

〔総説〕

マウス下顎頭軟骨の組織発生

柴田 俊一

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

Histogenesis of mandibular condylar cartilage in mice

Shunichi SHIBATA

Abstract

Mandibular condylar cartilage is a member of temporo-mandibular joint and function both as growth and articular cartilage. Developmentally, mandibular condylar cartilage is classified as being the secondary cartilage, differing from primary cartilage including limb bud cartilage, Meckel's cartilage etc. as follows: 1) It appears at later stages than primary cartilage. 2) It is derived from alkaline phosphatase-positive progenitor cells in the periosteum-like tissue adjacent to the mandibular bone. 3) Its progenitor cells rapidly differentiate into hypertrophic chondrocytes. The main function of secondary cartilage is considered to support the growth of mandibular bone. Additionally, three transcription factors related to bone and cartilage formation, Runx2, Osterix, and Sox9 are involved in the formation of condylar cartilage. Messenger RNAs for these molecules were simultaneously expressed in the anlagen of the condylar cartilage at embryonic day (E) 14. Reduced expression of osterix and continuous expression of Sox9 together with Sox5 expression are recognized in the newly formed condylar cartilage at E15. Therefore reduced expression of Osterix in combination with Sox9-Sox5 expression is important for the onset of condylar (secondary) cartilage formation. With further development, the condylar cartilage extends in length, especially the hypertrophic cell zone at E16. This phenomenon indicates that rapid interstitial growth occurs at this stage, and supports the function of secondary cartilage described above.

Key words : Mandibular condylar cartilage, Secondary cartilage, Histogenesis, Transcription factors

I 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。また同時に下顎頭軟骨は顎顔面の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。

この器官は一般的な軟骨研究に用いられている成長板や関節軟骨と異なり、軟骨表層に線維層を持っている。

これはもちろん、顎関節にかかる咬合力を緩衝するためといわれている。線維層直下には比較的未分化な細胞からなる増殖層があり、この層の細胞は骨と軟骨の両者に分化できる骨・軟骨原性細胞 (osteochondroprogenitor cell) であるといわれている。その下方の成熟層～肥大細胞層では、細胞配列が成長板のような柱状配列を示さず、比較的ばらついた状態となっている。これは力のかかる方向が成長板のような一方向ではなく、下顎頭表面が球状形態を取り、多方向から力が加わることから細胞が放射状に配列することで、これを支持する構造が要求されていると推察できる (図1)。さらに軟骨下の一次海綿質に分布する血管の分布様式も成長板と異なることなど、下顎頭軟骨は特有の構造上の特徴を持つことが知

受付:平成20年3月25日

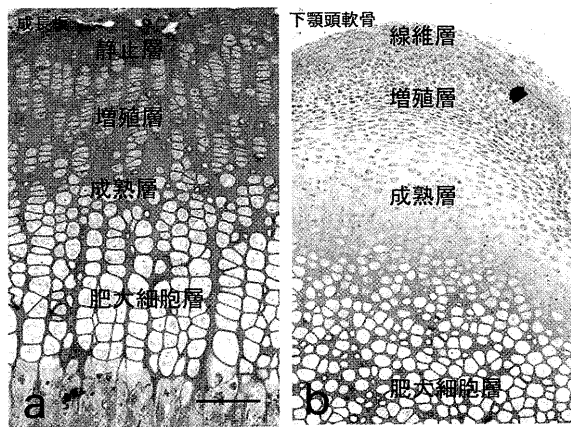


図1 3週齢ラット脛骨成長板 (a) と下顎頭軟骨 (b)

成長板は通常静止層 (resting zone), 増殖層 (zone of proliferation), 成熟層 (zone of maturation, 肥大細胞層 (hypertrophic cell zone)) に区分される。下顎頭軟骨も同様に区分される場合が多いが, 各層を構成する細胞の形態は異なっている。下顎頭軟骨の場合, 表層に線維層 (fibrous cell zone) があり, その直下の増殖層も典型的な軟骨細胞ではなく, 比較的分化度の低い細胞で構成されている。また成熟層から肥大細胞層にかけて, 細胞が次第に肥大していくが, 細胞の配列は成長板に見られるような柱状構造を示さず, 不規則な配列を示す。

Bar=100µm

られている (Durkin et al., 1973; Ten Cate, 2003; Silberman et al., 1987; Luder et al., 1988)。

本稿では特に下顎頭軟骨の発生過程における構造上の特徴について言及することとする。

II 二次軟骨としての下顎頭軟骨の発生過程における構造上の特徴 (図2)

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, 四肢の長骨や椎骨の原基, Meckel軟骨などの一次軟骨 (primary cartilage) 以外はすべて二次軟骨ということが出来る。もう少し詳しく説明すると 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)。

具体的に二次軟骨に分類されるものとして下顎頭軟骨の他, 下顎骨に関連する顎角軟骨 (angular cartilage), 筋突起軟骨 (coronoid cartilage), さらに嚙歯類の陰茎にみられる陰茎骨 (os penis) が知られている。また, 病理的なものでは骨折治癒過程で形成される仮骨や, 骨形成因子 (bone morphogenetic protein: BMP) で誘導された軟骨も二次軟骨に分類されている (Beresford, 1981; Vinkka, 1982; Hall, 2005)。鳥類では, 頭蓋にみられ

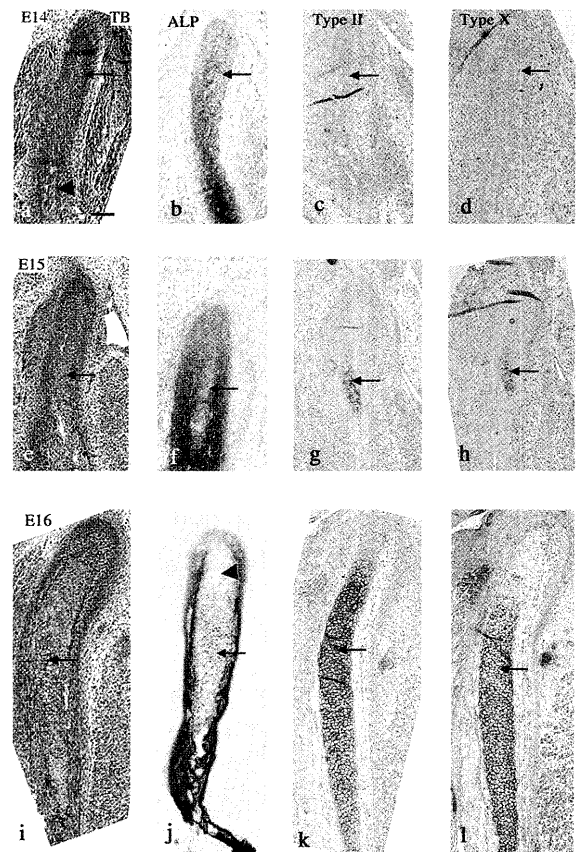


図2 胎齢14 (E14: a-d) と15 (E15: e-h) および16日齢 (E16: i-l) のマウス下顎頭軟骨の冠状断切片 (関節突起の長軸に平行な断面)。トルイジンブルー染色 (a, e, i) とアルカリフォスファターゼ染色 (b, f, j), さらに抗タイプIIコラーゲン抗体 (c, g, k) と抗タイプXコラーゲン (d, h, l) 抗体による免疫染色。

胎齢14日 (E14) で下顎頭軟骨原基 (図a矢印) はすでに形成されている下顎骨 (図a矢頭) に直接連続する遠心部分に間葉細胞凝集として認められる。この原基はアルカリフォスファターゼ染色陽性 (図b矢印) であるが, まだ抗タイプIIコラーゲン抗体 (図c 矢印), 抗タイプXコラーゲン抗体 (図d 矢印) による免疫染色は陰性である。

胎齢15日 (E15) で最初の軟骨形成が下顎頭軟骨原基の中に認められる (図e矢印)。新たに形成された軟骨細胞はアルカリフォスファターゼ染色陽性 (図f矢印) で, 抗タイプIIコラーゲン抗体 (図g 矢印), 抗タイプXコラーゲン抗体 (図h 矢印) で陽性を示すことから, 既に肥大軟骨細胞に分化していることが示唆される。

