

顎関節への荷重負荷の改変が下顎頭軟骨X型コラーゲン，オステオポンチン，オステオカルシンの発現及び局在に与える影響

著者	尾立 卓弥
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30年度
学位授与番号	30110甲第308号
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00064678/

關節荷重の改変が下顎頭軟骨の
細胞外基質タンパク質に及ぼす影響

平成 30 年度

北海道医療大学大学院歯学研究科

尾立卓弥

【要旨】

下顎頭軟骨は頭蓋の中で最も旺盛な成長を示す場、**growth site**の一つであり、3つの細胞層が存在し、生体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。矯正臨床では整形装置や機能的矯正装置などを用いて、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。したがって、下顎頭軟骨の生体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の領域で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、下顎頭軟骨の生体力学的力に対する細胞外基質の反応性を明らかにすることを目的とし、成長期ラット切歯部咬合挙上モデルを用いて、関節負荷により下顎頭軟骨に生じる細胞外基質の変化を検討し、以下の結果を得た。

1. 下顎頭軟骨における咬合挙上群のX型コラーゲン発現の変化

未処置群、咬合挙上群ともに下顎頭の肥大軟骨細胞層でのX型コラーゲンの局在が認められた。また線維層、増殖細胞層、骨組織では反応はみられなかった。

2. 下顎頭軟骨における咬合挙上群のアルカリフォスファターゼ酵素活性の変化

肥大軟骨細胞層や骨基質表面の骨芽細胞でアルカリフォスタターゼ活性が認められた。また線維層、増殖細胞層、骨基質での反応はみられなかった。

3. 下顎頭軟骨における咬合挙上群のオステオポンチンの変化

咬合挙上4週後では、オステオポンチン **mRNA** の発現量が有意に上昇した。また免疫組織化学染色では、咬合挙上群の肥大軟骨細胞の細胞質、軟骨小腔周囲の基質で陽性反応がみられた。

4. 下顎頭軟骨における咬合挙上群のオステオカルシンの変化

咬合挙上4週後では、オステオカルシン **mRNA** の発現量が有意に上昇した。また免疫組織化学染色では、咬合挙上群の肥大軟骨細胞の細胞質、軟骨小腔周囲の基質で陽性反応がみられた。

以上のことから、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長期間与えることにより、軟骨細胞が発現するアルカリフォスファターゼやX型コラーゲンに変化はないが、肥大軟骨細胞において骨基質タンパク質であるオステオポンチンやオステオカルシンの発現が上昇し、軟骨と骨の両方の機能をあわせもった組織に変化することが示唆された。

目次

【緒論】	1
【実験動物および方法】	4
1. 実験動物	4
2. 咬合挙上装置の作製	4
3. 下顎頭軟骨への関節負荷	4
4. 試料の固定とパラフィン切片の作製	4
5. 下顎頭軟骨におけるX型コラーゲンの mRNA 発現	5
6. 下顎頭軟骨におけるX型コラーゲンのタンパク局在	5
7. 下顎頭軟骨におけるアルカリフォスファターゼ活性の検出	5
8. 下顎頭軟骨におけるオステオポンチン, オステオカルシンの mRNA 発現	5
9. 下顎頭軟骨におけるオステオポンチン, オステオカルシンのタンパク局在	6
10. 統計学的分析	6
【結果】	7
1. 下顎頭軟骨におけるX型コラーゲン mRNA 発現	7
2. 下顎頭軟骨におけるX型コラーゲンのタンパク局在	7
3. 下顎頭軟骨におけるアルカリフォスファターゼ活性の検出	7
4. 下顎頭軟骨におけるオステオポンチン, オステオカルシンの mRNA 発現	8
5. 下顎頭軟骨におけるオステオポンチン, オステオカルシンのタンパク局在	8
【考察】	9
1. 咬合改変による顎関節の力学的環境の変化	9
2. 咬合改変によるX型コラーゲン, アルカリフォスファターゼの変化	9
3. 咬合改変によるオステオポンチン, オステオカルシンの変化	10
4. 咬合改変と歯科矯正治療	11
【結論】	13

【謝辞】 14

【文献】 15

【表・付図】

【緒論】

歯科矯正治療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。しかし咬合改変によって顎関節にどのような影響を及ぼすのか不明な点も多く見られる。

顎関節は、側頭骨と下顎骨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と機能を有する。解剖学的に顎関節は、側頭骨下顎窩・関節結節と下顎骨下顎頭、関節円板、円板後部組織、滑膜、靭帯等から構成される (Bell, 1990)。顎関節は、側頭骨と円板間の上関節、および円板と下顎頭間の下関節からなる複合関節とみなすことができ、機能的にみると、上関節は主に滑走運動を、下関節は回転運動を営むことから、ginglymo-arthrodial joint に分類される。また、顎関節の複雑な形態と運動機能によって下顎頭の関節面では圧縮、剪断、引張応力が生じ、下顎頭は複雑な力学的環境を受容する荷重負荷関節 (load-bearing joint) でもあることが知られている (Brehnan et al., 1981; Boyd et al., 1990; Hylander 1984, 1985; Kimura, 1990; Kopp, 1978; Nitzan, 1994; Tanaka et al., 1994)。そして、成長段階において下顎頭軟骨は軟骨内骨化を生じることで、下顎骨の主要な成長の場としても機能する (Symons, 1951)。一方で長管骨などのその他の軟骨組織では、2つの役割をそれぞれ2つの組織、関節軟骨と成長板で担っている。

組織学的にみると下顎頭軟骨は線維層、静止層、増殖細胞層および肥大軟骨細胞層から構成され、それぞれの細胞層は線維芽細胞、未分化間葉系細胞および軟骨細胞の3つの細胞集団が存在する (Chen et al., 2012; Copray et al., 1986; Folke & Stallard, 1967; Luder et al., 1988; McNamara, 1979; Oberg et al., 1967; Silbermann & von der Mark, 1990; Strauss et al., 1990; Stutzmann & Petrovic, 1982)。

軟骨細胞層の細胞外基質は、主にII型コラーゲンであり、成熟に従い軟骨細胞の大きさが増大、肥大化し、肥大軟骨細胞となり主要な生合成産物の1つであるX型コラーゲンの合成を開始し、最終的に骨化前面で石灰化する (Schmid et al., 1985; Lammi et al., 2002; Nishida et al., 2002)。X型コラーゲンの生物学的機能は、組織変化によって石灰化のプロセスを促進すると考えられている (Kwan et al., 1991)。また石灰化軟骨基質に付随する肥大軟骨細胞が骨芽細胞と同様の特性を獲得し得るという可能性を報告した研究もある (Moore et al., 1991; Owen et al., 1990, 1992)。 *in vitro*

の研究では、石灰化誘導培地において肥大軟骨細胞によるオステオポンチンやオステオカルシンの発現が上昇することが明らかになっている (Lian et al., 1993)。

オステオポンチンやオステオカルシンは、免疫組織化学において鶏 (McKee et al., 1992) やラット (Boivin et al., 1987; Mark et al., 1988) の肥大軟骨細胞の無機化された細胞外基質に局在している。対照的に、成長板の無機化していない領域では、オステオポンチンもオステオカルシンも軟骨基質で検出することができない。また、それらの成長板の軟骨細胞は、オステオポンチンに対して免疫反応性があるが、オステオカルシンに対して免疫反応性はない (Takashi et al., 1992)

下顎頭の成長メカニズムを知るために、外力や咬合の変化などの外的刺激が下顎頭の成長に及ぼす影響について検討した研究は、これまでに多く報告されている。 *in vivo* における研究において、片側咬合挙上は、ラット顎関節におけるプロテオグリカン発現を増加させることが示されている (Mao et al., 1998)。また臼歯部の咬合の変化は、ラット下顎頭軟骨における I 型、II 型および X 型コラーゲンおよびコンドロイチン 4 硫酸の発現活性を増加させた (Sasaki, 1998)。さらにラットにおける下顎運動の制限は、軟骨の厚さおよび軟骨の肥大領域におけるメタクロマジー反応を減少させた (Ogawa, 1999)。一方、圧縮力を加えた場合においても、下顎頭軟骨の細胞増殖および細胞外基質合成に変化を引き起こすことが報告された (Coprav, 1985)。 *in vitro* ではラット下顎頭軟骨細胞への伸展負荷により II 型コラーゲンやアグリカンの mRNA 発現の増加することが明らかにされている (Huang et al., 2007)。このように下顎等の環境変化は軟骨細胞の機能に影響を与える。しかし、生体力学的環境による細胞外基質の組成変化ならびに調節機構についてはいまだ不明な点が多い。

そこで、本研究ではラットの咬合改変モデルを使用して、 *in vivo* の実験系により生体力学的環境と細胞外基質、特に軟骨細胞の細胞外基質タンパク発現の変化を調べた。これまで顎関節部への影響を調べた研究はいくつか存在するが、そのほとんどは外科的処置を加え、侵襲が非常に大きな方法が採用されている。本研究では侵襲が比較的少なく、咬合改変を容易に行うことが可能な方法として、切歯部にレジン製の咬合挙上板を装着し咬合挙上のみが行える中尾らのラット咬合改変モデル (Nakao et al., 2015) を用い、解析した。

本研究では関節荷重による細胞外基質の反応性を明らかにすることを目的とし、成長期ラットに咬合挙上板を装着した咬合改変モデルを用い、下顎頭軟骨における組織

学的変化およびX型コラーゲン，オステオポンチンやオステオカルシンの mRNA 発現ならびにタンパク局在変化を検討した．

【実験動物および方法】

1. 実験動物

実験動物には、生後 7 週齢の Wistar 系雄性ラット 90 匹を用い、対照群と実験群の 2 群に分けた。すべての実験動物は通常のラット用固形飼料と水道水を十分に与え、自由摂食とした。なお、本研究における動物実験は、北海道医療大学動物実験規定に基づき承認を得た（承認番号：128）。

2. 咬合挙上装置の作製

本研究で用いた咬合挙上装置は、7 週齢ラットの上顎歯列を印象採得し、歯科用超硬石こうで上顎歯列模型を作製後、歯科充填用コンポジットレジン（BEAUTIFIL II, SHOFU INC.）を用いて作製した。咬合挙上装置の設計は、幅径(D):5.0 mm, 前後径(W):7.0 mm, 高径(H):3.0 mm とした（図 1）。

3. 下顎頭軟骨への関節負荷

顎関節部への関節負荷を増大させるため、イソフルラン（ファイザー、マイラン）による吸入深麻酔下にて、上顎切歯にエッチング・ボンディング処理後、歯科充填用コンポジットレジン（BEAUTIFIL Flow, SHOFU INC.）を用いて咬合挙上装置を装着し、咬合改変モデルを作製した。また、咬合挙上装置を装着した際の臼歯部の離開度は上下顎第一臼歯間で 3.0 mm となるように調整した。なお、実験期間中に咬合挙上装置の咬耗、下顎切歯の咬耗および臼歯の挺出により、臼歯部離開度の減少が認められた場合は、ラットの上顎前歯部に直接法によりコンポジットレジンを築盛し、実験期間を通して臼歯部離開度がほぼ一定となるよう調整した。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未処置群として用いた。

4. 試料の固定とパラフィン切片の作製

各実験期間終了後、ラットはイソフルラン（ファイザー、マイラン）吸入深麻酔下にて、二酸化炭素（CO₂）吸入法により安楽死を施行し、その後頸椎脱臼を行った。頭部を離断後、顎関節部組織を摘出し、4% paraformaldehyde / 0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.4）で 24 時間浸漬固定した。その後、4℃下で 10% EDTA（pH 7.4）脱灰液を

用いて 4 週間脱灰し，通法に従い脱水処理し，パラフィンに包埋した．包埋試料からは厚さ 7 μm の連続切片を作製した．

5. 下顎頭軟骨における X 型コラーゲンの mRNA 発現 (n=5)

採取した下顎頭軟骨から，RNeasy mini Kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出した．Omniscript reverse transcriptase protocol (Qiagen) を用いて RT 法により，total RNA から cDNA の調整を行った．X 型コラーゲンおよび GAPDH (内的標準) に対し，連続希釈系の試料を作製し，それぞれの cDNA 定量のための外的標準とした．X 型コラーゲンに対する exonuclease probe (TaqMan probe) を作製し (表 1)，Step One Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用い，RT-PCR 法による mRNA 発現量の定量を行った．

6. 下顎頭軟骨における X 型コラーゲンのタンパク局在

薄切切片を通法に従い脱パラフィン後，0.5%ヒアルロニダーゼにより 37°C で 1 時間処理を行った．内因性ペルオキシダーゼを不活化する目的で，0.3%過酸化水素にて 30 分間処理した．その後，3%Bovine serum albumin (BSA) で 30 分間ブロッキングした．抗体は，X 型コラーゲンを認識する一次抗体として抗 X 型コラーゲン抗体 (LB-0092, LSL) を選択した．抗体は 1%BSA を含む Phosphate buffered salts (PBS) (pH7.4) で 1000 倍に希釈調整し，これを切片上で室温，2 時間反応させた．反応終了後 PBS で洗浄し，二次抗体 (ヒストファイン シンプルステインラット MAX-PO (MULTI), ニチレイバイオサイエンス) を室温で 1 時間反応させ，Diaminobenzidine (Envision kit, DAKO) 法で発色した．免疫組織化学染色した切片はメチルグリーンで核染色を行った．

7. 下顎頭軟骨におけるアルカリフォスファターゼ活性の検出

薄切切片を通法に従い脱パラフィン後，Alkaline phosphatase staining kit (Merck) を用いて室温で 2 時間反応させ，アルカリフォスタファーゼの酵素活性を検出した．PBS による洗浄後，メチルグリーンで核染色を行った．

8. 下顎頭軟骨におけるオステオポンチン，オステオカルシンの mRNA 発現 (n=5)

採取した下顎頭軟骨から，RNeasy mini Kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出した．Omniscript reverse transcriptase protocol (Qiagen) を用いて RT 法により，total RNA から cDNA の調整を行った．オステオカルシンやオステオポンチンに対し，連続希釈系の試料を作製し，それぞれの cDNA 定量のための外的標準とした．オステオカルシンやオステオポンチンに対する primer および exonuclease probe (TaqMan probe) を作製し (表 1, 2)，Step One Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用い，RT-PCR 法による mRNA 発現量の定量を行った．

9. 下顎頭軟骨におけるオステオポンチン，オステオカルシンのタンパク局在

薄切切片を通常に従い脱パラフィン後，0.5%ヒアルロニダーゼにより 37°C で 1 時間処理を行った．内因性ペルオキシダーゼを不活化する目的で，0.3%過酸化水素にて 30 分間処理した．その後，3%BSA で 30 分間ブロッキングした．抗体は，オステオカルシン，オステオカルシンを認識する一次抗体として抗オステオカルシン抗体 (clone OCG3, abcam)，抗オステオポンチン抗体 (松本歯科大学) を選択した．抗体は 1%BSA を含む PBS (pH7.4) で 1000 倍に希釈調整し，これを切片上で室温，2 時間反応させた．反応終了後 PBS で洗浄し，二次抗体 (ヒストファイン シンプルステインラット MAX-PO (MULTI)，ニチレイバイオサイエンス) を室温で 1 時間反応させ，Diaminobenzidine (Envision kit, DAKO) 法で発色した．免疫組織化学染色した切片はメチルグリーンで核染色を行った．

10. 統計学的処理

各実験により得られた値は，単変量 F 検定と Student's t test により解析した．各群における有意差は，危険率 5%未満 ($P < 0.05$) をもって統計的有意差とした．

【結果】

1. 下顎頭軟骨におけるX型コラーゲンの mRNA 発現

未処置群では，実験期間を通してX型コラーゲン mRNA 発現量に有意な変化はみられなかった．咬合挙上群においても未処置群と同様に術後 4 週までX型コラーゲンの mRNA 発現量に有意な変化はみられなかった（図 2）．また，すべての週において，未処置群と咬合挙上群で同様のX型コラーゲン mRNA の発現が認められた．

2. 下顎頭軟骨におけるX型コラーゲンのタンパク局在

未処置群における下顎骨でのX型コラーゲン免疫組織化学染色の低倍率像では，肥大軟骨細胞層でのX型コラーゲンの局在が認められた．一方，線維層と増殖細胞層，および骨組織では反応はみられなかった（図 3a）．下顎頭表層の拡大像では，肥大軟骨細胞層においてX型コラーゲンのタンパク局在が認められたが，線維層，増殖細胞層においてタンパク局在は認められなかった（図 3b）．軟骨組織直下の骨組織においても，タンパク局在はみられなかった．また骨表面に配列する骨芽細胞も陰性であった（図 3c）．

咬合挙上 4 週後におけるX型コラーゲンのタンパク局在は未処置群と同様に，肥大軟骨細胞層で陽性反応が認められた（図 4a）．下顎頭表層では，線維層と増殖細胞層においてX型コラーゲンのタンパク局在は認められなかった（図 4b）．肥大軟骨細胞層では，X型コラーゲンのタンパク局在を認める．軟骨組織直下の骨組織においても，骨表面に配列する骨芽細胞はタンパク局在がみられなかった（図 4c）．

3. 下顎頭軟骨におけるアルカリフォスファターゼ活性の検出

未処置群における下顎骨でのアルカリフォスファターゼ染色は，肥大軟骨細胞層や骨基質表面の骨芽細胞でアルカリフォスタファーゼの酵素活性が認められた．また線維層と増殖細胞層では，反応はみられなかった（図 5a,b）．骨組織では，骨表面に配列する骨芽細胞は陽性だが，骨基質ならびに骨髄の細胞は陰性だった（図 5c）．

咬合挙上 4 週後における下顎骨でのアルカリフォスファターゼ染色は，未処置群と同様に，肥大軟骨細胞層でのアルカリフォスファターゼ活性が認められた（図 6a）．一方，下顎頭表層の線維層，増殖細胞層は，ほとんど染色性は認められなかった（図

6b). 骨組織においても未処置群と同様に、骨表面に配列する骨芽細胞が陽性であった (図 6c).

