

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 7日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20592344

研究課題名（和文） HUMARA assay および免疫染色を用いた咀嚼筋腱膜過形成症の病態解明

研究課題名（英文） The analysis of pathological condition in masticatory muscle tendon-aponeurosis hyperplasia using HUMARA assay and immunostaining methods.

研究代表者

依田 哲也（YODA TETSUYA）

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：60242210

研究成果の概要（和文）：

咀嚼筋腱・腱膜過形成症の検体で解析をしたのは7例であった。腱組織において Tenomodulin および Smad8 の発現が認められていることを見出し、腱組織の増殖様式はポリクローナルな増殖であることが示された。また、2次元電気泳動による解析を行った結果、collagen 6A1 の発現が上昇していた。

研究成果の概要（英文）：

We calculated seven samples in masticatory muscle tendon-aponeurosis hyperplasia (MATAPHY). We found that both Tenomodulin and Smad8 proteins expressed in MATAPHY s tendon and the proliferation of tendon was a polyclonal fashion. We also demonstrated that collagen 6A1 was upregulated in MATAPHY s tendon by using two dimensional electrophoresis system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：咀嚼筋腱膜過形成症、クローナリティー解析、免疫染色

1. 研究開始当初の背景

咀嚼筋腱膜過形成症は、側頭筋の腱や咬筋の腱膜などが過形成を引き起こすことにより開口制限を呈する疾患である。臨床的特徴として、10代より両側性に発症すること、長期間にわたる緩徐な開口制限、咬筋の腱膜過形成が強い場合は下顎角も過形成になり Square mandible 顔貌を呈することがあげられる。2000年に Murakami らにより、咬筋および側頭筋の剥離と筋突起および下顎角切除により改善することが報告された。さ

らに同年、井上らは腱膜の切除が効果的であることを報告した。その後国内でいくつか報告が相次ぎ、2005年の日本口腔外科学会においてその疾患名が決定された。しかしながら、本疾患の国外からの報告はいまだなく、疾患として認識されていないのが現状である。

本疾患はその概念が提唱されるまでは、難治性の顎関節症あるいは筋突起過長症と誤診されることが多かった。申請者が行ったある高校における予備調査では、1学年に2 -

3人は本疾患と考えられる学生が存在するという結果を得ている。したがって、本疾患に罹患している患者は多数存在すると考えられる。申請者らも2004年に本疾患の臨床的特徴を検討し、診断基準と治療法について報告し(日本顎関節学会)、2006年には手術の2年から5年の長期成績が良好であることを報告している(日本顎関節学会)。さらに腱分化に関する研究では、分化特異的なタンパク質である Tenomodulin と腱分化に重要とされている Smad8 が報告されており、我々は咀嚼筋腱膜過形成症患者より採取した組織において、免疫組織学的手法を用いて上記タンパク質の局在を報告した(日本顎関節学会, 2007)。本疾患に有効な治療方法は手術による腱膜切除であり、術後の開口訓練を継続すれば予後は良好であると考えられるが、腱・腱膜過形成の成因は不明であり、治療法が科学的根拠に基づいて確立されているとはいえない。前述のように、本疾患が顎関節症など別の疾患と誤診されて他の治療法を施行された場合、治療法によっては不可逆的变化を及ぼすことになりかねない。したがって、咀嚼筋腱膜過形成症の病態解明は急務であると考えられる。

2. 研究の目的

本疾患の成因について、Murakamiらは先天的要因の関与は低く、環境的要因が重要であると述べている。一方、井上らは個々の素因と異常習癖などの環境的要因によって起こると推測している。しかし、先天的素因か環境的要因かを判断するには、本疾患がどのような病態であるかを明らかにすることが必要である。本疾患の病態について、組織学的には腱・腱膜過形成が起こっているとされているが、科学的証拠が不十分で組織学的特徴に乏しい。そこで我々は、咀嚼筋腱膜過形成症患者の組織学的特徴を分子レベルで明確にすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織学的手法による分子の発現パターンの検討を行った。また、HE, アザン, トルイジンブルーの各組織染色を行ったほか、TeM, GDF5, Smad1, 5, 8を用いた免疫染色によって、発現の有無や局在を確認した。免疫染色の試薬はニチレイ社製のヒストファイン シンプルステインを使用し、固定には10%緩衝ホルマリンを用いた。通法に従ってパラフィン包埋, 脱パラ処理を行った後、内因性ペルオキシダーゼの除去, そしてバックグラウンドを補正するためさらに10%正常ヤギ血清によるブロッキングの処理を行った。

(2) 細胞のクローナリティー解析; 1つの細胞が増殖しているのか(モノクローナルな増殖; 腫瘍性増殖) または多数の細胞が増殖しているのか(ポリクローナルな増殖;

