

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293421

研究課題名(和文)顎関節症における細胞外基質の役割 - 顎関節円板の機械的刺激に対する反応特性 -

研究課題名(英文) Roles of extracellular matrices in TMJ disorders - response properties of TMJ disc to mechanical stress

研究代表者

溝口 到 (Mizoguchi, itaru)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：20200032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：In vivo 実験系では、顎関節の過重負荷の増大に伴い、関節円板のGAG量、decorin, biglycan, versican, condroadherinのmRNAとタンパク質発現の増加がみられた。In vitro実験系では、伸展負荷によってversican, aggrecan, fibromodulin, I型collagenのmRNA発現は増加、tropoelastin, lumican, decorinのmRNA発現は減少した。以上のことから、機械的刺激は、ラット関節円板における細胞外マトリックスの発現と密接に関連していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In vivo study showed that GAG content, mRNA and protein levels of decorin, biglycan, versican and condroadherin increased in response to increased joint loading. In vitro study indicated that the mRNA levels of versican, aggrecan fibromodulin and type I collagen increased in response to stretching, while the decorin mRNA levels of lumican, decorin and tropoelastin decreased. These results indicate that mechanical stress cause complicated changes in extracellular matrix components in TMJ disc.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：関節円板 細胞外基質 プロテオグリカン コラーゲン タンパク質発現 mRNA発現

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、顎関節症患者の増加とその若年化傾向が歯科学全体での大きな問題となっており、その原因の究明が求められている。また、矯正歯科の領域においても顎関節症の一つである下顎頭の退行性変化によって、重度の骨格型の下顎後退症、あるいは非対称を引き起こすことが報告されているが、それに対する有効な治療方法も確立されていない。現在までのところ、顎関節症の発症に関する正確なメカニズムは不明である。

(2) 近年、顎関節症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病するという考えが提唱されてきており、環境要因として、ブラキシズム等のパラファンクション、慢性的外傷、ホルモンバランスの破綻、咬合異常等が危険因子として指摘されている。一方、宿主要因として、軟食摂取あるいは咀嚼機能の低下による顎関節組織の脆弱化、すなわち組織のメカニカルストレスに対する抵抗性の低下が指摘されているが、この点に関する基礎的知見は極めて乏しい。

(3) 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。これら結合組織の主要な細胞外マトリックスは、コラーゲンとプロテオグリカンであるが、これらの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。

2. 研究の目的

顎関節を取り巻く力学的環境要因が顎関節の主要な細胞外マトリックスの発現にどのような影響を及ぼすのかについて、ラットの咬合改変による関節荷重を负荷する *in vivo* 実験系と、ラット関節円板由来培養細胞に機械的伸展刺激を负荷する *in vitro* の実験系を用いて、細胞外マトリックスのタンパク質および遺伝子発現を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *In vivo* 実験系：生後7週齢雄性 Wistar 系ラットの上顎切歯部に咬合挙上装置を装着し、顎関節部への関節荷重を増大させた。実験期間は7, 14, 21 および28日間とし、実験終了後、関節円板を含む顎関節部を摘出し、パラフィン切片を作製し、組織学的、組織形態計測学的および免疫組織学的観察を行った。生化学的分析では、摘出した関節円板を用いて GAG 含有量、DNA 量およびたんぱく質の発現 (Western blotting) を定量した。また、各 proteoglycan の mRNA 発現では、関節円板から抽出した total RNA を用いて、

exonuclease probe (TaqMan probe) 法にて定量を行った。また、mRNA 発現の亢進がみられた基質については、28日群において Western blotting も行い、タンパク質発現の検証も行った。

