

〔原著〕

成長期ラット顎関節円板におけるproteoglycanのmRNA発現

甲田 尚央¹⁾, 鳥谷奈保子¹⁾, 荒川 俊哉²⁾, 田隈 泰信²⁾, 溝口 到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生物学系生化学分野

mRNA expression of proteoglycans in temporomandibular joint disc of growing rats

Naohisa KOHDA¹⁾, Naoko TORIYA¹⁾, Toshiya ARAKAWA²⁾, Taishin TAKUMA²⁾ and Itaru MIZOGUCHI¹⁾¹⁾Department of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido.²⁾Department of Biochemistry, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido.

Abstract

It is well known that proteoglycans can be divided into small leusine-rich proteoglycans (SLRPs) and large modular proteoglycans, which are composed of various functional domains, and play crucial roles in cellular proliferation, cellular attachment, and matrix assembly. In addition, proteoglycans provide tissue integrity when subject to shearing and compressive forces via the glycosaminoglycan (GAG) chains linked to their core protein. This study analyzes the growth related changes in extracellular matrix components in temporomandibular joint (TMJ) discs, the expression of four SLRPs, including decorin, biglycan, fibromodulin, and lumican, and a modular proteoglycan, versican, in rat TMJ discs during the postnatal growth stage using real-time quantitative PCR (QPCR). Male Wistar rats at 2, 4, 8, and 16 weeks after birth were used in this study. Total RNA was extracted from the TMJ discs and used to generate cDNA. Quantification of target transcripts was performed by real-time PCR with SYBR Green I and/ or TaqMan probe. The copy number of the target transcript was determined using an external standard, which was serially diluted from 10^8 copies down to 10^1 copies, and calculated as the number of copies of proteoglycan per 10^3 copies of the internal standard, GAPDH. The real-time QPCR indicated that mRNA expression of decorin peaked at 2 weeks and gradually decreased after that. The mRNA expression levels of biglycan, fibromodulin, and lumican decreased with growth. The mRNA expression of biglycan was highest and the other three SLRPs showed similar expressions. The mRNA expression levels of V0, V1, and V3 isoforms decreased with growth, while the mRNA expression of the V2 isoform peaked at 8 weeks. Among the four versican isoforms, mRNA expression of the V1 isoform was predominant from 2 to 16 weeks. These results indicate that there are growth-related changes in mRNA expression of proteoglycans in the TMJ discs of growing rats.

Key words : Proteoglycan · Real-time quantitative PCR · Temporomandibular joint disc

緒 言

顎関節は、側頭骨と下顎骨と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および機能を有する (Bell, 1990)。顎関節は、解剖学的には側頭骨下顎窩、

関節結節、下顎骨下顎頭、関節円板、円板後部組織、滑膜および靱帯等から構成され、機能的には螺旋運動と滑走運動が複合した運動様式を呈し、ginglymoarthrodial jointに分類される。

顎関節の構成要素のひとつである顎関節円板は、下顎

受付：平成20年 9 月30日

頭と側頭骨関節窩の間に介在する陥凹形の線維性緻密結合組織であり、関節表面を被覆し、関節腔を上下に分けている。上関節は主に滑走運動を、下関節は蝶番運動を営む (Bell, 1990)。関節円板は、顎関節の滑走、蝶番運動によって生じる複雑な生力学的力のshock absorberとして働き (Kimura, 1990; Hart et al., 1992; Koriath et al., 1992; Tanaka et al., 1994)、また、関節運動を円滑に行うために下顎頭のdestabilizerとして機能している (Osborn, 1985)。関節円板が、損傷を受けると円板の変形、変位あるいは穿孔をきたし、顎運動の障害 (関節内障) や疼痛を引き起こす可能性がある (Scapino, 1983; Osborn, 1985; De Bont et al., 1986, Stegenga et al.; 1991)。

一方、顎関節円板における主要な細胞外基質は、collagenとproteoglycanであり (Kopp, 1976; Scapino, 1983; Mills et al., 1988; 1994; Milam et al., 1991)、一般的にcollagen線維は牽引に対する抵抗性を、proteoglycanはそれに結合する糖鎖 (glycosaminoglycan; GAG) を介して剪断、圧縮に対する耐性を組織に付与し、それぞれの組織での機械的特性に寄与していることが知られている (Tanaka et al., 2003)。

Proteoglycanは、core proteinと呼ばれる1本のポリペプチド鎖に1本以上のGAG鎖が付着し共有結合した複合糖鎖の一種である。近年、proteoglycanとcore proteinの遺伝子配列の解析が進み、様々なproteoglycanの存在が明らかになっている (Zimmermann et al., 1994; Iozzo and Murdoch, 1996)。Proteoglycanは、core proteinのアミノ酸配列の構造的な特徴から、小型のsmall leucine rich proteoglycan (SLRPs) と様々な機能を有したdomainが連結した大型のmodular proteoglycanの2つに分類される (Iozzo and Murdoch, 1996)。前者にはdecorin, bigly-

can, fibromodulin, lumicanなどが含まれ、後者には軟骨組織に特徴的なaggrecan、線維芽細胞が産生するversican、脳組織に特異的なbrevican, neurocanなどが属している (Zimmermann et al., 1994; Iozzo and Murdoch, 1996)。

SLRPsは40kD前後の短いcore proteinを有し、6から10個の繰り返し構造であるleucine-rich repeatを含む (Henly et al., 2001; Tasheva et al., 2004)。Leucine-rich repeat domainは、cystein残基を含むN末端とC末端には含まれている。Decorinとbiglycanは、core proteinにdecorinは1本、biglycanは2本のdermatan sulphateあるいはchondroitin sulphate鎖がserine残基に結合した構造をしている (Chopra et al., 1985; Krusius and Ruoslahti, 1986; Fisher et al., 1989)。またfibromodulinは4本、lumicanは2本から3本のkeratan sulphate鎖が結合した構造をしている (Plaas et al., 1990; Blochberger et al., 1992)。Decorinは、軟骨、骨、腱、皮膚、象牙質などの組織に、biglycanは、軟骨、骨、骨格筋、血管内膜などの組織に、fibromodulinは、軟骨、腱、皮膚などの組織に、lumicanは、角膜、筋肉、腸、軟骨などの組織に広く分布し、様々な生物学的機能を果たしていることが知られている (Bianco et al., 1990)。これらのSLRPsは、細胞外基質に存在し、それぞれcollagen線維との結合能を有し (Vogel et al., 1984; Scott et al., 1989; 1995; Pringle and Dodd, 1990)、collagen線維の形成速度や線維間の距離、線維の太さなどの調節を行い、組織の機械的特性等に重要な役割を果たしている (Vogel et al., 1984; Scott et al., 1995; Danielson et al., 1997; Kuc and Scott, 1997)。また、TGF- β などの成長因子との結合能を有し、細胞増殖や基質形成などの細胞機能に重要な役割を果たしているとされている (Bianco et al.,

表1 Small leucine rich proteoglycan と GAPDH の primer の配列 (SYBR Green I による QPCR 用)

	sequence	length (mer)	Tm (°C)	amplicon size (bp)
decorin (#X59859)	tgcccgaataattgcccaaac	22	56.7	180
	atccgagacccttcattccctg	22	60.4	
biglycan (#U17834)	cctactgggaagtgcagcct	20	58.0	67
	tttccaaattggatggcca	19	58.0	
fibromodulin (#X82152)	agaagatccctcccgtcaacac	22	60.4	153
	gcttgatctcgttcccatccag	22	60.4	
lumican (#X84039)	tcgcttcaccgggcttc	17	59.0	70
	gtttccaggcacgccact	18	58.0	
GAPDH (#AB017801)	gaaggtcgggtgtaacggatt	21	58.5	212
	tgatgggtttcccggtgatg	20	56.3	

() 内は GenBank accession number を示す。

表2 VersicanとGAPDHのprimerおよびprobeの配列 (TaqMan probeによるPCR用)

versican (#AF072892)		sequence	length (mer)	Tm (°C)
forward primer	VC-F	cctgcaagaagggaacagttg	21	58.5
	F-0	aaaacaacttccaaacctcaagagtt	26	55.8
	F-1	gggtgagaacctgtatcgt	20	55.4
reverse primer	VC-R	ttccaaaggcttgccatttc	22	54.8
	R-0	cctcactgtgatatagtctatttcg	26	57.3
	R-2	gtaggatagcaggtgcctccat	22	60.4
probe	Taq-VC	tgccgccaacccccctgtgt	20	62.5
	TaqR-116	gtcagggtggaatttggtccctgcc	26	65.2
	TaqR-141	cagtaggcataaatctatcagggagagg	30	65.7
	Taq-183	tgatctctgcaaaacacccatgcct	27	60.5

GAPDH (#AB017801)		sequence	length (mer)	Tm (°C)
forward primer		tgccaagtatgatgacatcaagaag	25	57.2
reverse primer		agcccaggatgcccttagt	20	58.4
probe		cctggccaaggtcatccatgacaacttt	27	63.5

() 内は GenBank accession number を示す.

表3 Versicanに対するprimerとprobeの組合せ (TaqMan probeによるQPCR用)

	primer combination	probe	amplicon size (bp)
VC	VC-F and VC-R	Taq-VC	66
V0	F-0 and R-0	TaqR-116	268
V1	F-1 and R-0	TaqR-141	240
V2	F-0 and R-2	Taq-183	161
V3	F-1 and R-2	Taq-183	133

VC: 4 つの isoform (V0 から V3) に共通の C 末端

表4 Real-time QPCRの反応条件

SYBR Green I 法

	initial	3-step cycling			final
	activation step	denaturation	annealing	extention	extention
temperature	95°C	94°C	52~55°C	72°C	72°C
incubation time	15 min	1 min	1 min	1 min	10 min
PCR cycles	1		50		1

TaqMan probe 法

	initial	2-step cycling		final
	activation step	denaturation	annealing / extention	extention
temperature	95°C	95°C	60°C	—
incubation time	10 min	15 sec	1 min	—
PCR cycles	1		50	

1990; Scott et al., 1995). 他には, 石灰化過程の制御因子としての作用も有していることが報告されている (Scott and Haigh, 1985).

一方, modular proteoglycanに属するversicanは線維芽

細胞から産生され (Zimmermann and Ruoslahti, 1989), core proteinの分子量は350から500kDに達し, 最大で20本前後のchondroitin sulphate側鎖を有する (Yamagata et al., 1993; Shinomura et al., 1993; Zimmermann et

al., 1994; Ito et al., 1995). VersicanはN末端側からヒアルロン酸結合部位 (HABR), GAG鎖が結合するGAG- α domainとGAG- β domain, およびC-terminalから成り, GAG鎖結合領域のsplicingによる4つのisoform, V0, V1, V2およびV3が存在することが報告されている (Shinomura et al., 1993; Zimmermann et al., 1994; Ito et al., 1995; Zako et al., 1995; Sztrlovics et al., 2002). Versicanは, 脳, 軟骨, 大動脈, 皮膚, 腱等の様々な組織に分布し (Yamagata et al., 1993; Zimmermann et al., 1994), 組織の形態維持, 細胞増殖 (Yamagata et al., 1993; Zimmermann et al., 1994), 細胞接着 (Yamagata et al., 1989; 1993; 1994; Ang et al., 1999), 細胞遊走 (LeBaron et al., 1992; Landolt et al., 1995) などの機能に参与している。

顎関節円板において, proteoglycanのcore proteinとそれらに関連したGAG鎖は, 生化学的分析によって検討されている (Mills et al., 1988; 1994; Scott et al., 1989; 1995; Nakano and Scott, 1989a; 1996; Nakano et al., 1993; Carvalho et al., 1995). Decorinとbiglycanの局在は顎関節円板の中央部と周辺部において異なり, その領域差は, 顎関節における複雑な生体力学的环境要因を反映していると考えられている (Scott et al., 1995; Mizoguchi et al., 1998). しかし, proteoglycanの局在あるいはその成長に伴う変化に関しては不明である。

そこで本研究では, 成長期ラット顎関節円板の細胞外基質の成長変化について検討することを目的とし, 実験動物に生後2週から16週の雄性Wistar系ラットを用い, real-time quantitative polymerase chain reaction (real-time QPCR) 法により, SLRPsに属するdecorin, biglycan, fibromodulinおよびlumicanと, modular proteoglycanに属するversicanのmRNA発現の変化を検討した。

実験動物および方法

実験動物には, 生後2週, 4週, 8週および16週齢の雄性Wistar系ラットを用いた。なお, すべての実験動物の取り扱い, 北海道医療大学動物実験の指針に基づき行った。

1. Total RNAの抽出とreverse transcription (RT) 反応

各週齢のラットより採取した顎関節円板からRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてtotal RNAを抽出した。なお, genomic DNAの試料への混入を防止するため, total RNAの抽出過程でRNase-free DNase

(Qiagen) 処理を行った。抽出されたtotal RNAに対しOmniscript reverse transcriptase protocol (Qiagen) を用いてRT反応を行った。

2. Primerの設計

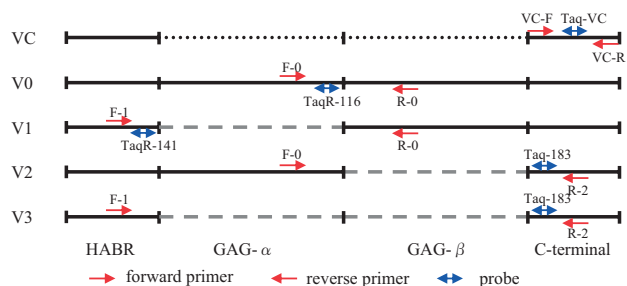
各SLRPsおよびinternal standardとしてのGAPDHを検出できるprimerを設計した (表1)。また, versican isoform (V0, V1, V2およびV3) の検出にTaqMan probe (exonuclease probe) を使用するため, primerとprobeを設計した (表2)。Versican isoformの識別のためには, 4種類のprimerと3種類のprobeとの組合せを適用した (表3)。Versican isoformのprimerとTaqMan probeの位置および組合せは図1に示す。Primerの設計には専用設計ソフト, Primer Express software (version2.0, Applied Biosystems, Foster, CA, U.S.A.) を用いた。

3. External standardの作製

生後2週齢のラット脳組織から抽出したtotal RNAをRT反応後, 各々に対応するprimerを用いてPCR産物を作製し, QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) を用いてPCR産物を精製した。精製した各々のPCR産物およびvector pT 7 T 3 (Qiagen) を2つの制限酵素, Hind III (Gibco BRL, Rockville, MD, U.S.A.) およびEcoR I (Gibco BRL) で処理後subcloningし, 10^1 から 10^8 コピー数の連続希釈系試料を作製しexternal standardとした。

4. 顎関節円板におけるmRNA発現の定量

生後2週, 4週, 8週および16週齢のラットより摘出した関節円板からtotal RNAを抽出し, RT反応およびreal-time QPCRを行った (表4)。各種SLRPsの検出にはSYBR Green I法を用い, versican isoformの検出にはTaqMan probe法を用いた。各種proteoglycanおよびGAPDHに対するcDNAの 10^1 から 10^8 コピー数の連続希釈系試料 (external standard) により, 得られたstandard curveからの数値を用い両分子のmRNAを定量化後,



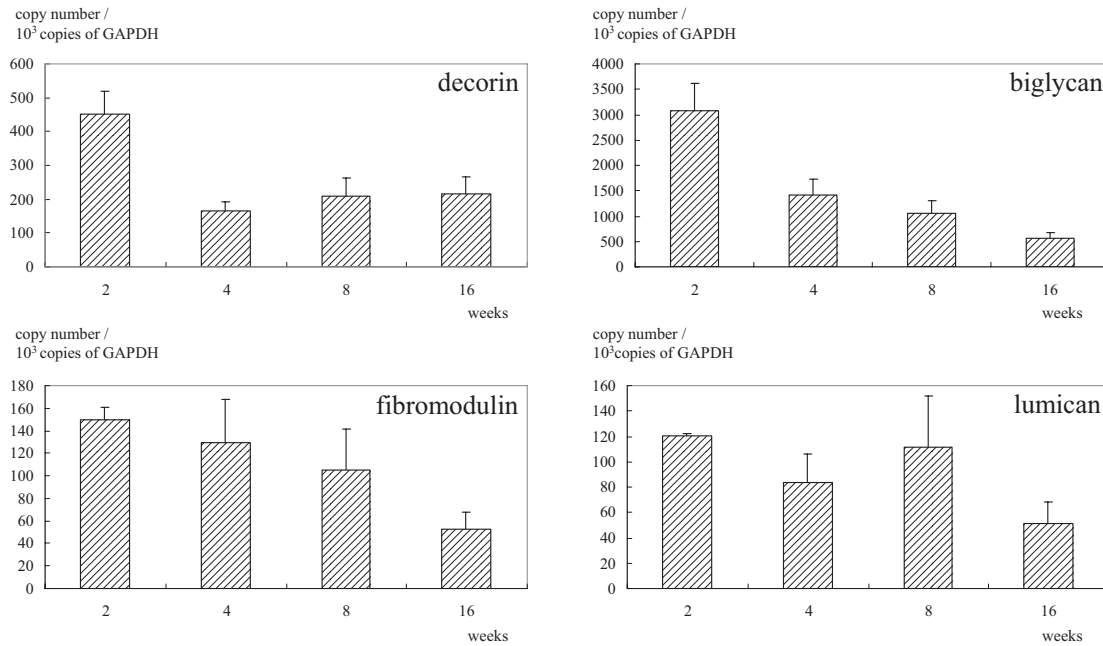


図2 顎関節円板におけるsmall leucine rich proteoglycanのmRNA発現の成長変化 (n=3 experiments; mean±S.E.)

DecorinのmRNA発現量は2週齢が最も多く、その後減少して一定量に推移した。一方、biglycan、fibromodulinおよびlumicanのmRNA発現は2週齢に最も多く、その後成長に伴い徐々に減少した。

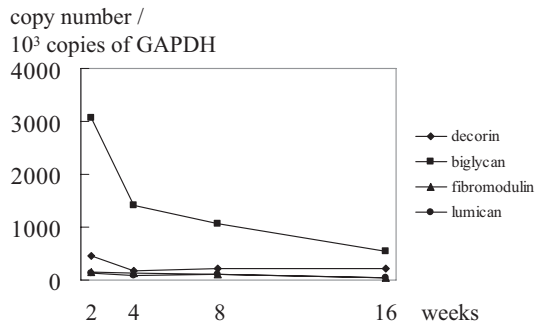


図3 顎関節円板におけるsmall leucine rich proteoglycanのmRNA発現の成長変化

Biglycanが最も多く、他のSLRPsの6倍以上の発現であった。Decorin、fibromodulinおよびlumicanの発現量は同程度であった。

GAPDH10³コピー数に対するproteoglycan cDNAのコピー数を算出した。検出にはGeanAmp5700Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いた。

結 果

QPCRの定量の結果、decorinのmRNA発現量は2週齢が最も多く、その後減少して一定量に推移した。一方、biglycan、fibromodulinおよびlumicanのmRNA発現は2週齢に最も多く、その後成長に伴い徐々に減少した(図2)。また4種のSLRPsにおけるmRNA発現量は、biglycanが最も多く、他のSLRPsの6倍以上の発現であった。Decorin、fibromodulinおよびlumicanの発現量は同程度であった(図3)。Versican isoformのmRNA発現量は、V0、V1およびV3は成長に伴い減少し、V2は8週齢にピークを示した(図4)。4つのisoformの中で

は、生後2週から16週の期間を通して、V1のmRNA発現量がversican全体のmRNA発現に占める割合が大きかった(図5)。

考 察

1. Quantitative PCRを用いたmRNAの定量方法

Quantitative PCRには、(1) double strand DNAに結合することによって蛍光を生じるSYBR Green Iという色素を用いる方法、(2) forwardおよびreverse primer間に特異的な配列のTaqMan probe (exonuclease probe) の両端に蛍光色素とそのquencher色素を付けたprobeを用い、Taq polymeraseによるprobeの加水分解の結果として蛍光を発することを利用する方法、および(3) primer間に特異的な配列をもつ2つのhybridization probeを反応させFRET反応を利用する方法の3つがある(Wittwer et al., 2001)。

本研究においてversican isoformに適用したTaqMan probe法では、primer dimerおよび非特異的なPCR産物が反応中に形成されても、目的とするcDNAに特異的なprobeがそれらには結合しないため、特異的かつ感度の高い手法であるとされている(Yin et al., 2001)。本研究においてもGeneAmp5700を用いてTaqMan probe法を適用した場合には、少なくとも10³コピー数までのcDNAの定量が可能であることが明らかになった(data not shown)。

本研究では、SLRP mRNA発現の定量にはSYBR Green I法を、versican isoformに関してはTaqMan probe法を用

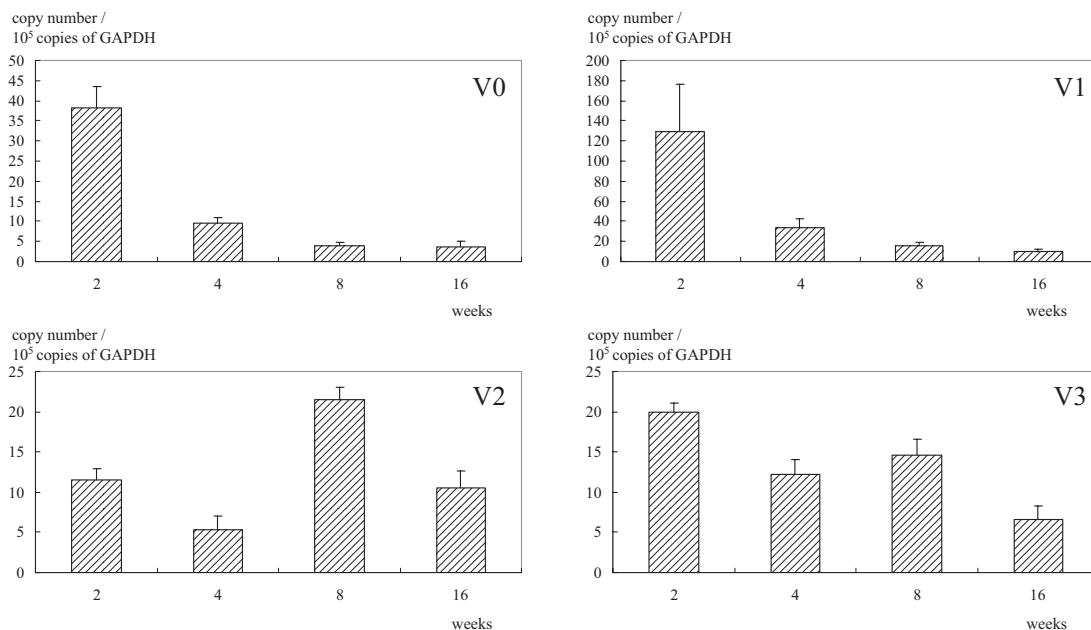


図4 顎関節円板におけるversican isoformのmRNA発現の成長変化 (n=5 experiments; mean±S.E.)
V0, V1およびV3は成長に伴い減少し, V2は8週齢にピークを示した。

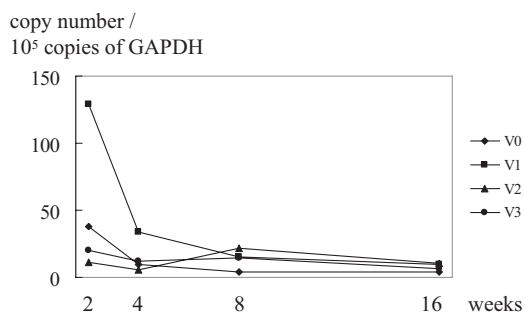


図5 顎関節円板におけるversican isoformのmRNA発現の成長変化
生後2週から16週の期間を通して, V1のmRNA発現量がversican全体のmRNA発現に占める割合が大きかった。

いた。前者のSYBR Green I法は、特別にprobeを作製する必要がなく簡便で比較的安価な方法ではあるが、dimerおよび非特異的なPCR産物に結合して蛍光を生じ、その結果としてmRNAの定量性が低下する可能性が指摘されている。この点に関して、Yinら（2001）は、PCR反応液内の目的cDNAが 10^3 コピー数以上であれば両者の定量性に差はほとんど認められないが、低コピー数のcDNAを定量する場合には、より感度の高いTaqMan probe法を選択する必要があることを指摘している。本研究では、versican isoformの定量においてmRNAの検出量がSYBR Green Iの検出限界である反応液中の目的cDNAのコピー数が 10^3 を下回ったため、SLRPおよびversicanの総発現量の定量にはSYBR Green Iを用い、versican isoformの定量にはTaqMan probe法を利用し良好な結果を得た。

2. DecorinとbiglycanのmRNA発現

DecorinはI型、II型、III型collagen, fibronectinなど、他の細胞外基質との結合能を有し、基質形成、細胞接着、細胞増殖などに関与していることが知られている（Vogel et al., 1984; Scott and Haigh, 1985; Pringle and Dadd, 1990; Scott et al., 1995）。Vogelら（1984）は、ウシ腱から抽出したdecorinの存在下ではcollagen原線維の形成速度が抑制され、また形成されたcollagen原線維の直径も減少することを初めて報告した。一方、KucとScott（1997）はウシ関節円板あるいは皮膚から抽出したdecorinを用いた同様の研究から、decorinはcollagen原線維の直径を増加させることを示した（Kuc and Scott, 1997）。このように、decorinのcollagen原線維形成に及ぼす影響に関しては統一された見解が得られずにいたが、最近のdecorinのknockout mouseを微細構造学的に検討した研究から、decorinが欠如した状態では、collagen原線維の直径には大きな影響がないものの、原線維の太さが不均一になることが明らかにされた（Danielson et al., 1997）。

ヒト関節軟骨におけるbiglycanの遺伝子発現を調べた研究によると、biglycanの発現は成長に伴い減少することが報告されている（Roughley et al., 1994）。一方、decorinは骨、軟骨、靱帯、真皮などの組織に広く分布し（Chopra et al., 1985; Bianco et al., 1990; Scott et al., 1981）、一般的に加齢に伴い増加傾向を示すことが報告されている（Bianco et al., 1990; Scott et al., 1981）。

ラット関節円板の蛋白発現の所見では、biglycanは生

直後からはほぼ一定であり, decorinは成長に伴い増加傾向を示している (Kuwabara et al., 2002). Decorinとbiglycanは, 関節円板においてchondroitin sulphateではなくdermatan sulphateを側鎖に持ち (Scott et al., 1995), dermatan sulphateはラット顎関節円板では成長に伴って増加傾向を示すことが報告されている (Kuwabara et al., 2002).

本研究においては成長に伴い, ラット顎関節円板のmRNA発現量は, decorinは2週齢が最も多く, その後減少して一定量に推移し, また, biglycanも2週齢が最も多いが, その後成長に伴い減少していた. また, 株化骨芽細胞様細胞 (MC 3 T 3 -E 1) を用いた研究では, mRNAの発現量はbiglycanがdecorinの60から80倍多いことが報告されているが (泰間ら, 2006), 本研究でもbiglycanが最も多く他のSLRPsの6倍以上の発現であった.

3. FibromodulinとlumicanのmRNA発現

Fibromodulinは, 関節軟骨と腱から初めて単離され, 腱, 皮膚, 筋肉, 強膜, 角膜などの間質性結合組織に存在することが報告された (Oldberg et al., 1989; Blochberger et al., 1992). しかし両proteoglycanともその機能に関しての知見は少ない. Fibromodulinはdecorinやbiglycanと同様にcollagen線維との結合能を有するが (Oldberg et al., 1989; Scott, 1996), その結合部位はdecorinのそれとは異なることが知られている (Svensson et al., 1999). 前述したようにdecorinがcollagen原線維の直径を調節しているのに対し (Danielson et al., 1997), fibromodulinはcollagen原線維間のスペースと太さを調節することが示唆されている (Scott and Parry, 1992). 一方, lumicanも広く軟組織, 石灰化硬組織に存在し (Blochberger et al., 1992; Ying et al., 1997; Hall et al., 1997), collagenとの結合能を有し, 原線維形成に深く関与する (Scott, 1996).

Knockout mouseを用いた研究から, fibromodulinとlumicanの欠乏はcollagen原線維の形態異常, サイズの不規則化を生じる (Svensson et al., 1999; Ezura et al., 2000; Chakravarti et al., 2002; Ameye and Young, 2002). Lumicanは原線維形成初期の細い原線維の反応の安定化に不可欠であり, fibromodulinは原線維形成後期における原線維の沿面成長の抑制に関与していることが明らかにされている (Chakravarti et al., 2002). この2つのproteoglycanの機能に関しては, 原線維形成に大きな役割を有していることは明らかとなったが, 他にどのような機能を有しているのかに関しては不明のままで

ある. Fibromodulinとlumicanの結合部位が同じであること, およびfibromodulinが欠損した状態では, lumicanのmRNA発現は減少していたにもかかわらずlumicanの蛋白質発現が代償的に約4倍増加し, collagen原線維上に蓄積されていたことから, fibromodulinとlumicanの機能は類似している可能性が指摘されている (Svensson et al., 1999). 株化骨芽細胞様細胞 (MC 3 T 3 -E 1) を用いた研究ではfibromodulinとlumicanは同様の機能を相補的に営んでいる可能性が指摘されている (泰間ら, 2006).

本研究においては成長に伴い, ラット顎関節円板のmRNA発現量は, fibromodulin, lumicanともに減少していたが, 減少する時期は異なっていた. このことはfibromodulinとlumicanが相補的に働いている可能性が考えられる.

4. VersicanのmRNA発現

Versicanの機能のひとつとして, 他の細胞外基質と結合することによる, 細胞外基質の構築および組織への機械的特性の付与がある. Versicanはtenascinおよびヒアルロン酸と結合することが知られている (LeBaron et al., 1992). 成長終了後のウシ関節円板の生化学的研究から, 円板には乾燥重量の5%のGAG鎖が存在し, その内訳は, ヒアルロン酸が5%, dermatan sulphateが14%, chondroitin sulphateが79%, keratan sulphateが2%含まれていることが報告されている (Nakano and Scott, 1989b). 円板組織内に存在するversicanが, 滑液に含まれるヒアルロン酸の動態にどのような影響を及ぼしているのかに関しては不明である.

本研究でのRT-PCRの結果から, versican mRNA総発現量が生後2週齢をピークとして減少していた. この結果は, 様々な組織でのversican遺伝子発現が加齢に伴い減少する報告と一致していた (Melching et al., 1997; Hart et al., 1998; Carrino et al., 2000; 鳥谷ら, 2005).

しかし, 最近の研究によると, versicanの成長に伴う発現はversicanのisoformによって異なることが報告されている. Versicanの α domainと β domainに対する2つの抗体を用いた生化学的研究によると, versicanの β domainを含むisoformであるV0およびV1は, 出生時をピークとし, 2週齢までに急速に減少, その後減少は少し緩やかとなり, 約8週齢で一定となったとしている (Milev et al., 1998). また, α domainを含むV0およびV2では, 出生の約5日前をピークとし2週齢までわずかに減少, その後約16週齢まで徐々に増加し, その後ほぼ一定となることが報告されている (Milev et al., 1998). 一方,

本研究においては、versicanのisoformにおけるmRNA発現は、V0、V1およびV3は2週齢以降減少していた。また、V2は8週齢にピークを示した。このことは、脳組織の遺伝子発現の研究でV2が10週まで増加する報告があり、顎関節円板でも類似した結果を示したと考えられる。

Versicanの4つのisoformのうち高い発現を示していたのはV0とV1であり、この傾向は特に生後2週から4週において顕著であった。なぜ、成長初期においてV0とV1のmRNA発現が高いのかは明らかではないが、2つのisoformと他のisoformとの構造的な違いはcore proteinに付くGAG鎖の数だけである。ヒトversicanでみると、V0 isoformとV1 isoformには12本のGAG鎖の結合部位をもつ β domainが存在するのに対し、 α domainのみが存在するV2 isoformには4本、GAG結合domainがないV3 isoformにはGAG鎖が存在しない (Zimmermann et al., 1994)。したがって、成長初期において α domainを有するversicanのisoformの発現が高いことはversicanの有するGAG鎖が顎関節円板の成長に何らかの役割を有していることを示唆していると考えられる。Versicanの各isoformの機能に関しては不明の点が多いが、最近の研究ではversicanと組織の機械的強度との関係が指摘されている。Theocharisら (2001) は、ヒト動脈管でのV0 isoformの減少が血管壁の粘弾性と被圧縮性を低下させ、動脈の変形を惹起することを報告している (Theocharis et al., 2001)。また、Hinekら (2004) は、V3 isoformを過剰発現させると、elastin-binding proteinの発現および弾性線維の合成が促進されることを報告し、これには、V3 isoformの増加に伴うGAG鎖の減少が関与していることを示唆した (Hinek et al., 2004)。これらの研究は、円板におけるversicanのisoformの発現が弾性線維系の動態を介して円板組織の機械的強度に関与している可能性を示唆している。

結 論

ラット顎関節円板における各種proteoglycanのmRNA発現は、成長に伴い変化することが明らかとなった。このことは、成長に伴うラットの顎口腔機能の発達、あるいは顎関節における生力学的環境の変化が関与していることを示唆している。今後は、弾性線維系分子に関わる分子も含めてラット顎関節円板の成長変化に伴うmRNA発現を検討していきたいと考えている。

