

〔原著〕

顎関節への荷重負荷がラット下顎頭軟骨の基質タンパク発現に与える影響

尾立 卓弥¹⁾, 中尾 友也¹⁾, 細矢 明宏²⁾, 飯嶋 雅弘¹⁾

1) 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

2) 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

Effects of joint loading on matrix protein expression in mandibular condylar cartilage of growing rat

Takuya ODACHI¹⁾, Yuya NAKAO¹⁾, Akihiro HOSOYA²⁾, Masahiro IJIMA¹⁾

1) Division of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Department of Oral Growth and Development, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido, Japan

2) Division of Histology, Department of Oral Growth and Development, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido, Japan

Key words : Temporomandibular joint, Mandibular condyle, Osteopontin, Osteocalcin**Abstract**

The present study examined the effect of load on the temporomandibular joint on the matrix synthesis of the mandibular condyle. Biochemical and histological examinations of the mandibular condyle were conducted after bite raising. A bite plane was attached to the upper incisor of a 7-week-old Wistar rat. RNA was extracted from the condylar cartilage 0-4 weeks later, and real-time polymerase chain reaction was used for analyzing the expression levels of type X collagen, osteopontin, and osteocalcin. In addition, sagittal sections of the mandibular condyle were prepared, and the localization of these matrix proteins was examined. A positive reaction for type X collagen was observed, but reactions for osteopontin and osteocalcin were negative in the hypertrophic chondrocyte layer before occlusal elevation. In contrast, the bone tissue was negative

for type X collagen and positive for osteopontin and osteocalcin. Four weeks after bite raising, the expression level of type X collagen was almost unchanged, whereas those of osteopontin and osteocalcin were significantly increased in the hypertrophic chondrocyte layer. In the mandibular condyle, positive reactions for osteopontin and osteocalcin were observed, not only in the bone tissue but also in the hypertrophic chondrocyte layer, 4 weeks after the bite raising. These findings indicated that the expression levels of osteopontin and osteocalcin increased in the hypertrophic chondrocyte layer of the mandibular condyle on applying a load to the temporomandibular joint. Thus, the mechanical stimulus due to bite raising has been suggested to affect the matrix synthesis ability of the chondrocytes and alter the physical properties of the condylar cartilage.

緒 言

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、下顎骨の成長を制御する。下顎骨の成長は、主に下顎頭で行われている。したがって、歯科矯正治療において下顎頭に与える影響を明らかにすることは臨床上極めて重要である。

下顎頭は線維層とよばれる線維性結合組織で覆われ、

その下層は軟骨組織である増殖細胞層と肥大軟骨細胞層、さらに骨組織へ移行する (Heeley, 1985; Copray et al., 1988)。最表層の線維層では、線維芽細胞が密に走行する I 型コラーゲン線維束や III 型コラーゲン線維束の間に散在性に存在している。増殖細胞層には II 型コラーゲンなどの軟骨基質を分泌する軟骨細胞と、その前駆細胞が多数みられ、下顎頭の軟骨細胞を供給している (Imamura, 1973)。また増殖細胞層に存在する増殖軟骨

細胞は、下顎頭の成長とリモデリングを担っている (Lubsen et al., 1985). 肥大軟骨細胞層の細胞外基質はII型コラーゲンを主体とするが、軟骨細胞は肥大化に伴いアルカリ性ホスファターゼ活性を示すようになり、X型コラーゲンを合成する (Schmid & Linsenmayer, 1985). また、骨基質においては骨芽細胞が産生するI型コラーゲンおよび非コラーゲン性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などが認められ、骨の石灰化に関与している (Gorski, 1992; Young et al., 1992; Bellows et al., 1999).

下顎頭へ圧縮力を加えると、軟骨細胞のタンパク質合成が変化することが報告されている (Coprav & Liem, 1989). また、片側咬合挙上で顎関節におけるプロテオグリカンの発現が上昇すること (Mao et al., 1998) や、抜歯による咬合変化が下顎頭におけるコラーゲンおよびコンドロイチン硫酸の遺伝子発現を上昇させること (Sasaki, 1998) も示されている. さらに、下顎頭の軟骨細胞に対する伸展負荷がII型コラーゲンとアグリカンの発現を上昇させることも知られている (Huang et al., 2007). このように、外力や咬合力などの外的刺激は、下顎頭の基質性状に影響を及ぼすと考えられるが、影響を受ける細胞ならびに細胞外基質タンパク質の局在についてはほとんど検討されていない.

下顎頭に外的刺激を加える方法として、切歯部に咬合斜面板を装着し、下顎を前方誘導する方法が知られている (Rabie et al., 2001; Chayanupatkul et al., 2003; Xiong

et al., 2004). しかしこの方法は、下顎の前方誘導により、下顎骨の過成長を促進させてしまう. そこで我々は、下顎の前方誘導を抑制するため、ラット切歯部にレジン製の咬合挙上板を装着する切歯部咬合挙上モデルを確立した (Nakao et al., 2015). この実験モデルでは、咬合挙上板を咬合平面と平行になるように改良したため、下顎を前方誘導することなく咬合挙上が行われる.

本研究では、咬合挙上による荷重負荷が下顎頭軟骨の細胞ならびに細胞外基質タンパク質の局在に与える影響を検討した. 咬合挙上はNakaoら (2015) の切歯部咬合挙上モデルを用い、荷重負荷後の下顎頭におけるアルカリ性ホスファターゼ活性の変化を観察した. またX型コラーゲン、骨基質タンパク質であるオステオポンチンならびにオステオカルシンの発現と局在を、生化学的および

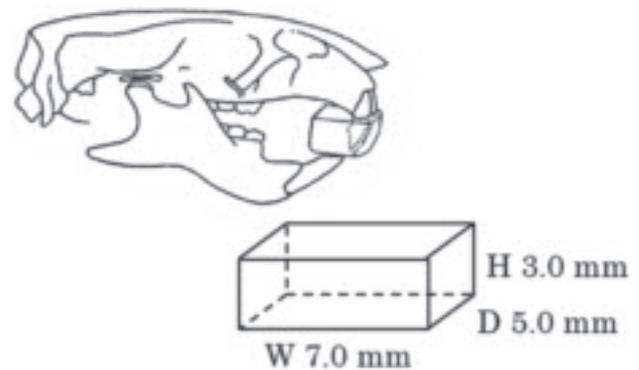


図1 切歯部咬合挙上装置の模式図
幅径 (W) 7.0mm, 前後径 (D) 5.0mm, 高径 (H) 3.0mm

表1 real-time PCR用のprimerおよびprobe

Molecule	Primer and probe sequence	Amplicon length	Accession no.	
Collagen type X	Sense (5'-3')	CGCTGGTTCATGGAACGTTT	68	XM_001053056
	Antisense (5'-3')	GGCAAGTGCCTCTTCACA		
	Probe (5'-3')	TGCTGAGCGGTACCAAACCTCCACAG		
Osteopontin	Sense (5'-3')	CCTGCAAGAAGGGAACAGTTG	61	M99252
	Antisense (5'-3')	GAAAATGCCAAGACCTTTGGAA		
	Probe (5'-3')	TGCGGCCAACCCCTGTTGT		
Osteocalcin	Sense (5'-3')	ACGAGCTAGCGACCACATT	67	NM_013414
	Antisense (5'-3')	CCCTAAACGGTGGTGCCATA		
	Probe (5'-3')	CTTCCAGGACGCCTACAAGCGCA		
GAPDH	Sense (5'-3')	TGCCAAGTATGATGACATCAAGAAG	71	AB017801
	Antisense (5'-3')	ACTAAAGGGCATCCTGGGCT		
	Probe (5'-3')	TGGTGAAGCAGCGGCCGA		

表2 end-point PCR用のprimer

Molecule	Primer sequence	Amplicon length	Accession no.	
Osteopontin	Sense (5'-3')	AGAGGAGAAGGCGCATTACA	498	M99252
	Antisense (5'-3')	GCAACTGGGATGACCTTGAT		
Osteocalcin	Sense (5'-3')	CATGAGGACCCTCTCTCTGC	408	NM_013414
	Antisense (5'-3')	AGCTGTGCCCTCCATACTTT		

び免疫組織化学的手法により解析した。

方 法

1. 咬合挙上

本研究における全ての動物実験は、北海道医療大学動物実験委員会の実験規定に基づき承認を得て実施された。実験動物には、生後7週齢のWistar系雄性ラット90匹を用い、未処置群0, 1, 2, 3, 4週と咬合挙上群1, 2, 3, 4週に分け、各10匹ずつ使用した。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, 松風, 京都, 日本) を用いて作製した。咬合挙上装置は、前後径5.0mm, 幅径7.0mm, 高径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, 松風) を用い、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、上顎切歯に装着した。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に調整した。

2. 定量的real time PCR解析

各実験期間終了後、ラットをイソフルラン (Mylan, Pennsylvania, USA) 吸入深麻酔下にて安楽死させ、実体顕微鏡下で下顎頭軟骨を採取した。試料からtotal RNAをRNeasy mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて抽出したのち、Omniscript RT kit (Qiagen) を用いてcDNAの調整を行った。X型コラーゲン、オステオカルシン、オステオポンチンおよびGAPDH (内的標準) のcDNAに対して連続希釈系の試料を調整し、それぞれのcDNA定量のための外的標準とした。また、これらの分子のcDNAに対する exonuclease probe (TaqMan probe, Qiagen) を作製し、プライマー (表1, 2) を用いて Step One Plus (Qiagen) で、mRNAを定量化した。

3. 免疫組織化学的解析

一部のラットよりイソフルラン (Mylan) 吸入深麻酔下にて下顎頭を摘出した。試料は4%パラホルムアルデヒド/0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.4) で24時間浸漬固定した。その後、4℃で10%EDTA (pH7.4) にて4週間脱灰し、通常に従いパラフィン包埋した。包埋した試料から矢状断 (厚さ7μm) の連続切片を作製した。切片を脱パラフィン後、37℃で1時間、0.5%ヒアルロニダーゼ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) に浸漬し、抗原

の賦活化を行った。内因性ペルオキシダーゼを不活性化する目的で、0.3%過酸化水素にて30分間処理した。その後、3%Bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) で30分間ブロッキングした。1%BSAを含むPhosphate buffered Saline (PBS, pH7.4) で1000倍に希釈したウサギポリクローナル抗ラットX型コラーゲン抗体 (LB-0092, LSL, Tokyo, Japan), マウスモノクローナル抗ウシオステオカルシン抗体 (clone OCG3, abcam, Cambridge, UK) およびウサギポリクローナル抗ラットオステオポンチン抗体 (Nakamura et al., 1997) を室温で2時間反応させた。その後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, ニチレイバイオサイエンス, 東京, 日本) を室温で1時間反応させ、Diaminobenzidine (DAB, Envision kit, DAKO, Santa Clara, USA) で免疫複合体を発色した。免疫組織化学染色した切片をメチルグリーンで核染色した。

4. アルカリ性ホスファターゼ染色

薄切切片を脱パラフィン後、Alkaline phosphatase staining kit (Merck, Kenilworth, USA) を用いて室温で2時間反応させ、アルカリ性ホスファターゼの活性を検出した。PBSによる洗浄後、メチルグリーンで核染色した。

5. 統計学的処理

すべての実験は5回以上行った。実験により得られた値は、単変量F検定とStudent's t-testで解析した。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, New York, USA) を使用した。

結 果

1. 体重変化

咬合挙上3週後は未処置群に比べ、体重が減少傾向を示した。しかし実験期間を通して、未処置群と咬合挙上群の体重に有意な変化はみられなかった (図2)。

2. 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型コラーゲンのmRNA発現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週まで発現量に有意な差は見られなかった (図3a)。また、咬合挙上群と未処置群の発現量についても有意な差は認めなかった。

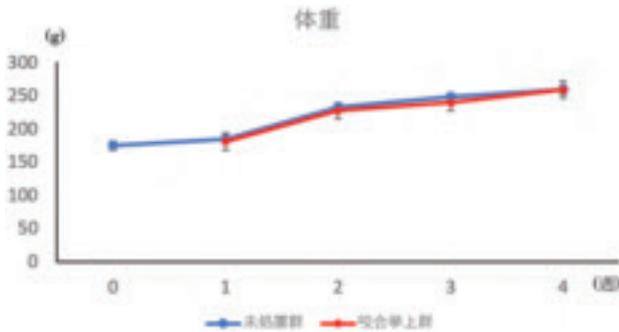


図2 実験期間における体重変化 (n=10, mean±S.D., *P < 0.05)

未処置群と咬合挙上群の体重変化に有意な変化はみられない。

3. X型コラーゲンの免疫局在

未処置群0週, 4週および咬合挙上群4週の下顎頭におけるX型コラーゲンの免疫組織化学染色像を図3b~図3dに示す。未処置群0週, 4週および咬合挙上群4

週の下顎頭はともに, 肥大軟骨細胞層でX型コラーゲンの陽性反応を示した(図3b, c, d)。また, この反応は増殖細胞層側の肥大軟骨細胞層の軟骨細胞および軟骨小腔周囲の基質で強くみられた。一方, 線維層, 増殖細胞層および骨組織では, X型コラーゲンの局在はみられなかった。

4. アルカリ性ホスファターゼ活性の局在

未処置群0週, 4週および咬合挙上群4週の下顎頭を図4a~図4cに示す。未処置群0週, 4週および咬合挙上群4週の下顎骨はともに, アルカリ性ホスファターゼ活性を肥大軟骨細胞層と骨組織で認めた(図4a, b, c)。肥大軟骨細胞層における陽性反応は, 増殖細胞層側ではほとんどみられなかったが, 骨組織に近づく軟骨細胞で強く認められた。骨組織では, 骨表面に配列する骨芽細胞が陽性反応を示したが, ほとんどの骨基質なら

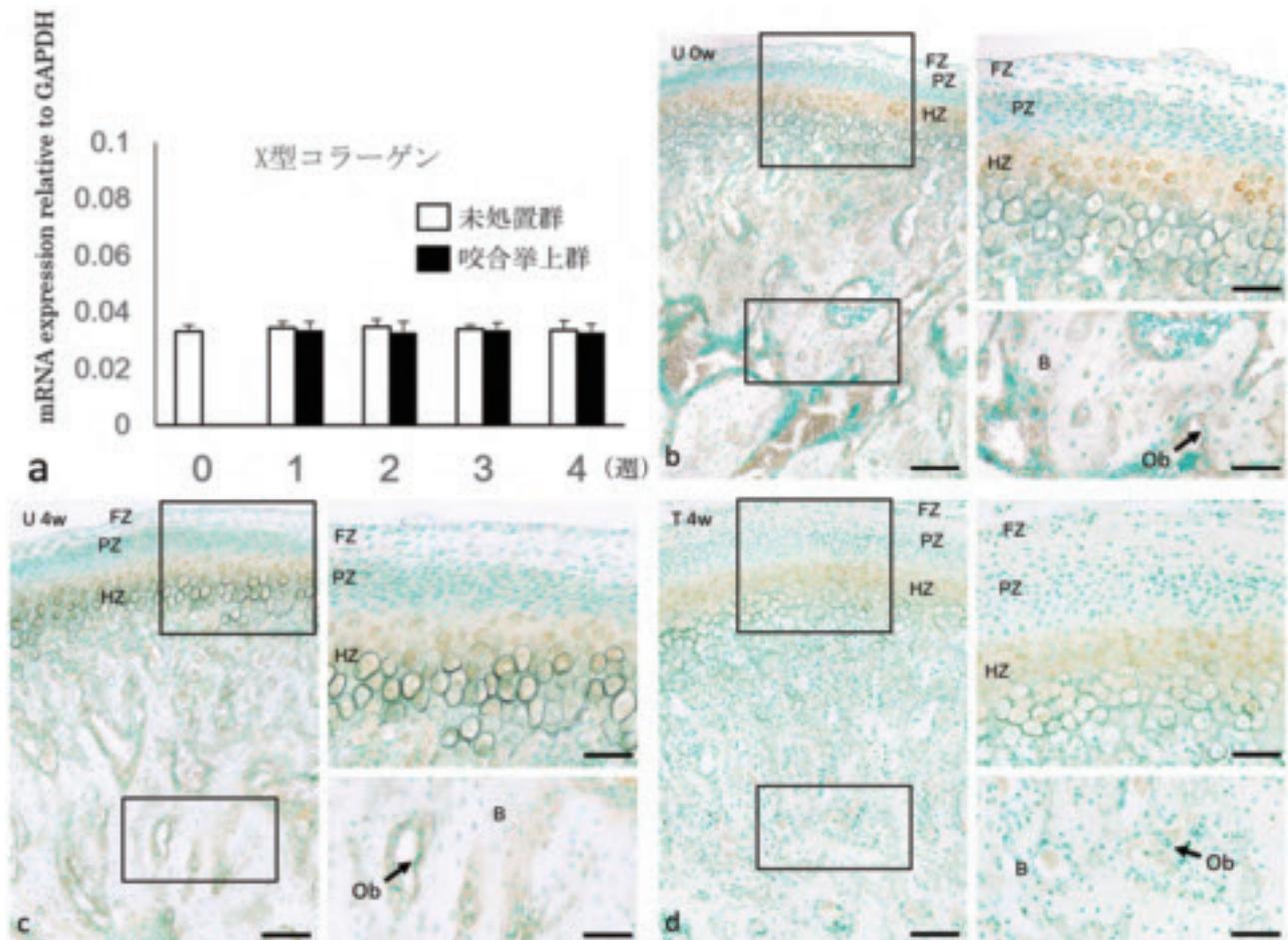


図3 X型コラーゲンのmRNA発現と免疫組織化学染色像

(a) X型コラーゲンのmRNA発現量の定量解析 (n=5, mean±S.D., *P < 0.05)