(2) *In vitro* 実験系：生後4週齢の Wistar 系雄性ラットの関節円板を採取後、10% NCS (newborn calf serum) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を添加した最小必須培養液 (MEM, Thermo Fisher Scientific Inc.: ペニシリン 100 units/ml, ストレプトマイシン 100 µg/ml, L-グルタミン酸含有) 中で 37 °C, 5% CO₂ 環境下にて培養し、3代継代して関節円板培養細胞として単離した。単離した細胞は4から6代継代細胞を実験に使用した。fibronectin 表面処理したシリコンチャンバー上に関節円板培養細胞を 2 × 10⁵ cells/mL の細胞密度で播種し、STB-140STREX cell stretch system (Strex Inc., 大阪) を用いて伸展刺激を负荷した。伸展条件は10%、頻度1分間/1往復とした。4時間と12時間における伸展群と対照群 (非伸展刺激) の比較を行った。実験期間終了後、マイクロアレイによる網羅的解析、exonuclease probe (TaqMan probe) PCR 法による mRNA 発現の定量および siRNA による fibromodulin 抑制実験を行った。

4. 研究成果

(1) *In vivo* 実験系

関節円板の厚径は、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 (図1)。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。

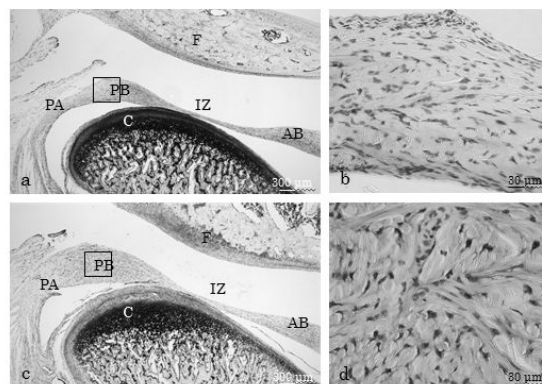


図1 咬合挙上28日における関節円板の組織像。(a, b) 対照群。(c, d) 実験群

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。GAG 量は、対照群と比べ、挙上後 14 日以降で有意に増加した (図 2)。

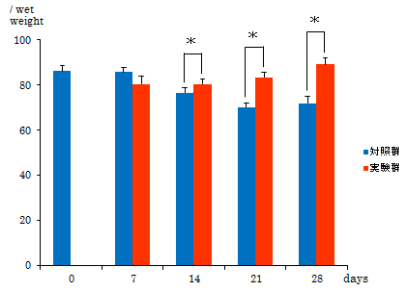


図 2 咬合挙上による関節円板の GAG 量の変化(平均 ± SD, * $P < 0.05$)

