

令和元年6月24日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07106

研究課題名（和文）下顎頭軟骨発生過程におけるSyndecanと成長因子による軟骨分化制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of chondrocyte differentiation by Syndecan and growth factor interactions

研究代表者

藤川 芳織（Fujikawa, Kaoru）

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：60805943

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、下顎頭軟骨初期形成過程におけるSyndecan1-4およびFgfr1-3の発現パターンについて検索し、一次軟骨である四肢軟骨原基との比較検討を行なった。四肢の軟骨原基と同様に、下顎頭軟骨形成初期ではSyndecan1, 2の間葉細胞凝集から軟骨細胞分化への関与が示唆された。Syndecan3は、四肢の軟骨原基と比較して、この時期における軟骨細胞増殖制御への関与の低さが推測された。下顎頭軟骨形成初期の細胞増殖活性の高い軟骨細胞層におけるFgfr1, 2の発現から、軟骨初期形成過程において両分子が四肢の軟骨原基とは異なる働きを担う可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎関節の構成要素の一つである下顎頭軟骨は、顎顔面の形成異常や顎関節症とも関連が深く、その構造的特徴を明らかにすることは臨床的見地から非常に重要である。また、下顎頭軟骨は代表的な二次軟骨であり、その発生由来や構造は四肢の軟骨原基などの一次軟骨とは異なる。Syndecanは成長因子およびその受容体との相互作用により細胞の増殖・分化に関与するが、下顎頭軟骨におけるSyndecanの発現および機能についての詳細な解析はない。本研究では、下顎頭軟骨の軟骨分化制御機構の解明の一端として、下顎頭軟骨形成初期におけるSyndecanとFgfrの発現パターンを一次軟骨である四肢の軟骨原基と比較検討した。

研究成果の概要（英文）：Mandibular condylar cartilage is embryologically classified as secondary cartilage and somewhat different from primary cartilage; for example, it differs in origin and pattern of expression for several matrix components and growth factors. The main purpose of this study was to investigate expression pattern of Syndecan1-4 and Fgfr1-3 in developing mandibular condylar cartilage.

研究分野：医歯薬学

キーワード：軟骨 二次軟骨 下顎頭軟骨

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

下顎頭軟骨は顎関節の構成要素の一つであり、関節軟骨としても、顎顔面領域の成長中心の一つとして成長軟骨としても機能している。したがって下顎頭軟骨は顎顔面の形成異常や顎関節症とも関連が深く、その構造的特徴を明らかにすることは臨床的な見地から非常に重要と考えられる。下顎頭軟骨は発生学的に二次軟骨に分類され、その発生由来や構造は四肢の軟骨原基などの一次軟骨とは異なることが知られている。すなわち、一次軟骨では未分化間葉系細胞が凝集し直接軟骨細胞へ分化するが、下顎頭軟骨においては、下顎骨に隣接するアルカリフォスファターゼ陽性の骨膜様組織より生じた間葉細胞凝集が軟骨細胞へと分化する。さらに、その軟骨細胞は直ちに肥大軟骨細胞へと分化することや、骨・軟骨に関連する分子の発現パターンが一次軟骨とは異なるという特徴が明らかになっている。これまで我々は、下顎頭軟骨発生過程の解明を目的として、プロテオグリカンや骨基質蛋白質を指標に、下顎頭軟骨におけるそれらの時空間的な発現パターンの解析および一次軟骨との比較検討を行ってきた。本研究では、ヘパラン硫酸プロテオグリカンである Syndecan に着目した。Syndecan は 4 種類のメンバーからなる細胞表面型ヘパラン硫酸プロテオグリカンで、そのヘパラン硫酸鎖を介して細胞外基質と相互作用し細胞増殖および分化に関与する。また、Syndecan は Fibroblast growth factor (Fgf) などの成長因子およびその受容体 (Fgfr) と複合体を形成し、細胞内シグナル伝達を惹起すると考えられている。肢芽軟骨においては Syndecan 3 が増殖軟骨細胞で発現することや Syndecan 1-3 が軟骨膜に発現することが知られているが、下顎頭軟骨の初期形成過程における Syndecan の発現や成長因子との相互作用による機能については不明である。

2. 研究の目的

本研究では下顎頭軟骨発生過程の解明の一端として、下顎頭軟骨初期形成過程における Syndecan および Fgfr の発現パターンについて解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) リアルタイム PCR によるマウス下顎頭軟骨発生過程における Syndecan1-4 および Fgfr1-3 発現の定量解析

マウス下顎頭軟骨の原基となる間葉細胞凝集は胎齢 14 日の下顎骨に隣接した部位に認められ、胎齢 15 日になると最初の軟骨細胞および肥大軟骨細胞が出現する。胎齢 16 日では特に肥大細胞層が著しく伸長し、特有の層構造が顕著となる。胎齢 14 日～16 日の下顎頭軟骨原基または下顎頭軟骨を実体顕微鏡下で摘出し、Total RNA 抽出後 cDNA を作成し、リアルタイム PCR により、下顎頭軟骨初期形成過程における Syndecan1-4 の遺伝子発現定量解析を行なった。Syndecan 関連分子として、骨・軟骨発生に関与する Fgfr1-3 の下顎頭軟骨初期形成過程における遺伝子発現についても同様の方法によりリアルタイム PCR を行い解析した。

