

〔原著〕

胎生期および生後マウス下顎頭軟骨における tenascin-C, fibronectinの免疫組織化学的研究

柴田 俊一¹⁾, 佐藤 麗²⁾, 田巻 玉器¹⁾, 小原 伸子¹⁾, 鈴木 裕子¹⁾

1) 北海道医療大学歯学部・口腔構造機能発育学系・組織学分野

2) 日本大学松戸歯学部矯正学講座

An immunohistochemical study of tenascin-C and fibronectin in mandibular condylar cartilage of fetal and postnatal mice

Shunichi SHIBATA¹⁾, Rei SATO²⁾, Tamaki YOKOHAMA-TAMAKI¹⁾, Nobuko OBARA¹⁾, Yuko SUZUKI¹⁾

1) Division of Histology, Department of Oral Growth and Development, Health Sciences University of Hokkaido

2) Department of Orthodontics, Dental school of University at Matsudo

Abstract

To investigate the functions of tenascin-C and fibronectin in mandibular condylar cartilage, immunohistochemical analyzes were performed in developing mouse mandibular condylar cartilage and cartilaginous anlagen of the tibia (tibial cartilage) as well as postnatal mandibular condylar cartilage. Fibronectin immunostaining was continuously detected within the cartilage matrix both in tibial and mandibular condylar cartilage, indicating the presence of fibronectin in the general cartilage matrix involved in the proliferation/maintenance of chondrocytes. Meanwhile tenascin-C immunostaining in the tibial cartilage was detected in the newly formed cartilage matrix but became limited to localized areas at the epiphyseal end with advancing age. In the mandibular condylar cartilage, however, tenascin-C immunostaining was mainly detected in the periosteum of mandibular bone, anlagen of condylar cartilage, and in the perichondrium and upper layer of the condylar cartilage during the fetal period. These tenascin-C positive areas showed weak fibronectin immunostaining, indicating that two molecules are present in a mutually exclusive pattern. Tenascin-C immunostaining was continuously detected in postnatal condylar cartilage in the fibrous cell zone, indicating this continuous immunostaining reflects structural features of condylar cartilage in terms of secondary cartilage and articular cartilage. Additionally, the mutual exclusive immunostaining pattern of both molecules implies the existence of competitive interactions in cartilage.

抄 録

胎生期のマウス下顎頭軟骨と脛骨原基軟骨および生後の下顎頭軟骨におけるtenascin-Cとfibronectinの機能を検索する目的でこれらの分子の発現を免疫組織学的に検索した。Fibronectinの免疫染色は下顎頭軟骨、脛骨原基軟骨とも形成された軟骨基質全体に認められた事から、fibronectinは軟骨の一般的な細胞外基質成分として存在し、軟骨細胞の増殖や維持に関連していると推察された。一方、tenascin-Cの免疫染色は胎生期の顎骨原基軟骨において、日齢が進むにつれ次第に骨端部に限局する

ようになった。胎生期および生後の下顎頭軟骨形成・成長過程においては、tenascin-C mRNAの発現および免疫染色が主に軟骨形成前の間葉凝集、軟骨膜、線維層から多形細胞層までの層に認められた。この染色結果は下顎頭軟骨の二次軟骨としての、また関節軟骨としての機能を反映するものと考えられた。またtenascin-Cとfibronectinは相互排除的な染色パターンを示したことから、軟骨組織において両分子間の何らかの競合作用が推測された。

受付：平成23年3月30日

緒 言

下顎頭軟骨は側頭骨の下顎窩と下顎骨の下顎頭の間に形成される顎関節 (Temporo-Mandibular Joint: TMJ) の構成要素の一つであり, 関節軟骨として咬合力を緩衝する働きがあると同時に顎顔面の1つの成長中心となっており, 成長軟骨としても機能している. したがって顎関節症や顎顔面の発育異常にも関連が深く, 口腔外科, 矯正, 小児歯科などの臨床的見地からも下顎頭軟骨の構造上の特徴を研究することは非常に重要であると考えられる.

発生学的に下顎頭軟骨は代表的な「二次軟骨」に分類されている。「二次軟骨」は正式な解剖学用語としては認められていないが, この軟骨の特徴をよく表しており, 解剖学のみならず臨床でも広く用いられている. 二次軟骨の正確な定義は確立していないが, 1) 時期的に一次軟骨より, 遅れて発生する. 2) 二次軟骨の軟骨細胞は未分化間葉細胞から直接分化するのではなく, 既存骨の骨膜に由来すること, が示されている (Beresford, 1981; Hall, 2005).

