**様式Ｃ－１９**

# 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３１日現在

機関番号：３０１１０
研究種目：若手研究（Ｂ）
研究期間：２００９～２０１１
課題番号：２１７９２０９２
研究課題名（和文）ラット顎関節円板由来線維芽細胞の伸展力および圧縮力による細胞外基質の変化の検討
研究課題名（英文）The change of the extracellular matrix for the extension and compression to fibroblast derived from a rat temporomandibular joint disc.
研究代表者
鳥谷　奈保子（ＴＯＲＩＹＡ　ＮＡＯＫＯ）
北海道医療大学・歯学部・助教
研究者番号：２０４３３４３５

研究成果の概要（和文）：ラット顎関節円板由来の線維芽細胞系を用い、細胞進展装置を使用して伸展刺激下にて培養することにより、メカニカルストレスに対するラット顎関節円板由来線維芽細胞における Fibrillin-1 とバーシカンの遺伝子発現およびタンパク発現について変化が認められた。

研究成果の概要（英文）：A change was recognized to gene and protein expression of fibrillin-1 and versican in the fibroblast derived from a rat temporomandibular joint disc by culturing for mechanical stress.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合　計 |
|---|---|---|---|
| ２００９年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| ２０１０年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| ２０１１年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総　計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学
キーワード：顎関節円板・細胞外マトリックス・線維芽細胞・伸展力

## 1. 研究開始当初の背景

近年、顎関節症患者の増加とその若年化傾向が歯科学全体での大きな問題となってきており、その原因の究明が求められている。また、矯正歯科の領域においても、顎関節症の一つである下顎頭の退行性変化によって、重度の骨格型の下顎後退症、あるいは非対称を引き起こすことが報告されているが、それに対する有効な治療方法も確立されていない。現在までのところ、顎関節症の発症に関する正確なメカニズムは不明である。

顎関節は、側頭骨と下顎骨とを連結する関節であり、生体の関節の中でも最も複雑な形態および機能を有する（Bell, 1990)。顎関節は、解剖学的には側頭骨下顎窩・関節結節、下顎骨下顎頭、関節円板、円板後部組織、滑膜および靭帯等から構成され、機能的には蝶番運動と滑走運動が複合した運動様式を呈する。関節円板は、顎関節の滑走、蝶番運動によって生じる複雑な生力学的力の shock absorber として働

き (Kimura, 1990; Hart et al., 1992; Korioth et al., 1992; Tanaka et al., 1994)、また、関節運動を円滑に行うために下顎頭のdestabilizer として機能している (Osborn, 1985)。一方、顎関節円板における主要な細胞外基質は、コラーゲンとプロテオグリカンであり(Kopp, 1976; Scapino, 1983; Mills et al., 1988; 1994; Milam et al., 1991)、一般的にコラーゲン線維は牽引に対する抵抗性を、プロテオグリカンはそれに結合する糖鎖 (glycosaminoglycan; GAG) を介して剪断、圧縮に対する耐性を組織に付与し、それぞれの組織での機械的特性に寄与していることが知られている (Tanaka et al., 2003)。しかし、それぞれのコラーゲンやプロテオグリカンの種々の負荷に対する反応の詳細は明らかになっていない。

そこで本研究では、顎関節円板の細胞外基質(コラーゲンおよびプロテオグリカン)の生体力学的負荷に対する変化を解明することを目的とし、細胞レベルでの力学的負荷に対する反応を検討することである。この研究から得られる所見は、顎関節症の発症のメカニズムを解明するための一助になるものと考えられる。

2. 研究の目的

顎関節円板の主要な細胞外マトリックスはコラーゲンと非コラーゲン性タンパクであり、後者にはグリコプロテインとプロテオグリカンが含まれる (Fisher et al., 1987)。プロテオグリカンは、コアタンパク質とそれに付着する糖鎖 (glycosaminoglycan: 以下 GAG と略す)からなる。

近年、弾性系線維とバーシカンの密接な関係性が注目されており、これらの研究は、円板における versican の isoform の発現が弾性線維系の動態を介して円板組織の機械的強度に関与している可能性を示唆している。