参 考 文 献

- Ameys L and Young MF. Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans : novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal disease. *Glycobiology* 12 : 107-116, 2002.
- Ang LC, Zhang Y, Cao L, Yang BL, Young B, Kiani C, Lee V, Allan K and Yang BB. Versican enhances locomotion of astrocytoma cells and reduces cell adhesion through its G1 domain. *J Neuropathol Exp Neurol* 58 : 597-605, 1999.
- Bell WH. Normal craniomandibular structure. In "Temporomandibular Disorders : Classification, Diagnosis, Management", ed. by W.E. Bell, Year Book Medical Publishers, London, Chicago : 18-37, 1990.
- Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD and Robey PG. Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J Histochem Cytochem* 38 : 1549-1563, 1990.
- Blochberger TC, Cornuet PK and Hassell JR. Isolation and partial characterization of lumican and decorin from adult chicken corneas. A keratan sulfate-containing isoform of decorin is developmentally regulated. *J Biol Chem* 267 : 20613-20619, 1992.
- Carino DA, Sorrell JM and Caplan AI. Age-related changes in the proteoglycans of human skin. *Arch Biochem Biophys* 373 : 91-101, 2000.
- Carvalho RS, Yen EH and Suga DM. Glycosaminoglycan synthesis in the rat articular disk in response to mechanical stress. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 107 : 401-410, 1995.
- Chakravarti S. Functions of lumican and fibromodulin : lessons from knockout mice. *Glycoconj J* 19 : 287-293, 2002.
- Chopra RK, Pearson CH, Pringle GA, Fackre DS and Scott PG. Dermatan sulphate is located on serine-4 of bovine skin proteodermatan sulphate. Demonstration that most molecules possess only one glycosaminoglycan chain and comparison of amino acid sequences around glycosylation sites in different proteoglycans. *Biochem J* 232 : 277-279, 1985.
- Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE and Iozzo RV. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol* 136 : 729-743, 1997.
- De Bont LG, Blankestijn J, van der Kuijl B and Boering G. The role of the articular disk in temporomandibular joint disorders. *Ned Tijdschr Tandheelkd* 93 : 345-350, 1986.
- Ezura Y, Chakravarti S, Oldberg A, Chervoneva I and Birk DE. Differential expression of lumican and fibromodulin regulate collagen fibrillogenesis in developing mouse tendons. *J Cell Biol* 151 : 779-788, 2000.
- Fisher LW, Termine JD and Young MF. Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. *J Biol Chem* 264 : 4571-4576, 1989.
- Hall RC, Embery G and Lloyd D. Immunohistochemical localization of the small leucine-rich proteoglycan lumican in human predentine and dentine. *Arch Oral Biol* 42 : 783-786, 1997.
- Hart DA, Sciore P, Boykiw R and Reno C. Pregnancy induces complex changes in the pattern of mRNA expression in knee ligaments of the adolescent rabbit. *Matrix Biol* 17 : 21-34, 1998.