筆者らは下顎骨関節突起の長軸に平行な断面, いわゆる冠状断切片を作成して検索した結果, 胎齢14日にアルカリフォスファターゼ (ALP) 陽性の下顎頭軟骨の原基が間葉細胞凝集として, 既に形成されている下顎骨の遠心に接する位置に認められ (Shibata et al., 1997), 胎齢14.5-15.0日に初めて軟骨組織がその間葉細胞凝集の中から生ずることを示した (Shibata et al., 1996; 1997; Fukuda et al., 1999). また筆者らは免疫組織化学およびin situ hybridizationの結果から, 原基の間葉細胞が軟骨細胞に分化するやいなや直ちに (あるいは直接) 肥大軟骨細胞に分化すること (Shibata et al., 1997; Fukuda et al., 1999), 骨形成に必須な転写因子であるRunx 2の遺伝子ノックアウトマウスにおいて, 下顎骨のみならず下顎頭軟骨も欠損していること (Shibata et al., 2004), 下顎頭軟骨形成過程には軟骨形成に必須なSox 9とSox 5の発現とともに骨形成に必須な転写因子であるRunx 2, Osterixの発現低下が重要な要因であることなど (Shibata et al., 2006; Shibata & Yokohama-Tamaki, 2008), 下顎頭軟骨形成過程の構造上の特徴を明らかにしてきた.

Tenascin-Cは大型の糖タンパク質でtenascin familyの中で最初に発見された分子で単にtenascinといえばこの分子を指す. Tenascin-CはN末側にheptat構造, EGF様反復構造, fibronectin III型反復構造を持ち, C末側にはフィブリノーゲン様ドメインを持つ. Tenascin-Cはheptat構造で三量体となり, central domain構造でさらに六量体

となる (Erickson, 1993; 吉田&坂倉, 1997). Fibronectin III型反復構造に選択的スプライシング部位がありマウスでは7種, ヒトでは9種の変異種が知られている (Erickson, 1993; Sahlberg et al. 2001). またこの部位にはヒトではRGD配列, マウスではRVD配列が認められる. この構造によりtenascin-Cはintegrinファミリーと結合でき, 後述のfibronectinと同様な細胞接着分子と考えられていたが, 現在ではEGF様反復構造, fibronectin III型反復構造の働きによる抗接着分子としての機能が注目されている. またフィブリノーゲン様ドメインはヘパリンと親和性を持つため, ヘパリン結合性成長因子との関連も推測され, 細胞増殖, 分化, 遊走に関する機能も示唆されているが, 細胞の種類, 部位, 状態によって起こる反応は多様性を示している (吉田&坂倉, 1997).

In vivoにおいて, 胎生初期ではtenascin-Cは原腸形成や神経堤細胞の移動時に発現し, その後歯を含む様々な器官の間葉凝集に発現する. 軟骨組織に関しては四肢の長骨や肋骨原基の軟骨では多くの報告が認められ, 胎生期の形成過程の軟骨膜, 比較的分化度の低い軟骨細胞, あるいは気管軟骨のような永久軟骨の軟骨細胞に発現が認められ, 分化 (成熟) した軟骨細胞や生後の軟骨組織では発現が低下することから軟骨細胞の初期分化に関連すると推測されている (Mackie and Tucker, 1992; Tucker et al., 1993; Pacifici et al., 1993; Glumoff et al., 1994). しかしながら下顎頭軟骨に関してはVäkevärä (1990) が生後5日および20日のラット下顎頭軟骨の増殖軟骨細胞層に免疫染色が認められるという報告が一例あるのみで, 下顎頭軟骨の発生過程と胎生期の成長過程および生後の成長過程における経時変化に関する報告は認められない. したがって本研究の主な目的はこれらの過程でのtenascin-Cの発現を免疫組織化学的に検索し, 長骨における所見と比較しつつ, 胎生期および生後発育におけるこの分子の働きを明確にすることである.

一方, fibronectinは血漿タンパクとして存在すると同時に主要な細胞外基質成分としても存在し, 現在までに最もよく研究されている細胞接着分子の一つである. その細かい構造に関しては成書に譲ることにするが (磯合&熊谷, 1996) 重要なのはRGD配列をもちintegrin ($\alpha 5 \beta 1$, $\alpha v \beta 1$ 等)と結合し, integrinを介するシグナル伝達系を介して細胞の様々な機能の活性化に関連することである (磯合&熊谷, 1996). 軟骨組織においても, fibronectinが軟骨組織の代謝, 維持, 修復に関係することや (Martin & Buckwalter, 1998) fibronectinそのものの合成や会合が生化学的あるいは機械的な刺激によって制御されていることが知られている (Burton-Wurster et al.,

1997; Mao & Schwarzbauer, 2005). 下顎頭軟骨においては、生後ラットを用いた実験で、機能的矯正装置がfibronectin-Integrinの系を介して軟骨細胞の増殖を促進し、下顎頭軟骨の成長に関連することが知られている (Marques et al., 2008). しかしながらtenascin-C同様、その発現を胎生期、生後発育を通して経時的に検索した研究は見られない。またtenascin-Cは直接的な細胞接着阻害機能の他、fibronectinの細胞接着機能を阻害することによる間接的な抗細胞接着機能もあるとされ (吉田&坂倉, 1997), この両分子が相互に排除しあうような (mutual exclusive) 染色パターンを示すことが創傷治癒過程などで知られている (Nakasone et al., 2007). したがってfibronectinの発現をtenascin-Cのそれと比較しつつ検索することが本研究のもう一つの目的である。