胎齢16日 (E16) では特に肥大細胞層が著しく伸長している (図i矢印)。肥大細胞層の軟骨細胞はアルカリフォスファターゼ染色陽性 (図j矢印) であるが, 上部では活性が弱まっている (図j 矢頭)。抗タイプIIコラーゲン抗体で陽性所見を示すものは, 軟骨層全体に認められた (図k 矢印)。抗タイプXコラーゲン抗体は肥大細胞層で陽性を示す (図l 矢印)。

Bar=100µm

る方形頬骨 (quadratojugal) が代表的な二次軟骨として古くから研究されている (Buxton et al., 2003)。

ただし2) の定義に関しては歴史的な論争がなされてきた。すなわち下顎頭軟骨は下顎骨の骨膜 (様組織) から形成されるという考え (骨膜説) と, 下顎頭軟骨特有の原基があり, そこから軟骨が発生し二次的に下顎骨と融合 (fusion) するという考えである (原基説)。ヒトの場合は観察標本数も少ないのだが, Baume (1962) は骨

膜説を, Symons (1952) は原基説の考えを記載している。またラット, マウス等の嚙歯類ではBhaskar (1953) やFrommer (1964) らが骨膜説の考えを示し, Duterloo and Jansen (1970) はラットのパラフィン連続切片の観察から原基説の考えを提唱し, 彼らの結果は教科書にも採用されて広く認められてきた。その後, 彼らの説を支持するラットにおける実験発生学的研究も報告されている。(Vinkka-Puhakka and Thesleff, 1993)。一方, 天願 (1990) は三次元復興模型を用いた観察から, 筆者ら (Shibata et al., 1996) 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, 骨膜説を支持する結果を得ている。さらに酵素組織化学的検索によると, 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が示された (Miyake et al., 1997; Shibata et al., 1997)。従って未だ異論もあるものの少なくともマウスにおいては, 下顎骨に接する骨膜様の組織から下顎頭軟骨が形成されることがわかり, Hall (2005) の教科書においても, この骨膜説を支持する結果が紹介されている。ただし, ヒトを含めた他の動物でもこの考えがそのまま適応できるかどうかは更なる検討が必要である。

筆者らは免疫組織化学およびin situ hybridizationの結果から, 胎齢15日に初めて認められる軟骨細胞はType II およびType Xコラーゲンを同時に発現する肥大軟骨細胞に分化していることを示し, さらに胎齢16日では肥大軟骨細胞層が著しく伸長することを明らかにした (Shibata et al., 1997; 2002; Fukada et al., 1999)。すなわち筆者らは上述の2点に加えて3) 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し, その後肥大細胞層が著しく伸長する, ということが二次軟骨の特徴として追加されることを示唆した。

骨膜説にしる, 原基説にしる, 下顎骨形成に付加する形で発生する二次軟骨の機能は下顎骨の成長を補佐することであると言われている (Beresford, 1981)。これに関しては軟骨細胞が出現すると直ちに肥大軟骨細胞に分化する, という現象がこの機能をよく説明できる。すなわち, 骨格の成長には付加成長appositional growthと間質成長interstitial growthがあることが古くから知られているが (Enlow, 1982), これらのうち付加成長は, 軟骨膜あるいは骨膜から細胞が供給されることによる成長で, 間質成長は細胞分裂と基質合成による内部からの

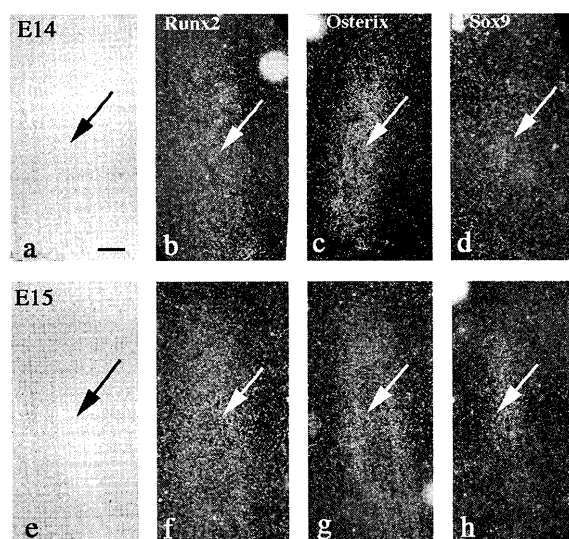


図3 胎齢14日 (E14: a-d) および15日 (E15: e-h) の下顎頭軟骨の冠状断切片. トルイジンブルー染色 (a, e) およびRunx2 (b, f), Osterix (c, g), Sox9 (d, h) 遺伝子のin situ hybridization染色。

胎齢14日 (E14) の下顎頭軟骨原基の間葉細胞凝集においてRunx2とOsterixおよびSox9遺伝子の発現が同時に認められた (図a-dの矢印)。胎齢15日 (E15) に形成された軟骨内では (図eの矢印) Runx2遺伝子の発現が低下し (図f 矢印), それとともにOsterix遺伝子も著しい発現低下を認める (図g 矢印)。一方, Sox9遺伝子は軟骨内で引き続き発現が認められた (図h矢印)。

Bar=100 μ m

成長であると規定されている。さらに骨組織は石灰化しているため付加成長しかできないが, 軟骨は両者の成長様式をとることができるため, 骨格の成長発育には大変有利であるとされている (それゆえ, 胎児の骨格や成長板は軟骨でできている)。

Luder et al. (1988) は成長期ラットの下顎頭軟骨を免疫組織化学と形態計測で解析し, 細胞分裂や基質合成に加えて, 細胞が肥大すること, すなわち細胞の総体積が増加することが, 間質成長の大きな要素であることを示唆した。従って肥大細胞層が急速に伸長するということはそこに著しい間質成長が起きているということになり, 下顎骨の成長を補佐するという二次軟骨の機能によく合致することになる。

Ⅲ 下顎頭軟骨発生過程における転写制御因子の発現 (図3)

近年骨・軟骨形成に関連する本質的な転写制御因子が次々と明らかにされている。その中でもRunx2 (runt-related transcription factor 2, 別名cbfa 1) とOsterixは骨形成に直接的に関与する転写制御因子とされ, これらの遺伝子のノックアウトマウスでは, 骨組織が完全に欠如することが示されている (Komori et al., 1997; Otto et al., 1997; Nakashima et al., 2002)。またRunx2は軟骨内

骨化過程における軟骨の肥大化を制御していることも知られている (Kim et al., 1999; Yoshida et al., 2004). さらに, Sox9 (SRY-box containing gene 9) はその下流に位置する Sox5, 6 とともに軟骨形成に関与することが明らかにされた (Lefebvre et al., 1997; 1998; Akiyama et al., 2002; Mori-Akiyama et al., 2003). これらの転写制御因子の関与はすべて一次軟骨に関するもので, 二次軟骨形成に関しては鳥類の二次軟骨形成過程で Sox9 の関与が示唆されているのみで (Buxton et al., 2003), 哺乳類の下顎頭軟骨においては全く検索されていないのが現状である.

筆者らは最近 Runx2 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を報告し, 軟骨形成は下顎骨の形成に依存していることを示唆した (Shibata et al., 2004). さらにマウスの下顎頭軟骨形成過程をモデルとして, 上述の転写制御因子の遺伝子発現を *in situ* hybridization で検索した. その結果, 胎齢14日の間葉細胞凝集において Runx2 と Osterix および Sox9 の遺伝子発現を認めた. 胎齢15日では形成された軟骨周囲の骨襟 (bone collar) の部分に Runx2 と Osterix の発現が引き続き認められたが, 軟骨内では相反してその発現が低下していた. 特に Osterix の著しい発現低下が認められた. 一方, Sox9 は軟骨内でも引き続き遺伝子発現が認められ, さらに同部位で Sox5 の発現が新たに認められた. 以上のことから, 二次軟骨形成には Sox9 と Sox5 の発現とともに Osterix の発現低下が重要な要因であることが示唆された (Shibata et al., 2006a). ただし, 本来は Runx2 や Osterix が発現し, 骨組織になるべき組織がなぜ途中から軟骨形成に向かって方向転換するかについてはいまだ不明なのが, 現状である. このことが解明されれば, 急速に間質成長する, という二次軟骨の性質を利用した急速仮骨延長術と位置づけられる臨床手技も可能になることが期待される.

IV 下顎頭軟骨のその後の発育過程

下顎頭軟骨は, 胎齢16日以後軟骨内骨化を開始し, 下顎枝の形成に関与する他, 側頭骨下顎窩との間に顎関節 (TMJ) を形成するようになる. この際下顎頭との間には関節円板と上下の関節腔が形成される (Ikeda et al., 2004). この顎関節形成過程においても組織発育過程におけるホメオボックス遺伝子に分類される Indian hedgehog 等の分子が関与していることが報告されている (Shibukawa et al., 2007). 生後の下顎頭軟骨は, 顎関節 (TMJ) の一員で関節軟骨として機能する他, 少なくとも

も成長期まで成長軟骨としての性質も維持しており, 軟骨への外力付加や (Teramoto et al., 2003), 軟食の摂取等に反応し (Bouvier and Hylander, 1984), 形態変化を示すことが知られている. このような下顎頭軟骨の加齢変化や種々の実験系での所見の詳細はまたの機会に述べることにする.

最後に筆者は同じ二次軟骨である顎角軟骨 (angular cartilage) が下顎頭軟骨と全く同様な発育過程を示し, 生後は関節機能が生じないために3—4週で消失していくことを明らかにした (Shibata et al., 2006b). すなわち, 下顎頭軟骨と顎角軟骨の構造を比較することによって, 関節機能と軟骨組織の維持に関する機能の解析ができるものと期待される.

V 結語

下顎頭軟骨は哺乳類において最も研究された二次軟骨であり, 一次軟骨とは共通する点も多いが, 上述のような異なる点も非常に多く認められる. その相違点が, とりもなおさず下顎骨の成長発育の特徴の一つにもなっており, 下顎頭軟骨研究は, 歯科医学および顎顔面の成長発育を研究する上で非常に重要なテーマであると確信している. 世界的にみると下顎頭軟骨の発育過程に関する研究はまだまだ活発ではないのが現状で, その重要性を訴え続けることによって, この分野の研究がさらに盛んになることを希望する.

謝辞

本研究は平成17—20年度の本学術振興会科学研究費 (基盤研究C課題番号17591901) の助成を受け, 現在研究を継続中である.

文献

- Akiyama H, Chaboissier M-C, Martin JF, Schedl A and de Crombrughe B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 16 : 2813–2828, 2002.
- Baume LJ. Ontogenesis of the human temporomandibular joint : 1. Development of the condyles. *J Dent Res* 41 : 1327–1339, 1962.
- Beresford WA. Chondroid bone, secondary cartilage and metaplasia. Baltimore : Urban & Schwarzenberg, 1981, p3–65.
- Bhaskar SN. Growth pattern of the rat mandible from 13 days in semination age to 30 days after birth. *Am J Anat* 92 : 1–53, 1953.
- Bouvier M and Hylander WL. The effect of dietary consistency on

