

〔原著〕

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

山口 優, 檜尾 治奈, 中尾 友也, 飯嶋 雅弘

北海道医療大学歯学部 口腔構造・機能発育学系 歯科矯正学分野

Effects of joint loading on the extracellular matrix mRNA expressions in condylar cartilage of growing rats

Masaru YAMAGUCHI, Haruna KASHIO, Yuya NAKAO, Masahiro IJIMA

Division of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Department of Oral Growth and Development,
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido, Japan**Key words** : temporomandibular joint, mandibular condyle, aggrecan, Growth

Abstract

In orthodontic clinics, we believe that an understanding the cellular changes due to altered joint loadings of the mandibular condylar cartilage (MCC) may contribute to our understanding of the mechanisms underlying condylar growth modifications in response to orthodontic forces. This study attempts to clarify morphological changes in the MCC due to joint loads and the reactivity of the extracellular matrix, investigated by using a growth model of rat incisor occlusal elevation, which involves histologically generated MCC joint loading and changes in the mRNA expression of the extracellular matrix. One hundred and four 7-week-old male Wistar rats were assigned randomly to control and bite plane groups. To increase the joint load to the temporomandibular joint, a resin occlusal plate was attached to the maxillary incisor part, and an occlusion modification model was prepared by occlusion elevation. Rats from each group were sacrificed after 1, 2, 3, or 4 weeks of wearing the appliance. Histological observations of the

mandibular condylar cartilage and quantification of DNA, GAG and collagen content, as well as a quantification of proteoglycan and collagen mRNA expression levels were performed. The collagen mRNA expression increased type I and type III collagen in response to the changes in the mechanical environment of the mandibular condylar cartilage. All proteoglycans that show increased mRNA expression were involved in the formation of collagen fibrils.

The raising of the incisor bite varied the mechanical load exerted on the MCC of the rats in the growth phase. As a result, differentiation from the proliferating cell layer to chondrocytes and hypertrophication of chondrocytes were suppressed. At the same time, the tissue structure of the MCC changed by maintaining cell proliferation in the proliferating cell layer and endochondral ossification in the hypertrophic chondrocyte layer. These changes suggest that the adaptation of the temporomandibular joint and surrounding tissue reverts to the original tissue structure.

緒 言

顎関節は、側頭骨と円板間の上関節腔、および関節円板と下顎頭間の下関節腔からなる複合関節であり、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、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でもあることが知られている。そして下顎頭軟骨は成長段階において軟骨内骨化を生じることで、頭蓋の中で最も旺盛な成長を示し、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。組織学的にみると下顎頭軟骨は3つの細胞層（線維層、増殖細胞層および軟骨細胞層）から構成され、それぞれの細胞層には線維芽細胞、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 (McNamara, 1979). 最表層の線維層では、細長い線維芽細胞が密に走行するI型、III型collagen線維束の間に散在している。増殖細胞層は、細胞外基質としてI型collagenで囲まれた、未分化間葉系細胞によって特徴付けられ、下顎頭軟骨における細胞増殖を行う。軟骨細胞層の細胞外基質は、主にII型collagenであり、成熟に従い大きさが増大、肥大化し、最終的に骨化前面で石灰化する。下顎頭軟骨は生力学的環境の変化に対して高い適応能を有するとされているが (Imamura et al., 1973), それに最も寄与しているのは未分化間葉系細胞で、骨芽細胞と軟骨細胞への分化能を有している (Strauss et al., 1990). 下顎頭の成長のメカニズムを知るために、ホルモンやビタミンなどの内的刺激、および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も多く報告されている。In vivoでは、咬合改変による、ラット顎関節細胞外基質の変化として、proteoglycan発現の増加や (Mao et al., 1998), I型、II型およびX型collagenの発現活性の増加が報告されている (Sasaki, 1998). また、下顎運動の制限による、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の減少など (Ogawa, 1999), 顎関節における荷重負荷の変化は、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ている (Coprav, 1985). しかし、生体力学的環境と細胞外基質の組成の変化についてはいまだ不明な点が多い。Proteoglycanは分子量の違いにより、modular proteoglycanとsmall leucine rich proteoglycan (SLRP) に分類されるが (Iozzo & Murdoch, 1996), 顎関節における荷重負荷による、これらのproteoglycanのmRNA発現の変化は、様々な結果の報告がなされている。歯科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ことから、下顎頭の荷重変化に対する応答反応を解明することは歯科矯正治療における、結果予測性の向上につながると考えられる。そこで、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ことを目的とし、切歯部にレジン製の咬合挙上板を装着し咬合挙上を行うラット咬合改変モデルを用いて (Nakao et al., 2015), in vivo実験系による生体力学的環境と下顎頭に生じる組織学的変化および細胞外基質のmRNA発現の変化を検討した。

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104匹を用いた。組織学的観察に24匹、生化学的分析に40匹、mRNA発現の定量に40匹を用い、各実験で対照群と実験群の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。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.) を用いて作製した。咬合挙上装置の設計は、D: 5.0mm, W: 7.0mm, H: 3.0mmとした (図1)。咬合挙上装置の装着には、歯科充填用コンポジットレジン (BEAUTIFIL Flow, SHOFU.) を用い、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3.0mmとなるように調整した。なお、実験期間中に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対照群として用いた。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: 094)。

2. 試料作製と組織学的観察 (n = 3)

各実験期間終了後、ラットはイソフルラン (マイラン製薬) 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 / 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4) で24時間浸漬固定した。その後、4℃下で10% EDTA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7μmの連続切片を作製した。

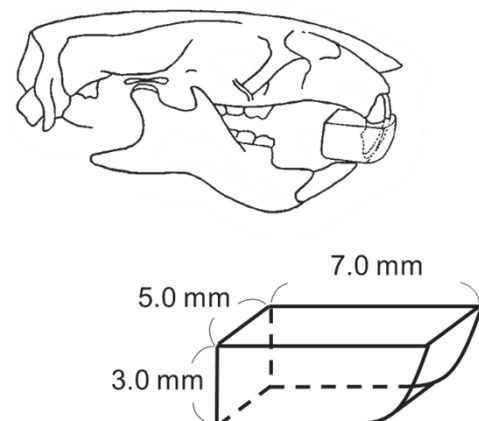


図1 切歯部咬合挙上装置の模式図

咬合挙上装置は幅径 (D): 5.0mm, 前後径 (W): 7.0mm, 高径 (H): 3.0mmで設計した。

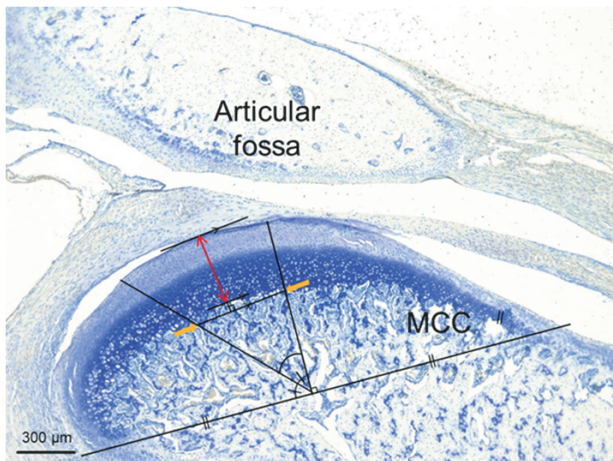


図2 下顎頭軟骨の軟骨層の形態計測の方法

下顎頭軟骨の下方、軟骨細胞の存在する境界領域を基準線とし、基準線の両端から設定した中点より垂直二等分線を引き、垂線と基準線のなす角の二等分線を後方領域に引いた。3分割した領域のうち、中間領域に軟骨と骨の境界を結ぶラインを設定（黄色の矢印に示す）、このラインと平行となるよう下顎頭表面に接線を引き、その位置に垂線を立てそのライン上（赤線）の各細胞層の厚径を計測した。