材料と方法

本実験は北海道医療大学実験動物委員会での審査の後、学長の承諾を得て行われた。胎齢12.0, 13.0, 14.0, 15.0, 16.0, 18.0日および生後7日, 14日, 21日のICRマウスを三協ラボラトリーズから入手して実験に用いた。各日齢のマウスをエーテル麻酔のもとで頸骨脱臼を行い、胎仔に関しては摘出後さらに頸骨脱臼を施し屠殺した。その後、頭部あるいは脛骨を摘出し4%パラホルムアルデヒドで1日浸漬固定を行い、さらに10% EDTAにて5日~2週間、4℃で脱灰したのち、通常に従ってパラフィン包埋を行った。その後脛骨は縦断切片、下顎頭軟骨は矢状面に垂直で、関節突起に平行な断面いわゆる冠状断切片を作成した。切片はキシロールで脱パラフィンを行った後、エチルアルコールを介して、PBSに浸漬した。切片は精巢ヒアルロニダーゼ (シグマ社, 25mg/ml) で37℃ 3時間処理しその後免疫染色を行った。用いた抗体はウサギ抗tenascin-Cポリクロナール抗体 (Chemicon社, 1:500) とウサギ抗fibronectinポリクロナール抗体 (LSL社, 1:1000) で、ニチレイのHISTOFINE SABキットによるSABC法を用いた。反応時間は一次抗体が1時間、ビオチン標識二次抗体が20分、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンが15分、いずれも室温で反応させた。反応産物はニチレイのAEC (3-amino-9-ethylcarbazole) 発色キットを用いた。コントロールには一次抗体のかわりに通常のウサギIgGを反応させた。

胎生期下顎頭軟骨においてはin situ hybridization法によるtenascin-C mRNAの発現も検索した。プローブ作成にはマウス胎仔肋骨軟骨由来のTotal RNAから逆転写によって作成したcDNAを鋳型にし、forward 5' (4972)-

GCTCTGGATGGTCCATCTGGTCTTC-3' (4996), reverse 5' (5540)-TTGCTGAGTAGTGGGTGGATGGGCT 3-3' (5416)というプライマーセットを用いたPCR法にてtenascin-Cの遺伝子を増幅させた。さらに得られたPCR産物をロッシュ社のDIG-RNAラベリングキットにてdigoxigenin標識のアンチセンス鎖およびセンス鎖を合成し、さらにin situ hybridizationはロッシュ社のDIG-RNAデテクションキットを用いて行った。詳細は過去の論文に記載したとおりである (Fukada et al., 1999; Shibata et al., 2006). コントロールにはセンス鎖を反応させた。なおこのプローブはtenascin-Cのすべてのタイプのスプライシング産物を認識するものである。

結 果

1. 胎生期下顎頭軟骨におけるtenascin-C mRNAの発現

胎齢14.0日では過去の文献で示されたように (Shibata et al., 1996; 1997; 2006; Fukada et al., 1999), 下顎頭軟骨の原基が間葉凝集として、それ以前に形成されていた下顎骨の遠心部分に密着して形成されており、それは骨膜と連続していた。Tenascin-C mRNAは下顎骨の骨膜 (図1 aの矢頭) と間葉凝集 (図1 aの矢印) に発現が認められた。

胎齢15.0日では最初の下顎頭軟骨形成が認められた (図1 bのCC)。この時点で間葉凝集の周辺の組織は骨膜と連続した軟骨膜となっていた。Tenascin-C mRNAは下顎骨の骨膜および軟骨膜 (図1 bの矢頭) とそれに連続する線維層 (軟骨の遠心部分に見られる) (図1 bの矢印) に発現が認められたが、新生軟骨組織内には認めら

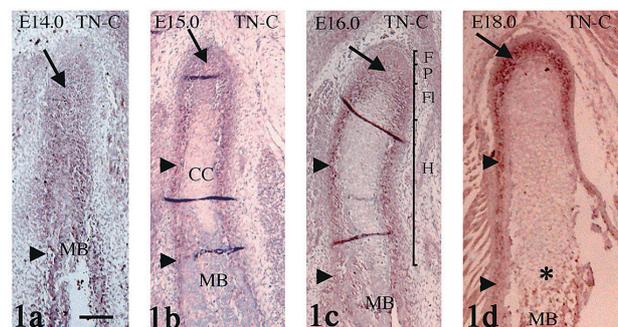


図1 In situ hybridization法によるtenascin-C (TN-C) mRNAの発現。胎齢14.0日 (a), 15.0日 (b), 16.0日 (c), 18.0日 (d)のマウス下顎骨関節突起の冠状断切片。

(a) Tenascin-C mRNAは下顎骨 (MB) の骨膜 (矢頭) と下顎骨の遠心に密着する間葉凝集 (矢印) に発現が認められる。(b) 最初の下顎頭軟骨形成が認められる (CC)。Tenascin-C mRNAは骨膜および軟骨膜 (矢頭) とそれに連続する線維層 (矢印) に発現が認められる。(c) 下顎頭軟骨は線維層 (F), 多形細胞層 (P), 扁平細胞層 (FI), 肥大細胞層 (H) に区分される。Tenascin-C mRNAは骨膜、軟骨膜 (矢頭) のほか、線維層、多形細胞層、そして扁平細胞層の上部までの領域に発現が認められる (矢印)。(d) 下顎頭軟骨の下方に軟骨内骨化が認められる (*). Tenascin-C mRNAは引き続き骨膜、軟骨膜 (矢頭) のほか線維層、多形細胞層に発現が認められる (矢印)。Bar=100μm.

