

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2005～2008

課題番号：17591901

研究課題名（和文） 下顎頭軟骨等の二次軟骨形成を制御する転写因子、成長因子の検索

研究課題名（英文） Analyzes of transcription and growth factors on secondary chondrogenesis such as mandibular condylar cartilage

研究代表者

柴田 俊一 (SHIBATA SHUNICHI)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号 80187400

研究成果の概要：4年間の研究期間で、下顎頭軟骨形成過程における転写因子 (Runx2, Osterix, Sox9)、成長因子 (IGF) の発現パターンが明らかになるとともに、新規軟骨細胞増殖因子である cartducin の下顎頭軟骨形成に対する機能の一端が明らかとなった。この間に原著論文 13 報 (いずれも査読ありの雑誌) を出版した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	2,100,000	0	2,100,000
2006 年度	500,000	0	500,000
2007 年度	500,000	150,000	650,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,600,000	300,000	3,900,000

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：軟骨 二次軟骨 下顎頭 転写因子 成長因子

## 1. 研究開始当初の背景

下顎頭軟骨は顎関節の一員であり、関節軟骨として働き咬合力を緩衝する働きがある。また同時に下顎頭軟骨は顎顔面の 1 つの成長中心として、成長軟骨としても働いており、機能的にもユニークな特徴を持つ器官であるとともに口腔外科、矯正、小児歯科などの臨床的見地からもその構造上の特徴を研究することは非常に重要であると考

えられる。

下顎頭軟骨は発生学的に二次軟骨に分類され、四肢の軟骨原基やメッケル軟骨などの一次軟骨とは構造、発生由来、血管分布等が異なるとされている。もう少し詳しく定義付けると 1) 時期的に一次軟骨より遅れて発生する。2) 二次軟骨の軟骨細胞は未分化間葉細胞から直接分化するのではなく、既存の骨の骨膜に由来するものである、ということ

があげられている。具体的には下顎頭軟骨以外に下顎角軟骨、陰茎骨、さらに広い意味では骨折時に生じる仮骨も二次軟骨に含まれる。研究代表者らはマウス下顎頭軟骨の初期発生過程に着目し、この軟骨が独立した間葉凝集ではなく下顎骨の原基に連続するアルカリフォスファターゼ陽性の細胞集団から発生することを明らかにした (Shibata et al. J. Anat. 191, 561-570, 1997)。さらに軟骨組織が形成されるや否や細胞は直ちに肥大軟骨細胞に分化し肥大細胞層がその後急速に伸長すること、その際に BSP の発現が顕著であることなど、四肢の軟骨原基とは異なる分化、形成過程を明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

これまでは主にプロテオグリカンやコラーゲンあるいは BSP やオステオポンチンといった基質成分を指標に解析を行ってきたが、これらの成分を合成、分泌する細胞を制御する成長因子 (FGF, IFG, BMP 等)、あるいは基質成分、成長因子の遺伝子発現を調整する転写因子の解析、とりわけ二次軟骨原基に特異的に発現する因子の遺伝子の解析は非常に重要な研究テーマであると考えられる。転写因子に関しては小守らによって発見された Runx2 (cbfa1) が骨形成に関する本質的な制御因子でその遺伝子欠損マウスでは骨組織が完全に欠如することが知られている。研究代表者らもこの遺伝子欠損マウスの解析を遂行し、このマウスでは一次軟骨は形成されるものの、下顎頭軟骨等の二次軟骨は完全に欠如すること、ただしアルカリフォスファターゼ陽性の原基までは形成されていることなどを明らかにしていた。また中島らによって発見された Osterix と呼ばれる転写因子は Runx2 の下流で働く骨形成制御因子であり、また軟骨形成には抑制的に働くとされている。二次軟骨はアルカリフォスファターゼ陽性の原基、すなわち本来骨原性細胞として機能している原基が骨に分化せず軟骨の方へ分化が進んだものと解釈できる。従って Runx2 の下流にあり Osterix に相当する二次

軟骨形成を制御する転写因子の存在が推測される。本研究はまずもって既知の転写因子あるいは成長因子を形態学、生化学両面から検索すると共に最終的には上述のような未知の転写因子を同定することを目的としている。

