

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 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22792064

研究課題名（和文）メカニカルストレスによる下顎頭の発育制御にストレス応答タンパク質が果たす役割

研究課題名（英文）The role for the stress protein in regulation of development of the mandibular condylar cartilage by mechanical stress

研究代表者

藤田 優子（FUJITA YUKO）

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90514670

研究成果の概要（和文）：本研究において我々は、生後1、7、14、21、49日齢のC57BL/6Jマウス脛骨骨幹端部軟骨と下顎頭軟骨の連続切片におけるヘムオキシゲナーゼ（HO）-1、Ⅱ型およびⅩ型コラーゲン、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）-13の発現と局在を免疫組織染色学的に検索した。その結果、HO-1は初期の成長期軟骨に特異的に発現し、特に低酸素環境下に数多く発現する蛋白であることが明らかとなった。さらに、HO-1は、肥大軟骨細胞において血管侵入から石灰化の過程に関与し、初期の軟骨成長における制御因子としての役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study investigated the localization and expression of heme oxygenase (HO)-1, type II and X collagen (Col10 and 2) and matrix metalloproteinase (MMP)-13 proteins in mouse mandibular condylar cartilage and mouse tibial cartilage. C57BL/6J mice aged 1, 7, 14, 21 and 49 days were subjected to using immunohistochemistry. This study demonstrated that HO-1 is the protein which expresses specifically to early stages of the development, in particular under hypoxia environment in chondrocytes. These findings suggest that HO-1 is involved in the process of the endochondral ossification from a blood vessel invasion in hypertrophic chondrocytes and acts as a regulatory factor in the early stages of the development of condylar cartilage.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2012年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 総計 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

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：小児歯科学

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

(1) 下顎頭は表層から線維、増殖、成熟、肥大軟骨層の4層からなる軟骨で構成されている。無血管組織の軟骨は、未分化間葉系細胞が一定の部分で凝集して軟骨細胞に分化し、増殖や軟骨基質の分泌に伴って成長して肥大軟骨細胞となる。肥大軟骨細胞内では低酸素誘導因子(HIF)-1 α が血管内皮細胞増殖因子(VEGF)やその他の生理活性物質を誘導し、血管侵入が起こり、それとともに入ってきた破軟骨細胞が石灰化した軟骨基質を分解し、骨膜から侵入してきた骨芽細胞が骨基質を産生して一次海綿骨が形成される。この軟骨は、咀嚼や咬合時の顎運動などの生体力学的ストレスに対する応答と下顎骨の成長・発達、すなわち長管骨の成長板軟骨に相当する役割を担っているが、長管骨とは異なり下顎頭軟骨は生涯を通じて存在する。

軟骨の成長や恒常性の維持は正常なメカニカルストレスの負荷によって制御され、顎関節の軟骨形成においてもメカニカルストレスが非常に重要な制御因子となっている。しかし、過剰なメカニカルストレスの負荷や蓄積は関節の骨硬化、変性、破壊を生じる変形性関節症(OA)を発症する。顎関節症においてもその約15%が退行性病変を主徴としたOAである。硬組織の血管新生と石灰化のメカニズムはOA発症機序に共通すると予測されているが、それらは未だ明らかにされていない。

(2) 熱ショック蛋白質(Heat shock protein, Hsp)は、熱や重金属、活性酸素などのストレス刺激によって誘導される蛋白質で、特に分子量が32kDaのHsp32、別名ヘムオキシゲナーゼ(Heme oxygenase, HO)-1は変形性関節症(OA)軟骨の破壊の制御に関与することが報告されている。HO-1が細胞内で誘導されると、ヘムタンパク質の補欠分子であるヘムが分解され、その結果、一酸化炭素、遊離鉄、ビリベルジンが産生される。ビリベルジンは、さらにビリベルジンリダクターゼによりビリルビンに変換される。これらのヘム分解産物は、基本的に抗酸化作用、炎症性サイトカイン産生抑制作用などの多様な機能を有し、ストレス負荷時の細胞保護に重要な役割を担っていると考えられている。また近年、OA患者の軟骨細胞ではHO-1の発現が正常軟骨細胞よりも著しく増強することが明らかとなり、OAをはじめとする軟骨代謝疾患とHO-1の関連性が示唆される。しかし、HO-1と軟骨形成との関連に関する報告は極めて少ない。

2. 研究の目的

以上の背景より、メカニカルストレスの負

荷によって制御されている下顎頭軟骨の成長にHO-1が関与していると我々は仮定し、成長期マウスの膝関節と下顎頭軟骨におけるHO-1、II型コラーゲン(Co12)、X型コラーゲン(Co110)、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-13の局在とその変化について免疫組織化学的手法を用いて検討した。