4. 下顎頭軟骨におけるオステオポンチン, オステオカルシンの mRNA 発現 (n=5)

未処置群では、実験期間を通してオステオポンチン mRNA の発現量に変化はほとんどみられなかった (図 7). しかし咬合挙上群では、1, 2 および 3 週後まではオステオポンチン mRNA の発現量に変化はほとんどみられなかったが、4 週後では、この群において発現量が有意に上昇した (図 7).

オステオカルシンの mRNA 発現量も同様に、未処置群では実験期間を通して変化がほとんどみられなかったが、咬合挙上群では咬合挙上 4 週後でオステオカルシンの mRNA 発現が有意に増加した (図 7).

5. 下顎頭軟骨におけるオステオポンチン, オステオカルシンのタンパク局在

未処置群において、下顎頭の骨組織に特異的にオステオポンチンの陽性反応が認められた (図 8a). この反応は、石灰化軟骨基質と接する骨組織で線状に強い陽性反応がみられた (図 8c). 骨芽細胞には、強い陽性反応がみられた (図 8c, 矢印). これらの反応は、下顎頭の軟骨細胞ならびに基質では陰性であった (図 8b).

咬合挙上 4 週後における下顎骨でのオステオポンチン免疫組織化学染色の低倍率像では、骨基質においてオステオポンチンの陽性反応が線状に認められた (図 9a, c). また矢頭で示すように肥大軟骨細胞の細胞質、軟骨小腔周囲の基質にも陽性反応がみられた. 一方この反応は、線維層や増殖細胞層では陰性であった (図 9b).

未処置群において、下顎頭の骨組織にオステオカルシンの強い陽性反応が認められた (図 10a). 一方、骨髄や軟骨組織では陽性反応はみられなかった. 軟骨直下の海綿骨の内部における石灰化軟骨組織は陰性であるが、その外側にみられる骨基質は陽性であった (図 10c). また骨表面に配列する骨芽細胞も陽性であった. 下顎頭表層の軟骨細胞ならびに基質においては、オステオカルシンのタンパク局在はほとんどみられなかった (図 10b).

咬合挙上 4 週後においても骨基質や骨芽細胞に強い染色性を認めた (図 11a, c). これらの反応に加えて矢頭で示すように下顎頭軟骨の肥大軟骨細胞や軟骨小腔周囲

の基質で陽性反応がみられた (図 11b). 一方この反応は, 線維層や増殖細胞層では陰性であった.

【考察】

1. 咬合挙上による顎関節の力学的環境の変化

本研究で用いた咬合改変モデルは、臼歯部咀嚼ストロークを排除し、より大きな関節荷重が関節組織に負荷される切歯部切歯ストロークの頻度の増加と持続時間を延長させるよう設計されている（図 1）（Nakao et al., 2015）. ヒト顎関節をモデルとした生体力学研究（Hart et al., 1992; Haskell et al., 1986; Hylander, 1985; Kimura, 1990）では、顎関節には機能時に圧縮応力と引っ張り応力が複雑に作用すること、および領域によって異なる力学的環境を示すことが示唆されている. また、凸面形態を有する関節組織表面に荷重が負荷された場合、中央部には圧縮応力が集中する接触面を生じるが、その辺縁部には逆に引っ張り応力が分布することが知られており（O' Connor & Johnson, 1993）、いずれの関節組織も複雑な力学的環境下にあることがわかる. 本装置の装着により、咬合挙上群では未処置群に対してラット顎関節部への食事時の荷重負荷は増大しているものと考えられる. また未処置群と咬合挙上群の間で実験期間を通して体重に有意差はみられなかった. 従って本研究で行った咬合挙上は、外科的処置を加えないで顎関節に荷重負荷する方法として有用であると考えられる.

2. 咬合改変による X 型コラーゲン、アルカリフォスファターゼの変化

X 型コラーゲンは結合組織の細胞外基質の主要な構成要素であり、組織の機械特性に重要な役割を担っている（Merrilees & Flint, 1980）. コラーゲンは、現在 30 近くの型が発見されているが、下顎頭軟骨では、I 型、II 型、III 型、VI 型、IX 型、X 型 collagen の存在が明らかにされている（Ali & Sharawy, 1995; 1996; Chen et al., 2012; Fukuda et al., 1999; Luder et al., 1988; Milam et al., 1991; Mizoguchi et al., 1990; 1996; 1997a; 1997b; Silbermann et al., 1987; 1990; Strauss et al., 1990）. 本研究では、軟骨に特異的であり、肥大性軟骨細胞によって合成される（Schmid et al., 1985）X 型コラーゲンについて検討した. X 型コラーゲンの発現は、軟骨内骨化において重要であり、基質石灰化および軟骨内骨化における X 型コラーゲンの役割について多くの議論がなされている（Kwan et al., 1989; Poole et al., 1989; Schmid et al., 1990）. X 型コラーゲンは、肥大軟骨細胞表現型のマーカーとして機能し、X 型コラーゲン遺伝子転写物および翻訳産物の検出は、軟骨細胞の成長および分化の研究に有用である（Bohme et al., 1992）. 本研究では、未処置群、咬合挙上群ともに X 型コラーゲンの