れなかった。

胎齢16.0日では軟骨組織が伸張し生後の下顎頭軟骨に認められる層区分が明瞭になっていた(図1c)。ここではLuderら(1997)の分類に従って線維層, 多形細胞層, 扁平細胞層, 肥大細胞層に区分した。Tenascin-C mRNAは骨膜, 軟骨膜のほか, 線維層, 多形細胞層, そして扁平細胞層の上部までの領域で発現が認められた(図1cの矢印)。

胎齢18.0日では下顎頭軟骨に軟骨内骨化が認められた(図1dの*)。Tenascin-C mRNAは引き続き, 骨膜, 軟骨膜(図1dの矢頭)のほか, 線維層, 多形細胞層に発現が認められた(図1dの矢印)。

2. 胎生期下顎頭軟骨における tenascin-C および fibronectin の免疫染色

Tenascin-Cの免疫染色は胎齢14.0日の間葉凝集, その他の日齢の骨膜, 軟骨膜に関してはmRNAとほぼ同様な領域に発現が認められた(図2a-d)。その他, 胎齢16.0日, 18.0日では扁平細胞層の全層に反応が認められ(図2c, dの矢印), 胎齢18.0日では肥大細胞層の上部にも弱い反応が認められた(図2dの*)。

Fibronectinの免疫染色は胎齢14.0日では下顎頭軟骨原基の外の間葉凝集(図2eの*)と形成されている下顎骨基質(図2eのMB)に反応が認められ, 骨膜および間葉凝集では発現が弱かった。軟骨組織が形成された後は形成された軟骨基質の内部に強い反応が認められた。すなわち胎齢15.0日ではあらたに形成された軟骨全体に(図2fの矢印), 16.0日, 18.0日では扁平細胞層から肥大細胞層までの範囲で反応が認められた(図2g, hの矢印)。一方, 胎齢15.0日の骨膜および軟骨膜とそれに連続する線維層(図2fの矢頭), 胎齢16.0日, 18.0日の軟骨膜, 線維層, 多形細胞層では反応が弱かった(図2g, hの矢頭)。

3. 胎生期脛骨原基における tenascin-C および fibronectin の免疫染色

胎齢12.0日の脛骨原基は間葉凝集の中に最初の軟骨形成が認められたが, tenascin-Cの免疫染色は認められなかった(図3aの矢印)。胎齢13.0日では軟骨組織の伸張が見られ, tenascin-Cの免疫染色も中央の骨幹部分に認められた(図3bの矢印)。胎齢14.0日では骨幹部分に肥大細胞層の形成が認められたが, tenascin-Cの免疫染色は辺縁の骨端部分にのみ認められた(図3cの矢印)。胎齢15.0日では骨幹部で軟骨内骨化が開始していた。Tenascin-Cの免疫染色は骨端部分の末端に近い領域に認