薄切切片を通法に従い脱パラフィン後、0.04% Toluidine Blue (pH4.1) 染色を行い、封入後、鏡検した。咬合挙上の際に最も荷重のかかる下顎頭の中央部を各細胞層の厚径計測部位とした。組織像を用いて、下顎頭軟骨の下方、軟骨細胞の存在する境界領域を基準線とし、垂直二等分線を引き、垂線と基準線のなす角の二等分線を後方領域に引いた（図2）。3分割した領域のうち、中間領域に軟骨と骨の境界を結ぶラインを設定、このラインと平行となるよう下顎頭表面に接線を引き、その位置に垂線を立てそのライン上の各細胞層の厚径を計測した。また、厚径計測部位を中心とした200 μ mの幅に存在する各細胞層の細胞数をカウントした。

3. 下顎頭軟骨の生化学的分析 (n = 5)

各実験期間終了後、顎関節より下顎頭を明示し軟骨を採取、glycosaminoglycan (GAG) 含有量、DNA 含有量、collagen含有量の測定を行った（Hoemann et al., 2002）。GAGの抽出は、採取した下顎頭軟骨をホモジナズ後、500 μ Lのパパイン（Sigma）溶液を加え、60 $^{\circ}$ C、24時間反応させた。その後、パパイン処理したサンプルに、等量のDimethylmethyle Blue溶液を加え、速やかに吸光度計で計測した。吸光度は、530nmと590nmの2波長の値を計測した。DNA含有量はGAG含有量と同様の手順で、下顎頭軟骨からDNAを抽出し、パパイン処理したサンプルにHoechst33258を添加し、速やかに蛍光プレートリーダー（infinite F200, TECAN）で計測した。collagen含有量も同様の手順で、下顎頭軟骨から hy-

droxyprolineを抽出し、パパイン処理したサンプルに6 N HCLを加え110 $^{\circ}$ Cに加熱し加水分解後、pH指示薬としてフェノールレッドを加え6 N NaOHにより中和し、試料を作製した。その後Ehrlich試薬による比色反応を、吸光度計で吸光度550nmの値を計測した。

4. 下顎頭軟骨におけるmRNA発現の定量 (n = 5)

実験期間終了後、採取した下顎頭軟骨から、RNeasy mini Kit (Qiagen) を用いてtotal RNAを抽出後、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。Proteoglycan (aggrecan, versican, biglycan, decorin, fibromodulin, lumican, PRELP, osteoadherin, mimecan, chondroadherin), collagen (I型collagen, II型collagen, III型collagen) 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。各proteoglycan, collagenとGAPDHに対し、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。

5. 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。統計解析には統計解析ソフト (IBM SPSS Statistics ver23, IBM) を使用した。

結 果

1. Toluidine Blue染色性の変化と各細胞層厚径の変化

下顎頭の組織学的観察では、実験期間2週目に対照群と比較し、実験群で増殖細胞層における細胞密度の減少およびToluidine Blue染色による染色性の低下を認めた。軟骨細胞層に局限してメタクロマジー反応を認めたが、実験群ではメタクロマジーの反応は弱かった。また肥大軟骨細胞は対照群と比べ、小型化していた。4週目の組織像では対照群と実験群で違いは認めなかった（図3）。各細胞層の厚径は、実験群では線維層で3、4週目に、増殖細胞層では1、2週目に厚径の増加を認め、軟骨細胞層では1、2、3週目に厚径の減少を認めた（図4, A）。軟骨細胞層全体の厚径は、対照群では4週目で加齢に伴う、厚径の減少を生じた。実験群では1週目で厚径は減少したが、2週目では厚径は増加した（図4, B）。各細胞層の細胞数は、実験群では増殖細胞層の1週目に有意な増加を認めた。軟骨細胞層では、対照群、実験群の間に有意差は認められなかった（図5）。

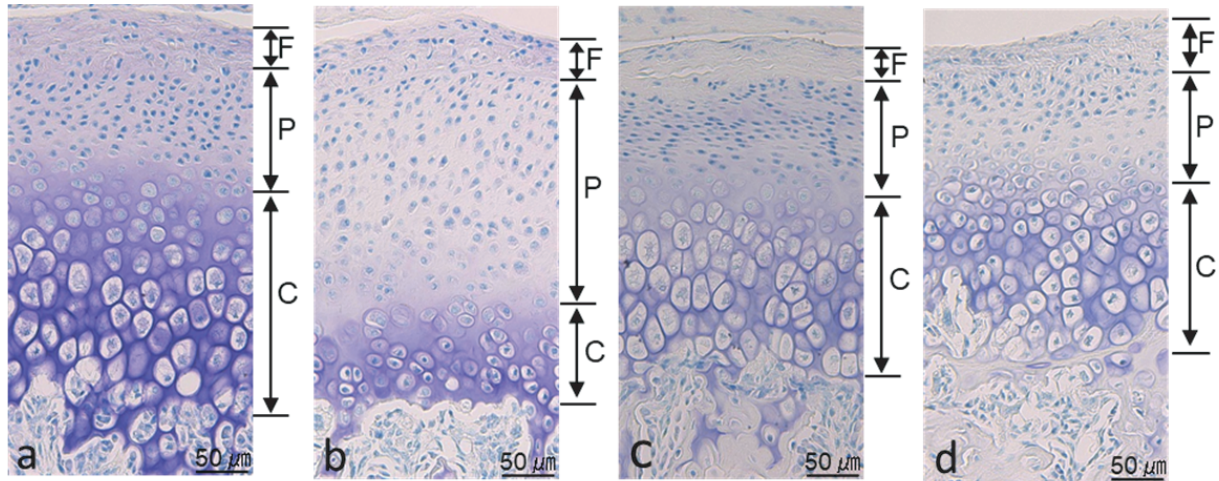


図3 咬合挙上2週と4週における下顎頭軟骨の組織像 (Toluidine Blue染色pH4.1)

(a) 2週における対照群の下顎頭軟骨の組織像 (b) 2週における実験群の下顎頭軟骨の組織像。実験群で増殖細胞層における細胞密度の減少およびToluidine Blue染色による染色性の低下を認めた。軟骨細胞層では限局した赤紫のメタクロマジーを認めた。実験群では肥大軟骨細胞の小型化とメタクロマジーを示す反応領域の減少を認めた。(c) 4週における対照群の下顎頭軟骨の組織像 (d) 4週における実験群の下顎頭軟骨の組織像。両群の組織像に違いは認めなかった。F: 線維層, P: 増殖細胞層, C: 軟骨細胞層。

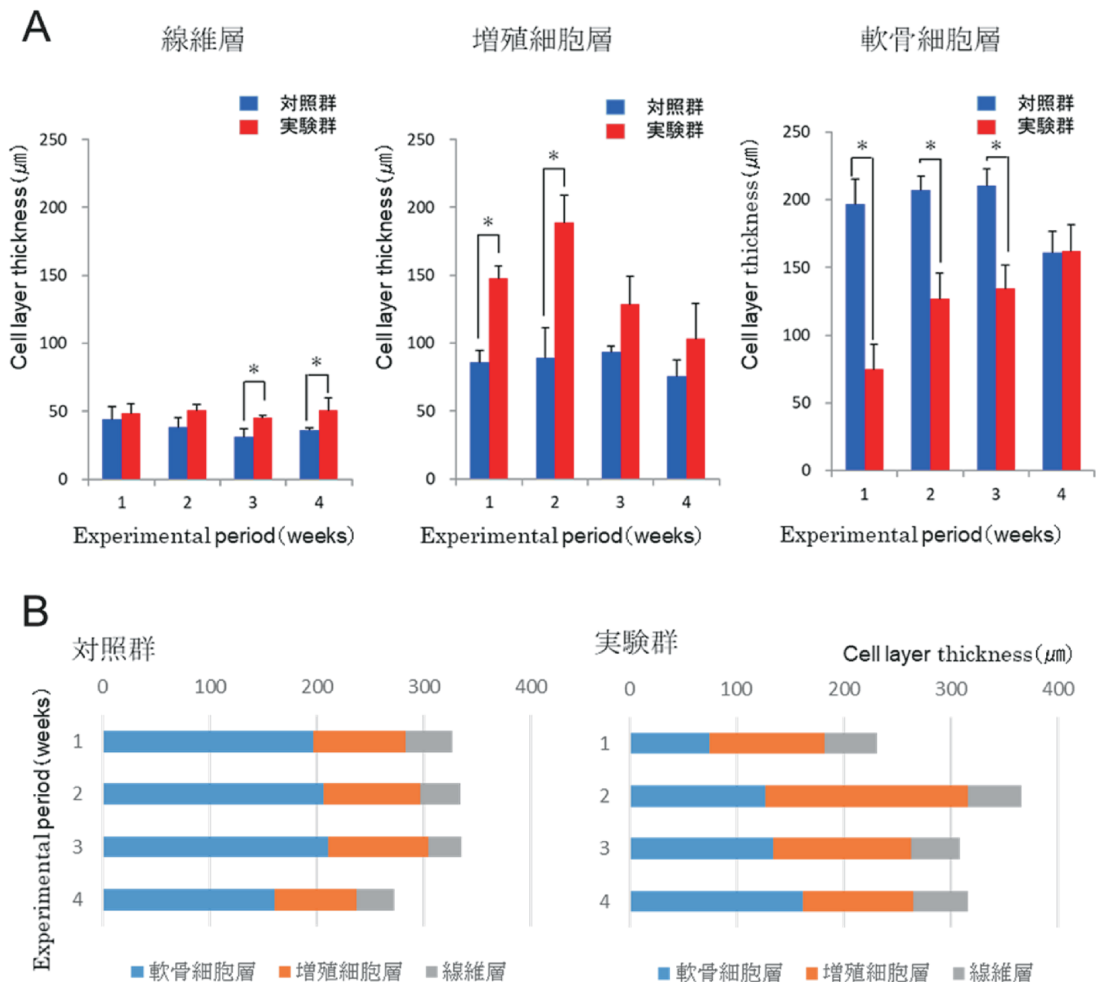


図4 咬合挙上による下顎頭軟骨の各細胞層の厚径変化

(A) 実験群では線維層は3, 4週目, 増殖細胞層では1, 2週目に厚径の増加を認め, 軟骨細胞層では3週目まで厚径の減少を認めた. ($n = 5$, $\text{mean} \pm \text{S.D.}$, $*P < 0.05$)

(B) 軟骨層全体の厚径は, 対照群では4週目で加齢に伴う, 厚径の減少を生じた。実験群では1週目で減少したが, 2週目では増加した。

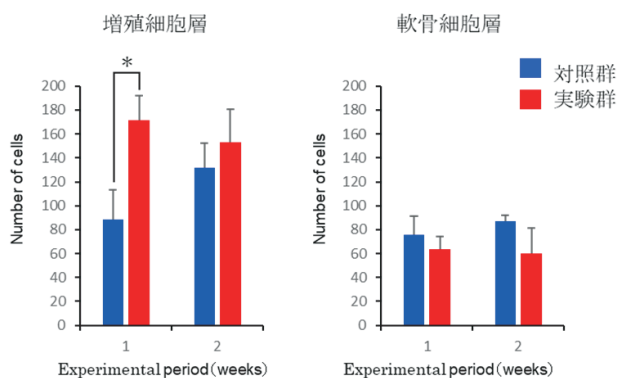


図5 咬合挙上1, 2週での下顎頭軟骨の増殖細胞層, 軟骨細胞層の細胞数

各細胞層における細胞数は, 増殖細胞層の1週に有意な増加を認めた. 軟骨細胞層では, 対照群, 実験群の間に有意差は認められなかった. ($n = 5$, $\text{mean} \pm \text{S.D.}$, $*P < 0.05$)

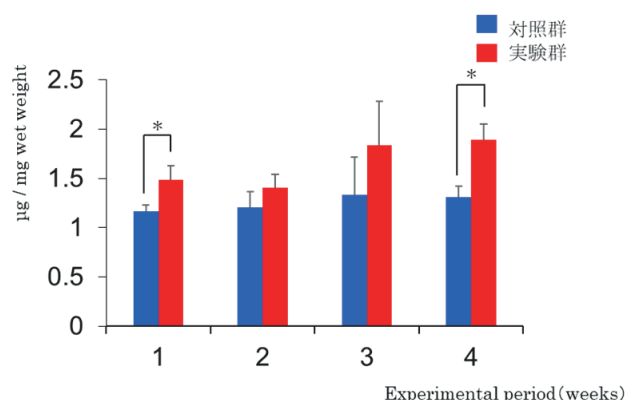


図7 咬合挙上における下顎頭軟骨のDNA量の変化

下顎頭軟骨におけるDNA含有量の変化は, 実験期間の1週目, 4週目に実験群で有意に増加した. ($n = 5$, $\text{mean} \pm \text{S.D.}$, $*P < 0.05$)

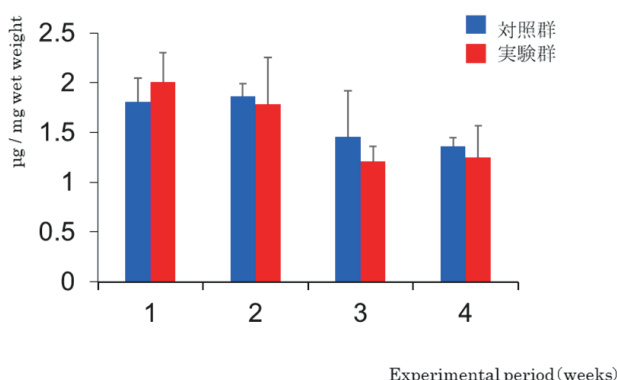


図6 咬合挙上における下顎頭軟骨のGAG量の変化

下顎頭軟骨におけるGAG含有量の変化は, 実験期間を通じ, 対照群, 実験群の間に有意差は認めなかった. ($n = 5$, $\text{mean} \pm \text{S.D.}$, $*P < 0.05$)

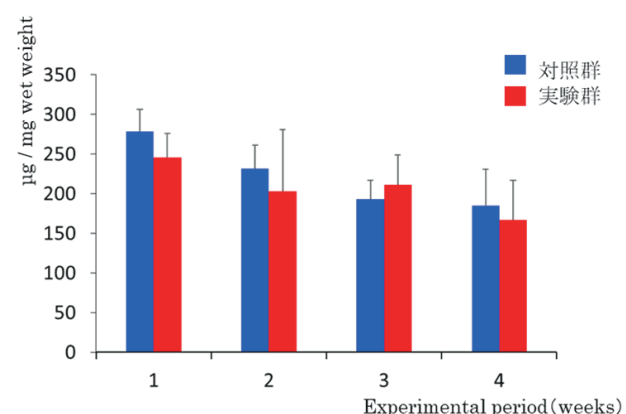


図8 咬合挙上における下顎頭軟骨のcollagen量の変化

下顎頭軟骨におけるcollagen含有量の変化は, 実験期間を通じ, 対照群, 実験群の間に有意差は認められなかった. ($n = 5$, $\text{mean} \pm \text{S.D.}$, $*P < 0.05$)

2. 下顎頭軟骨におけるGAG含有量

実験期間を通じ, 対照群, 実験群ともに加齢に伴いGAG含有量は減少傾向を示した. 対照群と実験群の間に有意差は認めなかった (図6).

3. 下顎頭軟骨におけるDNA含有量

実験期間を通じ, 対照群と比較して, 実験群で高い値を示す傾向を示し, 1, 4週目では実験群で有意に高い値を示した (図7).

4. 下顎頭軟骨におけるcollagen含有量

実験期間を通じ, 対照群, 実験群ともに加齢に伴いcollagen含有量は減少傾向を示した. 対照群と実験群の間に有意差は認めなかった (図8).

5. 下顎頭軟骨における各collagenおよび各proteoglycanのmRNA発現

各collagenにおけるmRNA発現は, 対照群と比べ, 実験群ではI型collagenは1週目, III型collagenは1, 2週目に高値を示した. II型collagenは3週目まで有意に低い値を示した (図9). 各ProteoglycanにおけるmRNA発現は, 対照群と比べ, 実験群ではaggrecanが2週目に低値, biglycan, decorin, PRELP, mimecanは1週目に高値を示した. fibromodulin, lumican, chondroadherinでは1, 2週目に対照群と比較して実験群で有意に高い値を示した. その他のproteoglycanは, 実験期間を通して, 対照群と実験群の間に有意差は認めなかった (図10, 11).

考 察

1. 咬合改変による顎関節の組織学的変化

ラット顎機能の解析研究によると, ラットの主要な顎運動には臼歯部での咀嚼と切歯部での切断の2つのストロークが存在する (Hiimae, 1971; Weijs & Dantuma,

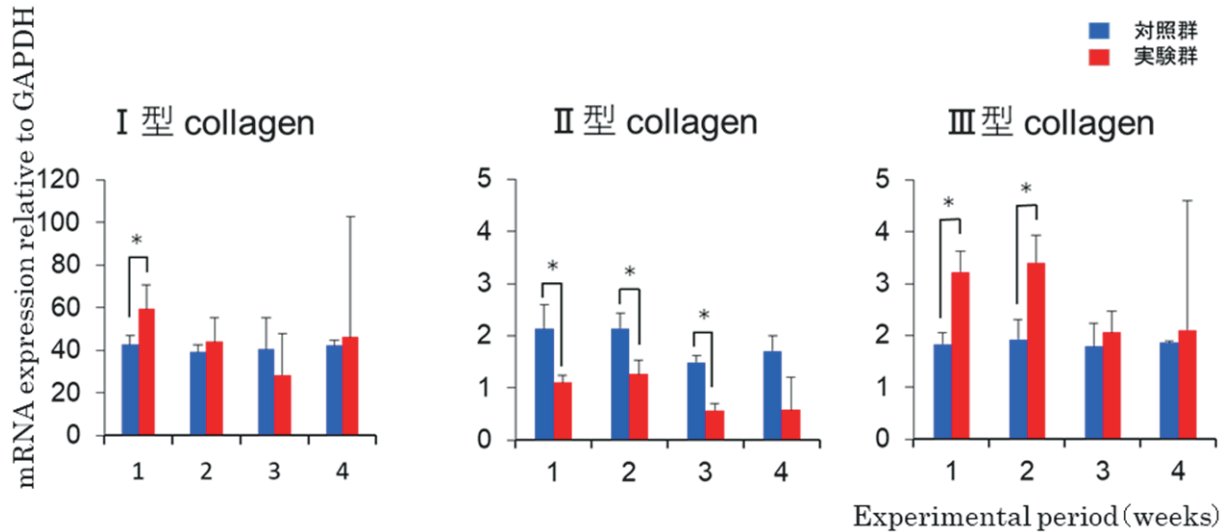


図9 咬合挙上による下顎頭軟骨の各collagenのmRNA発現

各collagenにおけるmRNA発現はI型collagenでは1週目、III型collagenは1、2週目に高値を示した。II型collagenは3週目まで対照群と比較して有意に低い値を示した。(n = 5, mean±S.D., *P<0.05)

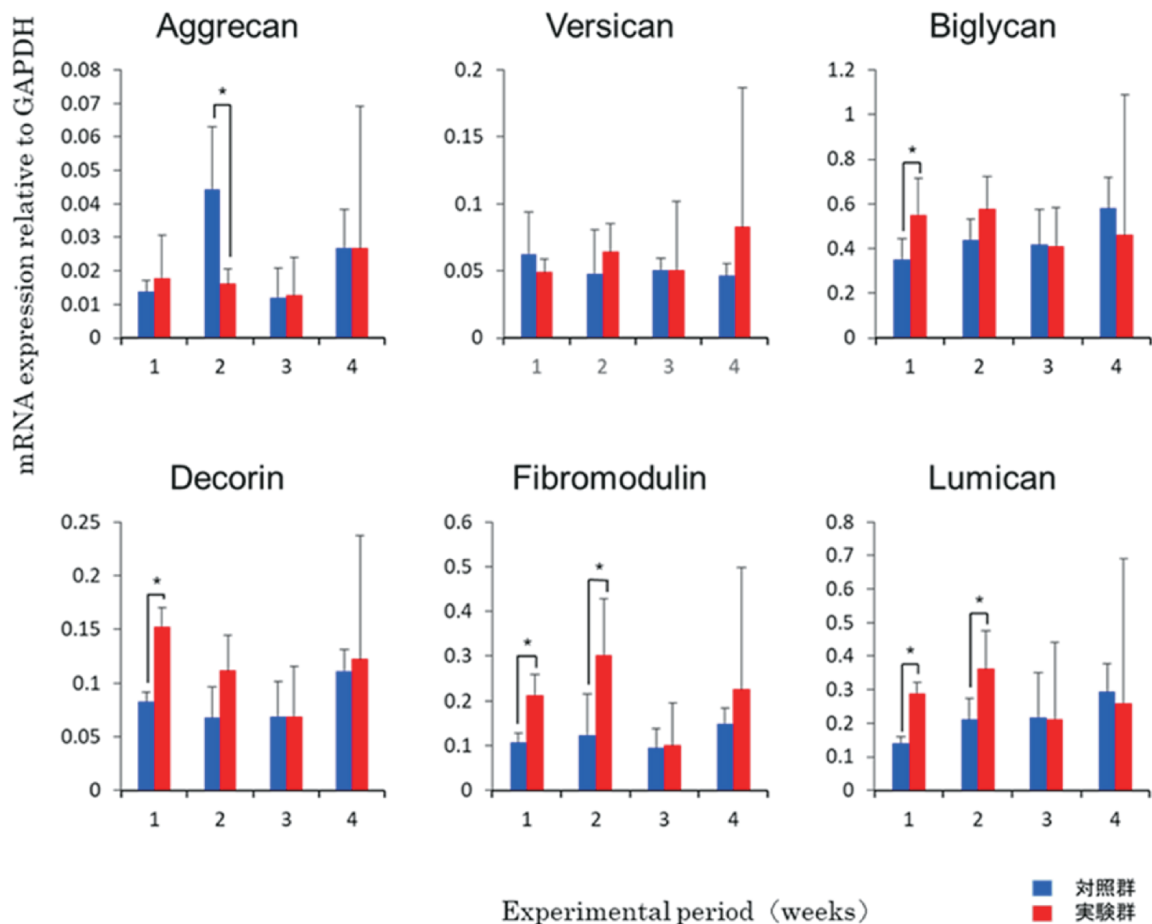


図10 咬合挙上による下顎頭軟骨の各ProteoglycanのmRNA発現

各proteoglycanにおけるmRNA発現は、対照群と咬合挙上群の比較では、咬合挙上群のaggrecanは2週目にて低値、biglycanは1週目、decorinは1週目、fibromodulin、lumicanは1週目、2週目に有意に高い値を示した。その他のproteoglycanは、実験期間を通して、対照群と実験群の間に有意差は認められなかった。(n = 5, mean±S.D., *P<0.05)

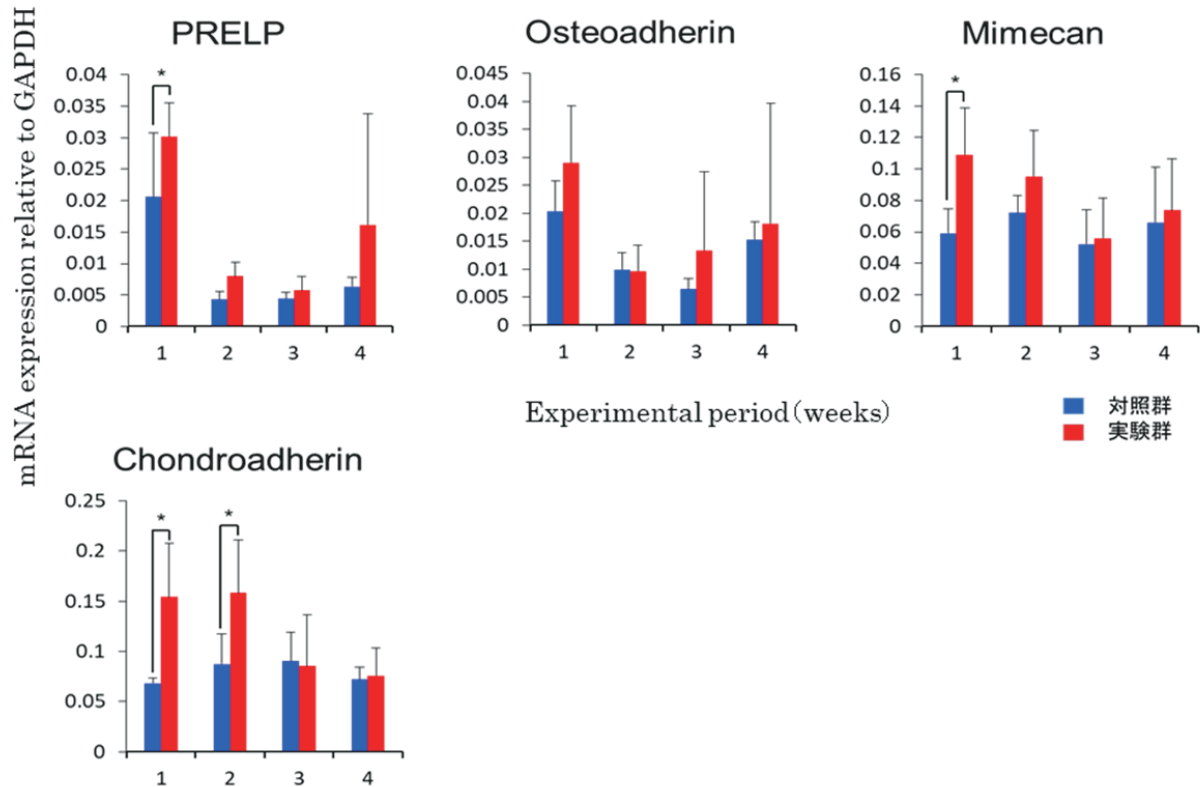


図11 咬合挙上による下顎頭軟骨の各ProteoglycanのmRNA発現

各ProteoglycanにおけるmRNA発現は、PRELPの1週目、mimecanの1週目、およびchondroadherin 1週目、2週目に対照群と比較して有意に高い値を示した。その他のproteoglycanは、実験期間を通して、対照群と実験群の間に有意差は認められなかった。(n = 5, mean±S.D., *P<0.05)

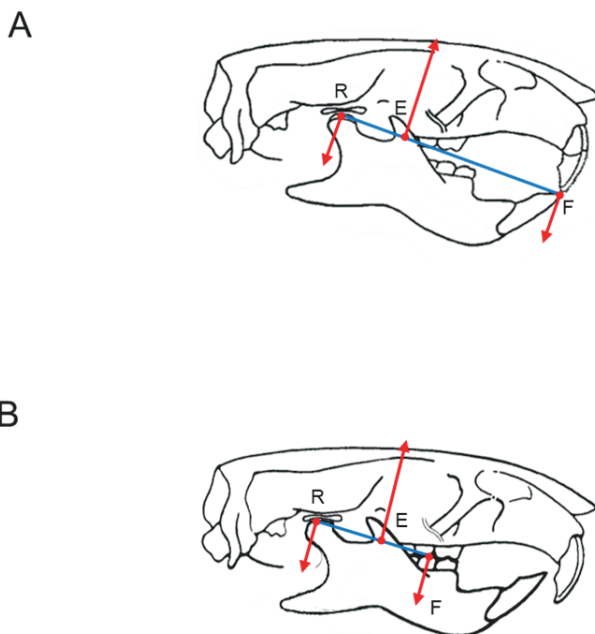


図12 (A) 切歯部切断ストロークおよび (B) 臼歯部咀嚼ストロークにおけるラット顎関節部の力学的環境

(R)：顎関節部の機能圧 (E)：咀嚼筋の筋力 (F)：咬合力

1975) (図12, A, B). 本研究で用いた咬合改変モデルは、切歯部咬合挙上板を用いることで、臼歯部咀嚼ストロークを排除し、切歯部切断ストロークの頻度の増加と

持続時間が延長し、切歯部切断ストロークでは、作用力と抵抗点である切歯間の距離が増大、より大きい荷重が顎関節部に負荷される (Hiemae, 1971).

下顎頭軟骨に生じる力学特性については、ヒト顎関節をモデルとした生体力学研究 (Hylander, 1985) によると、顎関節には機能時に圧縮応力と引っ張り応力および剪断応力が複雑に作用し、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。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生じ (O'Connor & Johnson, 1993)、関節組織は複雑な力学的環境下にある。加えて、下顎頭における成長は、軟骨内骨化の一連の過程を経て行われ、最表層の線維層は、下顎頭の成長には関与していない (Luder & Schroeder, 1992) が、増殖細胞層は軟骨細胞を供給し、これらの細胞が下層に行くに従って分化、肥大化し、併せて肥大軟骨細胞は骨髓側からの吸収により骨組織に置換することで成長し、そのバランスが保たれることにより軟骨細胞層全体の厚みが制御されている (Enlow, 1968). 本研究では、咬合挙上に伴って下顎頭中央部において1, 2週で増殖細胞層の厚径の増加と軟骨細胞層の厚径の減少が認められたが、4週では厚径の変化

は認めなかった。これらの厚径の変化には、各細胞層を構成する細胞の数、細胞サイズおよび細胞外基質の容量が関与していると考えられる (Luder & Schroeder, 1992)。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り (Luder et al., 1988)、本研究では咬合挙上 1 週の下顎頭軟骨の DNA 量と増殖細胞層の細胞数で有意な増加を示したが、2 週では増殖細胞層の細胞数に有意な差はなかった (図 5)。このことから下顎頭軟骨の中央部における増殖細胞層の細胞数の増加は、下顎頭軟骨全体での DNA 量の増加に関与した可能性がある。また、細胞サイズと細胞外基質の容量については、軟骨細胞層だけが厚径の減少を示し、肥大軟骨細胞の消失、軟骨細胞層の軟骨細胞のサイズの小型化を認められたが、軟骨細胞層の細胞数では変化を認めなかった。これらの変化は以前に行われた関節荷重を増大させる研究 (Kantomaa et al., 1992) でも、同様の報告がある。有限要素法を用いた下顎頭軟骨の生体力学研究 (Chen et al., 1998) によると、下顎頭軟骨に負荷される力は、軟骨およびその直下の骨の境界部に集中することが示されており、Young 率などの物性が著しく異なる組織間の界面である石灰化開始部位、すなわち肥大軟骨細胞の領域に力が集中することが考えられる。したがって、本研究でも同様に下顎頭の肥大軟骨細胞領域に関節荷重が強く作用し、この力学的環境が軟骨細胞の肥大化を抑制する因子を刺激している可能性が考えられる。

2. 咬合改変による GAG の変化

GAG は 20 数種類が存在し (Iozzo, 1996)、下顎頭軟骨に存在する GAG は、コンドロイチン硫酸 (chondroitin sulfate; CS)、デルマトン硫酸 (dermatan sulfate; DS)、ケラタン硫酸 (keratan sulfate; KS) およびヒアルロン酸 (hyaluronic acid; HA) である (Hargital et al., 2018)。これらの GAG のうち、HA 以外は硫酸化されていて、proteoglycan の発現変化に伴い、そこに結合する硫酸化 GAG は Toluidine Blue 染色によりメタクロマジー反応を示す。本研究では、実験群 2 週において下顎頭軟骨全体での両群間の GAG 量は有意な変化は示さなかったが、組織化学での結果は、軟骨細胞層にメタクロマジーの反応部位と反応強度の顕著な減少を示した。硫酸化 GAG 鎖との結合能を有し、咬合挙上 2 週に mRNA 発現に変化のあった proteoglycan は、aggrecan (KS, CS), biglycan (DS), decorin (DS), mimecan (DS), fibromodulin (KS) および lumican (KS) であり、aggrecan のみ mRNA 発現が減少を示し、その他は増加を示していた。これら

の結果から、下顎頭軟骨の GAG 量は軟骨細胞が産生する aggrecan とそれに結合する硫酸化 GAG の減少に対し、線維芽細胞と未分化間葉系細胞が産生する、aggrecan 以外の proteoglycan が増加した結果、組織全体では実験群の GAG 鎖の数が対照群と同等に保たれたと考えられる。そして、軟骨細胞層のメタクロマジー反応の変化については、多くの硫酸化 GAG を持ち、軟骨細胞層に高密度に存在する aggrecan の減少を強く反映した可能性が考えられる。また、ウシの関節円板の proteoglycan に結合する硫酸化 GAG を調べた研究では、関節負荷のかかる領域の硫酸化 GAG には長さに伸長を認めたとの報告があり (Scott et al., 1995)、本研究でも、aggrecan に結合する硫酸化 GAG もしくはその他の proteoglycan に結合する硫酸化 GAG の長さの変化により、組織全体では実験群の GAG 量は補償された可能性も考えられた。つまり、荷重負荷により GAG と proteoglycan の組成は変化した。下顎頭軟骨全体でみると GAG の総量は変わらず、GAG がもたらす組織の荷重抵抗性は維持された可能性が考えられる。

3. Collagen mRNA 発現

Collagen 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 (Silbermann et al., 1987; 1990; Luder et al., 1988; Strauss et al., 1990; Mizoguchi et al., 1990; 1997a; 1997b; Milam et al., 1991; Ali & Sharawy, 1995; 1996; Fukuda et al., 1999; Chen et al., 2012)。本研究では、線維性 collagen に分類され、組織の機械特性と関連性が高い 3 つの型の collagen mRNA 発現について検討した。下顎頭軟骨における collagen の分布は、I 型 collagen は線維層と増殖細胞層に存在し (Strauss et al., 1990)、組織の牽引力に対する抵抗性を付与していて、II 型 collagen は軟骨細胞層に存在する軟骨特異的な collagen である (Scott et al., 1986)。III 型 collagen は線維層、増殖細胞層、軟骨細胞層に分布を認め (Mizoguchi et al., 1997)、成長が旺盛な胎生期など組織改造が盛んに生じる部位に豊富に存在するとされている (Gay et al., 1978)。本研究における各 collagen mRNA 発現は、I 型では咬合挙上後 1 週、III 型は 1, 2 週に高値を示したのに対し、II 型は 3 週まで対照群と比較して有意に低い値を示した。この結果は、増殖細胞層と軟骨細胞層の厚径変化のあった期間に相関しており、I 型、III 型 collagen の増加は増殖細胞層、II 型 collagen の減少は軟骨細胞層で生じた変化であると考えられる。荷重負荷に対する線維芽細胞を主体とする結合組織の I 型 collagen

mRNA発現に及ぼす影響に関するin vitroの研究は数多く行われている。ラット歯根膜由来細胞 (Ozaki et al., 2005), ヒト膝蓋腱由来細胞 (Yang et al., 2004), ヒト前十字靭帯由来細胞 (Lee et al., 2007) への伸展負荷によってI型collagen mRNA発現が増加することが報告されており, 本研究と一致する結果を示した。一方, III型collagenはI型collagenの原線維形成に必要な不可欠であることがIII型collagen遺伝子の突然変異の導入実験から明らかにされている (Liu et al., 1997)。III型collagen mRNA発現に関しては, 伸展応力に対して間葉系幹細胞で増加したという報告がある (Lee et al., 2007)。II型collagenは軟骨組織に特徴的な細胞外基質であり (Evanko & Vogel, 1993), 圧縮力, 剪断応力に対する耐性を組織に付与する (Stegenga et al., 1991)。荷重を加えたin vivoの研究では, 間欠的負荷はII型collagen mRNA発現を増加し (Smith et al., 1996), 静的な持続的荷重負荷ではmRNA発現を減少したとの報告がある (Ragan et al., 1999)。本研究ではII型collagen mRNA発現の減少が認められ, さらに軟骨組織に特徴的な細胞外基質であるaggrecan mRNA発現の減少も認められた。また, II型collagen産生の最も高い領域は軟骨細胞層上層であるとの報告もある (Luder et al., 1988)。以上から本研究における結果は, 咬合挙上による下顎頭中央部での持続的な圧縮応力の負荷によって, 軟骨細胞層の分化直後から肥大化初期の分化段階の軟骨細胞のII型collagenの産生が著しく抑制され, II型collagenの減少に対し, 喪失した荷重抵抗性を補うため増殖細胞層のI型, III型collagenは増加したと推察される。これらの変化は, 下顎頭軟骨における軟骨細胞層と増殖細胞層の組織改造の一過程であり, これは適応反応であったと推察される。

4. Modular proteoglycan

Aggrecanは, 軟骨細胞 (Kiani et al., 2002), versicanは未分化間葉系細胞と線維芽細胞が産生する (Iozzo & Murdoch, 1996)。本研究では, aggrecanは2週目で対照群に対して有意に低い値を示し, versicanは実験期間を通じ変化を示さなかった。メカニカルストレスが軟骨のaggrecanに及ぼす影響に関する研究は数多く報告されている。In vitro研究では, 関節軟骨細胞への間欠的な圧力がaggrecan mRNA発現を増加させることが示され (Smith et al., 1996), 持続的静的圧縮はaggrecan mRNA発現を低下させるという報告と (Ragan et al., 1999), aggrecan mRNA発現を増加させるという報告があるが (Takahashi et al., 1996), これらはおそらく圧縮応力の大きさの違いによる結果であると推察される。以上か

ら, 本研究では咬合挙上によって関節荷重の増大と, 持続的な荷重負荷を行ったことで軟骨細胞によるaggrecanの産生が抑制されたと考えられる。

5. Small leucine-rich proteoglycan (SLRP)

本研究では, 下顎頭軟骨でその発現が確認された8種類のSLRPのmRNAの定量を行い, mRNA発現が高い値を示したのは, biglycan, decorin, fibromodulin, lumican, mimecan, PRELP, condroadherinの7つであった。これらのうち, PRELPとcondroadherinを除くSLRPは, collagen原線維の形成に重要な役割を担っていることが明らかにされている (Brown & Vogel, 1989)。Biglycanとdecorinは, 免疫組織学的研究によると, biglycanとdecorinはともに下顎頭軟骨では線維層と増殖細胞層に分布する (Del Santo et al., 2000)。Decorinは, collagen原線維の直径や形成速度を調整し (Brown & Vogel, 1989), decorin遺伝子を欠損させたマウスでは, 腱や皮膚のcollagen原線維の直径が不均一となり, 組織の脆弱性を引き起こすことが報告されている (Danielson et al., 1997)。一方, biglycanは, 遺伝子の欠損によって, decorinと同様に, collagen原線維の直径を不均一にすること, および2つの遺伝子の欠損では, 相乗作用を示す (Svensson et al., 1999)。Biglycanは圧縮主応力に対して, decorinは牽引主応力に対して機能している (Scott et al., 1995; Mizoguchi et al., 1998)。本研究におけるbiglycanとdecorinのmRNA発現は, 咬合挙上装置による荷重負荷により1週目において高値を示した。つまりこの結果は下顎頭において圧縮力と牽引力による複雑な生体力学的環境が生じていることを示唆している。一方, fibromodulinとlumicanはI型collagen分子との結合能を有し, 原線維の形成を調節していることが明らかにされている (Svensson et al., 1999)。興味のあることに, この2つのSLRPは, I型, III型collagen分子への結合部位を一部共有し (Svensson et al., 2000), fibromodulinの遺伝子欠損は, lumicanのmRNA発現も減少させるが, lumicanのタンパク質発現およびcollagen原線維への結合量を増加させる。しかし, 形成されたcollagen原線維は細く, 直径は不均一で, 組織の機械的強度が低下する (Svensson et al., 1999)。このことは, 2つのSLRPがcollagenとの反応に関して競合関係にあり, タンパク質レベルでは相補的に作用して組織の機械的強度の維持に寄与することを示している。本研究ではfibromodulinとlumicanはいずれも1, 2週目にmRNA発現は高値を示した。これらの結果は同じく1, 2週目にmRNA発現に変化のあったIII型collagenの形成に伴う反応であったと

考えるのが妥当である。以上から、本研究において mRNA 発現の増加を示した biglycan, decorin, fibromodulin, lumican 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、増殖細胞層における厚径変化に大きく寄与したものと考えられる。また、軟骨における細胞の成熟過程で、軟骨細胞への分化調節を行う甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTHrP) は、軟骨における細胞増殖の促進と軟骨細胞肥大を阻害する作用があり、PTHrP のノックアウトマウスによる研究では細胞増殖の低下と軟骨細胞の早期の肥大を生じた (Amizuka et al., 1994)。SLRP については軟骨細胞分化での関与が報告されており、biglycan と fibromodulin の遺伝子欠損マウスの研究では、下顎頭軟骨の軟骨細胞の増殖の減少、PTHrP 発現の減少 (Chen et al., 2009)、軟骨細胞層での軟骨細胞のアポトーシスの促進 (Wadhwa et al., 2005)、骨代謝を促進することが報告されている (Embree et al., 2011)。ラットの下顎骨に器具を装着し、前方誘導を行った研究では荷重変化による PTHrP の発現増加と、肥大軟骨の分布を示すマーカーの減少を認めたという報告もあり (Rabie, 2003)、本研究で厚径の減少と細胞の小型化を認めた軟骨細胞層での反応と類似している。よって、咬合挙上による力学的環境の変化で生じた SLRP の発現変化も、PTHrP 発現に関与して、軟骨細胞分化の抑制に影響を与えた可能性がある。これらを確認するには軟骨から骨領域まで対象を拡大し、荷重負荷に対する下顎頭軟骨の骨分化への影響や骨構造の変化も検討していく必要がある。

結 論

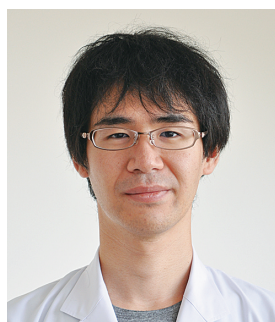
切歯咬合挙上により成長期ラットの下顎頭軟骨にかかる力学的負荷を変化させると、増殖細胞層から軟骨細胞への分化および軟骨細胞の肥大化は抑制された。一方で、増殖細胞層の増殖および肥大軟骨細胞層での軟骨内骨化は維持されることによって下顎頭軟骨の組織構造に変化を起こすと考えられた。そして、これらの変化は顎関節や周囲の組織の適応によって、最終的に元の組織構造に収束することが示唆された。

参 考 文 献

- Ali AM & Sharawy M. An immunohistochemical study of collagen types III, VI and IX in rabbit craniomandibular joint tissues following surgical induction of anterior disk displacement. *J Oral Pathol Med* 25 : 78–85, 1996.
- Ali AM & Sharawy M. An immunohistochemical study of the effects of surgical induction of anterior disc displacement in the rabbit craniomandibular joint on type I and type II collagens. *Arch Oral Biol* 40 : 473–80, 1995.
- Amizuka N, Warshawsky H, Henderson JE, Goltzman D & Karaplis AC. Parathyroid hormone-related peptide-depleted mice show abnormal epiphyseal cartilage development and altered endochondral bone formation. *J Cell Biol* 126 : 1611–1623, 1994.
- Brown DC & Vogel KG. Characteristics of the in vitro interaction of a small proteoglycan (PG II) of bovine tendon with type I collagen. *Matrix* 9 : 468–478, 1989.
- Chen J, Akyuz U, Xu L & Pidaparti RM. Stress analysis of the human temporomandibular joint. *Med Eng Phys* 20 : 565–572, 1998.
- Chen J, Gupta T, Barasz JA, Kalajic Z, Yeh WC, Drissi H, Hand AR & Wadhwa S. Analysis of microarchitectural changes in a mouse temporomandibular joint osteoarthritis model. *Arch Oral Biol* 54 : 1091–1098, 2009.
- Chen J, Utreja A, Kalajic Z, Sobue T, Rowe D & Wadhwa S. Isolation and characterization of murine mandibular condylar cartilage cell populations. *Cells Tissues Organs* 195 : 232–243, 2012.
- Copray JC, Jansen HWB & Duterloo HS. Effect of compressive force on proliferation and matrix synthesis in mandibular condylar cartilage of the rat in vitro. *Arch Oral Biol* 30 : 299–304, 1985.
- Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE & Iozzo RV. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol* 136 : 729–743, 1997.
- Del Santo M Jr, Marches F, Ng M & Hinton RJ. Age-associated changes in decorin in rat mandibular condylar cartilage. *Archs Oral Biol* 45 : 485–494, 2000.
- Enlow DH. *The Human Face : An Account of the Postnatal Growth and Development of the Craniofacial Skeleton*. New York : Harpers & Row, 1968.
- Evanko SP & Vogel KG. Proteoglycan synthesis in fetal tendon is differentially regulated by cyclic compression in vitro. *Arch Biochem Biophys* 307 : 153–164, 1993.
- Fukuda et al. 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.
- Gay S & Miller EJ. *Collagen in the physiology and pathology of connective tissue*. Stuttgart, Gustav-Fischer Verlag