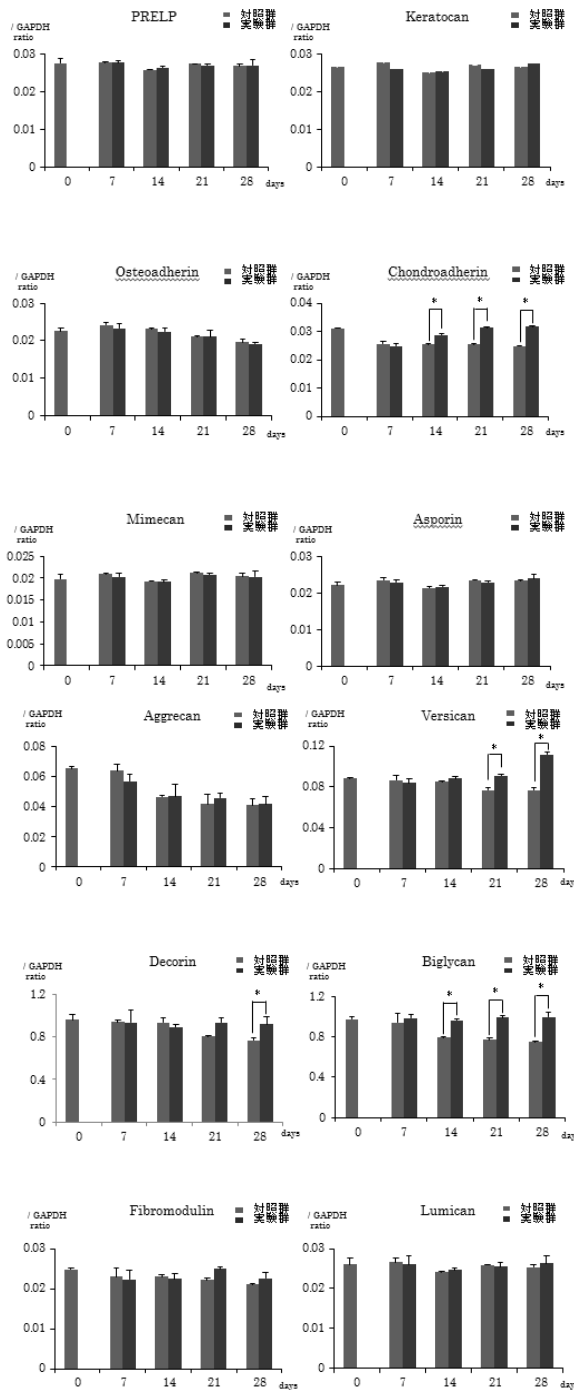


図 3 咬合挙上による関節円板の各 Proteoglycan の mRNA 発現 (平均 ± SD)

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 (図 3)。また、これらの 4 つの基質では 4 週群での Western blotting の結果から、タンパク質の発現も更新していることが明らかになった。

関節円板の免疫組織学的観察において、対照群では中央狭窄部から前方肥厚部において versican に対する中等度の免疫反応を認めたが、実験群では後方肥厚部で versican に対する強い免疫反応を認めた。

(2) *In vitro* 実験系

関節円板培養細胞に 4 時間と 12 時間の 10% 伸展負荷を行い、対照群と伸展群の試料に対しマイクロアレイ解析を行った。結果として、versican, aggrecan, fibromodulin の mRNA 発現は 4 時間と 12 時間で増加した。I 型 collagen の mRNA 発現は 4 時間で増加した Lumican, decorin, asporin, tropoelastin, III 型 collagen の mRNA 発現は 12 時間で減少した。Keratocan の mRNA 発現は 4 時間で増加し、12 時間で減少した。

Versican の mRNA 発現は、伸展負荷により 4 時間と 12 時間でそれぞれ 1.7 倍、1.3 倍に増加した (図 4)。Aggrecan の mRNA 発現は 4 時間では変化が認められなかったが 12 時間では 1.5 倍に増加した。Tropoelastin の mRNA 発現は 4 時間では変化が認められなかったが 12 時間では 0.6 倍に減少した。Fibromodulin の mRNA 発現は 4 時間では 3.4 倍に増加し、12 時間では対照群と同レベルとなった。

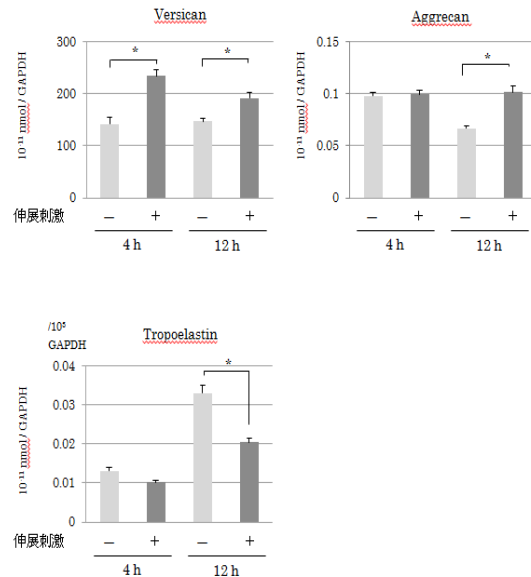


図4 伸展負荷によるI型collagen, tropoelastin および各 proteoglycan の mRNA 発現 (平均±SD)

I型collagenのmRNA発現は4時間では1.5倍に増加し、12時間では対照群と同レベルとなった(図5)。LumicanのmRNA発現は4時間では変化が認められなかったが、12時間では0.3倍に減少した。DecorinのmRNA発現は4時間と12時間でそれぞれ0.4倍、0.3倍に減少した。