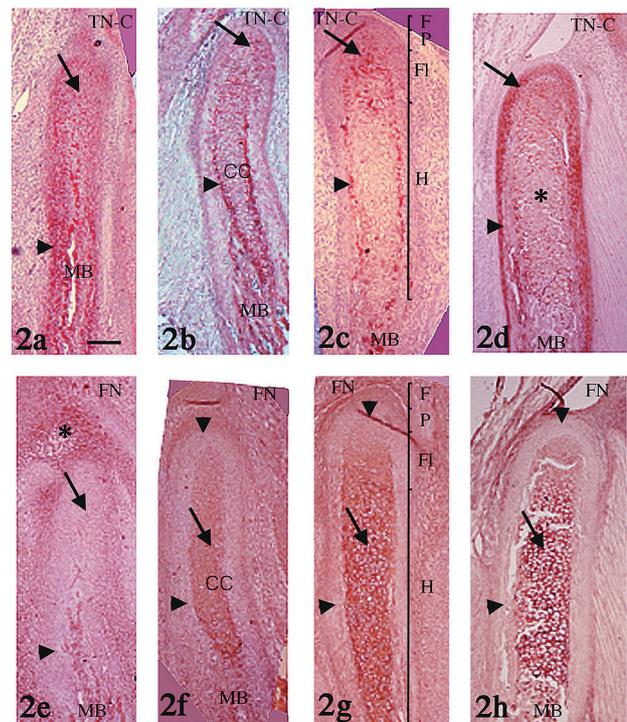


図2 胎生期下顎頭軟骨における tenascin-C (TN-C) (a-d) および fibronectin (FN) (e-h) の免疫染色。胎齢14.0日 (a, e), 15.0日 (b, f), 16.0日 (c, g), 18.0日 (d, h) のマウス下顎骨関節突起の冠状断切片。(a) Tenascin-Cの免疫染色は間葉凝集(矢印), 下顎骨(MB)の骨膜(矢頭)に認められる。(b) Tenascin-Cの免疫染色は軟骨膜(矢頭)とそれに連続する線維層(矢印)に認められるが, 形成された下顎頭軟骨(CC)内では弱い。(c) Tenascin-Cの免疫染色は軟骨膜(矢頭)および線維層から扁平細胞層の全層に認められる(矢印)。(d) Tenascin-Cの免疫染色は軟骨膜(矢頭), 線維層から扁平細胞層まで(矢印)の他, では肥大細胞層の上部にも弱い反応が認められる(*)。(e) Fibronectinの免疫染色は下顎頭軟骨原基外の間葉組織(*)、下顎骨基質(MB)に反応が認められ, 骨膜(矢頭)および間葉凝集(矢印)では反応が弱い。(f) Fibronectinの免疫染色は新たに形成された軟骨全体に認められるが(矢印), 骨膜および軟骨膜では反応が弱い(矢頭)。(g) Fibronectinの免疫染色は扁平細胞層から肥大細胞層までの軟骨基質に認められるが(矢印), 線維層, 多形細胞層では反応が弱い(矢頭)。(h) 胎齢16.0日と同様, 免疫染色は扁平細胞層から肥大細胞層までの軟骨基質に認められるが(矢印), 線維層, 多形細胞層では反応が弱い(矢頭)。Bar=100 μ m。

められた(図3dの矢印)。胎齢18.0日では関節軟骨と成長板軟骨が区別されるようになったが, tenascin-Cの免疫染色は関節軟骨の最表層に局限して認められ(図3eの矢印), 成長板軟骨には全く認められなかった。Fibronectinの免疫染色はこの期間に形成された軟骨基質全体に免疫染色が認められ(図3f-jの矢印), 特に肥大細胞層では強い反応が観察された。胎齢18.0日ではtenascin-Cの免疫染色が認められる関節軟骨最表層ではfibronectinの免疫染色は弱くなっていた(図3jの矢頭)。

4. 生後の下顎頭軟骨における tenascin-C および fibronectin の免疫染色

生後の下顎頭軟骨を冠状断切片で観察すると, 軟骨は週齢を経るとともに内外的な幅が増加するが, 軟骨内骨

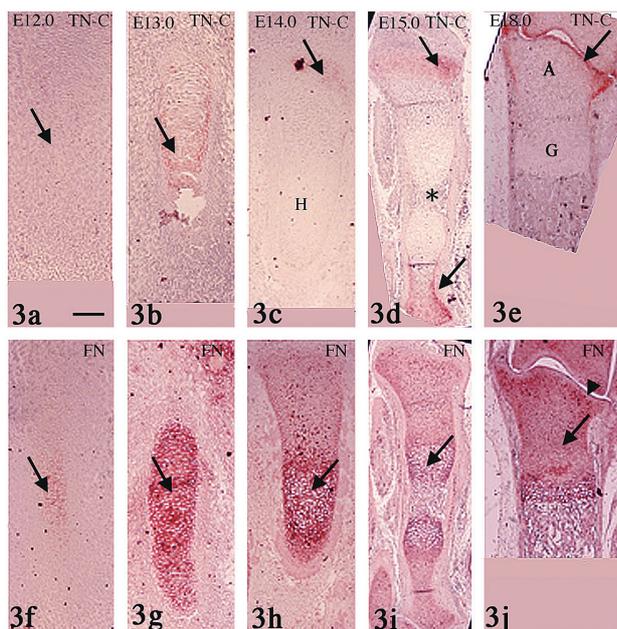


図3 胎生期脛骨原基におけるtenascin-C (TN-C) (a-e) およびfibronectin (FN) (f-j) の免疫染色。胎齢12.0日 (a, f), 13.0日 (b, g), 14.0日 (c, h), 15.0日 (d, i), 18.0日 (e, j) の縦断切片。(a) 最初の軟骨形成は認められるが、tenascin-Cの免疫染色は認められない(矢印)。(b) 軟骨組織が伸張し、tenascin-Cの免疫染色が中央の骨幹部に認められる(矢印)。(c) 骨幹部に肥大細胞層が出現している(H)。Tenascin-Cの免疫染色は骨端部分にのみ認められる(矢印)。(d) 骨幹部で軟骨内骨化が開始している(*)。Tenascin-Cの免疫染色は骨端部分の末端に近い領域に認められる(矢印)。(e) 関節軟骨(A)と成長板軟骨(G)が区別される。Tenascin-Cの免疫染色は関節軟骨の表層に限局して認められ(矢印)、成長板軟骨には全く認められない。(f) Fibronectinの免疫染色は中央の骨幹部に認められる(矢印)。(g) Fibronectinの免疫染色は骨幹部の広い範囲に認められる(矢印)。(h) Fibronectinの免疫染色は軟骨基質全体に認められ、特に肥大細胞層では強く染色されている(矢印)。(i) Fibronectinの免疫染色は前段階と同様軟骨基質全体に認められ、特に肥大細胞層では強く染色されている(矢印)。(j) Fibronectinの免疫染色は関節軟骨、成長板軟骨の全体に認められるが(矢印)、関節軟骨の最表層では反応が弱くなっている(矢印)。Bar=100 μ m。