3. 研究の方法

実験動物は生後1、7、14、21、49日齢の雄性C57BL/6Jマウスを用いた。各日齢のマウスに4%パラホルムアルデヒドで灌流固定を行い、膝関節と下顎骨を摘出、通法に従い包埋、凍結後、矢状方向に厚さ5 μ mの連続切片を作製した。一般染色にはトルイジンブルー染色(Fig 1)、HE染色を施した。HO-1、Co12、Co110、MMP-13の局在の検索には、ストレプトアビジン-ビオチン標識法で免疫組織染色を行った。一次抗体には、Anti HO-1 antibody (Stressgen, Brussels, Belgium)、Anti type II collagen antibody (Novotec, Saint Martin La Garenne, France)、Anti type X collagen antibody (LSL, Tokyo, Japan)、Anti MMP-13 antibody (Santa Cruz Biotechnology, California, USA)を使用した。切片は、0.3%過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼ活性の除去(室温30分)を行ったあと、10%ヤギ正常血清にてブロッキングを行った(室温30分)。次いで各種一次抗体を反応させ(室温2時間)、PBSで洗浄した。その後ビオチン標識抗ウサギIgG抗体を添加・反応させPBSで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを添加・反応させ、0.05mol/l Tris-HCl Buffer Solution (pH 7.6)で洗浄後、diaminobenzidine (DAB)で染色した。また、陰性コントロールには一次抗体の代わりにウサギ正常血清を使用した。

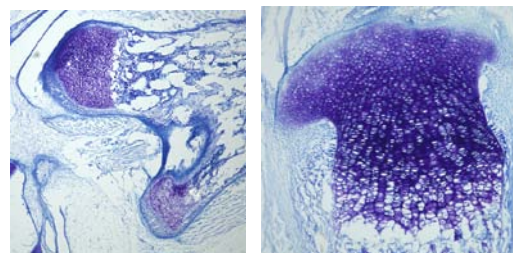


Fig 1. 生後1日齢マウス下顎頭軟骨(左)と脛骨骨幹部軟骨(右)のトルイジンブルー染色標本。

4. 研究成果

(1) 脛骨骨幹端部軟骨では、生後1日目は概ね静止軟骨細胞で構成されているが、軟骨膜直下の増殖軟骨細胞内でHO-1とCol10の発現がみられた。生後7日目になると軟骨管が形成され (Fig. 2)、その周囲の肥大軟骨細胞内にHO-1とCol10の発現がみられた。生後14日目には骨化中心に海綿骨が形成された。成長板の肥大軟骨細胞では、生後1日から14日目までHO-1とCol10の発現がみられたが、生後49日目にはこれらの発現はほぼ消失した。MMP-13の発現は成長板の肥大軟骨細胞にみられたが21日目に反応が減衰し、49日目に消失した。Col2の発現は、生後21日目までは肥大軟骨細胞内に発現し49日目には、成長板の軟骨基質に強い免疫陽性反応を認めた。

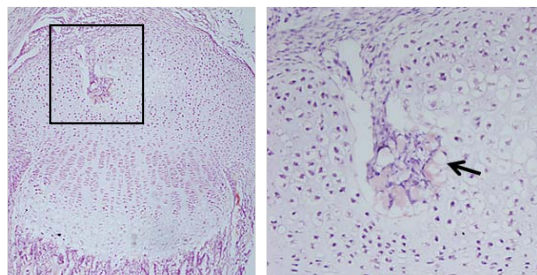


Fig 2. 生後1週齢マウス脛骨骨幹端軟骨のHE染色標本
右は口の拡大像。矢印は骨端軟骨中に侵入した血管。

(2) 下顎頭軟骨では、生後1日目はすべての層にHO-1がみられ、生後7と14日目には肥大軟骨細胞と成熟軟骨細胞に、生後21日目は肥大軟骨細胞と成熟軟骨細胞にわずかにみられた。Col10の発現は、生後1日目と7日目はすべての軟骨細胞に認められた。生後14日目以降は肥大軟骨細胞に陽性反応を示した。MMP-13の発現は、生後1日目には増殖軟骨細胞、成熟軟骨細胞、肥大軟骨細胞に広範囲に認められた。生後7日目には肥大軟骨細胞に強い陽性反応を認め、それ以降は、深層部の肥大軟骨細胞にわずかに発現した。Col2の発現は、生後1日目と7日目には増殖軟骨細胞、成熟軟骨細胞、肥大軟骨細胞に広範囲に認められた。生後14日目以降は肥大軟骨細胞内に認められた。下顎頭軟骨におけるHO-1の発現は、出生直後はすべての軟骨細胞に分布するが、成長・発育期になると主に肥大軟骨細胞に局在することが明らかとなった。この結果は、長管骨の成長板軟骨におけるHO-1の局在とほぼ同様であった。さらに、生後21日までの肥大軟骨細胞に免疫陽性反応を認め、その局在はCol10の発現部位と類似していた (Fig 3, Table 1)。