## 3. 研究の方法

(1) In situ hybridization 法によるマウス下顎頭軟骨初期形成過程における転写因子、成長因子の解析

我々の研究から胎齢 14 日で下顎頭軟骨は間葉凝集の状態であり、15 日で最初の軟骨形成が認められ、16 日では肥大細胞層が著しく伸長することがわかっている。この結果を踏まえて、下顎頭軟骨初期形成過程における既知の転写因子、成長因子の発現を検索した。通報にしたがって試料を固定、パラフィン包埋し冠状断切片を作成した後、転写因子としては Runx2、Osterix、Sox family 等、成長因子として IGF family, BMP family, FGF family 等の遺伝子の発現を、in situ hybridization 法で検索した。比較対照のため一次軟骨である体肢軟骨においても同様な解析を行った。この場合基質タンパクと異なり、これらの因子の発現量が低いため Digoxigenin ではなく <sup>35</sup>S-UTP で標識したプローブを用いた。

(2) 新規軟骨細胞増殖因子、cartducin の二次軟骨形成過程における発現と機能

前田らによって発見された cartducin, の発現を in situ hybridization で検索した後、二次軟骨軟骨形成過程における役割を実際に検索するために、胎齢 14 日のマウスから下顎頭軟骨原基を取り出し、器官培養の系に移し、それに核成長因子に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド (AS-ON) を設計し、培地に添加することによって、これらの成長因子の発現を制御し、その変化を解析した。解析方法は組織学的

な観察に加え、コラーゲン他のマーカータンパクの免疫組織とリアルタイム PCR 法による mRNA の定量である。

#### 4. 研究成果

(1) マウス下顎頭軟骨発生過程における、Runx2、Osterix、Sox9 の発現

マウス下顎頭軟骨は胎齢 14 日で、間葉凝集の状態であり 15 日で最初の軟骨形成が認められ、16 日では肥大細胞層が著しく伸長することがわかっている。本年はまずもってこの下顎頭軟骨初期形成過程における既知の転写因子の発現を検索した。通法にしたがって試料を固定、パラフィン包埋し、冠状断切片を作成して In situ hybridization 法で Runx2、Osterix、Sox9、Sox5 の発現を検索したところ、前 3 者はいずれも胎齢 14 日の間葉凝集に発現がみられ、下顎頭軟骨形成に何らかの働きをしていることが判明した。胎齢 15 日で最初の軟骨形成が認められると軟骨内では、Osterix の発現が著しく低下していること、また Runx2 の発現も若干減少していることがわかり、一方 Sox9 の発現は引き続き軟骨内で認められるほか、Sox5 の発現が新たに軟骨内に認められた(図 1)。

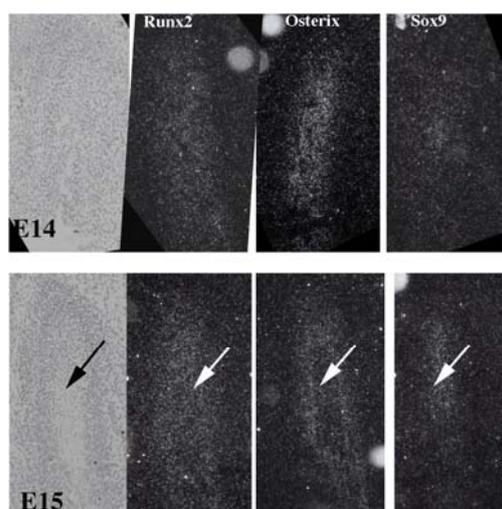


図 1 下顎頭軟骨初期形成部位における Runx2、Osterix、Sox9 mRNA の発現

この観察からマウス下顎頭軟骨の初期形成部位においては Osterix が軟骨形成に抑制的に働いており、その発現の低下と軟骨形成促進因子である Sox9-Sox5 が関係していることが明らかになった

(2) マウス下顎頭軟骨発生過程における、IGF-1, 2, および IGF-I receptor (IGF-R) の発現

胎齢 14 日において、IGF-1 と IGF-II の mRNA は間葉細胞凝集の周辺部で全体を取り囲むように発現が認められた。一方 IGF-IR mRNA は間葉凝集の中心部に、リガンドとネガティブの関係になるように発現が認められた。胎齢 15 日において、下顎頭軟骨原基の中に最初の軟骨形成が認められ、胎齢 16 日では軟骨の大きさが著しく伸長していた。また形成された軟骨の周囲組織は扁平な線維芽細胞を含む軟骨膜の形成が認められた。この間、IGF-I および IGF-II mRNA は軟骨周囲の軟骨膜に発現が認められ、IGF-IR mRNA は軟骨上部の間葉細胞(増殖帯)に発現が認められた(図 2)。

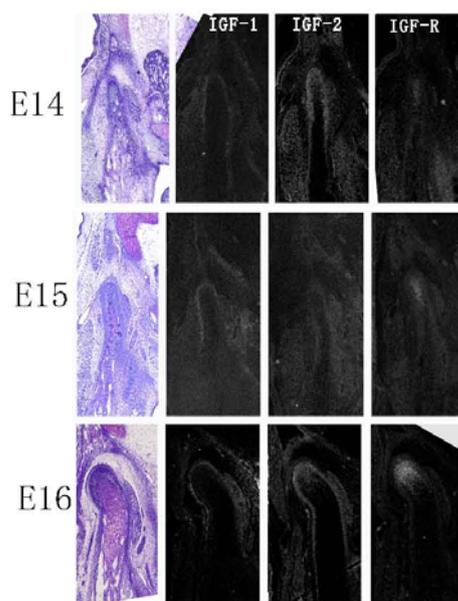


図 2 下顎頭軟骨初期形成部位における IGF-1、IGF-2、IGF-receptor mRNA の発現

以上のことから、IGF-1, 2 は軟骨原基周囲に発現し、“IGF-リッチ”な環境を作り、レセプターの発現を構成することによって初期軟骨形成を制御していることが判明した。

### (3) 下顎頭軟骨形成過程における cartducin の機能に関する研究

胎齢 14.5 日マウスから下顎頭軟骨原基を取り出し、器官培養の系に移し、cartducin に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド (AS-ON) を培地に添加したところ、下顎頭の正常な発育が阻害され、扁平化し舌状に広がるという形態変化を示した (図 3)。

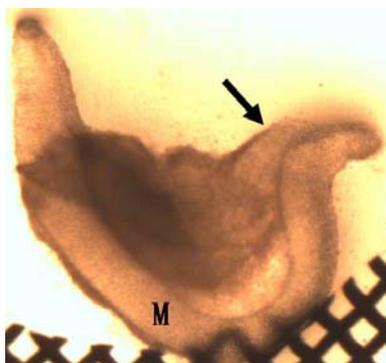


図 3 AS-ON 添加 4 日後の下顎頭軟骨 (矢印) と Meckel 軟骨 (M)。

組織切片では、下顎頭軟骨の線維層が完全に消失し、層区分が著しく乱れた軟骨組織が認められた。Real time PCR 法で軟骨マーカー蛋白の mRNA の発現を定量したところ AS-ON 添加群では、アグリカン、タイプ X コラーゲン、テネイシン-C などの mRNA の発現低下が認められた。

また同様に培養した Meckel 軟骨においても、軟骨膜が消失し、その部位に異所性の軟骨形成が生じている状態が観察された。

以上の結果から、cartducin は従来報告されている軟骨細胞増殖因子としての機能に加え、軟骨膜や骨膜組織の維持という機能もあると考えられた。下顎頭軟骨などの二次軟骨は、既存の骨の骨膜組織に由来することが特徴としてあげられる。従って、cartducin

は二次軟骨形成において非常に重要な役割を演じてと考えられ、今後この因子を用いた二次軟骨形成の制御機構解析や tissue engineering への応用が考えられ、研究を継続する予定である。

