

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463170

研究課題名(和文) 不死化顎関節円板クローン細胞による顎関節のバイオエンジニアリング技術の基盤的開発

研究課題名(英文) Basic research of tissue engineering for TMJ using immortalized TMJ disc cell clones

研究代表者

細道 純 (Hosomichi, Jun)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：00420258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、成人の顎骨低形成の病態解明のため、リラキシンの変形性顎関節疾患への関与を検討することを、第一の目的とした。in vitroにおいて、不老不死化マウス顎関節円板由来細胞に対して、リラキシン処理し、線維芽細胞様クローン細胞において、RXFP1/2およびMM9/13の発現量が増加した。また小児の顎骨低形成の病態を解明するため、小児OSAにおける顎骨低形成に着目した。病態の主徴である間欠的低酸素下にて成育したラットのX線解析の結果、低酸素曝露による下顎骨を主体とする顎顔面骨劣成長が見られた。下顎頭の骨微細構造をCT解析すると、骨密度の上昇が認められ、関節部における骨代謝の変調が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Our first purpose was to clarify the mechanism of osteoarthritis in TMJ, leading to disturb TMJ regeneration in adults, especially in female adults. We checked cell responses of TMJ disc clone cells to female hormone, relaxin. Relaxin enhanced the expression of RXFP1/2 in fibroblast-like clones. It caused a greater induction of MMP9/13 in fibroblast- than in chondrocyte-like clones. Our second purpose was to examine the role of intermittent hypoxia (IH) observed in pediatric obstructive sleep apnea (OSA) in dentofacial morphological changes in growing rats. We demonstrated that IH induces the formation of a smaller mandible and larger tongue in peripubertal rats, consistent with children with OSA who exhibit macroglossia and retrognathia, as well as discrepant growth in the transverse dental arch. Mandibular growth persists during adolescence, suggesting that IH induces earlier intramembranous ossification and growth delay in the mandible in growing rats.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：顎骨低形成 骨軟骨破壊

1. 研究開始当初の背景

顎骨は、サイトカインやホルモン、低酸素、力学的刺激などの内的小および外的要因に対して応答しながら成長する。歯科矯正学において顎顔面骨の低成長は咬合構築の大きな障害となり、疾患による顎関節の低形成、破壊の機序の解明は重要な課題である。

顎関節組織は、関節窩、関節円板および下顎頭から構成される。維軟骨組織である顎関節円板は、関節機能に関わる重要な組織であり、顎関節疾患の増悪において顎関節円板の病的破壊が進行する。研究代表者は、先行研究において、顎関節円板を構成する細胞の種類や細胞性格について特定した。変形性顎関節疾患の罹患率は、思春期から出産適齢期の女性において高いことから、女性ホルモンがその病態を担う可能性が考えられている。リラキシンは、妊娠・出産期において多く産生される女性ホルモンであり、軟骨基質の分解作用を持つ。したがって、本研究では、第一に、成人における顎骨の低形成の要因のひとつである、変形性顎関節疾患と女性ホルモンに着目する。

小児における顎骨低形成は、閉塞性睡眠時無呼吸症候群(OSA)の患者において、多く見られる。小児 OSA は、慢性的な間欠性低酸素血症を主徴とすることから、低酸素血症による顎骨の成長障害の可能性が考えられる。しかし、小児 OSA に関する病理研究や病態を再現したモデルを用いた報告は少なく、低酸素血症の顎顔面成長障害の機構への関与は不明である。関節末端の成長板を介した軟骨性骨化による四肢骨の成長に対して、顎顔面頭蓋は膜性骨化または縫合性骨化により成長する。したがって、本研究では、第二に、小児 OSA における顎顔面骨特有の成長障害に着目し、小児における低酸素曝露による顎骨の低形成について検討する。

2. 研究の目的

本研究では、成人における顎骨の低形成の病態を解明するため、女性ホルモンであるリラキシンの変形性顎関節疾患への関与を検討することを、第一の目的とする。

また、小児における顎骨の低形成の病態を解明するため、小児 OSA における顎骨の低形成に着目し、病態の主徴である間欠的低酸素曝露による顎顔面の成長障害について検討することを、第二の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 不死化顎関節円板細胞クローンの女性ホルモンに対する細胞反応

ヒト・テロメラーゼ逆転写酵素(hTERT) cDNA 発現ベクターを強制発現させることにより不老不死化させた、12 週齢雌性マウス顎関節円板由来細胞のクローン細胞 2 種類(軟骨細胞様クローン細胞#1 および#11、線維芽細胞様クローン細胞#2 および#6)を細胞材料として用いる。リラキシン(0.1ng/ml)を添加し

た条件で、各顎関節円板クローン細胞を培養し、リラキシン受容体 Rxfp1/2、基質分解酵素 MMP9/13 の発現変化について、定量 PCR により mRNA レベルを、ウエスタンブロットイングによりタンパク質レベルを解析した。(2) 成長期ラットの間欠的低酸素(IH)曝露モデルの作成

6 週齢雄性ラットを、間欠的低酸素飼育チャンバー(毎日 8 時間、90 秒サイクルで、酸素濃度を 1-21% で変化させる)内で 4 日-6 週間飼育し、動物モデルを作製する。

(3) ラット歯列・舌形態の解析

ラット顎顔面成長が終了する 10 週齢にて飼育を終えた後、ラット歯列模型の作成し、歯列形態を評価する。また舌の形態計測の実施する。

(4) 四肢骨および顎顔面骨の X 線解析および組織学的解析

頭部と脛骨を採取し、軟 X 線撮影による顎顔面骨および脛骨の形態評価を行い、マイクロ CT 撮影による骨密度、骨微細構造の解析を実施する。

(5) 上気道形態の X 線学的手法による解析

小児 OSA 患者が鼻呼吸障害を呈することから、鼻腔を含む上気道の形態を小動物実験用 CT 解析により行い、上気道の成長に対する間欠的低酸素曝露の影響について、検討する。

4. 研究成果

(1) リラキシンに対する顎関節円板細胞クローンの細胞反応

リラキシン処理(リラキシン濃度 0.1 ng/ml)は、mRNA レベルおよびタンパク質レベルにおいて、2 種類のリラキシン受容体 RXFP1 と RXFP2 の発現量をクローン#2 と#6 において上昇させた。しかし、クローン#1、#11 に対して、リラキシン処理は、RXFP1、RXFP2 の発現レベルに影響を与えなかった。リラキシン処理は、線維芽細胞様クローンであるクローン#2、#6 の MMP9、MMP13 の mRNA レベル及びタンパク質レベルの発現量を増加させ、リラキシン受容体と MMPs の発現変化に相関があることが示唆された。

(2) IH が及ぼす全身成長への影響

全身の成長評価の為、体重及び脛骨長径を測定した。IH 曝露 4 日後および対照群である通常大気曝露 4 日後の両モデル間において、体重および脛骨長径に有意な差は認められなかった。IH 曝露 3 週間後においては、通常大気曝露 3 週間後と比較し体重に有意な低下が認められたが、脛骨長径においては有意な変化は認められず、全身骨長径への影響は少ないと考えられた。

(3) 成長期 IH 曝露ラット歯列形態解析

IH 曝露後の動物モデルにおいて、上顎歯列幅径の減少と下顎歯列幅径の増加が生じ、上下顎臼歯部の歯列幅径の不調和が示唆された。μCT 画像を用いた形態評価からも、下顎臼歯歯列がなす歯列弓の角度が有意に増

加し、下顎歯列の形態変化が認められた。

(4) IH 曝露ラット舌形態解析

モデルの歯列形態の評価から、舌の幅、長径の実測値に明確な差は認められなかったが、下顎骨の狭小化を考慮すると、舌幅径は、舌を納める顎骨に対して相対的に増加したことが判明した。

(5) セファロ分析によるラット顎顔面成長の評価

IH 曝露 4 日後および通常大気 4 日後において、各測定項目に有意な差は認められなかった。実験 3 週間後、IH 群は、対照群と比較して、鼻腔幅径 (M_1-M_1) は、有意に小さな値を示し、鼻骨長径 (E-N) においても IH 群は対照群と比較して小さな値を示した。しかし、鼻腔の高径 (E-U) および前後径 (ANS-PNS) は、実験群および対照群との間で、有意な差は認められなかった。また、脳頭蓋骨領域の測定項目においては、有意な差は認められなかった。

IH 曝露 3 週間後、下顎骨については、下顎骨長径 (Co-L1)、下顎頭-Me 間距離 (Co-Me)、下顎枝高径 (Co-Gn)、下顎骨体後方部長径 (Go-Mn) および下顎角幅径 (Go1-Go2) において、有意に小さな値を示した。

(6) ラット顎顔面頭蓋領域間の形態評価

IH 曝露 3 週間後、IH 群および対照群において、脳頭蓋骨長径 (Po-E) を基準に、下顎骨領域および鼻骨領域測定項目の比率を算出した。脳頭蓋骨に対する鼻骨及び下顎骨の比率が変化しており、顔面頭蓋領域における形態の不調和が認められた。

(7) ラット鼻腔の 3 次元 CT 解析

ラット鼻腔の μ CT 解析により、ANS、E、PNS を指標として、鼻腔前方部、中間部および後方部の鼻気道断面積および容積を算出した結果、気道断面積は、鼻腔の前方部と中間部において、対象群と比較して、IH 群で有意に小さな値を示し、気道容積も実験群において有意に小さな値を示した。