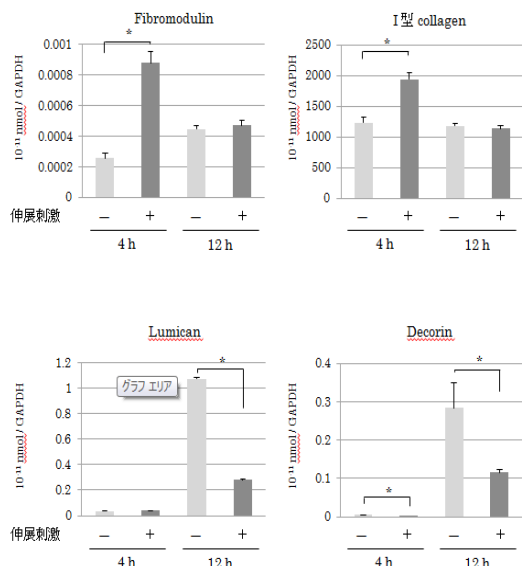


図5 伸展負荷によるI型collagen, tropoelastin および各 proteoglycan の mRNA 発現 (平均±SD)

Fibromodulinのlumicanに対する阻害作用を検討するため、fibromodulinのmRNA発現をsiRNAにより抑制し、12時間の伸展負荷によるlumicanのmRNA発現の変化を検討した。その結果、対照群におけるfibromodulinのmRNA発現はsiRNAによるfibromodulin抑制によって0.1倍に減少した(図6)。一方、対照群におけるlumicanのmRNA発現は、siRNAによる変化が認められなかった。また12時間の伸展群におけるfibromodulinのmRNA発現は、siRNAによるfibromodulin抑制によって0.4倍に減少した。しかし12時間の伸展群におけるlumicanのmRNA発現は、siRNAによるfibromodulin抑制によって1.7倍まで回復した。

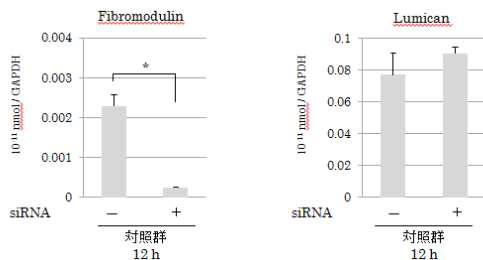


図6 対照群におけるsiRNAによるfibromodulin抑制状態でのfibromodulinとlumicanのmRNA発

現(平均±SD)

(3) 本研究課題の位置付けと今後

in vivo 実験系では、関節円板への過重負荷の増大に伴い、GAG鎖の増加およびGAG鎖の担体であるversican、decorin、biglycanのmRNA発現の亢進がみられた。この所見は、圧縮力に対する関節円板の適応反応が選択的なproteoglycanの発現亢進を介していることを示しており、世界的にみても初めての新しい所見と言える。今後は、GAG鎖の数にバリエーションをもたらすと考えられているversicanのisoform(V0, V1, V2, V3)の発現とGAG鎖の関係についても検討を加えていく予定である。

in vivo 実験系においては、fibromodulinのmRNA発現は4時間をピークに増加し、12時間で変化は認められなかったのに対し、lumicanのmRNA発現は4時間で変化は認められなかったが、12時間で減少したことから、lumicanのmRNA発現にフィードバック調節機構が働き12時間のlumicanのmRNA発現が減少したという仮説を立てた。この仮説を検証するために、siRNAによるfibromodulinのmRNA発現の抑制実験を行った結果、siRNAによるfibromodulinのmRNA発現の抑制下において、lumicanのmRNA発現は変化がみられなかったのに対し、伸展群では1.7倍まで回復した。本研究ではfibromodulinとlumicanのタンパク質の定量は行っていないが、この解析によって、伸展負荷によるfibromodulinのmRNA発現の増加がlumicanのmRNA発現を減少させるという興味深い結果が得られた。今後は、タンパク質レベルでも解析も必要と考えられた。