したがって、HO-1は成長期に特異的に発現し、特に低酸素環境下において多く発現する蛋白であることが明らかとなった。

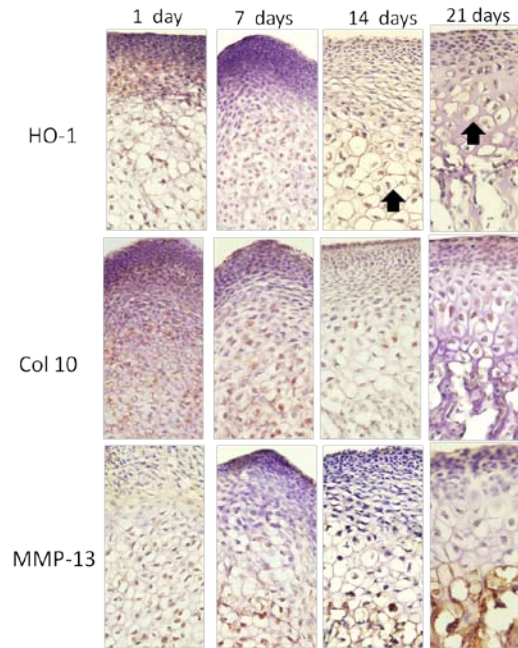


Fig 3. マウス下顎頭軟骨におけるHO-1(上段)、
Col10(中段), MMP-13(下段)の局在。矢印は肥大軟骨細胞。

| | HO-1 | Col10 | Col2 | MMP-13 |
|-----------------------|------|-------|------|--------|
| 生後1日齢 (n = 5) | | | | |
| 線維軟骨細胞層 | ++ | ++ | - | - |
| 増殖軟骨細胞層 | ++ | ++ | + | + |
| 成熟軟骨細胞層 | ++ | ++ | ++ | + |
| 肥大軟骨細胞層 | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 生後7日齢 (n = 5) | | | | |
| 線維軟骨細胞層 | ± | + | - | - |
| 増殖軟骨細胞層 | - | - | + | - |
| 成熟軟骨細胞層 | + | + | + | - |
| 肥大軟骨細胞層 | + | ++ | + | + |
| 生後14日齢 (n = 5) | | | | |
| 線維軟骨細胞層 | - | - | - | - |
| 増殖軟骨細胞層 | - | - | - | - |
| 成熟軟骨細胞層 | ± | ± | + | - |
| 肥大軟骨細胞層 | + | + | + | ± |
| 生後21日齢 (n = 5) | | | | |
| 線維軟骨細胞層 | - | - | - | - |
| 増殖軟骨細胞層 | - | - | - | - |
| 成熟軟骨細胞層 | ± | ± | + | - |
| 肥大軟骨細胞層 | + | + | - | ± |

Table 1. マウス下顎頭軟骨細胞におけるHO-1, Col10,
Col2, MMP-13の発現

本研究では、HO-1のほか、軟骨肥大分化マーカーである Col10 と最終分化マーカーである MMP-13 の局在について同時に検討を行ったが、Col10 と MMP-13 は OA モデルマウスの軟骨に発現するが、健常である場合、成人の軟骨では存在せず、小児期の成長板軟骨における軟骨内骨化の過程に現れる分子である。OA は軟骨細胞の Col10 発現で示される肥大化、肥大軟骨細胞から分泌される MMP-13 などの蛋白質分解酵素による軟骨基質の変性が発症の引き金になるといわれている。これらは成長期特有の軟骨内骨化のプロセスでもあり、軟骨は低酸素や機械的負荷などストレスの程度によって正常な骨化、もしくは破壊の過程を辿ると考えられる。

肥大軟骨細胞内では低酸素誘導因子 (HIF)-1 α が血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) やその他の生理活性物質を誘導し、血管侵入とそれに続く骨髄形成が行われている。HO-1 は *in vitro* で VEGF 産生に関与することが報告されているが、本研究によって *in vivo* で HO-1 が VEGF 同様、血管侵入から石灰化の過程、例えば、軟骨細胞のアポトーシスや石灰化に関与している可能性が示唆された。

