

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 6 月 15 日現在

機関番号：32710

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890009

研究課題名（和文） PTH/PTHrP 受容体シグナルによるコンドロイチン硫酸の低硫酸化と軟骨組織異常

研究課題名（英文） Undersulfation of chondroitin sulfate and abnormal cartilage tissue by the signaling of the receptor of PTH/PTHrP

研究代表者

和田 悟史 (WADA SATOSHI)

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号：20581119

研究成果の概要（和文）：軟骨細胞の増殖、分化と細胞外基質の関係を明らかにするために、BALB/c-*bm/bm* マウス(*bm/bm* マウス)の蝶後頭軟骨結合部の免疫染色を行った。II型およびX型コラーゲンの発現は不規則に認められた。アルカリフォスファターゼは軟骨の中心部に発現し、PCNAは軟骨周囲に発現が認められた。以上より *bm/bm* マウスの蝶後頭軟骨結合部では中心部で肥大軟骨細胞への分化の亢進し、軟骨周囲で軟骨細胞の増殖が認められることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The objectives of this study are to elucidate the relationship between not only differentiation of chondrocytes and extracellular matrix, but also proliferation of them. We performed immunohistochemical analysis in cartilage of the spheno-occipital synchondrosis of BALB/c-*bm/bm* mice. The expression of collagen II and collagen X were expressed irregularly in the spheno-occipital synchondrosis. Additionally, the expression of alkaline phosphatase was expressed in the center of the spheno-occipital synchondrosis, whereas that of the PCNA was expressed around the spheno-occipital synchondrosis. In summary, these results presented that the differentiation of hypertrophic chondrocytes was enhanced in the center of the spheno-occipital synchondrosis, whereas the proliferation of chondrocytes was increased around the spheno-occipital synchondrosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	870,000	261,000	1,131,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,070,000	621,000	2,691,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：コンドロイチン硫酸の低硫酸化、PTH/PTHrP シグナル、細胞外基質合成異常

1. 研究開始当初の背景

骨格組織である軟骨の分化形成において、副甲状腺ホルモン(PTH)および副甲状腺ホルモン関連ペプチド(PTHrP)、ならびにその受容体(PTH/PTHrP 受容体)は重要な役割を果たす。一方、PTH/PTHrP 受容体の遺伝子変異は、系統疾患の中でも高頻度を示す軟骨異形成症を発症させる。軟骨異形成症として Jansen 型および Blomstrand 型骨・軟骨異形成症変異型などがあげられ、遺伝子発現の解析は進んでいるが細胞外基質の病理組織異常については未だに未解明である。

軟骨は細胞外基質に富んだ組織であり、プロテオグリカン、特に、コンドロイチン硫酸が占める割合は非常に高い。しかしながら、コンドロイチン硫酸合成は単に遺伝子発現だけでは解析ができず、組織学的に詳細な解析を必要とする。

我々は以前に先天的に短肢症を生じる BALB/c-*bm/bm* 系マウス(*bm/bm* マウス)の軟骨合成が低下しており、硫酸化グリコサミノグリカン濃度も低いために、軟骨異形成症様の異常を示すことを明らかにした。それにより、*bm/bm* マウスは下顎骨軟骨および頭蓋底軟骨の異常を示すこと、また、顎関節においては、軟骨が薄く硫酸化グリコサミノグリカン濃度は低いことを示した。特に、頭蓋底の蝶後頭軟骨結合部においては、①軟骨の小柱構造の崩壊、②一次骨梁の形成不全、③軟骨膜石灰化が起こり、脳頭蓋底の成長発育の障害が認められる。またこのマウスは、生後において四肢の関節軟骨の形成異常と低身長が認められ、軟骨および骨組織における低硫酸化プロテオグリカンの合成による影響があると推測される。また、顎関節異常により咬合不全を示す。以上より、軟骨異形成症の異常と細胞外基質の関係は現在もわかっていない。

2. 研究の目的

BALB/c マウスおよび *bm/bm* マウスを用いて、蝶後頭軟骨結合部のコンドロイチン硫酸の低硫酸化により引き起こされる軟骨内骨化の異常、つまり PTH/PTHrP 受容体が軟骨細胞の増殖および分化に対する影響、特に細胞外基質の合成にフォーカスをあてながら、組織化学的に解析を行う。つまり、軟骨形成異常を細胞外基質の視点から明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

BALB/C マウスおよび *bm/bm* マウスの脳頭蓋底の組織切片を作製し、II型コラーゲン、X型コラーゲン、アルカリフォスファターゼの各種免疫染色を行い、軟骨細胞の分化の状態を確認した。また抗核内増殖抗原(proliferation cell nuclear antigen : PCNA)を用いて免疫染色を行い、増殖に対する検討を行った。一方、破骨細胞の影響も検討するために酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ染色(TRAP 染色)を行い、TRAP 陽性細胞の分布の確認を行った。

4. 研究成果

(1)*bm/bm*マウス蝶後頭軟骨結合部のII型コラーゲンおよびX型コラーゲンの発現。

*bm/bm*マウスのII型コラーゲンおよびX型コラーゲンの免疫染色を行った。その結果、コントロール群の蝶後頭軟骨結合部ではII型コラーゲンおよびX型コラーゲンは規則的に発現していたが、*bm/bm*マウス群ではII型コラーゲンおよびX型コラーゲンの発現が不規則に認められ、その発現は軟骨基質には認められず、軟骨細胞質にのみ限局し、さらにX型コラーゲンの発現は軟骨細胞質にわずかしこ認められなかった(図1,2)。