反応性増殖)を行った。

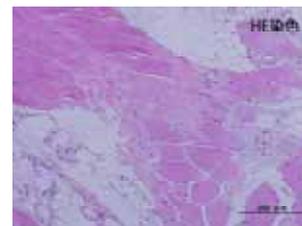
細胞を採取する際、できるだけ解析目的以外の細胞のDNAの混入を避ける必要があるためmicrodissectionにより細胞の採取を行う。手術で切除した組織より1cm³の腱組織を採取し、10μmの厚みに薄切し1.4μmメンブレン上にマウントする。通法に従ってHE染色を行い、P.A.L.M. laser microdissection systemを用いて、紡錘形の腱細胞を含む領域を採取する。この細胞についてDNAを抽出し、DNAを制限酵素Hpaにて処理する。Hpaサイトがメチル化を受け、不活化されたX染色体由来のDNAのみが切り取られ残る。これに対し、2つのHpaサイトとCAGリピートとを含む領域をテンプレートとするPCR(polymerase chain reaction)を施行する。PCRのテンプレートとして残存しているのはHpaで切断されなかったDNAであるから、PCRで増幅されるのは不活化されていたX染色体由来のDNAのみとなる。このPCR産物について電気泳動を行う。モノクローナルな場合には1本のバンドが、ポリクローナルな場合には2本のバンドが検出される。以上の方法を用いた。

検体採取については事前に大学倫理委員会に申請し、許可を得た(倫理委員会承認番号595)。

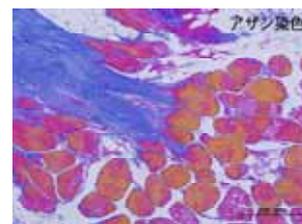
4. 研究成果

咀嚼筋腱・腱膜過形成症の患者は4年間で7症例であった。

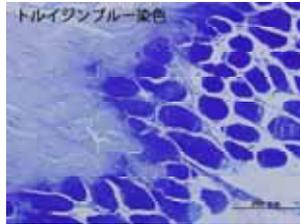
(1) HE染色において、左上のエリアが腱組織, 右下のエリアが筋組織で、その間隙には脂肪組織や血管, 結合織などを認めた。



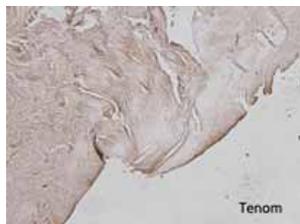
(2) アザン染色において、青く染まった膠原線維と赤色の筋組織がお互いに入り込むように接合している。



- (3) トルイジンブルー染色において、メタクロマジーを呈することなく軟骨基質等の存在は認めなかった。

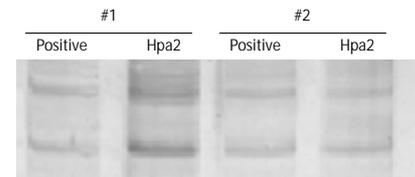


- (4) 側頭筋の検体について、Smad8, Tenomodulin の抗体を用いて免疫染色を行った。各分子はタンパク質レベルで強く発現しており、咀嚼筋腱・腱膜過形成症患者の腱組織での発現が確認された(下図)。

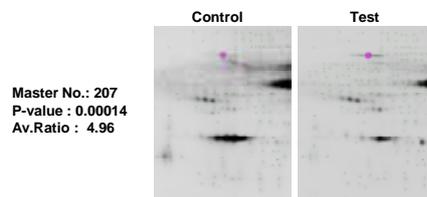


- (5) とくに筋組織と腱組織の境界領域において発現が認められた。クローナリティー解析については、P.A.L.M. laser microdissection system を用いて紡錘形の腱細胞を含む領域を採取する Laser Captured Microdissection(LCM)を行い、採取を数回に分けて行うことでサンプル量を多く採取できた。このサンプルについてDNAを抽出し、DNAを制限酵素 *Hpa* にて処理する。*Hpa* サイトがメチル化を受け、不活化されたX染色体由来のDNAのみが切り取られ残る。これに対し、2つの *Hpa* サイトと CAG リピートとを含む領域をテンプレートとする PCR(polymerase chain reaction)を施行する。PCRのテンプレートとして残存しているの

は *Hpa* で切断されなかった DNA であるから、PCR で増幅されるのは不活化されていた X 染色体由来の DNA のみとなる。この PCR 産物について電気泳動を行う。モノクローナルな場合には1本のバンドが、ポリクローナルな場合には2本のバンドが検出される。今回、2検体について行ったところ、2検体(#1、#2)ともポリクローナルであった(下図)。



- (6) 上記タンパク質のみの検討では、病態解明には不十分であり、腱および腱膜の過形成にどのようなタンパク質が関与しているかを検索する必要が生じたために、2次元電気泳動による解析を行ったところ、collagen6A1 の発現が上昇していた(下図)。controlとして、顎変形症患者の検体を使用した。また、2つのサンプルからタンパク質を抽出して、ウエスタンブロッティング法を行ったところ、1例において発現上昇していることを確認した。



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1件)

1. Sato T, Nakamoto A, Hori N, Enoki Y, Fukushima Y, Nakamoto N, Sakata Y, Yamanaka H, Chida D, Abe T, Yoda T. Proteomic analysis of a masticatory muscle tendon-aponeurosis hyperplasia: a preliminary study using 2D-DIGE system. J Oral Maxillofac Surg Med Pathol 2012 in press (査読あり)

〔学会発表〕(計1件)

1. 佐藤毅 中本文 安部貴大 堀直子 中本紀道 福島洋介 坂田康彰 依田哲也 咀嚼筋腱膜過形成症におけるタンパク質プロファイリング 第23回日本顎関節学会学術大会 東京 平成22年7月24日 船堀

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

依田 哲也 (YODA TETSUYA)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：60242210

(2) 研究分担者

佐藤 毅 (SATO TSUYOSHI)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号：60406494

坂田 康彰 (SAKATA YASUAKI)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号：50322425