### 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 13 件)

- ① Shibata S. Yokohama-Tamaki T. An in situ hybridization study of Runx2, Osterix, and Sox9 in the anlagen of mouse mandibular condylar cartilage in the early stages of embryogenesis. *Journal of Anatomy* 213, 274-283, 2008. (査読有り)
- ② Yokota T. Shimokawa H. Shibata S. 他 5 名 Insulin-like growth factor I regulates apoptosis in condylar. *Journal of Dental Research* 87, 159-163, 2008. (査読有り)
- ③ Shibata S. Baba O. Oda T. 他 5 名 An immunohistochemical and ultrastructural study of the pericellular matrix of uneroded hypertrophic chondrocytes in the mandibular condyle of aged c-src-deficient mice. *Archives of Oral Biology* 53, 220-230, 2008. (査読有り)
- ④ Hiraoka S. Furuichi T. Nishimura G., Shibata S. 他 14 名 Nucleotide-sugar transporter SLC35D1 is critical to chondroitin sulfate synthesis in cartilage and skeletal development in mouse and human. *Nature Medicine* 13(11), 1363-7, 2007. (査読有り)
- ⑤ Fukuoka H. Shibata S. 他 3 名 Bone

morphogenetic protein rescues the lack of secondary cartilage in *Runx2*-deficient mice. *Journal of Anatomy*, 211, 8-15, 2007. (査読有り)

⑥ Shibata S. Dias RA 他 3 名  
Immunohistochemical localization of syndecan-1 in the dental follicle of postnatal mouse teeth. *Journal of Periodontology*, 78, 1322-1328, 2007. (査読有り)

⑦ Nakasone A. Shibata S. 他 3 名  
Laser burn wound healing in naso-labial region of fetal and neonatal mice. *Oral Diseases*, 13, 45-50, 2007. (査読有り)

⑧ Kitasako Y. Shibata S. Tagami  
Migration and particle clearance from hard-setting Ca(OH)<sub>2</sub> and self-etching adhesive resin following direct pulp capping. *J. American Journal of Dentistry*, 19, 370-375, 2007. (査読有り)

⑨ Baba O Miyata A Abe T Shibata S 他 5 名  
Formation of acellular cementum-like layers with and without extrinsic fiber insertion along inert bone surfaces of aging c-*Src* gene knockout mice. *European Journal of Oral Sciences* 114, 524-534, 2006. (査読有り)

⑩ Shibata S. Oda T. Abe T. 他 2 名  
Structural features of incremental line-like striations in mandibular condylar cartilage of c-*src*-deficient mice *Archives of Oral Biology*, 51, 951-959, 2006 (査読有り)

⑪ Shibata. S. Fujimori T. Yamashita Y.  
An in situ hybridization and histochemical study of developing and postnatal changes

of mouse mandibular angular cartilage compared with condylar cartilage *Journal of Medical and Dental Sciences* 53, 41-50, 2006. (査読有り)

⑫ Shibata. S. Suda N. 他 3 名  
An in situ hybridization study of *Runx2*, *Osterix*, and *Sox9* at the onset of condylar cartilage formation in fetal mouse mandible. *Journal of Anatomy* 208, 169-177, 2006. (査読有り)

⑬ Dias R.A. Shibata S. 他 4 名  
Syndecan-1 Expression during the Formation of Junctional Epithelium *Journal of Periodontology* 76 696-704, 2005. (査読有り)

[学会発表] (計 4 件)

① 柴田俊一、田巻玉器、鈴木裕子  
マウス下顎頭軟骨発生過程における IGF family の発現に関する研究 第 50 回歯科基礎医学会総会平成 20 年 9 月 25 日有明コンベンションセンター

② 田巻玉器、前田隆史、柴田俊一  
マウス下顎頭軟骨発生過程における cartducin の発現と機能解析 第 50 回歯科基礎医学会総会平成 20 年 9 月 24 日 有明コンベンションセンター

③ Shibata S et al. Expression of IGF Family in Developing Mouse Mandibular Condylar Cartilage 86th General Session and Exhibition of the IADR July 2, 2008 Toronto convention center

④ 柴田俊一、馬場麻人 他 3 名  
長期飼育 c-*src* 遺伝子欠損マウス下顎頭における肥大軟骨細胞の運命 第 49 回歯科基礎医学会総会 2007 年 8 月 30 日 北海道大学

6. 研究組織

(1)研究代表者

柴田 俊一

北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学  
系組織学分野

研究者番号 80187400

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

山下 靖雄

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・教授

研究者番号 70014157

須田 直人

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 90302885

寺田 典夫

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・准教授

研究者番号 30251531