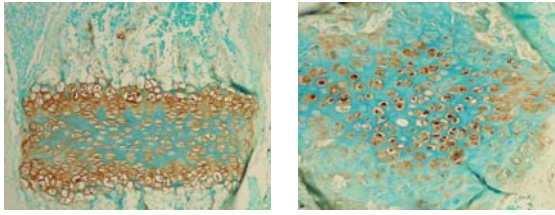


図1. 蝶後頭軟骨結合部のⅡ型コラーゲン発現
(左図: BALB/Cマウス 右図: *bm/bm*マウス)

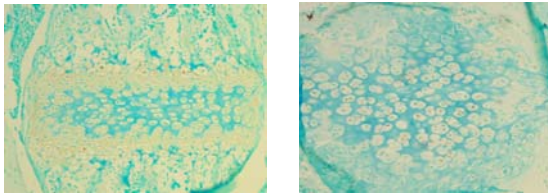


図2. 蝶後頭軟骨結合部のX型コラーゲン発現
(左図: BALB/Cマウス 右図: *bm/bm*マウス)

以上より X型コラーゲンの発現がわずかし
か認められなかったことから、肥大軟骨細胞
への分化に異常が示唆された。

(2) *bm/bm*マウス蝶後頭軟骨結合部のアルカ
リフォスファターゼ(ALP)の免疫染色。

X型コラーゲンの発現の異常が認められた
ことから、肥大軟骨細胞に特異的に発現して
いるアルカリフォスファターゼ(ALP)の免疫
染色を行った。免疫染色の結果より、*bm/bm*
マウスにおけるALPの発現はコントロールに
比べて、軟骨の中心部の軟骨細胞質に発現し
ており、免疫反応も強いものであった。

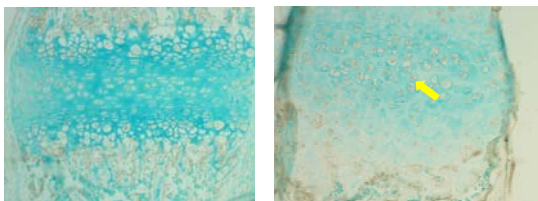


図3. 蝶後頭軟骨結合部のアルカリフォスファ
ターゼの発現
(左図: BALB/Cマウス 右図: *bm/bm*マウス)

以上より、*bm/bm*マウスはコントロール群に
比べて、軟骨中心部で肥大軟骨細胞への分化

が亢進していることが推測された。

(3) 蝶後頭軟骨結合部の増殖の評価

一方、細胞増殖の評価を行うために、PCNA
の免疫染色を行った。その結果、コントロー
ル群では増殖細胞層にPCNA陽性細胞が確認
されたが、*bm/bm*群では不規則に認められ、
その発現は弱く、軟骨周囲に発現が認められ
た。

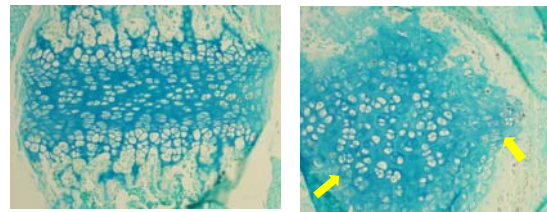


図4. 蝶後頭軟骨結合部のPCNA発現
(左図: BALB/C 右図: *bm/bm*マウス)

以上より *bm/bm*マウスの蝶後頭軟骨結合部で
は軟骨周囲で軟骨細胞の増殖が認められる結
果が示唆された。

(4) 蝶後頭軟骨結合部の破骨細胞の評価

軟骨形成異常が骨吸収に影響を与えているか
どうか評価するために、TRAP染色を行った。
その結果、コントロール群に対して、*bm/bm*
マウスの蝶後頭軟骨結合部ではTRAP陽性細胞
の減少が認められた。

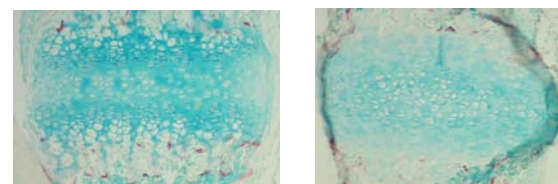


図5. 蝶後頭軟骨結合部のTRAP染色像
(左図: BALB/Cマウス 右図: *bm/bm*マウス)

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)

Takahashi K, Kajii TS, Tsukamoto Y, Saito F,
Wada S, Sugawara-Kato Y, Iida J. Histological
study of the nasal septal cartilage in
BALB/c-bm/bm mouse which spontaneously
induces malocclusion. Orthodontics &
craniofacial research, 15(2), 2012, 84-91,
DOI:10.1111/j.1601-6343.2011.01538.x

〔学会発表〕(計 1 件)

和田悟史、大西康友、菅原由紀、梶井貴史、
塚本祐理、斎藤文男、平林義章、飯田順一郎、
前歯部交叉咬合自然発症マウス
(BALB/c-bm/bm)の蝶後頭軟骨結合部の免疫
組織学的検討、第 69 回日本矯正歯科学会大
会、2010 年 9 月 29 日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田悟史(WADA SATOSHI)

鶴見大学・歯学部・その他

研究者番号:20581119

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし