

関節荷重が成長期ラット下顎頭軟骨の細胞外基質 mRNA 発現に及ぼす影響

著者	山口 優
学位名	博士（歯学）
学位授与機関	北海道医療大学
学位授与年度	平成29年度
学位授与番号	30110甲第298号
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00064592/

関節荷重が成長期ラット下顎頭軟骨の
細胞外基質 mRNA 発現に及ぼす影響

平成 29 年度

北海道医療大学大学院歯学研究科

山口 優

【目的】

矯正歯科治療において重要な標的組織である下顎頭軟骨は頭蓋の中で最も旺盛な成長を示す場、**growth site** の一つである。臨床では整形装置や機能的矯正装置などを用いて直接的、または間接的に顎関節の生力学環境を改変することで、顎顔面形態と咬合形成に大きな影響を及ぼす下顎骨の成長を制御している。下顎頭には、線維芽細胞、増殖細胞および軟骨細胞という 3 つの **cell population** からなる細胞層が存在し、生力学的環境の変化に対して複雑な反応を示すことが知られている。したがって、下顎頭軟骨の生力学的力に対する適応反応のメカニズムを知ることは矯正臨床領域の咬合形成を考えるうえで重要な課題の一つであるといえる。

本研究では、関節荷重による下顎頭軟骨の形態変化と細胞外基質の反応性を明らかにするため、成長期ラット切歯部咬合挙上モデルを用いて、関節荷重により下顎頭軟骨に生じる組織学および細胞外基質の mRNA 発現の変化を検討した。

【資料および方法】

1, 顎関節への関節荷重

生後 7 週齢の Wistar 系雄性ラット 104 匹を用いた。顎関節部への関節荷重を増大させるため、上顎切歯部にレジン製咬合板を装着し、咬合挙上による咬合改変モデルを作製した。実験期間は 1, 2, 3 および 4 週とし、装置未装着同週齢ラットを対照群として用いた。

2, 組織学的観察と下顎頭軟骨における各細胞層厚径の計測 (n=3)

各実験期間終了後、顎関節部組織を取り出し、通法に従い厚さ 7 μm の連続切片を作製した。切片には toluidine blue (TB) 染色 (pH 4.1) を施し、組織学的観察を行った。また、下顎頭軟骨中央部における各細胞層の厚径と細胞数の計測を行った。

3, 下顎頭における DNA, GAG, collagen 含有量の定量 (n=5)

各実験期間終了後、下顎頭軟骨を採取した。組織から DNA を抽出するために、ホモジナイズし、パパイイン消化処理を 24 時間行った。その後、Hoechst 法による DNA 含有量の定量を行った。GAG 含有量は Dimethylmethylene Blue (DMB) 法により定量した。

Collagen は採取した組織から hydroxyproline を抽出し、定量した。

4, 下顎頭における proteoglycan および collagen の mRNA 発現量の定量 (n=5)

各実験期間終了後、採取した下顎頭軟骨から total RNA を抽出し、RT 法により cDNA の調整を行った。Exonuclease probe (TaqMan® probe) を作製し、qPCR 法により下顎頭軟骨の proteoglycan と collagen mRNA 発現量を定量した。

5, 統計処理

単変量 F 検定と Student's t test により解析した。

【結果】

1, 下顎頭軟骨における組織学的観察では、対照群との比較で実験群は増殖細胞層の細胞密度の低下および軟骨細胞層での肥大軟骨細胞数の減少と toluidine blue に対する基質

の染色強度の低下を認めた。下顎頭軟骨各細胞層の厚径の計測では、対照群と比べ、実験群では線維層で咬合挙上後 3, 4 週に厚径の増加、増殖細胞層では 1, 2 週に厚径の増加を認め、軟骨細胞層では 1, 2, 3 週に厚径の減少を認めた。細胞数は増殖細胞層の 1 週で増加した。

2, 下顎頭軟骨での実験群の DNA 含有量は実験期間の 1 週と 4 週で対照群に比べ有意に高い値を示した。GAG 含有量は実験期間を通じ、両群に有意差は認めなかった。

3, 下顎頭軟骨における collagen 含有量の定量では実験期間を通じ、両群に有意差は認めなかった。

4, 下顎頭軟骨の各 collagen mRNA の発現では、I 型 collagen は 1 週、III 型 collagen は 1, 3 週に高値を示した。II 型 collagen は 1, 2, 3 週に低値を示した。

各 proteoglycan mRNA 発現量は、実験群の biglycan, decorin, PRELP, mimecan で 1 週, fibromodulin, lumican, chondroadherin は 1, 2 週に有意に高い値を認めた。Aggrecan は 2 週に低値を示した。

【考察】

切歯部に咬合挙上板を装着し、切歯咬合としたことで下顎頭軟骨の力学的環境は変化し下顎頭軟骨中央部での圧縮応力が増大しているものと推察される。下顎頭軟骨の厚径変化は、各細胞層を構成する細胞数の増加もしくは細胞外基質の変化が考えられた。先行研究では下顎頭軟骨で増殖活性を示すのは線維層の線維芽細胞と増殖細胞層の未分化間葉系細胞である。本研究では、2 週で増殖細胞層と軟骨細胞層に著明な組織的变化を認めたが細胞数には変化がなかったことから、これらの細胞層の厚径変化は細胞サイズと細胞外基質の容量が関与していると考えられた。

Collagen と proteoglycan mRNA の発現では、下顎頭軟骨の力学的環境変化に対する反応として、I 型と III 型 collagen が増加した。過去の幾つかの組織学的研究では、機械的刺激と細胞外基質の組成や構成との関連性を指摘している。したがって、下顎頭軟骨の collagen 分布は組織の生体力学のおよび機能的要件を反映する可能性がある。本研究において、mRNA 発現の増加を示した biglycan, decorin, fibromodulin, lumican および mimecan はいずれも collagen 原線維の形成への関与が明らかにされていて、これらの SLRP は力学的環境の変化に対する下顎頭軟骨の I 型, III 型 collagen の原線維の形成や改造過程に関与し、増殖細胞層の厚径変化に大きく寄与したものと考えられる。

一方、II 型 collagen の mRNA 発現は減少した。II 型 collagen と aggrecan は軟骨に特異的な細胞外基質である。今回の実験での軟骨細胞層の変化は、荷重負荷により軟骨細胞の分化は抑制され、形態的に細胞は肥大化しないため対照群と比べ小型化し、軟骨細胞層の細胞外基質である aggrecan および II 型 collagen を産生する肥大軟骨細胞の減少により、軟骨細胞層の厚径は減少して、下顎頭軟骨の組織の荷重抵抗性に大きく影響した

可能性が考えられる。しかしながら、増殖細胞層と軟骨細胞層での変化は4週では有意な差は認めなかった。これは下顎頭をはじめとした顎関節およびその周囲の組織の適応によって、荷重負荷に対応した組織改造が生じた結果であると考えられた。

【結論】

切歯咬合挙上により成長期ラットの下顎頭軟骨にかかる力学的負荷を変化させると、増殖細胞層から軟骨細胞への分化および軟骨細胞の肥大化が抑制される一方で、増殖細胞層の増殖および肥大軟骨細胞層での軟骨内骨化は維持されることによって下顎頭軟骨の組織構造に変化を起こすこと、これらの変化は顎関節や周囲の組織の適応によって、元の組織構造に戻ることが示唆された。