本研究では、ラットの顎関節円板由来の線維芽細胞培養系を用い、関節円板に負荷される生体力学的な力を想定した伸長力と圧縮力を負荷することにより、コラーゲンおよびプロテオグリカンの発現にどのような影響を与え、顎関節円板に対してどのような変化をもたらすのかを解明する。また、弾性系線維とバーシカンの密接な関係性にも注目し、その相互作用による機能の解明を行う。

3. 研究の方法

1)ラット顎関節円板由来線維芽細胞培の単離

ラット顎関節円板の組織の小片をプラスチックシャーレ上に置き、10% 新生仔仔牛血清を添加した minimum essential medium 培養液(MEM、Invitrogen:ペニシリン100units/ml、ストレプトマイシン100μg/ml、L-グルタミン含有)中で37℃、5% $CO_2$ 環境下にて培養し、ラット顎関節円板由来線維芽細胞培を単離した。単離した細胞を継代培養後、実験に用いた。

2)周期的伸展培養

STB-140 STREXcell stretch system (Strex Co.)を用いてラット顎関節円板由来線維芽細胞培に伸展刺激を負荷した。50μg/ml I 型コラーゲンをコーティングしたエラスティック・シリコン・チャンバー上に$1×10^5$cells/ml の細胞密度で播種した。7日間培養後、80%サブコンフルエント状態を確認し、伸展率4%、頻度は1分間に1往復のプログラム設定で伸展刺激を負荷し、37℃、5% $CO_2$の培養環境下にて7日間伸展刺激を与えた。

3)免疫蛍光染色による形態学的観察

培養7日後のラット顎関節円板由来線維芽細胞を2%パラホルムアルデヒドで5～10分間固定した。PBS (Phosphate-buffered saline、pH 7.4)で洗浄し、一次抗体[goat anti-human fibrillin-1 polyclonal antibody (1:100、Santa Cruz)、rabbit anti-mouse versican (GAG α-domain) polyclonal antibody (1:100、Millipore)、rabbit anti-mouse versican (GAG β-domain) polyclonal antibody (1:100、Millipore)]でそれぞれ室温にて60分間反応させた。PBS で洗浄した後、二次抗体として Alexa Fluor®488 donkey anti-goat IgG (H+L)、Alexa Fluor® 568 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Invitrogen) をそれぞれ室温にて40分間反応させた。PBS 洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

4)Real-Time quantitative PCR 法による fibrillin-1 と versican の mRNA 発現

培養7日後の対照群と伸展刺激群のラット顎関節円板由来線維芽細胞から RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA に対し Omniscript reverse transcriptase protocol (Qiagen) を用いて RT 反応を行った。

Fibrillin-1、versican と internal standard

としての GAPDH に対する primer および、TaqMan probe (exonuclease probe) を設計した(表1)。

ラット顎関節円板由来線維芽細胞からの cDNA について GeenAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)を用いて、TaqMan probe による Real-Time quantitative PCR 法を行った。得られた結果は、比較 Ct 法により相対的に定量し検討した。統計分析には、Student's t-test を用いた。

表1. Fibrillin-1 および versican の primer および TaqMan probe の配列

| |
|---|
| fibrillin-1 |
| forward : 5'-GCATCATGCGTCGAGG-3' |
| reverse : 5'-GGACGCTAAAAGCACGGTAA-3' |
| TaqMan probe : 5'- CGTCTGCTGGAGATCGCCCT-3' |
| versican |
| forward : 5'-ACGTGCAAGAAAGGAACAGTTG-3' |
| reverse : 5'-TCCAAAGGTCTTGGCATTTTCTA-3' |
| TaqMan probe : 5'- TTGCGGCCAGCCCCCTGTT-3' |
| GAPDH |
| forward : 5'-GCGGATCCCTCTGCTCCTCCTGTTCGAC-3' |
| reverse : 5'-GGAATTCTGACAAAGTGGTCGTTGAGG-3' |
| TaqMan probe : 5'-CTCCTCCTGTTCGACAGTCAGCCGC-3' |

