

平成22年5月27日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19592133

研究課題名（和文） 遺伝子発現解析による下顎頭の加齢的变化と変形性顎関節症の病態の解明

研究課題名（英文） Molecular change in condylar cartilage and subchondral bone
accompanying aging and temporomandibular joint osteoarthritis

研究代表者

渋川 義宏 (SHIBUKAWA YOSHIHIRO)

東京歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：50297347

研究成果の概要（和文）：

インディアンヘッジホッグ(以下、*Ihh*)は、軟骨細胞の増殖や分化を調節することにより長管骨や頭蓋底の成長に重要な役割を担うことが報告されている。本研究は下顎頭の軟骨基質の産生・維持における *Ihh* の役割を明らかにし、変形性顎関節症の発症、進行に伴う *Ihh* と軟骨基質の変化を調べた。その結果、*Ihh* は下顎頭のコラーゲンやプロテオグリカンの産生調節や維持に関与し、変形性顎関節症の軟骨基質産生の低下にはヘッジホッグシグナルが関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Objectives: Temporomandibular joint (TMJ) osteoarthritis (OA) is mainly caused by aging or occlusal abnormalities such as loss of occlusion. However, the mechanism underlying the early stages of TMJ-OA and its progression remain to be fully clarified. One major problem in OA is the low rate of matrix synthesis and failure of chondrocytes to exceed the rate of matrix degradation. Indian hedgehog (*Ihh*) is essential for embryonic mandibular condylar growth and disc primordium formation, and its expression is also required for completion of post-natal TMJ growth and organization. In this study, a decrease was observed in expression of *collagen II* and *Aggrecan*, the main extra-cellular-matrix (ECM) components of condylar cartilage, in post-natal *Ihh*-deficient condyles, which is indicative of OA lesions. The purpose of this study was to determine the role of *Ihh* in the development of TMJ-OA accompanying aging and loss of occlusion in Senescence Accelerated Mouse.

Methods: We used two 4-month-old strains: senescence-accelerated prone (SAMP8) mice and senescence-accelerated resistant (SAMR1) mice as a control, each strain comprising 40 males. Each strain was divided into two groups: (1) a milling group (MG: crowns of upper and lower bilateral molars and incisors milled to loss of occlusion and soft dough diet

for 4-8 weeks); and (2) a non-milling group (NG: no molar or incisor milling and hard pellet diet for 4-8 weeks). The mandibular condyle was evaluated by histology and gene expression by real time polymerase chain reaction.

Results: In the MG, both strains showed a reduction in thickness of the condylar cartilage and gene expression of type II collagen (*Col II*), *Aggrecan* and *Ihh*, and a gradual increase in gene expression of matrix metalloproteinase (*MMP*)-13 and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif-5 (*ADAMTS5*) over 4-8 weeks compared to in the NG. Although a significant reduction was observed in gene expression of *Col II*, *Aggrecan* and *Ihh* in the SAMP8 MG compared to in the SAMR1 MG over 4-8 weeks, gene expression of *ADAMTS5* and *MMP13* showed a significant increase compared to in SAMR1 over 4-8 weeks.

Conclusion: The results suggest that loss of occlusion affects extracellular matrix remodeling, leading to degradation of the mandibular condyle, and that hedgehog signaling affects extracellular matrix remodeling.

The observed degradation of extracellular matrix in SAMP8 indicated development toward more serious TMJ-OA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔解剖学（含組織学・発生学）、下顎頭、顎関節、変形性顎関節症、加齢、遺伝子発現、インディアンヘッジホッグ

1. 研究開始当初の背景

変形性顎関節症は加齢に伴う下顎頭軟骨細胞の細胞外環境の変化や、咬合性外傷による過剰な生体力学的荷重などが誘因となり発症する。その病態には下顎頭軟骨細胞の変性が指摘されており、加齢的变化や軟骨変性に陥った軟骨組織では、プロテオグリカンなどの軟骨基質の産生が低下する。従って、そ

の産生と維持が変形性顎関節症の発症の予防と治療に重要であると考えられる。我々は、これまで下顎頭の発生過程において、分泌性タンパク質であるインディアンヘッジホッグ(以下、Ihh)が軟骨細胞の増殖、分化や軟骨基質の産生を調節することを報告した。本研究では、生後マウス下顎頭の軟骨基質の産

生および維持における *Ihh* の役割を明らかにし、さらに、変形性顎関節症の実験モデル（老化促進マウスにおける咬合喪失モデル）を用いて、変形性顎関節症の発症、進行における *Ihh* と軟骨基質の変化を明らかにする。

2. 研究の目的

下顎頭の軟骨基質の産生および維持における *Ihh* の役割を明らかにし、変形性顎関節症の病態における下顎頭の *Ihh* と軟骨基質の変化を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウス下顎頭軟骨の形態形成、特に

