-20
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kashio H, Hosiriluck N, Yamaguchi M, Nakao Y, Mizoguchi I, Iijima M, Arakawa T.
2. 発表標題 The profiling and analysis of gene expression in rat temporomandibular joint disk tissue and its derived cells.
3. 学会等名 9th International Orthodontic Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Haruna KASHIO, Nattakarn HOSIRILUCK, Masaru YAMAGUCHI, Yuya NAKAO, Itaru MIZOGUCHI, Masahiro IIJIMA, Toshiya ARAKAWA
2. 発表標題 The profiling and analysis of gene expression in rat temporomandibular joint disc tissue and fibroblasts.
3. 学会等名 第79回日本矯正歯科学会/第9回国際矯正歯科会議世界大会（国際学会）
4. 発表年 2020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