化の進行とともに上下的な厚みは減少していた。Tenascin-Cの免疫染色は各週齢とも主として線維層に強い免疫染色が認められ(図4 a-cの矢印)、多形細胞層以下肥大細胞層までの軟骨基質にも弱い免疫染色が残存していた(図4 a-cの*)。一方、fibronectinの免疫染色は多形細胞層以下の軟骨基質に強い反応が認められ(図4 d-fの矢印)、線維層での反応は弱かった(図4 d-fの矢印)。従って両分子の免疫染色は多形細胞層以下の軟骨基質に弱いtenascin-Cの反応が残存しているものの、ほぼ相互排除的な染色様式を示していることが判明した。

考 察

本研究において、胎生マウスにおけるtenascin-Cの免疫染色は、下顎骨の骨膜に認められるほか、下顎頭軟骨形成前の間葉凝集、軟骨形成後の軟骨膜、下顎頭軟骨の線維層～多形細胞層に強い免疫染色が認められた(図2 a-d)。In situ hybridization法でmRNAの発現を調べたと

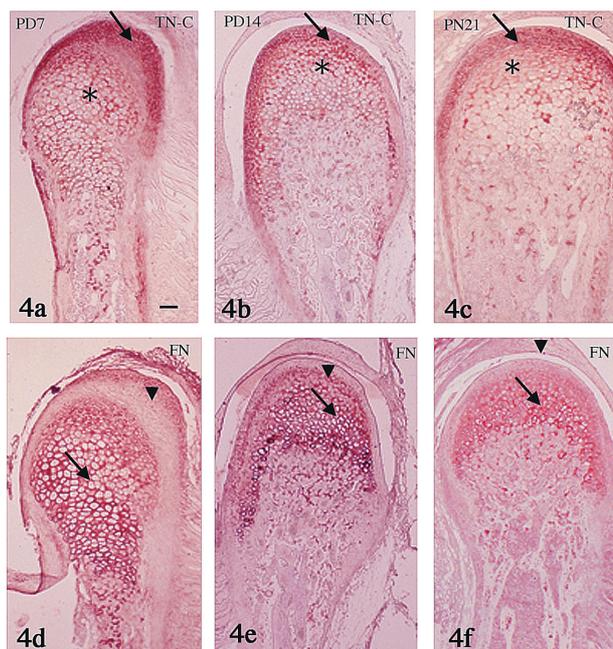


図4 生後の下顎頭軟骨におけるtenascin-C (TN-C) (a-c) およびfibronectin (FN) (d-f) の免疫染色。生後7日 (a, d), 14日 (b, e), 21日 (c, f) の冠状断切片。(a-c) 各日齢ともtenascin-Cの免疫染色は主として線維層に強い免疫染色が認められ(矢印)、多形細胞層以下肥大細胞層までの軟骨基質にも弱い免疫染色が残存している(*)。(d-f) 各日齢ともfibronectinの免疫染色は多形細胞層以下の軟骨基質に強い免疫染色が認められ(矢印)、線維層での反応は弱い(矢印)。Bar=50 μ m。

ころほぼ同様な領域に発現が認められたことから(図1 a-d)、これらの領域に存在する骨芽細胞、軟骨細胞あるいは線維芽細胞がtenascin-Cを合成、分泌していることが判明した。胎齢18.0日や生後の下顎頭軟骨ではより深層の領域にもtenascin-Cの免疫染色が認められたが(図4 a-c)、これは分泌されたtenascin-Cが完全に分解されずに残存したものであると考えられる。

胎生期の脛骨原基の軟骨においては形成のごく初期には中央の骨幹部部分にも反応が認められたが、すぐに骨端部分のみに認められるようになり、関節軟骨と成長板軟骨の分化が明瞭となった胎齢18.0日では関節軟骨の最表層に限局して認められるようになった(図3 a-d)。この脛骨原基の軟骨における結果は過去に報告されているニワトリ、ラット、マウスの長骨におけるものと一致している(Mackie & Tucker, 1992; Tucker et al., 1993; Pacifici et al., 1993; Glumoff et al., 1994)。これらの結果からtenascin-Cはintegrin等との相互作用等を介して軟骨細胞の初期分化に関連するとされてきたが、今回の脛骨原基の所見はそれを支持するものである。しかしながら、下顎頭軟骨形成過程における染色結果は、原則的には「比較的未成熟な軟骨細胞に発現が認められる」という点では長骨の場合と同様であるが、異なる点も認められる。まず脛骨原基では軟骨組織が形成されたのちに免疫染色が認められたのに対し、下顎頭軟骨では軟骨形成前の間

葉凝集にすでに免疫染色およびmRNAの発現が認められた点があげられ(図1aおよび図2a), このことは一次軟骨と二次軟骨の発生由来の違いを反映しているものと考えられる。すなわち, 「オリジナルの間葉組織に由来するのではなくすでに形成されている骨膜に由来する」というのが二次軟骨の最も認められている定義であり, 我々はマウスの下顎頭軟骨でその定義が正しいことを明らかにしてきた(Shibata et al., 1996; 1997; 2006; 2008; Fukada et al., 1999)。本研究でもtenascin-Cが下顎頭軟骨形成以前の骨膜に強く発現していることから, それに由来する下顎頭軟骨原基の間葉凝集に発現が認められるのも理にかなったことで, 逆にこのtenascin-Cの発現が骨膜に由来するという下顎頭軟骨の特徴をさらに裏付けるものであると考えられた。