軟骨基質の産生における *Ihh* の役割

生後マウス下顎頭軟骨の形態形成における *Ihh* の役割について生後1日齢から生後8週齢の軟骨細胞特異的 *Ihh* ノックアウト (KO) マウス (*Ihh^{fl/fl}; Col2 α 1Cre*; tamoxifen-inducible conditional *col2 α 1-Cre ER^{*}; floxed Ihh* knockout mice) および正常マウス (*Ihh^{fl/fl}* Wild Type: WT) を用い、下顎頭の形態形成を解剖学的、組織学的に観察した。さらに、*Ihh*、*Ptch1* (*Patched 1: Ihh* のレセプター)、アグリカン (*Aggrecan*)、1型コラーゲン (*Col 1*)、2型コラーゲン (*Col 2*) の遺伝子の時空的な発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法により解析した。

(2) 変形性顎関節症の病態における下顎頭の *Ihh* と軟骨基質の変化

従来より報告されている変形性顎関節症の実験モデルを使用した。実験動物には生後8週齢、16週齢の老化促進モデルマウス (SAMP8) とその対照群 (SAMR1; 正常老化) を各30匹用いた。各週齢両群マウスの上下左右側臼歯歯冠全部と切歯の一部を削合し、咬合喪失モデルを作製し、解剖学的、組織学

的 (Safranin O - fast green 染色) に観察した。さらに、歯冠削合2、4週後に下顎頭軟骨を採取、*Ihh*、軟骨基質 (*Col 2*、*Aggrecan*)、軟骨基質分解酵素 (*MMP13*、*ADAMTS5*) の遺伝子発現量の変化を real-time RT PCR を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) *Ihh*、*Ptch1* の遺伝子発現

Ihh は軟骨細胞層に、*Ptch1* は軟骨細胞層とその上部の線維層に認められた。*Ihh* および *Ptch1* の遺伝子発現は生後1日齢に比較して生後8週齢では減少がみられた (図1)。

(ICR mice)

(2) マウス下顎頭軟骨の形態形成、特に軟骨基質の産生における *Ihh* の役割

8週齢の WT マウスでは下顎頭表層部より線維層、前軟骨細胞 (間葉細胞) よりなる増殖層、Safranin O に赤く染色される軟骨細胞層が認められ (図2A)、その部位に一致して *Col 2*、*Aggrecan* の発現がみられた (図2B、D)。また、*Col 1* は線維層のみならず、軟骨細胞層にも認められ線維軟骨としての特徴を呈していた (図2C)。一方、*Ihh* KO マウスでは Safranin-O に染色される領域が狭く (図2E)、さらに *Col 2*、*Aggrecan*、*Col 1* の発現が減少しており、軟骨基質の形成不全が認められた (図2F、G、H)。以上の結果から *Ihh* は下顎頭の軟骨基質 (*Aggrecan*、*Col 1*、*Col 2*) の産生に関与していることが示唆された (*Journal of Dental Research* 89(4):349-354, 2010)。

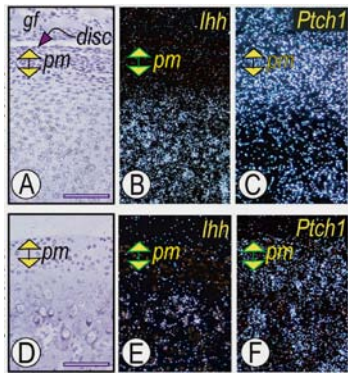


図1 *Ihh*、*Ptch1*の遺伝子発現

生後1日齢 (A-C)、生後8週齢 (D-F)

pm: 増殖層、disc: 関節円板、gf: 下顎窩

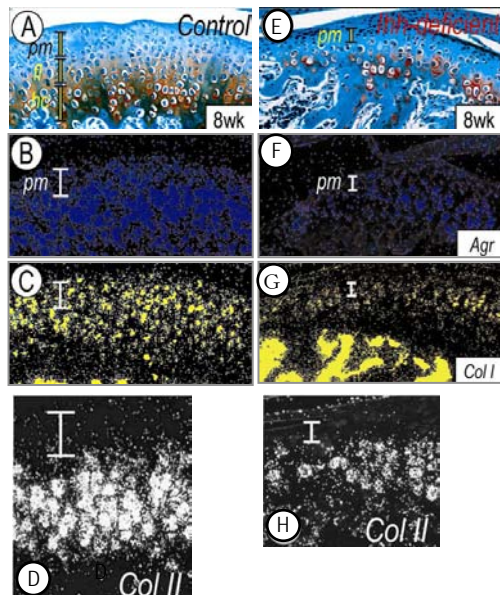


図2 *Aggrecan*、*Col 1*、*Col 2*の遺伝子発現

WT: A-D、*Ihh* KO: E-H

(8週齢)

(3) 老化促進マウスの咬合喪失による軟骨基質の変化 (図3)

老化促進マウスの歯冠を削合して咬合を喪失させた下顎頭の Safranin O - fast green 染色では、無削合群と比較して、削合群では Safranin O に赤く染色される領域が少なく、軟骨基質の著しい減少が認められた。