発現量に有意な変化みられなかった。軟骨細胞外基質の主要成分は、軟骨特異的なⅡ型コラーゲンであり、軟骨特異的プロテオグリカンアグリカンとのヒアルロン酸の大きな凝集体である。軟骨細胞が肥大化することによりⅡ型コラーゲンの合成が制御され、その段階でⅩ型コラーゲンの合成が開始される (Eerden et al., 2003)。本研究の下顎頭軟骨において、軟骨細胞の多くはⅩ型コラーゲンを発現している (図 3b, 4b)。軟骨細胞が肥大化することにより、Ⅱ型コラーゲンの発現が抑制され、相対的にⅩ型コラーゲンの発現が増加した可能性がある。したがって下顎頭軟骨への荷重負荷によるⅩ型コラーゲン発現の変化はわずかなものである可能性がある。

アルカリフォスファターゼは、骨および石灰化軟骨において発達初期に発現され、骨芽細胞細胞膜および基質小胞で観察される。骨芽細胞分化、軟骨形成およびアルカリフォスファターゼ発現を制御する主な調節経路は、互いに相互作用する BMP / Runx2 (Cbfa1, AML3) / Osterix 系および WNT シグナル伝達カスケードである (Gaur et al, 2005, 2006; Golub et al, 2007)。本研究では、アルカリフォスファターゼ染色により、未処置群と咬合挙上群ともに肥大軟骨細胞層、骨芽細胞においてアルカリフォスファターゼ活性がみられた。増殖細胞層における軟骨細胞および石灰化基質はアルカリフォスファターゼ活性を示さないが、成熟および肥大軟骨細胞層は高度に反応性である。いくらかの弱い反応性も、増殖細胞層の軟骨細胞によって示される。このアルカリフォスファターゼが軟骨細胞中で合成され、石灰化開始時に細胞外基質に輸送されるという観察は、石灰化の過程において特定の役割を果たしている。(Bernard et al., 1986) 本研究では、咬合挙上群は未処置群と同様に肥大軟骨細胞層、骨基質表面の骨芽細胞でアルカリフォスファターゼ活性がみられた。アルカリフォスファターゼは軟骨細胞では石灰化初期に観察されるため、関節荷重負荷により石灰化に変化は起きなかったと考えられる。

本研究において、関節荷重負荷によるⅩ型コラーゲン発現やアルカリフォスファターゼ活性への影響はほとんどみられなかった。したがって顎関節に荷重負荷しても肥大軟骨細胞の石灰化にほとんど影響がないことが示唆された。

3. 咬合改変によるオステオポンチン、オステオカルシンの変化

オステオポンチンは、骨、象牙質、セメント質、軟骨および、これら硬組織の形成細胞で局在が認められる (Butler et al., 1996; Denhardt and Noda, 1998)。この局在

は硬組織以外の腎臓，脳，骨髄由来の子宮筋層腺細胞，子宮内の絨毛膜絨毛の血管組織および細胞栄養芽層を含む様々な組織に認められる (Giachelli et al., 1995; Patarca et al., 1989, 1993; Rittling and Denhardt, 1999; Sodek et al., 2000, Weber and Cantor, 1996). またオステオカルシンは石灰化硬組織とその形成細胞に特異的に局在する (Boivin et al., 1987). さらにヒドロキシアパタイトに関連する肥大軟骨細胞の石灰化部位におけるオステオカルシンの免疫化学的局在を報告している (Bronckers et al., 1985; Groot et al., 1986).

本研究では，咬合挙上 4 週後の下顎頭軟骨においてオステオポンチンやオステオカルシンの mRNA 発現が未処置群と比較して有意に上昇した．また免疫組織化学染色では肥大軟骨細胞や軟骨小腔周囲の基質でオステオポンチンやオステオカルシンの陽性反応がみられた．過去の研究では，*in vitro*において関節軟骨の軟骨細胞を石灰化誘導培地で培養すると，オステオポンチンやオステオカルシンの発現が上昇したという報告がある (Lian et al., 1993). 軟骨細胞は，Noggin, BMP, IHH などの骨形成を制御するいくつかの重要な分子を分泌することができる (Datta et al., 2008; Karsenty, 2008). さらに下顎頭の軟骨細胞は，BMP 受容体を発現する (Miyazono et al., 2005). BMP シグナリングは骨芽細胞分化に必須の転写因子である Runx2 の発現を誘導する (Renny and Guozhi et al., 2003). Runx2 は特定のエンハンサー領域に結合することにより，オステオカルシン，I 型コラーゲン，オステオポンチンなどの骨芽細胞関連遺伝子の転写を直接刺激することができる (Ducy et al., 1997; Kern et al., 2000; Selvamurugan et al., 1998). 荷重負荷が軟骨細胞における BMP シグナリングを促進させ，通常の軟骨細胞での基質産生とは異なるオステオポンチンやオステオカルシン等の骨基質タンパク質の発現を上昇させたと考えられる．このように軟骨基質において骨基質タンパクの局在が認められたことは荷重負荷に対して，軟骨の強度を上げる防御反応として働いているかもしれない．