- Acad. Sci. U. S. A. 72, 3925–3929, 1978.
- Hiemae K. The structure and function of the jaw muscles in the rat (*Rattus norvegicus* L.). *Zool J Linn Soc* 50 : 111–132, 1971.
- Hoemann CH, Sun J, Chrzanowski V, Buschmann MD. 2002. A multivalent assay to detect DNA, RNA, glycosaminoglycan, protein, and collagen content of milligram samples of cartilage or chondrocytes grown in chitosan hydrogel. *Anal Biochem*. 300(1) : 110.
- 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, 1985, p19–35.
- Imamura M. Cellular responses of condylar cartilage induced by mandibular displacement in rats. *J Stomatol Soc Jpn* 40 : 457–475, 1973.
- Iozzo RV & Murdoch A. Proteoglycans of the extracellular environment : clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J* 10 : 598–614, 1996.
- Lee IC, Wang JH, Lee YT, Young TH. The differentiation of mesenchymal stem cells by mechanical stress or/and co-culture system. *Biochem Biophys Res Commun*. Jan 352 : 147–152, 2007.
- Liu Q, Gibson MP, Sun H & Qin C. Dentin sialophosphoprotein (DSPP) plays an essential role in the postnatal development and maintenance of mouse mandibular condylar cartilage. *J Histochem Cytochem* 61 : 749–758, 2013.
- Liu X, Wu H, Byrne M, Krane S & Jaenisch R. Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94 : 1852–1856, 1997.
- Luder HU & Schroeder HE. Light and electron microscopic morphology of the temporomandibular joint in growing and mature crab-eating monkeys (*Macaca fascicularis*) : the condylar calcified cartilage. *Anat Embryol* 185 : 189–199, 1992.
- 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.
- Mao JJ, Rahemtulla F & Scott PG. Proteoglycan expression in the rat temporomandibular joint in response to unilateral bite raise. *J Dent Res* 77 : 1520–1528, 1998.
- McNamara JJ & Carlson DS. Quantitative analysis of temporomandibular joint adaptations to protrusive function. *Am J Orthod* 76 : 593–611, 1979.
- Milam SB, Klebe RJ, Triplett RG & Herbert D. Characterization of the extracellular matrix of the primate temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg* 49 : 381–391, 1991.
- Mizoguchi I, Nakamura M, Takahashi I, Kagayama M & Mitani H. An immunohistochemical study of localization of type I and type II collagens in mandibular condylar cartilage compared with tibial growth plate. *Histochemistry* 93 : 593–599, 1990.
- Mizoguchi I, Scott PG, Dodd CM, Rahemtulla F, Sasano Y, Kuwabara M, Satoh S, Saitoh S, Hatakeyama Y, Kagayama M & Mitani H. An immunohistochemical study of the localization of biglycan, decorin and large chondroitin-sulphate proteoglycan in adult rat temporomandibular joint disc. *Arch Oral Bio* 43 : 889–898, 1998.
- Mizoguchi I, Takahashi I, Sasano Y, Kagayama M & Mitani H. Localization of types I, II and III collagen and glycosaminoglycans in the mandibular condyle of growing monkeys : an immunohistochemical study. *Anat Embryol (Berl)* 195 : 127–135, 1997b.
- Mizoguchi I, Takahashi I, Sasano Y, Kagayama M, Kuboki Y & Mitani H. Localization of types I, II and X collagen and osteocalcin in intramembranous, endochondral and chondroid bone of rats. *Anat Embryol (Berl)* 196 : 291–297, 1997a.
- Nakao Y, Konno M, Toriya N, Arakawa T, Kashio H, Takuma T & Mizoguchi I. Proteoglycan expression is influenced by mechanical load in TMJ discs. *J Dent Res* 94 : 93–100, 2015.
- O'Connor JJ & Johnson I. Transmission of rapidly applied load through articular cartilage : the mechanics of osteoarthritis. In : Turner-Smith AR, editor. *Microenvironment in orthopaedics*. Oxford : Clarendon Press. p 244–268, 1993.
- Ogawa M, Kawamoto T, Fukada K, Itoh K, Suzuki S & Kuroda T. A study on histological changes of condylar cartilage under restricted mandibular movement in young rat. *Orthod Waves* 58 : 335–343, 1999.
- Ozaki M, Wada-Katsumata A, Fujikawa K, Iwasaki M, Yokohari F, Satoji Y, Nisimura T & Yamaoka R. Ant nestmate and non-nestmate discrimination by a chemo-

- sensory sensillum. *Science* 309 : 311–314, 2005.
- Rabie AB, Zhao Z, Shen G, Hägg EU, Dr O & Robinson W. Osteogenesis in the glenoid fossa in response to mandibular advancement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 119 : 390–400, 2001.
- Sasaki N. Immunohistochemical study of rat mandibular condylar cartilage with occlusal alteration caused by teeth extraction. *J Jpn Soc TMJ* 61 : 196–197, 1998.
- Scott PG, Nakano T & Dodd CM. Small proteoglycans from different regions of the fibrocartilaginous temporomandibular joint disc. *Biochim Biophys Acta* 1244 : 121–128, 1995.
- Silbermann M, Reddi AH, Hand AR, Leapman R, von der Mark K & Franzen A. Chondroid bone arises from mesenchymal stem cells in organ culture of mandibular condyles. *J Craniofac Genet Dev Biol* 7 : 59–79, 1987.
- Silbermann M & von der Mark K. An immunohistochemical study of the distribution of matrical proteins in the mandibular condyle of neonatal mice. I. Collagens. *J Anat* 170 : 11–22, 1990.
- Smith RL, Rusk SF, Ellison BE, Wessells P, Tsuchiya K, Carter DR, Caler WE, Sandell LJ & Schuman DJ. In vitro stimulation of articular chondrocyte and extracellular matrix synthesis by hydrostatic pressure. *J Orthop Res* 14 : 53–60, 1996.
- Stegenga B, de Bont LG, Boering G & van Willigen JD. Tissue responses to degenerative changes in the temporomandibular joint : a review. *J Oral Maxillofac Surg* 49 : 1079–1088, 1991.
- Strauss E, Satz P & Wada J. An examination of the crowding hypothesis in epileptic patients who have undergone the carotid amygdalotomy. *Neuropsychologia* 28 : 1221–1227, 1990.
- Svensson L, Aszódi A, Reinholt FP, Fässler R, Heinegård D & Oldberg A. Fibromodulin–null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon. *J Biol Chem* 274 : 9636–9647, 1999.
- Svensson L, Närlid I & Oldberg A. Fibromodulin and lumican bind to the same region on collagen type I fibrils. *FEBS Lett* 470 : 178–182, 2000.
- Symons NB. Studies on the growth and form of the mandible. *Dent Rec* 71 : 41–53, 1951.
- Takahashi I, Nuckolls GH, Takahashi K, Tanaka O, Semba I, Dashner R, Shum L & Slavkin HC. Compressive force promotes sox9, type II collagen and aggrecan and inhibits IL–1 beta expression resulting in chondrogenesis in mouse embryonic limb bud mesenchymal cells. *J Cell Sci* 111 : 2067–2076, 1996.
- Wadhwa S, Embree MC, Kilts T, Young MF & Ameye LG. Accelerated osteoarthritis in the temporomandibular joint of biglycan/fibromodulin double–deficient mice. *Osteoarthritis Cartilage* 13 : 817–827, 2005.
- Weijs WA & Dantuma R. Electromyography and mechanics of mastication in the Albino rat. *J Morphol* 146 : 1–34, 1975.
- Yang G, Crawford RC & Wang JH. Proliferation and collagen production of human patellar tendon fibroblasts in response to cyclic uniaxial stretching in serum–free conditions. *J Biomech* 37 : 1543–1550, 2004.



山口 優

北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野 臨床助手

平成19年4月 北海道医療大学歯学部 入学

平成25年3月 北海道医療大学歯学部 卒業

平成30年3月 北海道医療大学歯学部歯学研究科博士課程 修了

平成30年4月 北海道医療大学歯科矯正学講座 臨床助手