(4) 老化促進マウスの咬合喪失による各遺

伝子発現量の変化 (図4)

SAMP8 群 (老化促進マウス) の削合群は、無削合群と比較して *Ihh*、*Col 2*、*Aggrecan* の遺伝子発現量は有意に減少し、*MMP13*、*ADAMTS5* の遺伝子発現量は有意な増加が認められた。

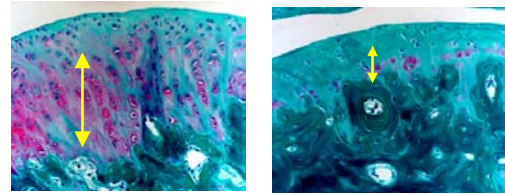


図3 老化促進マウスの咬合喪失による軟骨基質の変化

左: 無削合群、右: 削合群 (16週間)

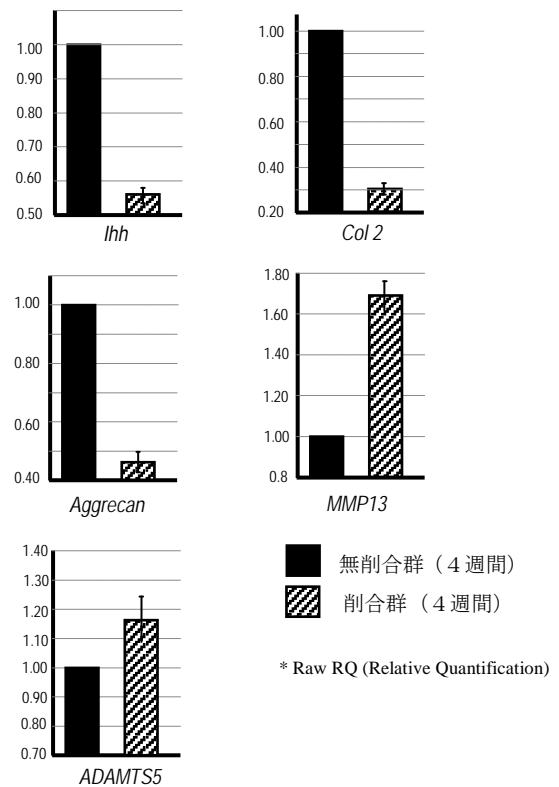


図4 老化促進マウスの咬合喪失による各遺伝子発現量の変化

(16週齢、老化促進マウス)

以上の結果より、*Ihh* は下顎頭のコラーゲン、プロテオグリカンなどの軟骨基質の産生や維持に関与していることが示唆された。今後、これらの詳しいメカニズムを解析するとともに、咬合回復に伴う下顎頭軟骨のリモデ

リングと *Ihh* の変化を明らかにしたいと考えている。

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)

- ① Ochiai T, Shibukawa Y, Nagayama M, Mundy C, Yasuda T, Okabe T, Shimono K, Kanyama M, Hasegawa H, Maeda Y, Lanske B, Pacifici M, Koyama E. Indian hedgehog roles in post-natal TMJ development and organization.

査読有 *Journal of Dental Research*. 2010 Apr;89(4):349-54. 2010

- ② Koyama E, Shibukawa Y, Nagayama M, Sugito H, Young B, Yuasa T, Okabe T, Ochiai T, Kamiya N, Rountree RB, Kingsley DM, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M, Pacifici M. A distinct cohort of progenitor cells participates in synovial joint and articular cartilage formation during mouse limb

skeletogenesis. 査読有

DevBiol.;316(1):62-73. 2008

[学会発表] (計3件)

- ① 石塚洋一、衣松高志、林 智子、太田幹夫、渋川義宏、山田 了 加齢および咬合の喪失に伴う下顎頭の形態変化における *Indian Hedgehog* の役割第53回春季日本歯周病学会学術大会 盛岡 5/13~5/14
- ② Y. Shibukawa, Y. Ishizuka, T. Kinumatsu and S. Yamada Expression of Indian Hedgehog during postnatal development of mandibular condyle 38th

Meeting of the AADR Washington, DC, USA
March 3-6, 2010.

- ③ 渋川義宏、米津博文 顎関節の形態形成における Indian Hedgehog と Gli3 の役割
第21回日本顎関節学会学術大会 平成20年7月26日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渋川 義宏 (SHIBUKAWA YOSHIHIRO)

東京歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：50297347

(2) 研究分担者

太田 幹夫 (OTA MIKIO)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：30322473

村松 敬 (MURAMATSU TAKASHI)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：00276982

山田 了 (YAMADA SATORU)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20103351

(3) 研究協力者

EIKI KOYAMA

トーマスジェファーソン大学医学部

整形外科学講座 基礎研究部門 准教授

MAURIZIO PACIFICI

トーマスジェファーソン大学医学部

整形外科学講座 基礎研究部門 教授