下顎頭軟骨は関節軟骨と成長軟骨両方の性質を持つとされているが(Ten Cate, 2003), 胎生期では線維層~多形細胞層に発現が継続して認められたことは関節軟骨としての性質を裏付けるものである。線維層の存在というのは下顎頭軟骨にみられる重要な特徴の一つであるので, tenascin-Cは四肢の軟骨よりも下顎頭軟骨の分化, 維持により密接に関連していると言える。この構造上の特徴は生後の下顎頭軟骨においても引き続き線維層~多形細胞層にtenascin-Cの免疫染色が継続して認められたことで裏付けられる。生後組織における下顎頭軟骨線維層の生理学的意義は咬合力を緩衝することであると考えられているが, その考えに基づくとtenascin-Cは咬合という現象にも密接に関連した重要な分子であると言及でき, 顎関節症やリウマチ性の顎関節の変形など臨床との関連も注目される場所である。さらにtenascin-Cの発現は脳など一部の組織を除いて, 生後は発現が弱まるとされているが(吉田&坂倉, 1997), この領域に生後も継続してtenascin-Cの発現が認められたことは下顎頭軟骨の機能の特殊性を示唆するものであると考えられる。

Fibronectinに関しては脛骨, 下顎頭軟骨とも形成された軟骨基質に広く免疫染色が認められた(図2e-h, 図3f-j)。この分布様式はアグリカンやII型コラーゲンの免疫染色とほぼ同様である(Shibata et al., 1997; 2002)。従ってfibronectinは軟骨組織の細胞外基質成分として一般的に存在するものであると考えられ, integrinを介した細胞接着分子として軟骨細胞の維持や分化に関連しているものと推測される。過去の文献では軟骨基質全体ではなく, 部分的に認められるとする報告も見られるが(Martin & Buckwalter, 1998; Livne et al., 1990; Marques et al., 2008), これらの所見の中にはヒアルロニダーゼによる前処置を施していないものがあり, アグリ

カンなどのプロテオグリカンのグリコサミノグリカン鎖による免疫染色のプロッキングが関与している可能性がある。本研究ではヒアルロニダーゼによる前処置を十分に施しており, fibronectinの正確な軟骨内分布を表わしていると考えられる。

注目されるのはtenascin-Cの免疫染色部位との関係である。Tenascin-Cが分解されずに残っていると考えられる生後下顎頭軟骨の深層では両分子の共存も認められるが, tenascin-Cの免疫染色が強く認められる下顎頭軟骨原基や, 形成された下顎頭軟骨の線維層~多形細胞層, あるいは脛骨原基の関節軟骨最表層ではfibronectinの免疫染色が非常に弱くなっており, 基本的には相互排他的(mutual exclusive)な染色様式, 言葉を変えれば「ネガーポジ」の関係となっている。このような両分子の存在様式は創傷治癒などの病的な状態ではしばしば認められる現象である(Nakasone et al., 2007)。機能的にtenascin-Cはfibronectinの細胞接着機能を阻害することによる間接的な抗細胞接着機能もあるとされている。本研究でも見られた両分子の特徴的な染色様式がこの機能を直接反映していることかどうかは不明であるが, 何らかの競合作用を示唆していることは確実で, 今後正常, 異常を問わず様々な状況での両分子の局在ということに注目する必要があるであろう。

なお本研究では両分子ともすべてのスプライシング産物すべてを認識する抗体, プローブを用いて, その分布様式を検索したが, 両分子とも様々なスプライシング産物があり, 時期, 空間的な分布の違いも報告されている(吉田&坂倉1997; 磯合&熊谷, 199; Sahlberg et al., 2001)。したがって下顎頭軟骨における経時的なスプライシングの多様性も今後必須の研究事項であると考えられる。

結 論

1. 胎生期および生後の下顎頭軟骨形成・成長過程においてtenascin-C mRNAの発現および免疫染色は主に軟骨形成前の間葉凝集, 軟骨膜, 線維層から多形細胞層までに認められた。
2. 胎生期の頸骨原基の軟骨においては日齢が進むにつれ, tenascin-Cの免疫染色は次第に骨端部に限局するようになった。
3. この両軟骨の染色性の違いは一次軟骨と二次軟骨の発生由来の違いと, 咬合力を緩衝するという下顎頭軟骨特有の機能に関係していると推測された。
4. Fibronectinはいずれの標本においても形成された軟骨基質に免疫染色が認められることから, 軟骨の一

般的な細胞外基質成分として機能していると考えられた。

5. Tenascin-Cとfibronectinは基本的には相互排除的な染色パターンを示したことから両分子間の競合作用が推測された。

謝 辞

本研究は1)平成22年度の日本学術振興会科学研究費助成金(基盤研究C課題番号22592044),2)文部科学省私立大学ハイテクリサーチプロジェクト助成金(2008-2012),3)文部科学省日大松戸歯学部学術フロンティア助成金(2007-2011)の援助を受けて行われた。