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33件)

Matsuzawa H, Toriya N, Nakao Y, 他、Cementocyte cell death occurs in rat cellular cementum during orthodontic tooth movement、Angle Orthod、査読あり、87、2017、416-422

Nakao Y, Konno-Nagasaka M, Toriya N, Arakawa T, Kashio H, Takuma T, Mizoguchi I、Proteoglycan expression is influenced by mechanical load in TMJ discs、J Dent Res、94、2015、93-100

Ito M, Arakawa T, Okayama M, Shitara A, Mizoguchi I, Takuma T、Gravity loading induces adenosine triphosphate release

and phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases in human periodontal ligament cells, J Invest Clin Dent 5, 査読あり、2014、266-74

鳥谷奈保子, 永坂 萌, 敦賀英知, 坂倉康則, 溝口 到、ヒト歯根膜由来線維芽細胞のメカニカルストレスによるversicanの発現と局在の変化、北医療大歯誌、査読あり、32、2013、33-41

Shitara A, Shibui T, Okayama M, Arakawa T, Mizoguchi I, Sakakura Y, Takuma T、VAMP4 is required to maintain the ribbon structure of the Golgi apparatus, Mol Cell Biochem、査読あり、380、2013、11-21.

Mizoguchi I, Toriya N, Nakao Y、Growth of the mandible and biological characteristics of the mandibular condylar cartilage, Jpn Dent Sci Rev、査読あり、4、2013、139-150

〔学会発表〕(計65件)

櫻尾治奈 他、伸展刺激下でのラット関節円板培養細胞の fibromodulin と lumican の相互作用、第 29 回日本顎関節学会、2016 年 7 月 17~18 日、湯本富士屋ホテル(神奈川県)

櫻尾治奈 他、伸展刺激がラット関節円板由来線維芽細胞の collagen と proteoglycan の発現へ及ぼす影響、2015 年 11 月 18~20 日、福岡国際会議場(福岡県)

中尾友也 他、顎関節荷重負荷が成長期ラット関節円板の proteoglycan 発現に及ぼす影響、2015 年 7 月 4~5 日、第 28 回日本顎関節学会、第 20 回日本口腔顔面疼痛学会、名古屋国際会議場(愛知県)

櫻尾治奈 他、ラット関節円板細胞の伸展刺激に対する collagen および proteoglycan の発現への影響、2015 年 7 月 4~5 日、第 28 回日本顎関節学会、第 20 回日本口腔顔面疼痛学会、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

中尾友也 他、顎関節円板荷重負荷がラット関節円板の proteoglycans の mRNA 発現に及ぼす影響、第 26 回日本顎関節学会、2014 年 7 月 19~20 日、九州大学医学部百年講堂(福岡県・福岡市)

中尾友也 他、咬合挙上による咬合変化が成長期ラット関節円板の versican の発現に及ぼす影響、第 72 回日本矯正歯科学会、2013 年 10 月 7~9 日、キッセイ文化ホール・松本市総合体育館(長野県・松本市)

〔図書〕(計1件)

溝口 到、医歯薬出版、口腔組織・発生学、2015、233-236

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝口 到 (MIZOGUCHI, Itaru)
北海道医療大学・歯学部・教授
研究者番号：20200032

(2) 研究分担者

鳥谷 奈保子 (TORIYA, Naoko)
北海道医療大学・歯学部・助教
研究者番号：20433435

岡山 三紀 (OKAYAMA, Miki)
北海道医療大学・歯学部・助教
研究者番号：30382500

田隈 泰信 (TAKUMA, Taishin)
北海道医療大学・歯学部・教授
研究者番号：40095336

荒川 俊哉 (OKAYAMA, Miki)
北海道医療大学・歯学部・助教
研究者番号：40306254

中尾 友也 (NAKAO, Yuya)
北海道医療大学・歯学部・助教
研究者番号：90733048

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者