- gross and histologic morphology in the craniofacial region of young rats. *Am J Anat* 170 : 117–126, 1984.
- Buxton PG, Hall B, Archer CW and Francis–West P. Secondary chondrocytes–derived Ihh stimulates proliferation of periosteal cells during chick development. *Development* 130 : 4729–4739, 2003.
- Duterloo HS and Jansen HWB. Chondrogenesis and osteogenesis in the mandibular condylar blastema. *Trans Eur orthod Soc* 1969 : 109–118, 1970.
- Durkin JF, Heeley JD and Irving JT. The cartilage of the mandibular condyle. *Oral Science Reviews*. 2 : 29–99, 1973.
- Enlow DH. *Handbook of facial growth*. 2nd. ed. Philadelphia : Saunders, 1982, p367–418.
- Frommer J. Prenatal development of the mandibular joint in mice. *Anat Rec* 150 : 449–462, 1964.
- Fukada K, Shibata S, Suzuki S, Ohya K and Kuroda T. In situ hybridisation 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.
- Hall BK. *Bones and cartilage, Developmental and evolutionary skeletal biology*. San Diego : Elsevier Academic Press, 2005, p149–165.
- Ikeda N, Nozawa–Inoue K, Takagi R and Maeda T. Development of the synovial membrane in the rat temporomandibular joint as demonstrated by immunocytochemistry for heat shock protein25. *Anat Rec Part A*, 279 : 623–35, 2004.
- Kim IS, Otto F, Zabel B and Mundlos S. Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech Dev* 80 : 159–70, 1999.
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao Y–H, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S and Kishimoto T. Targeted disruption of cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89 : 755–764, 1997.
- Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN and de Crombrughe B. Sox9 is a potent activator of the chondrocyte–specific enhancer of the pro α 1 (II) collagen gene. *Mol. Cell Biol.* 17 : 2336–2346, 1997.
- Lefebvre V, Li P and de Crombrughe B. A new long form of Sox5 (L–Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J.* 17 : 5718–5733, 1998.
- Luder HU, Leblond CP and 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.
- Miyake T, Cameron AM and Hall BK. Stage–specific expression patterns of alkaline phosphatase during development of the first arch skeleton in inbred C57BL/6 mouse embryos. *J Anat* 190 : 239–260, 1997.
- Mori–Akiyama Y, Akiyama H, Rowitch DH and de Crombrughe B. Sox9 is required for determination of chondrogenic cell lineage in the cranial neural crest. *Proc Natl Aca Sci in USA* 100 : 9360–9365, 2003.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR and de Crombrughe B. The novel zinc finger–containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 8 : 17–29, 2002.
- Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GWH, Beddington RSP, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB and Owen MJ. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89 : 765–771, 1997.
- Shibata S, Suzuki S, Tengan T, Ishii M and 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, Fukada K, Suzuki S and 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, Fukada K, Suzuki S, Ogawa T and Yamashita Y. In situ hybridization and immunohistochemistry of bone sialoprotein and secreted phosphoprotein 1 (osteopontin) in the developing mouse mandibular condylar cartilage compared with limb bud cartilage. *J. Anat.* 200 : 309–320, 2002.
- Shibata S, Suda N, Yoda S, Fukuoka H, Ohyama K, Yamashita Y and Komori T. Runx2–deficient mice lack mandibular condylar cartilage and have deformed Meckel’s cartilage. *Anat. Embryol. (Berl)* 208 : 273–280, 2004.
- Shibata S, Suda N, Suzuki S, Fukuoka H and 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, 2006a.
- Shibata S, Fujimori T and Yamashita Y. An in situ hybridization and histochemical study of developing and postnatal changes of mouse mandibular angular cartilage compared with condylar cartilage *Journal of Medical and Dental Sciences* 53 : 41–50, 2006b.
- Shibukawa Y, Young B, Wu C, Yamada S, Long F, Pacifici M and Koyama E. Temporomandibular joint formation and condylar growth require Indian hedgehog signaling. *Dev Dyn* 236 : 426–434, 2007.
- Silbermann M, Reddi AH, Hand AR, Leapman RD, von der Mark K and Franzen A. Further characterization of the extracellular matrix in the mandibular condyle in neonatal mice. *J. Anat.* 151, 169–188, 1987.
- Symons NBB. The development of the human mandibular joints. *J Anat.* 151 : 169–188, 1952.
- Ten Cate AR. Temporomandibular joint. In Nanci N editor, *Ten Cate’s Oral Histology : Development, structure, and Function*. St. Louis : Mosby, 2003, p376–396.
- 天願俊泉 マウス下顎頭軟骨の組織発生ならびにその立体的観察, *口病誌* 571 : 32–57, 1990.
- Teramoto M, Kaneko S, Shibata S, Yanagishita M and Soma K. Effect of compressive forces on extracellular matrix in rat mandibular condylar cartilage. *J Bone Miner Metab* 21 : 276–286, 2003.
- Vinkka H. Secondary cartilages in the facial skeleton of the rat. *Proc Finn Dent Soc [Supple78]* 7 : 1–137, 1982.
- Vinkka–Puhakka H and Thesleff I. Initiation of secondary cartilage in the mandible of the Syrian hamster in the absence of muscle function. *Arch Oral Biol* 38 : 49–54, 1993.
- Yoshida CA, Yamamoto H, Fujita T, Furuichi T, Ito K, Inoue K, Yamada K, Zanma A, Takada K, Ito Y and Komori T. Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Gene Dev.* 18 : 952–963, 2004.