(8) μ CT によるラット骨微細構造解析

IH3 週間後、対照群と比較して、IH 群において、下顎頭海綿骨及び下顎第一臼歯根間中隔歯槽骨の BMD 及び BV/TV の上昇が認められた。また、3 次元 CT 画像からも、IH 群においてより骨微細構造が緻密になっていた。

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 5 件)

Hosomichi J, Kuma Y, Oishi S, Nagai H, Maeda H, Usumi-Fujita R, Shimizu Y, Kaneko S, Shitano C, Suzuki J, Yoshida K, Ono T. Intermittent hypoxia causes mandibular growth retardation and macroglossia in growing rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2016 in press. 査読有。
Oishi S, Shimizu Y, Hosomichi J, Kuma Y, Nagai H, Maeda H, Usumi-Fujita R,

Kaneko S, Shitano C, Suzuki J, Yoshida K, Ono T. Intermittent hypoxia induces disturbances in craniofacial growth and defects in craniofacial morphology. *Arch Oral Biol*. 61:115-124. 2016. 査読有。

Park Y, Hosomichi J, Ge C, Xu J, Franceschi R, Kapila S. Immortalization and characterization of mouse temporomandibular joint disc cell clones with capacity for multi-lineage differentiation. *Osteoarthritis Cartil*. 23:1532-1542. 2015. 査読有。

Kuma Y, Usumi-Fujita R, Hosomichi J, Oishi S, Maeda H, Nagai H, Shimizu Y, Kaneko S, Shitano C, Suzuki J, Yoshida K, Ono T. Impairment of nasal airway under intermittent hypoxia during growth period in rats. *Arch Oral Biol*. 59:1139-45. 2014. 査読有。

Kapila S, Park Y, Ahmad N, Hosomichi J, Hayami T, Tacon C. Mechanisms for relaxin's modulation of MMPs and matrix loss in fibrocartilages. *Ital J Anat Embryol*. 2013;118:62-5. 査読有。

[学会発表](計 18 件)

Hosomichi J, Nakai Y, Maeda H, Kuma Y, Oishi S, Usumi-Fujita R, Shimizu Y, Kaneko S, Ishida Y, Shibutani N, Yoshida K, Ono T. Intermittent hypoxia triggers inflammatory pathway with down-regulated myofibrillar and mitochondrial biogenesis in the geniohyoid muscle. 74th Annual Meeting of the Japanese Orthodontic Society. 福岡市・マリンメッセ. 2015 年 11 月 20 日.

Japanese Orthodontic Society Award of Excellence 受賞.

大石修史, 清水康広, 細道純, 金香佐和, 渋谷直樹, 白見莉沙, 隈陽一郎, 中井雄太, 鈴木淳一, 前田秀将, 吉田謙一, 小野卓史. 成長期ラットにおける間欠的低酸素曝露は、骨成長障害とともに関節頭海綿骨の骨密度増生をもたらす. 第 74 回日本矯正歯科学会大会. 福岡市・マリンメッセ. 2015 年 11 月 20 日. 日本矯正歯科学会優秀発表賞受賞.

Hosomichi J, Oishi S, Kuma Y, Maeda H, Nagai Y, Kaneko S, Shitano C, Suzuki J, Yoshida K, Ono T. Up-regulation of inflammatory pathway through interleukins and NOS in the geniohyoid muscle. *SLEEP* 2015. アメリカ・シアトル. 2015 年 6 月 6~10 日.

Kuma Y, Usumi-Fujita R, Hosomichi J, Oishi S, Nagai Y, Maeda H, Kaneko S, Suzuki J, Yoshida K, Ono T. Impairment of nasal airway under intermittent hypoxia during growth period in rats. *SLEEP* 2015. アメリカ・シアトル. 2015 年 6 月 6~10

日.
Oishi S, Shimizu Y, Hosomichi J, Kuma Y, Maeda H, Nagai Y, Kaneko S, Suzuki J, Yoshida K, Ono T. The effects of intermittent hypoxia on the microstructure of growing craniofacial bones. SLEEP 2015. アメリカ・シアトル. 2015年6月6~10日.

Hosomichi J, Kuma Y, Oishi S, Nagai H, Maeda H, Kaneko S, Usumi-Fujita R, Shimizu Y, Ishida Y, Suzuki J, Yoshida K, Ono T. Intermittent hypoxia induces impaired craniofacial and muscular growths in rats. 2015 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition. アメリカ・ボストン. 2015年3月11~14日.