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 5 件)

- ① Fujita Y, Maki K. Single-visit revascularization treatment of an immature permanent tooth with apical periodontitis: a case report. *Ped Dent J*, 査読有, 2013 in press.
- ② Fujita Y, Watanabe K, Maki K. Serum leptin levels negatively correlate with trabecular bone mineral density in high-fat diet-induced obesity mice. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 査読有, 12(2), 2012, 84-94.
- ③ Bori M, Fujita Y, Watanabe K, Saeki K, Maki K. Influence of childhood type 2 diabetes on bone formation in the growing period. *Ped Dent J*, 査読有, 22(2), 2012, 125-139.
- ④ 藤田優子: 成長期の顎骨におけるステロイド性骨粗鬆症の発症機序とビスホスホネート治療 *小児歯誌*, 査読無, 50(3), 2012, 161-169.
- ⑤ Fujita Y, Watanabe K, Uchikanbori S, Maki K. Effects of risedronate on cortical and trabecular bone of the mandible in glucocorticoid-treated growing rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 査読有, 139(3), 2011, e267-e277.

[学会発表] (計 13 件)

- ① 藤田優子, 牧 憲司 高脂肪食誘発肥満モデルマウスの脛骨および下顎骨における骨構造の相違 (2013 年 5 月 24 日 第 51 回日本小児歯科学会大会 岐阜)
- ② 藤田優子, 牧 憲司 小児期の肥満におけるアディポサイトカイン異常と骨粗鬆症との関連 (2013 年 5 月 18 日 第 73 回九州歯科学会 北九州)
- ③ Yuko Fujita, Kenshi Maki Pulp revascularization and root development of an immature permanent tooth with apical periodontitis: a case report (2013 年 1 月 26 日 Asia-Pacific Conference in Fukuoka kitakyushu)
- ④ 藤田優子, 牧 憲司 根尖性歯周炎を発症した幼若永久歯に 1 回法 revascularization treatment を施行した 1 例 (2012 年 10 月 28 日 第 29 回日本小児歯科学会九州地方会大会 長崎)
- ⑤ 藤田優子, 牧 憲司 成長期マウスの下顎頭軟骨における熱ショック蛋白質 Hsp32 の局在 (2012 年 5 月 12 日 第 50 回日本小児歯科学会大会 東京)
- ⑥ 藤田優子, 中川綾子, 牧 憲司 成長期マウスの膝関節軟骨における heme oxygenase-1 の発現 (2011 年 11 月 28 日 第 49 回日本小児歯科学会大会 盛岡)
- ⑦ 藤田優子 ステロイド性骨粗鬆症を惹起した成長期ラットの顎骨にビスホスホネート治療が及ぼす影響 (2011 年 11 月 29 日 第 49 回日本小児歯科学会 盛岡)
- ⑧ 母里麻衣子, 牧 憲司, 藤田優子, 西田郁子, 森川和政 小児期の II 型糖尿病が成長発育期の骨形成に与える影響について (2011 年 11 月 29 日 第 49 回日本小児歯科学会大会 盛岡)
- ⑨ 母里麻衣子, 藤田優子, 坂本淑子, 西田郁子, 森川和政, 牧 憲司 小児期の II 型糖尿病が成長発育期の骨形成に与える影響について (2011 年 10 月 10 日 第 28 回日本小児歯科学会九州地方会大会 北九州)
- ⑩ 藤田優子, 渡辺幸嗣, 牧 憲司 血清アディポカイン濃度は骨粗鬆症の予測因子となるか? (平成 23 年 10 月 10 日 第 28 回日本小児歯科学会九州地方会大会 北九州)
- ⑪ 藤田優子 子どもの骨を考える ～骨粗鬆症の現状と予防～ (2010 年 9 月 9 日 第 15 回成育歯科医療研究会大会 北九州)

- ⑫ 藤田優子、牧 憲司 高脂肪食肥満マウスにおける骨密度とレプチンおよびアディポネクチンとの関連 (2010年5月23日 第70回九州歯科学会 北九州)
- ⑬ 藤田優子、渡辺幸嗣、牧 憲司 小児期の肥満が骨の成長発育に与える影響—血清レプチン、アディポネクチン濃度と骨密度の関連— (2010年5月1日 第48回日本小児歯科学会大会 名古屋)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 優子 (FUJITA YUKO)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：90514670