(2) In situ hybridization によるマウス下顎頭軟骨初期形成過程における Syndecan および Fgfr の解析

下顎頭軟骨初期形成過程における時期・部位特異的な Syndecan および Fgfr の発現を In situ hybridization 法により検索した。試料は胎齢 13 日～16 日マウスより採取し 4%パラホルムアルデヒドで固定後、通法に従いパラフィン包埋し、冠状断かつ下顎枝の長軸に平行な断面の切片を作成した。また、比較対象として一次軟骨である四肢の軟骨原基においても同様の解析を行なった。

4. 研究成果

(1) マウス下顎頭軟骨初期形成過程における Syndecan1-4 の遺伝子発現定量解析

リアルタイム PCR 解析の結果、Syndecan1 および Syndecan3 mRNA 発現量は胎齢 14 日から胎齢 16 日まで顕著に減少していたのに対し、Syndecan2 mRNA 発現量は胎齢 14 日から胎齢 16 日まで一定であった。Syndecan4 mRNA 発現量は胎齢 14 日から胎齢 16 日まで約 3 倍に増加した。

(2) マウス下顎頭軟骨初期形成過程における Fgfr1-3 の遺伝子発現定量解析

リアルタイム PCR 解析の結果、Fgfr1 および Fgfr2 mRNA 発現量は胎齢 14 日から胎齢 16 日まで一定であった。Fgfr3 mRNA 発現量は胎齢 14 日から胎齢 16 日まで著しく増加した。

(3) マウス下顎頭軟骨初期形成過程における Syndecan1-4 の発現局在検索

胎齢 13 日、下顎頭軟骨原基である間葉細胞凝集は下顎骨に隣接しており、Syndecan 1 は間葉細胞凝集全体に発現し、Syndecan 2, 3 は間葉細胞凝集の下顎骨に隣接した部位に限局して発現していた。胎齢 14 日の間葉細胞凝集では引き続き Syndecan1, 2 が発現していたが、Syndecan3 の発現は認められず、syndecan4 が間葉細胞凝集の中心部に発現していた。胎齢 15 日になると最初の軟骨形成が認められ、その後方部には間葉細胞凝集が存在していた。この時期の間葉細胞凝集には Syndecan1 が、軟骨細胞には Syndecan4 が発現しており、軟骨膜には Syndecan1, 2 が発現していた。胎齢 16 日になると下顎頭軟骨は著しく伸張し細胞層構造が明

瞭となる。細胞増殖活性の高い上部の層では Syndecan1 が発現しており、肥大細胞層上層には Syndecan4 が、下層には Syndecan2, 3 が発現していた。軟骨膜には Syndecan1, 2, 3 が発現していた。

(4) マウス下顎頭軟骨初期形成過程における Fgfr1-3 の発現局在検索

胎齢 14 日の下顎頭軟骨原基である間葉細胞凝集では、Fgfr1 が下顎骨に隣接した部位に、Fgfr2 が間葉細胞凝集全体に発現していた。胎齢 15 日の間葉細胞凝集および軟骨膜には Fgfr2 が発現しており、軟骨細胞では Fgfr1 および 3 の発現が認められた。

胎齢 16 日では、細胞増殖活性の高い上部の層で Fgfr1 および 2 が、肥大細胞層上層に Fgfr3 が発現していた。軟骨膜には Fgfr1 および 2 の発現が認められた。

以上の結果より、下顎頭軟骨原基である間葉細胞凝集に発現していた Syndecan1, 2 は軟骨分化とともに消失し、このような発現パターンは一次軟骨である四肢の軟骨原基においても同様であった。これらのことから Syndecan1, 2 の間葉細胞凝集から軟骨細胞分化への関与が示唆された。また、四肢の軟骨原基では増殖軟骨細胞に Syndecan3 が発現するが、下顎頭軟骨形成初期における Syndecan3 の発現パターンより、四肢の軟骨原基と比較してこの時期における Syndecan3 の軟骨細胞増殖制御への関与の低さが推測された。四肢の軟骨原基において、Syndecan4 は肥大細胞層を除く軟骨細胞全体に発現が認められるが、下顎頭軟骨形成初期の肥大細胞層では Syndecan4 の発現が認められた。これは、形成初期の軟骨細胞が急速に肥大分化し一過的に発現が持続した結果であり、著しい間質成長を遂げる二次軟骨としての特性を反映したものと考えられた。四肢の軟骨原基の間葉細胞凝集では主に Fgfr2 が発現し、軟骨分化後は軟骨細胞には Fgfr3、肥大軟骨細胞には Fgfr1、軟骨膜には Fgfr1, 2 が発現する。下顎頭軟骨では軟骨分化後も細胞増殖活性の高い軟骨細胞層において Fgfr1, 2 の発現が認められたことから、軟骨初期形成過程において両分子が四肢の軟骨原基とは異なる働きを担う可能性が示唆された。これらの下顎頭軟骨形成過程における Syndecan と Fgfr の発現パターンを踏まえ、Syndecan、Fgf および Fgfr の相互作用による下顎頭軟骨分化制御機構の解析については、さらなる検討を進める必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 藤川芳織、福島美和子、井上知、中村雅典

マウス下顎頭軟骨発生過程における FGF 受容体の発現に関する研究

第 124 回日本解剖学会総会 全国学術集会 2019 年 3 月 27 日

2. Kaoru Fujikawa, Shunichi Shibata, Masanori Nakamura

Expression patterns of Syndecan family in the developing fetal mouse mandible and condylar cartilage.

65th Annual Meeting of the Japanese Association for Dental Research

2017 年 11 月 19 日

〔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:

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：
国内外の別：

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。