(b) 未処置群0週目 (U 0w) のX型コラーゲン局在

(c) 未処置群4週後 (U 4w) のX型コラーゲン局在

(d) 咬合挙上4週後 (T 4w) のX型コラーゲン局在

FZ: 線維層, PZ: 増殖細胞層, HZ: 肥大軟骨細胞層, B: 骨, Ob (矢印): 骨芽細胞

b, c, d: bar 100 μm. 拡大像: bar 50 μm

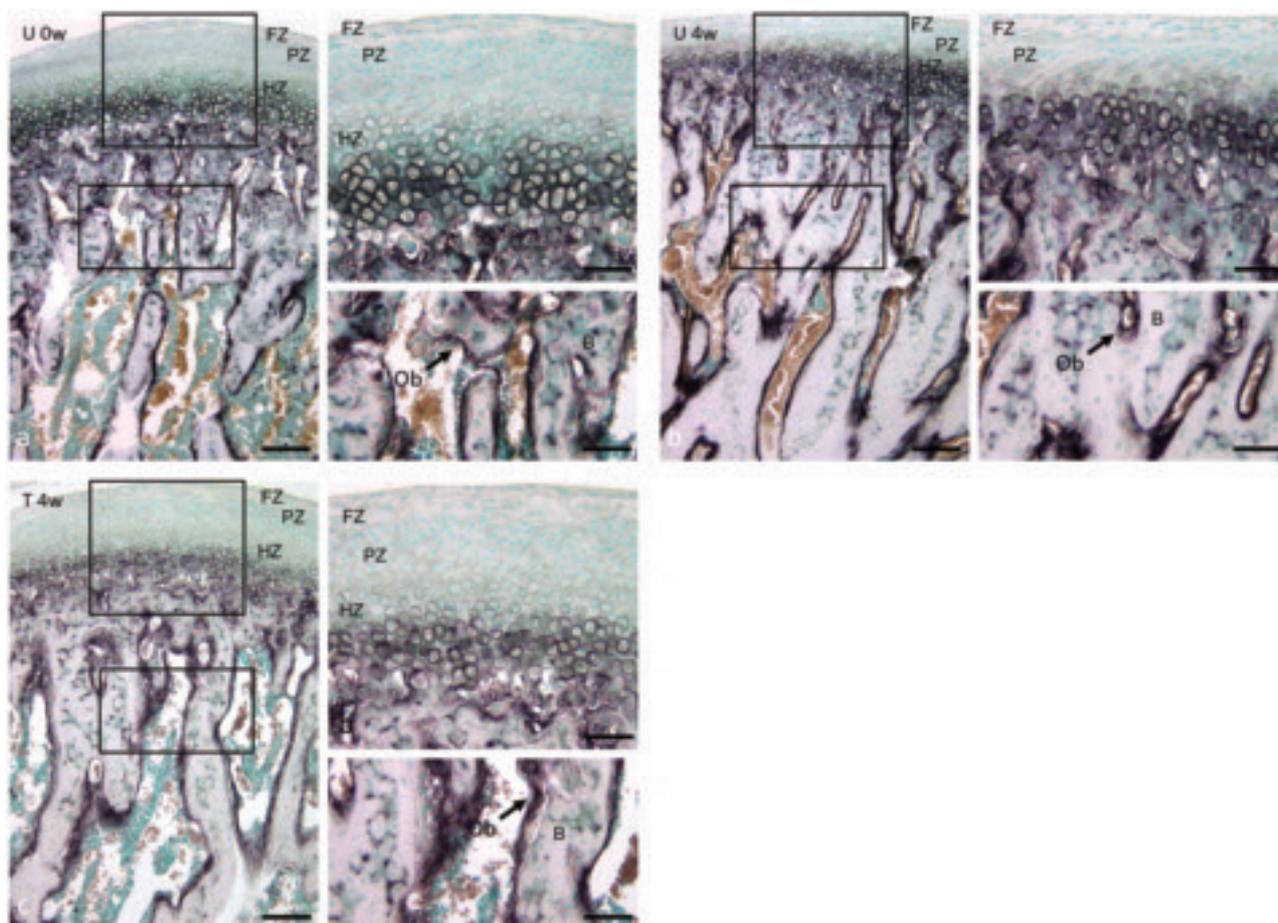


図4 アルカリ性ホスファターゼ染色

(a) 未処置群0週目 (U 0w) のアルカリ性ホスファターゼ活性の局在
 (b) 未処置群4週後 (U 4w) のアルカリ性ホスファターゼ活性の局在
 (c) 咬合挙上4週後 (T 4w) のアルカリ性ホスファターゼ活性の局在
 FZ: 線維層, PZ: 増殖細胞層, HZ: 肥大軟骨細胞層, B: 骨, Ob (矢印): 骨芽細胞
 a, b, c: bar 100 μ m. 強拡大像: bar 50 μ m

びに骨髄の細胞では陰性だった。また石灰化軟骨基質と骨基質の境界部に、線状にアルカリ性ホスファターゼ活性の反応を認めた。一方、線維層と増殖細胞層では、活性はみられなかった。

5. オステオポンチンおよびオステオカルシンのmRNA発現

オステオポンチンならびにオステオカルシンのmRNA発現は、咬合挙上群1, 2および3週後では未処置群と比較して有意な変化はみられなかった (図5 a, 6 a)。一方、咬合挙上群4週後では未処置群と比較して発現量が有意に上昇した。

6. オステオポンチンの免疫組織化学的局在

未処置群0週, 4週および咬合挙上群4週の下顎頭軟骨におけるオステオポンチンの免疫組織化学染色像を図5 b~図5 dに示す。未処置群0週, 4週では、下顎頭の

軟骨細胞ならびに軟骨基質ではオステオポンチンの陽性反応はみられなかった (図5 b, c)。また、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、石灰化軟骨基質に接する骨組織で線状に強い陽性反応がみられた (図5 b, c)。この強い陽性反応は、軟骨小腔周囲の骨基質や骨芽細胞にもみられた。咬合挙上群4週では骨組織に加えて、肥大軟骨細胞層の軟骨細胞でオステオポンチンの陽性反応がみられた (図5 d)。しかし、この反応は線維層や増殖細胞層にはみられなかった。骨基質での陽性反応は骨芽細胞および一部の骨基質で線状に認められた (図5 d)。

7. オステオカルシンの免疫組織化学的局在

未処置群0週, 4週および咬合挙上群4週の下顎頭軟骨におけるオステオカルシンの免疫組織化学染色像を図6 b~図6 dに示す。未処置群0週, 4週では、下顎頭の軟骨細胞ならびに軟骨基質において、オステオカルシン

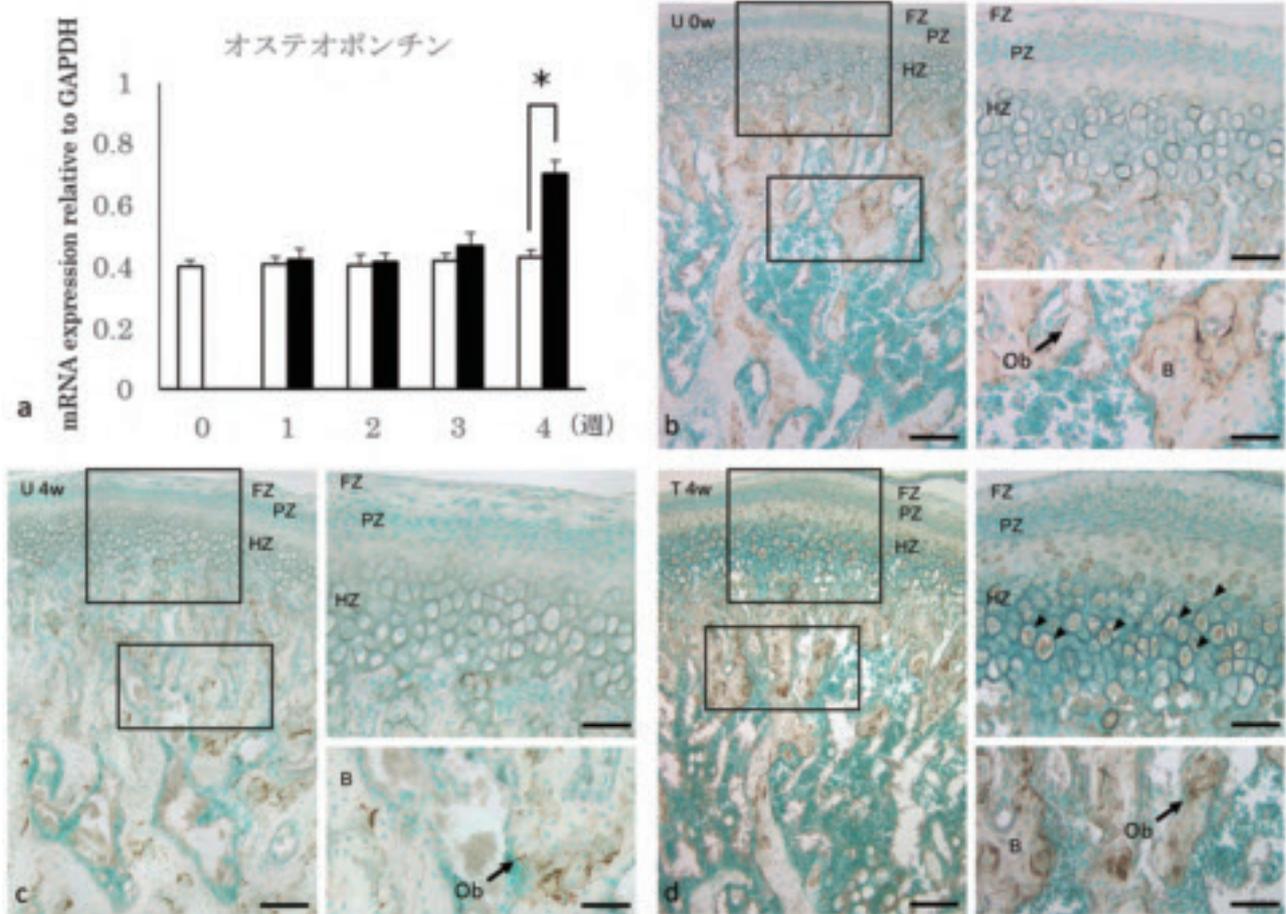


図5 オステオポンチンのmRNA発現と免疫組織化学染色像
 (a) オステオポンチンのmRNA発現量の定量解析 ($n=5$, $\text{mean}\pm\text{S.D.}$, $*P < 0.05$)
 (b) 未処置群0週目 (U 0w) のオステオポンチン局在
 (c) 未処置群4週後 (U 4w) のオステオポンチン局在
 (d) 咬合挙上4週後 (T 4w) のオステオポンチン局在
 FZ: 線維層, PZ: 増殖細胞層, HZ: 肥大軟骨細胞層, B: 骨, Ob (矢印): 骨芽細胞
 矢頭: 肥大軟骨細胞
 b, c, d: bar 100 μm . 強拡大像: bar 50 μm

の陽性反応は認められなかった (図 6 b, c). 下顎頭の骨基質には強い陽性反応が認められたが、骨髄や軟骨組織では陽性反応はほとんどみられなかった (図 6 b, c). 一次海綿骨の内部に残存する石灰化軟骨組織でもオステオカルシンの反応は認められなかったが、その軟骨を取り囲む骨基質は陽性反応を示した。また骨表面に配列する骨芽細胞も陽性であった。咬合挙上群4週のオステオカルシンの免疫局在は、骨基質や骨芽細胞で強い陽性反応を認めた (図 6 d)。また、肥大軟骨細胞においても陽性反応がみられた (図 6 d)。軟骨組織における染色性は、骨組織に比べて弱く認められた。一方、この反応は線維層や増殖細胞層ではみられなかった。

考 察

顎関節を取り巻く生体力学環境は複雑であり、圧縮力と牽引力とが複雑に作用し、領域によって異なる力学環

境を示すため、これを完全に理解することは、技術的に困難である (Hylander, 1985; Boyd et al., 1990; Kimura, 1990). 本研究では、切歯部咬合挙上モデルを用い、顎関節への荷重負荷を行い、下顎頭の性状を観察した。この実験モデルでは、関節荷重の増大により、関節円板後方肥厚部の厚径が増加し、関節円板における細胞外基質合成の量的変化が生じる (Nakao et al., 2015). また下顎頭の肥大軟骨細胞層に関節荷重が強く作用する (山口ら, 2019). さらに本研究においても、下顎頭に骨破壊が生じることなく、基質タンパク質の発現に変化が認められた。従って、この実験モデルは、顎関節に荷重負荷を与えた後の生体反応を観察する手法として有用であると考えられる。

X型コラーゲンは肥大軟骨細胞によって合成され、軟骨内骨化において重要な役割を有することが報告されている (Kwan et al., 1989; Poole & Pidoux, 1989; Schmid

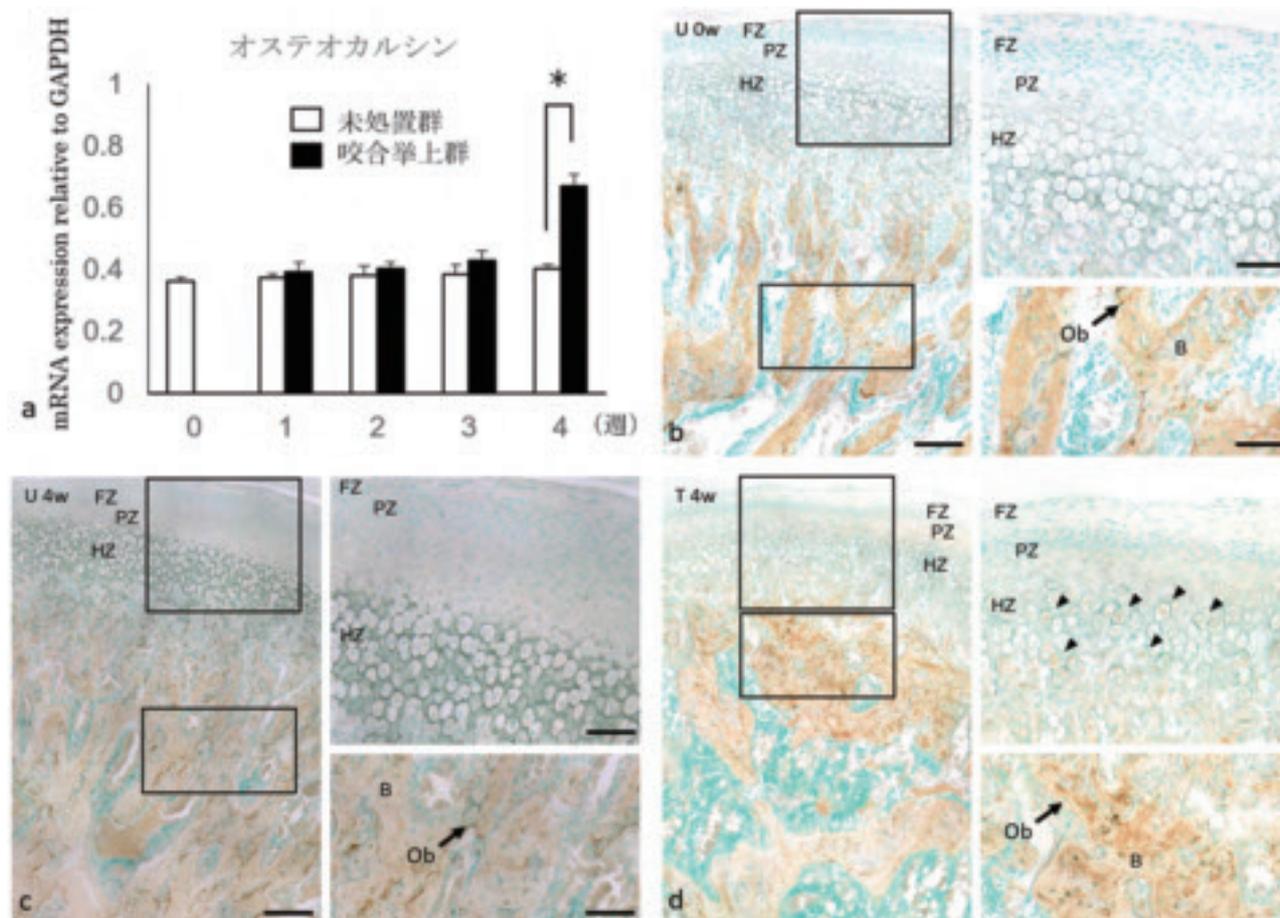


図6 オステオカルシンのmRNA発現と免疫組化染色織像

(a) オステオカルシンのmRNA発現量の定量解析 (n = 5, mean ± S.D., *P < 0.05)