文 献

- Beresford WA. Chondroid bone, secondary cartilage and metaplasia. Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1981, p3-65.
- Burton-Wurster N, Lust G & Macleod JN. Cartilage fibronectin isoforms: in search of functions for a special population of matrix glycosaminoglycans. *Matrix Biol* 15: 441-454, 1997.
- Erickson HP. tenascin-C, tenascin-R, and tenascin-X: a family of talented proteins in search of functions. *Curr Opin Cell Biol* 5: 869-876, 1993.
- Fukada K, Shibata S, Suzuki S, Ohya K & Kuroda T. In situ hybridization study of Type I, II, X collagens and aggrecan mRNAs in the developing condylar cartilage of fetal mouse mandible. *J Anat* 195: 321-329, 1999.
- Glumoff V, Savontaus M, Vehanen J & Vuorio E. Analysis of aggrecan and tenascin gene expression in mouse skeletal tissue by northern and in situ hybridization using species specific cDNA probes. *Biochim Biophys Acta* 1219: 613-622, 1994.
- Hall BK. Bones and cartilage, Developmental and evolutionary skeletal biology. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005, p149-165.
- 磯合 敦, 熊谷博道: フィブロンネクチン. In竹内雅俊, 宮坂昌之編 細胞接着分子-その生体機能の全貌-東京: 東京化学同人, 1996, p201-207.
- Livne E, Lewinson D, Dickman G & Silbermann M. Histochemical study of metrical components in the mandibular condyle of neonatal mice. *Acta Anat* 138: 32-41, 1990.
- Luder HU, Leblond CP & von der Mark K. Cellular stages in cartilage formation as revealed by morphometry, radioautography and Type II collagen immunostaining of the mandibular condyle from weanling rats. *Am J Anat* 182: 197-214, 1988.
- Mackie EJ & Tucker RP. Tenascin in bone morphogenesis: expression by osteoblasts and cell type-specific expression of splice variants. *J Cell Sci* 103: 765-771, 1992.
- Mao Y & Schwarzbauer JE. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol* 24: 389-399, 2005.
- Marques MR, Hajjar D, Franchini KG, Moriscot AS & Santos MF. Mandibular appliance modulates condylar growth through integrins. *J Dent Res* 87: 153-158, 2008.
- Martin JA & Buckwalter. Effects of fibronectin on articular cartilage chondrocyte proteoglycan synthesis and response to insulin-like growth factor-I. *J Orthop Res* 6: 752-757, 1998.
- Nakasone A, Shibata S, Suzuki S, Yamashita Y & Ohyama K. Laser burn wound healing in naso-labial region of fetal mice. *Oral Diseases* 13,45-50, 2007.
- Pacifici M, Iwamoto M, Golden EB, Leatherman JL, Lee Y-S & Chuong C-M. Tenascin is associated with articular cartilage development. *Dev Dyn* 198: 123-134, 1993.
- Sahlberg C, Aukhil I & Thesleff I. Tenascin-C in developing mouse teeth: expression of splice variants and stimulation by TGF β and FGF. *Eur J Oral Sci* 109: 114-124, 2001.
- Shibata S, Fukada K, Suzuki S & Yamashita Y. Immunohistochemistry of collagen types II and X, and enzyme-histochemistry of alkaline phosphatase in the developing condylar cartilage of the fetal mouse mandible. *J. Anat* 191: 561-570, 1997.
- Shibata S, Suda N, Suzuki S, Fukuoka H & Yamashita Y. An in situ hybridization study of Runx2, Osterix, and Sox9 at the onset of condylar cartilage formation in fetal mouse mandible. *J Anat* 208: 169-177, 2006.
- Shibata S, Suda N, Yoda S, Fukuoka H, Ohyama K, Yamashita Y & Komori T. Runx2-deficient mice lack mandibular condylar cartilage and have deformed Meckel's cartilage. *Anat Embryol (Berl)* 208: 273-280, 2004.
- Shibata S, Suzuki S, Tengan T, Ishii M & Kuroda T. A histological study of the developing condylar cartilage of the fetal mouse mandible using coronal sections. *Arch Oral Biol* 41: 47-54, 1996
- Shibata S & Yokohama-Tamaki T. An in situ hybridization study of Runx2, Osterix, and Sox9 in the anlagen of mouse mandibular condylar cartilage in the early stages of embryogenesis. *J Anat* 208: 274-283, 2008.
- Ten Cate AR. Temporomandibular joint. In Nanci N editor, Ten Cate's Oral Histology: Development, structure, and Function. St. Louis: Mosby, 2003, p376-396.
- Tucker RP, Hammarback JA, Jerath DA, Mackie EJ & Xu Y. Tenascin expression in the mouse: in situ localization and induction in vitro by FGF. *J Cell Sci* 104: 69-76, 1993.
- Väkevä L, Machie E, Kantomaa T & Thesleff I. Comparison of the distribution patterns of tenascin and alkaline phosphatase in developing teeth, cartilage, and bone of rats and mice. *Anat Rec* 228: 69-76, 1990.
- 吉田利通, 坂倉照代. テネインファミリーの構造と機能. *生体の科学* 48: 273-279, 1997.



柴田 俊一

昭和57年3月 東京医科歯科大学歯学部卒
昭和61年3月 東京医科歯科大学大学院歯学研究科修了
昭和61年4月 東京医科歯科大学助手
平成9年4月 同上講師
平成16年4月 同上助教授
平成18年11月 北海道医療大学教授 現在に至る