４．研究成果

1）Fibrillin-1と versican の免疫組織化学的局在および発現の変化

伸展刺激を負荷していない対照群では、fibrillin-1は緑色反応をもって細胞シート上に明瞭に観察され、網目状の走行配列を示した(図2(a)、control: fibrillin-1)。一方、versican (α-domain)の赤色反応は fibrillin-1の走行に沿うように認められたが、fibrillin-1に比して全体的に不規則であった(図2(a)、control: versican (α-domain))。また、融合画像では fibrillin-1が強い反応を示す部位以外において versican 単独の反応部位も散見された(図2(a)、control: merge)。

また、versican (β-domain)の蛍光強度、fibrillin-1との走行配列および網目状構造は versican (α-domain)とほぼ同様の反応を示した(図2(b)、control: control、versican (β-domain)、merge)。

一方、7日間伸展培養したラット顎関節円板由来線維芽細胞の免疫染色像では、fibrillin-1の緑色反応の強度は対照群の染色結果と大きな差異を示さなかった(図2(a)、stretch: fibrillin-1)。しかし、その局在は大きさを増した網目として認められ、伸展方向に直行して集束し

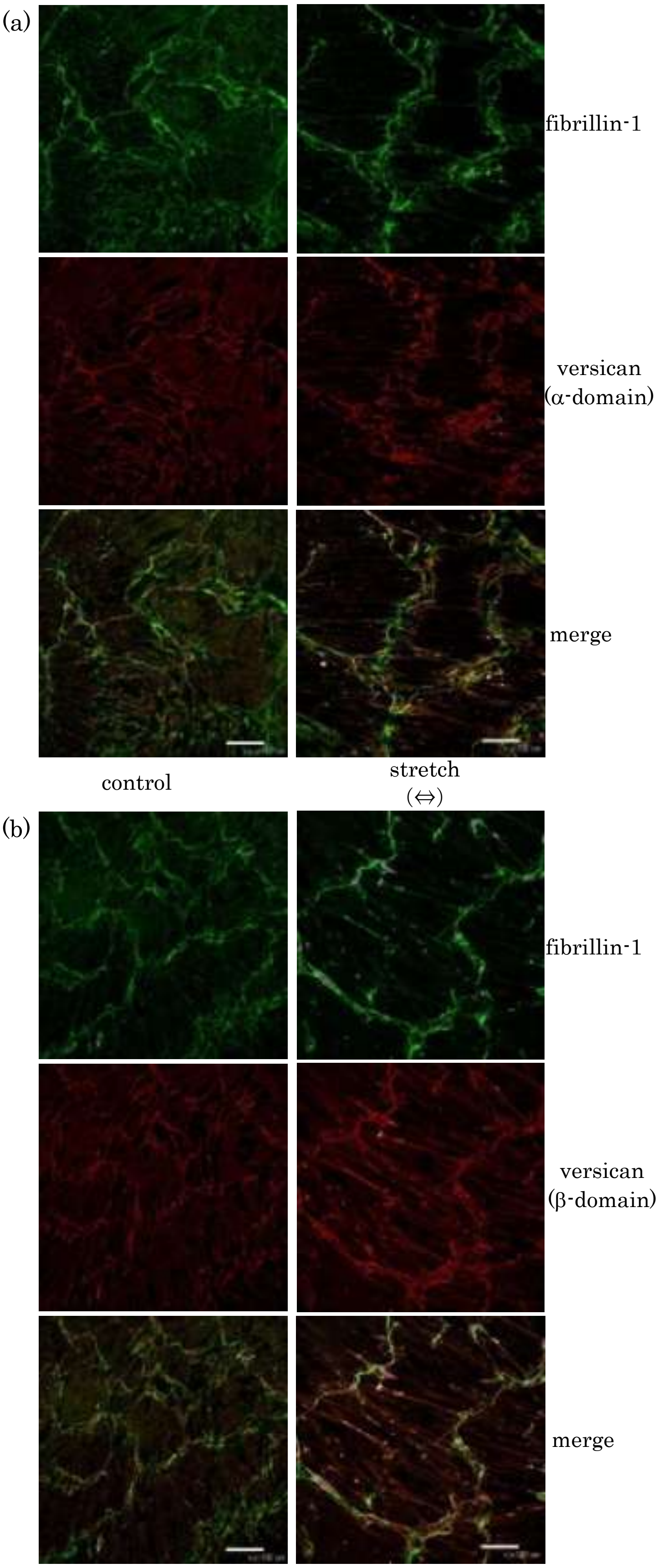


図1. ラット顎関節円板由来線維芽細胞における周期的伸展刺激負荷による fibrillin-1および versican の発現変化.