(b) 未処置群0週目 (U 0w) のオステオカルシンの局在

(c) 未処置群4週後 (U 4w) のオステオカルシンの局在

(d) 咬合挙上4週後 (T 4w) のオステオカルシンの局在

FZ: 線維層, PZ: 増殖細胞層, HZ: 肥大軟骨細胞層, B: 骨, Ob (矢印): 骨芽細胞

矢頭: 肥大軟骨細胞

b, c, d: bar 100 μm. 強拡大像: bar 50 μm

& Linsenmayer, 1985; Schmid et al., 1990). またアルカリ性ホスファターゼは骨および肥大軟骨細胞層に発現し, 石灰化基質形成に関与する (Gaur et al., 2005, 2006; Golub & Boesze-Battaglia, 2007). 本研究では, 咬合挙上を4週間行っても, 下顎頭の肥大軟骨細胞層でX型コラーゲンの発現や局在に変化はみられなかった (図3). また, アルカリ性ホスファターゼの局在に変化はみられなかった (図4). 一方, ラットに抜歯を行い咬合変化させ, 下顎頭に荷重を付加させた研究 (Sasaki, 1998) では, 抜歯後24週で肥大軟骨細胞層においてX型コラーゲンの染色性が増加すると報告されている. またラットにハード食を与えることにより関節荷重を増大させた実験では, 8週後にアルカリ性ホスファターゼ活性の上昇が認められた (Bouvier, 1987). 従って本研究においては, 実験期間が4週間と短期であったため, 下顎頭軟骨におけるX型コラーゲン発現およびアルカリ性ホ

スファターゼ活性に変化は認められなかったと考えられる. 切歯部咬合挙上モデルを用いて下顎頭軟骨への荷重負荷を増大させても, 咬合挙上前から認められるX型コラーゲンとアルカリ性ホスファターゼの局在に対しては, 早期では影響が少ないと推察される.

オステオポンチンは, 骨, 象牙質, セメント質およびこれら硬組織の形成細胞に局在する (Butler, 1985; Denhardt & Noda, 1998). 一方, 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). さらに石灰化軟骨組織では, 肥大軟骨細胞が石灰化する部位に局在することが報告されている (Bronckers et al., 1985; Groot et al., 1986). このように, オステオポンチンやオステオカルシンは主として硬組織に存在し, カルシウムの沈着を制御していると考えられている (Denhardt & Guo, 2000; Hauschka et al., 1989). 本研究では, 咬合挙上4週後の下顎頭軟骨にお

いて、オステオポンチンおよびオステオカルシンの発現が未処置群と比較して有意に上昇した。また免疫組織化学的な観察により、咬合挙上4週後の肥大軟骨細胞や軟骨小腔周囲の基質でこれらタンパク質の局在が認められた。過去の研究において、肥大軟骨細胞を*in vitro*で石灰化誘導すると、オステオポンチンとオステオカルシンの発現が上昇することが報告されている (Lian et al., 1993)。子宮内のマウス胎児では、下顎頭の未分化間葉系細胞を培養することにより、骨の表現型を発現すると報告されている (Silbermann et al., 1983; Strauss et al., 1990)。下顎骨は中胚葉起源であり (Hall, 1987)、軟骨細胞が骨関連タンパク質を発現する可能性を示唆されている。下顎頭軟骨は線維層、増殖細胞層、肥大軟骨細胞層で構成されているが (McNamara & Carlson, 1979)、増殖細胞層には未分化間葉系細胞が存在し、骨芽細胞と軟骨細胞への分化能を有している (Strauss et al., 1990)。また下顎頭軟骨は生体力学的环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, 1973)、それに最も寄与しているのは未分化間葉系細胞である (Strauss et al., 1990)。従って、下顎頭に関節荷重を負荷すると、機械的刺激により下顎頭軟骨における未分化間葉系細胞が骨様特性を有する肥大軟骨細胞に分化したと考えられる。しかし、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、骨構造の変化も検討していく必要がある。

結 論

ラット顎関節に咬合挙上による力学的負荷を加えると、下顎頭においてオステオポンチンとオステオカルシンの発現が上昇することが示された。また、これらの非コラーゲン性タンパク質は肥大軟骨細胞層の軟骨小腔周囲の基質に局在することが明らかになった。従って、咬合挙上の機械的刺激により下顎頭軟骨における未分化間葉系細胞が骨様特性を有する肥大軟骨細胞に分化することが示唆された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、オステオポンチン抗体を供与いただきました松本歯科大学の中村浩彰教授に感謝申し上げます。また本研究に際しご指導ご鞭撻を賜りました、東北大学大学院歯学研究科顎口腔矯正学分野の溝口到教授に心より感謝の意を表します。

参 考 文 献

Boivin, G., Morel G, Lian J, Dubois P & Meunier P. Ultra-

structural-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 : 427-31, 1987.

Bouvier, M. Variation in alkaline-phosphatase activity with changing load on the mandibular condylar cartilage in the rat. Archives of oral biology, 32, 671-675, 1987.

Boyd RL, Gibbs CH, Mahan PE, Richmond AF & Laskin JL. Temporomandibular joint forces measured at the condyle of Macaca arctoides. Am J Orthod Dentofacial Orthop 97 : 472-479, 1990.

Bronckers ALJJ, Gay S, Dimuzio MT & Butler WT. Immunolocalization of gamma-carboxyglutamic acid containing proteins in developing rat bones. Coll Relat Res 5 : 273-281, 1985

Butler. Immunolocalization of gamma-carboxyglutamic acid containing proteins in developing rat bones. Collagen Related Res. 5 : 273-81, 1985.