4. 咬合改変と歯科矯正治療

歯科矯正治療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．整形装置や機能的矯正装置は，患者の筋肉組織に由来する力学的システムの改変および歯列矯正を可能にし、筋肉機能の障害および筋肉の

伸展を介して作用し、筋肉緊張を増加させると考えられている (Hasund, 1975) . しかしそのような装置を用いることで、顕著な歯科矯正副作用を経験する可能性がある (Marklund et al., 2001) . 本研究において、下顎頭軟骨におけるオステオポンチンとオステオカルシンの mRNA 発現が、咬合挙上 1, 2 および 3 週後では変化はほとんどみられなかったが、咬合挙上 4 週後で有意に増加した. したがって、咬合改変を短期間行っても、オステオポンチンとオステオカルシンの発現に変化はないが、長期間行うことで発現が増加した. 咬合改変を行うような歯科矯正装置を長期間装着することは、下顎頭軟骨に予期せぬ影響を及ぼす可能性がある.

【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長期間与えることにより、軟骨細胞が発現するアルカリフォスファターゼやX型コラーゲンに変化はないが、肥大軟骨細胞において骨基質タンパク質であるオステオポンチンやオステオカルシンの発現が上昇し、軟骨と骨の両方の機能をあわせもった組織に変化することが示唆された。

【謝 辞】

本研究に際し終始ご指導ご鞭撻を賜りました，本学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野 飯嶋雅弘 教授に心より感謝の意を表します．また，本研究を進めるにあたりご協力とご教示をいただきました東北大学歯学部口腔保健発育学講座顎口腔矯正学分野 溝口到 教授，本学歯学部口腔生物学系生化学分野 荒川俊哉 教授ならびに本学歯学部口腔構造・機能発育学系組織学分野 細矢明宏 准教授に厚くお礼を申し上げます．

【文献】

- Bernard B, Bianco P, Bonucci E, Costantini M, Lunazzi GC, Martinuzzi P, Modricky C, Moro L, Panfili E & Pollesello P. Biochemical and immunohistochemical evidence that in cartilage an alkaline phosphatase is a Ca²⁺-binding glycoprotein. *J Cell Biol* 103:1615-23,1986
- Blum B, Moseley J, Miller L, Richelsoph K & Haggard W. Measurement of bone morphogenetic proteins and other growth factors in demineralized bone matrix. *Orthopedics* 27:161-165, 2004
- Boivin, G., Morel G, Lian J, Dubois P & Meunier P. Ultrastructural-immunocytochemical evidence of endogenous osteocalcin in osteoblasts, bone matrix and cartilage from neonatal rats. In: *Calcium Regulation and Bone Metabolism: Basic and Clinical Aspects*, edited by D. V. Cohn, T. J. Martin, and P. J. Meunier.: Elsevier Amsterdam 9: 427-431, 1987
- Butler. Immunolocalization of γ -carboxyglutamic acid containing proteins in developing rat bones. *Collagen Related Res.* 5: 273-281, 1985.
- Cao Y, Zhou Z & Crombrughe B. Osterix, a transcription factor for osteoblast differentiation, mediates antitumor activity in murine osteosarcoma. *Cancer Res* 65:1124-1128, 2005
- Cheng A & Genever PG. SOX9 determines RUNX2 transactivity by directing intracellular degradation. *J Bone Miner Res* 25:2680–2689, 2010
- Chen P, Carrington JL, Hammonds RG & Reddi AH. Stimulation of chondrogenesis in limb bud mesoderm cells by recombinant human bone morphogenetic protein 2B (BMP-2B) and modulation by transforming growth factor beta 1 and beta 2. *Exp Cell Res* 195:509-515, 1991
- Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP & Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol* 61: 577-587, 2008
- Ducy P, Schinke T & Karsenty G. The osteoblast: A sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 289: 1501–1504, 2000

Franceschi RT, Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R, Yang S & Reith E. Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation. *Connect Tissue Res* 44:109-116, 2003

Fu HH, Doll B, McNelis T & Hollingerr JO. Osteoblast differentiation *in vitro* and *in vivo* promoted by Osterix. *J Biomed Mater Res A* 83:770-778, 2007

Groot C Danes K, Blok J, Hoogendijk A & Hauschka V. Light and electron microscopic demonstration of osteocalcin antigenicity in embryonic and adult rat bone. *Bone* 7: 379-385, 1986.