た強い反応性を示した。また、versican (α-domain)の赤色反応は対照群と同様fibrillin-1に沿うように配列し、fibrillin-1と同様に集束していたが、その蛍光強度は明らかに増していた（図２(a)、stretch: versican (α-domain)、merge)。

また、伸展刺激による versican (β-domain)の赤色反応の強度は、versican (α-domain)よりも増して観察され（図２(b)、stretch: versican (β-domain))、fibrillin-1に匹敵するほどの反応強度であった。

２）Real-Time quantitative PCR 法による fibrillin-1と versican の mRNA 発現の定量

周期的伸展刺激の結果、fibrillin-1 mRNA は対照群と比較して約3倍（n = 3、p<0。01）に増加していた（図２、fibrillin-1）。一方、versican mRNA は伸展刺激により対照群の約8倍（n = 3、p<0。005）に増加した（図3、versican)。

伸展刺激によるメカニカルストレスによって、fibrillin-1 と versican の両方の mRNA の発現の有意な増加が認められたが、versican の mRNA の発現変化は fibrillin-1 と比較しても著しい増加を示した。

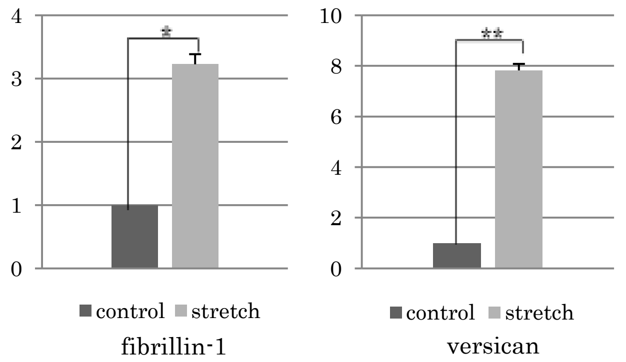


図2. ラット顎関節円板由来線維芽細胞における周期的伸展刺激負荷による fibrillin-1 および versican の mRNA 発現の変化.

Fibrillin-1 および versican の mRNA 発現の変化について TaqMan probe による Real-Time PCR 法を行い、比較 Ct 法を用いて相対的定量によって比較検討した。Fibrillin-1 において対照群と比較して約 3.2 倍（n=3、*p<0。01)、versican においては約 7.8 倍（n=3、**p<0。005）の増加を示した.

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 村井　茂、齋藤貞政、湯浅壽大、水上和博、鳥谷奈保子、岡山三紀、飯嶋雅弘、溝口到. 唇顎口蓋裂患者のアンケート調査. 北医療大歯誌、2010、29:91-99.

〔学会発表〕（計３件）

① 松沢史宏、鳥谷奈保子、溝口　到. ラット上顎第一臼歯の実験的歯の移動方法. 第 29 回北海道医療大学歯学会. 2011 札幌.

② 永坂　萌、鳥谷奈保子、敦賀英知、坂倉康則、溝口　到. 歯根膜由来線維芽細胞の伸展刺激に対する fibrillin-1 および versican の発現変化. 第 69 回日本矯正歯科学会大会. 2010 横浜.

③ 鳥谷奈保子、湯浅壽大、上地　潤、溝口到. 小臼歯の抜去と矯正用インプラントによる大臼歯の遠心移動を行った3症例. 第 51 回北海道矯正歯科学会. 2010 札幌.

６．研究組織
(1)研究代表者

鳥谷　奈保子（TORIYA NAOKO）
北海道医療大学・歯学部・助教
研究者番号：20433435