Chayanupatkul A, Rabie AB & Hägg U. Temporomandibular response to early and late removal of bite-jumping devices. Eur J Orthod 25 : 465-470, 2003.

Copray, J. C. V. M., Dibbets, J. M. H., & Kantomaa, T. The role of condylar cartilage in the development of the temporomandibular joint. The Angle orthodontist 58 : 369-380, 1988.

Copray JC & Liem RS. Ultrastructural changes associated with weaning in the mandibular condyle of the rat. Acta Anat 134 : 35-47, 1989.

Denhardt D. T., & Noda M. Osteopontin expression and function : role in bone remodeling. Journal of Cellular Biochemistry 72, 92-102, 1998.

Denhardt DT & Guo X. Osteopontin : a protein with diverse functions. Oral Biology & Medicine 11 : 279-303, 2000.

Gaur T, Lengner CJ & Hovhannisyan H. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. J Biol Chem 280 : 33132-40, 2005.

Gaur T, Rich L & Lengner CJ. Secreted frizzled related protein 1 regulates Wnt signaling for BMP2 induced chondrocyte differentiation. J Cell Physiol 208 : 87-96, 2006.

Golub, E. E., & Boesze-Battaglia, K. The role of alkaline

- phosphatase in mineralization. *Current opinion in Orthopaedics* 18, 444–8, 2007.
- Gorski JP. Acidic phosphoproteins from bone matrix : a structural rationalization of their role in biomineralization. *Calcif Tissue Int* 50 : 391–396, 1992.
- 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 : 379–85, 1986.
- Hall B. K. Earliest evidence of cartilage and bone development in embryonic life. *Clinical orthopaedics and related research* 225 : 255–272, 1987.
- Hauschka, P. V., Lian, J. B., Cole, D. E., & Gundberg, C. M. Osteocalcin and matrix Gla protein : vitamin K–dependent proteins in bone. *Physiological reviews* 69 ; 990–1047, 1989.
- Heeley, J. D. Maturation of rat, monkey and human condylar cartilage. *J Dent Res* 64 : 1717, 1985.
- Huang, J., Ballou, L. R., & Hastay, K. A. Cyclic equibiaxial tensile strain induces both anabolic and catabolic responses in articular chondrocytes. *Gene* 404, 101–9, 2007.
- Hylander WL. Mandibular function and temporomandibular joint loading. *Aspects of Temporomandibular Joint Disorders* : 19–35, 1985.
- Imamura M. Cellular responses of condylar cartilage induced by mandibular displacement in rats. *J Stomatol Soc Jpn* 40 : 457–475, 1973.
- Kimura A. Stress analysis of the temporomandibular joint by finite element method. *J Jpn Oral Surg* 36 : 1180–1196, 1990.
- Kwan, A. P., Dickson, I. R., Freemont, A. J., & Grant, M. E. Comparative studies of type X collagen expression in normal and rachitic chicken epiphyseal cartilage. *The Journal of cell biology* 109, 1849–56, 1989.
- Lian, J. B., McKee, M. D., Todd, A. M., & Gerstenfeld, L. C. Induction of bone-related proteins, osteocalcin and osteopontin, and their matrix ultrastructural localization with development of chondrocyte hypertrophy in vitro. *Journal of cellular biochemistry*, 52, 206–19, 1993.
- Lubsen, C. C., Hansson, T. L., Nordström, B. B., & Solberg, W. K. Histomorphometric analysis of cartilage and subchondral bone in mandibular condyles of young human adults at autopsy. *Archives of oral biology* 30 : 129–136, 1985.
- 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.
- Nakamura, H., Yamada, M., Fukae, M., & Ozawa, H. The localization of CD44 and moesin in osteoclasts after calcitonin administration in mouse tibiae. *Journal of bone and mineral metabolism* 15 ; 184–192, 1997.
- Nakao, Y., Konno–Nagasaka, M., Toriya, N., Arakawa, T., Kashio, H., Takuma, T., & Mizoguchi, I. Proteoglycan expression is influenced by mechanical load in TMJ discs. *Journal of dental research* 94, 93–100, 2015.
- Poole A. R., & Pidoux, I. Immunoelectron microscopic studies of type X collagen in endochondral ossification. *The Journal of cell biology* 109, 2547–54, 1989.
- 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.
- Schmid T M & Linsenmayer T F. Immunohistochemical localization of short chain cartilage collagen (type X) in avian tissues. *J Cell Biol* 100 : 598–605, 1985.
- Schmid, T. M., Popp, R. G., & Linsenmayer, T. F. Hypertrophic Cartilage Matrix : Type X Collagen, Supramolecular Assembly, and Calcification a. *Annals of the New York Academy of Sciences* 580, 64–73, 1990.
- Silbermann, M., Lewinson, D., Gonen, H., Lizarbe, M. A., & von der Mark, K. In vitro transformation of chondroprogenitor cells into osteoblasts and the formation of new membrane bone. *The Anatomical Record* : 206. 373–383, 1983.
- Strauss E, Satz P & Wada J. An examination of the crowding hypothesis in epileptic patients who have undergone the carotid amygdal test. *Neuropsychologia* 28 : 1221–1227, 1990.
- Xiong H, Hägg U, Tang GH, Rabie AB & Robinson W. The effect of continuous bite–jumping in adult rats : a morphological study. *Angle Orthod* 74 : 86–92, 2004.
- Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM & Robey PG. Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop* 281 :

275-294, 1992.

山口 優, 檜尾 治奈, 中尾 友也, 飯嶋 雅弘. 顎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. 北海道医療大学歯学雑誌38(1): 10-20, 2019.



尾立 卓弥

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 任期制助手

平成26年3月 北海道大学歯学部 卒業

平成31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31年4月 北海道医療大学歯科矯正学分野 任期制助手