Hasund A. Muskulatur som kraftkilde. In: *Nordisk Larobok i Ortodonti*. 262, 1975.

Hylander WL, Mandibular function and temporomandibular joint loading. In: Carlson DS, McNamara JAJ, Ribben KA, editors. *Developmental Aspects of Temporomandibular Joint Disorders*. University of Michigan 19-35, 1985

Karsenty, G. Transcriptional control of skeletogenesis. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet* 9: 183-196, 2008

Kern B, Shen J, Starbuck M & Karsenty G. Cbfa1 contributes to the osteoblast - specific expression of Type I collagen genes. *J Biol Chem* 5: 7101-7107, 2001

Kobayashi T, Lyons KM, McMahon AP & Kronenberg HM. BMP signaling stimulates cellular differentiation at multiple steps during cartilage development. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:18023-18027, 2005

Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem* 99:1233-1239, 2006

Marie M, Karl A. Franklin & Maurits P. Orthodontic side - effects of mandibular advancement devices during treatment of snoring and sleep apnoea. *European J Ortho*. 23. 135-144, 2001

Matsubara T, Kida K & Yamaguchi A, et al. BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 283:29119-29125, 2008

Miyazono K, Maeda S & Imamura T. BMP receptor signaling: Transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* 16 251-263, 2005

Nakashima K, Zhou X & Kunkel G. The novel zinc finger - containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108:17-29, 2002

Ohba S, Chung UI & Tei Y. Osteoblast differentiation induced by BMP signaling and Runx2 through Cbfb regulation. *Nihon Rinsho* 65:71-74, 2007

Pan Q, Yu Y, Chen Q, Li C, Wu H & Wan Y. Sox9, a key transcription factor of bone morphogenetic protein-2-induced chondrogenesis, is activated through BMP pathway and a CCAAT box in the proximal promoter. *J Cell Physiol* 217:228-241, 2008

Renny T & Guozhi X. Regulation of the Osteoblast-Specific TranscriptionFactor, Runx2: Responsiveness to Multiple SignalTransduction Pathways. *Journal of Cellular Biochemistry* 88:446-454, 2003

Retting KN, Song B, Yoon BS & Lyons KM. BMP canonical Smad signaling through Smad1 and Smad5 is required for endochondral bone formation. *Development* 136:1093-1104, 2009

Sakano S, Murata Y, Miura T, Iwata H, Sato K & Matsui N. Collagen and alkaline phosphatase gene expression during bone morphogenetic protein (BMP)-induced cartilage and bone differentiation. *Clin Orthop Relat Res* 292:337-344, 1993

Selvamurugan N, Chou WY, Pearman AT, Pulumati MR & Partridge NC. Parathyroid hormone regulates the rat collagenase - 3 promoter in osteoblastic cells through the cooperative interaction of the activator protein - 1 site and the runt domain binding sequence. *J Biol Chem* 273: 10647-10657, 1998

Shen B, Wei A, Tao H, Diwan AD & Ma DD. BMP-2 enhances TGF-beta3-mediated chondrogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in alginate bead culture. *Tissue Eng Part A* 15. 1311-1320, 2009

Sodek J, Ganss B & McKee MD. OSTEOPONTIN. *Crit Rev Oral Biol Med* 11:279-303, 2000

Stein GS, Lian JB & Wijnen AJ. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene* 23:4315-4329,2004

- Vimalraj S, Arumugam B, Miranda PJ & Selvamurugan N. Runx2: structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation. *Int J Biol Macromol* 78:202-208, 2015
- Wu X, Shi W & Cao X. Multiplicity of BMP signaling in skeletal development. *Ann NY Acad Sci* 1116:29-49, 2007
- Yamaguchi A, Komori T & Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 21:393-411, 2000
- Yu J, Liang F, Huang H, Pirttiniemi P & Yu D. Effects of loading on chondrocyte hypoxia, HIF-1 α and VEGF in the mandibular condylar cartilage of young rats. *Orthod Craniofac Res* 21:41-47, 2018
- Zhu F, Friedman MS, Luo W, Woolf P & Hankenson KD. The transcription factor osterix (SP7) regulates BMP6 - induced human osteoblast differentiation. *J Cell Physiol* 227:2677-2685, 2012