Kapila S, Park Y, Ahmad N, Hosomichi J, Hayami T, Xu J. Mechanisms for relaxin's modulation of fibrocartilage MMPs and matrix loss. 2015 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition. アメリカ・ボストン. 2015年3月11~14日.

Yamaguchi H, Ishida Y, Suzuki J, Watanabe R, Hosomichi J, Shitano C, Usumi-Fujita R, Shimizu Y, Kaneko S, Isobe M, Ono T. Introducing a decoy into the periodontium via an ultrasound microbubble. 2015 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition. アメリカ・ボストン. 2015年3月11~14日.

細道純, 隈陽一郎, 大石修史, 永井恒志, 金香佐和, 臼見莉沙, 清水康広, 舌野知佐, 石田雄之, 鈴木淳一, 吉田謙一, 小野卓史. 成長期の間欠的低酸素曝露は, ラット顎顔面の成長障害とともに舌の肥大および下顎歯列の拡大をもたらす. 第73回日本矯正歯科学会大会. 千葉市・幕張メッセ. 2014年10月22日.

大石修史, 清水康広, 細道純, 隈陽一郎, 前田秀将, 臼見莉沙, 金香佐和, 舌野知佐, 鈴木淳一, 吉田謙一, 小野卓史. 成長期ラットにおける間欠的低酸素曝露は, 骨成長障害とともに関節頭海綿骨の骨密度増生をもたらす. 第73回日本矯正歯科学会大会. 千葉市・幕張メッセ. 2014年10月22日. 日本矯正歯科学会優秀発表賞受賞.

Hosomichi J, Oishi S, Kuma Y, Maeda H, Nagai Y, Kaneko S, Shitano C, Suzuki J, Yoshida K, Ono T. Intermittent-hypoxia induced expression of autophagy accelerates BNIP3 in the geniohyoid muscle in contrast to gastrocnemius muscle in rats. SLEEP 2014. アメリカ・ミネアポリス. 2014年5月31日~6月4日.

Kuma Y, Usumi-Fujita R, Hosomichi J, Oishi S, Nagai Y, Maeda H, Kaneko S, Suzuki J, Yoshida K, Ono T. Growth impairment of nasal airway under intermittent hypoxia during growth period

in rats. SLEEP 2014. アメリカ・ミネアポリス. 2014年5月31日~6月4日.

Oishi S, Shimizu Y, Hosomichi J, Kuma Y, Maeda H, Nagai Y, Kaneko S, Suzuki J, Yoshida K, Ono T. Disturbance of maxillofacial bone growth induced by intermittent hypoxia in growing rats. SLEEP 2014. アメリカ・ミネアポリス. 2014年5月31日~6月4日.

Oishi S, Shimizu Y, Hosomichi J, Kuma Y, Maeda H, Nagai H, Kaneko S, Suzuki J, Yoshida K, Ono T. The Intermittent hypoxia induced discrepancy of bone growth and density in rat maxillofacial bone. The Annual Dental Scientific Conference. ベトナム・ホーチミン. 2014年3月31日~4月1日.

Kuma Y, Usumi-Fujita R, Hosomichi J, Oishi S, Nagai H, Maeda H, Kaneko S, Suzuki J, Yoshida K, Ono T. Impairment of nasal airway under intermittent hypoxia during growth period in rats. The Annual Dental Scientific Conference. ベトナム・ホーチミン. 2014年3月31日~4月1日.

大石修史, 清水康広, 細道純, 隈陽一郎, 前田秀将, 臼見莉沙, 金香佐和, 舌野知佐, 鈴木淳一, 吉田謙一, 小野卓史. 間欠的低酸素はラット顎顔面領域の骨成長を抑制し形態の不調和をもたらす. 第72回日本矯正歯科学会大会. 松本市・キッセイ文化ホール. 2013年10月8~9日. 日本矯正歯科学会優秀発表賞受賞.

隈陽一郎, 臼見莉沙, 細道純, 大石修史, 永井恒志, 清水康広, 金香佐和, 舌野知佐, 鈴木淳一, 吉田謙一, 小野卓史. 成長期における間欠的低酸素がラット鼻腔気道の三次元形態に与える影響. 第72回日本矯正歯科学会大会. 松本市・キッセイ文化ホール. 2013年10月8~9日. 日本矯正歯科学会優秀発表賞受賞.

Oishi S, Shimizu Y, Hosomichi J, Ono T.

The effect of intermittent hypoxia on mandibular growth in childhood.

CU-TMDU Research Experience Exchange. タイ・バンコク. 2013年1月.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細道 純 (HOSOMICHI, Jun)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・講師
研究者番号：00420258

(2) 研究分担者

米満 郁男 (YONEMITSU, Ikuo)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・助教
研究者番号：00431940

清水 康広 (SHIMIZU, Yasuhiro)
東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号：00431940