- Hart RT, Hennebel VV, Thongpreda N, Van Buskirk WC and Anderson RC. Modeling the biomechanics of the mandible : a three-dimensional finite element study. *J Biomech* 25 : 261–286, 1992.
- Henry SP, Takanosu M, Boyd TC, Mayne PM, Eberspaecher H, Zhou W, de Crombrughe B, Hook M and Mayne R. Expression pattern and gene characterization of asporin, a newly discovered member of the leucine-rich repeat protein family. *J Biol Chem* 276 : 12212–12221, 2001.
- Hinek A, Braun KR, Liu K, Wang Y and Wight TN. Retrovirally mediated overexpression of versican v3 reverses impaired elastogenesis and heightened proliferation exhibited by fibroblasts from Costello syndrome and Hurler disease patients. *Am J Pathol* 164 : 119–131, 2004.
- Iozzo RV and Murdoch AD. 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.
- Ito K, Shinomura T, Zako M, Ujita M and Kimata K. Multiple forms of mouse PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan generated by alternative splicing. *J Biol Chem* 270 : 958–965, 1995.
- Kimura A. Stress analysis of the temporomandibular joint by finite element method. *J Jpn Oral Surg* 36 : 1180–1196, 1990.
- Kopp S. Topographical distribution of sulphated glycosaminoglycans in human temporomandibular joint disks. A histochemical study of an autopsy material. *J Oral Pathol* 5 : 265–276, 1976.
- Korioth TW, Romilly DP and Hannam AG. Three-dimensional finite element stress analysis of the dentate human mandible. *Am J Phys Anthropol* 88 : 69–96, 1992.
- Krusius T and Ruoslahti E. Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 : 7683–7687, 1986.
- Kuc IM and Scott PG. Increased diameters of collagen fibrils precipitated in vitro in the presence of decorin from various connective tissues. *Connect Tissue Res* 36 : 287–296, 1997.
- Kuwabara M, Takuma T, Scott PG, Dodd CM and Mizoguchi I. Biochemical and immunohistochemical studies of the protein expression and localization of decorin and biglycan in the temporomandibular joint disc of growing rats. *Arch Oral Biol* 47 : 473–480, 2002.
- Landolt RM, Vaughan L, Winterhalter KH and Zimmermann DR. Versican is selectively expressed in embryonic tissues that act as barriers to neural crest cell migration and axon outgrowth. *Development* 121 : 2303–2312, 1995.
- LeBaron RG, Zimmermann DR and Ruoslahti E. Hyaluronate binding properties of versican. *J Biol Chem* 267 : 10003–10010, 1992.
- Melching LI, Cs-Szabo G and Roughley PJ. Analysis of proteoglycan messages in human articular cartilage by a competitive PCR technique. *Matrix Biol* 16 : 1–11, 1997.
- Milam SB, Klebe RJ, Triplett RG and Herbert D. Characterization of the extracellular matrix of the primate temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg* 49 : 381–391, 1991.
- Milev P, Maurel P, Chiba A, Mevissen M, Popp S, Yamaguchi Y, Margolis RK and Margolis RU. Differential regulation of expression of hyaluronan-binding proteoglycans in developing brain : aggrecan, versican, neurocan, and brevican. *Biochem Biophys Res Commun* 247 : 207–212, 1998.
- Mills DK, Daniel JC and Scapino R. Histological features and in-vitro proteoglycan synthesis in the rabbit craniomandibular joint disc. *Arch Oral Biol* 33 : 195–202, 1988.
- Mills DK, Fiandaca DJ and Scapino RP. Morphologic, microscopic, and immunohistochemical investigations into the function of the primate TMJ disc. *J Orofac Pain* 8 : 136–154, 1994.
- Mizoguchi I, Scott PG, Dodd CM, Rahemtulla F, Sasano Y, Kuwabara M, Satoh S, Saitoh S, Hatakeyama Y, Kagayama M and Mitani H. An immunohistochemical study of the localization of biglycan, decorin and large chondroitin-sulphate proteoglycan in adult rat temporomandibular joint disc. *Arch Oral Biol* 43 : 889–898, 1998.
- Nakano T, Imai S, Koga T, Dodd CM and Scott PG. Monoclonal antibodies to the large chondroitin sulphate proteoglycan from bovine temporomandibular joint disc. *Matrix* 13 : 243–254, 1993.
- Nakano T and Scott PG. Changes in the chemical composition of the bovine temporomandibular joint disc with age. *Arch Oral Biol* 41 : 845–853, 1996.
- Nakano T and Scott PG. A quantitative chemical study of glycosaminoglycans in the articular disc of the bovine temporomandibular joint. *Arch Oral Biol* 34 : 749–757, 1989a.
- Nakano T and Scott PG. Proteoglycans of the articular disc of the bovine temporomandibular joint. I. High molecular weight chondroitin sulphate proteoglycan. *Matrix* 9 : 277–283, 1989b.
- Oldberg A, Antonsson P, Lindblom K and Heinegard D. A collagen-binding 59-kD protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). *EMBO J* 8 : 2601–2604, 1989.
- Osborn JW. The disc of the human temporomandibular joint : design, function and failure. *J Oral Rehabil* 12 : 279–293, 1985.
- Plaas AH, Neame PJ, Nivens CM and Reiss L. Identification of the keratan sulfate attachment sites on bovine fibromodulin. *J Biol Chem* 265 : 20634–20640, 1990.
- Pringle GA and Dodd CM. Immunoelectron microscopic localization of the core protein of decorin near the d and e bands of tendon collagen fibrils by use of monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 38 : 1405–1411, 1990.
- Roughley PJ, Melching LI and Recklies AD. Changes in the expression of decorin and biglycan in human articular cartilage with age and regulation by TGF- β . *Matrix Biol* 14 : 51–59, 1994.
- Scapino RP. Histopathology associated with malposition of the human temporomandibular joint disc. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 55 : 382–397, 1983.
- Scott JE. Proteodermatan and proteokeratan sulfate (decorin, lumican/fibromodulin) proteins are horseshoe shaped. Implications for their interactions with collagen. *Biochemistry* 35 : 8795–8799, 1996.
- Scott JE, Orford CR and Hughes EW. Proteoglycan-collagen arrangements in developing rat tail tendon. An electron microscopical and biochemical investigation. *Biochem J* 195 : 573–581, 1981.
- Scott JE and Haigh M. Proteoglycan-type I collagen fibril interactions in bone and non-calcifying connective tissues. *Biosci Rep* 5 : 71–81, 1985.
- Scott JE and Parry DA. Control of collagen fibril diameters in tissues. *Int J Biol Macromol* 14 : 292–293, 1992.
- Scott PG, Nakano T and Dodd CM. Small proteoglycans from different regions of the fibrocartilaginous temporomandibular joint disc. *Biochim Biophys Acta* 1244 : 121–128, 1995.
- Scott PG, Nakano T, Dodd CM, Pringle GA and Kuc IM. Proteoglycans of the articular disc of the bovine temporomandibular joint. II. Low molecular weight dermatan sulphate proteoglycan. *Matrix* 9 : 284–292, 1989.

- Shinomura T, Nishida Y, Ito K and Kimata K. cDNA cloning of PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan expressed during chondrogenesis in chick limb buds. Alternative spliced multiforms of PG-M and their relationships to versican. *J Biol Chem* 268 : 14461-14469, 1993.
- Stegenga B, de Bont LG, Boering G and van Willigen JD. Tissue responses to degenerative changes in the temporomandibular joint : a review. *J Oral Maxillofac Surg* 49 : 1079-1088, 1991.
- Svensson L, Aszódi A, Reinholt FP, Fassler R, Heinegard D and Oldberg A. Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon. *J Biol Chem* 274 : 9636-9647, 1999.
- Sztrolovics R, Grover J, Cs-Szabo G, Shi SL, Zhang Y, Mort JS and Roughley PJ. The characterization of versican and its message in human articular cartilage and intervertebral disc. *J Orthop Res* 20 : 257-266, 2002.
- 泰間康平, 鳥谷奈保子, 荒川俊哉, 田隈泰信, 溝口 到. 株化骨芽細胞様細胞MC3T3-E1細胞の分化・石灰化過程におけるデコリンとパイグリカンのmRNA発現. *北医療大歯誌* 25 : 63-71, 2006.
- Tanaka E, Tanne K and Sakuda M. A three-dimensional finite element model of the mandible including the TMJ and its application to stress analysis in the TMJ during clenching. *Med Eng Phys* 16 : 316-322, 1994.
- Tanaka E, Aoyama J, Tanaka M, Van Eijden T, Sugiyama M, Hanaoka K, Watanabe M and Tanne K. The proteoglycan contents of the temporomandibular joint disc influence its dynamic viscoelastic properties. *J Biomed Mater Res* 65 : 386-392, 2003.
- Tasheva ES, Klocke B and Conrad GW. Analysis of transcriptional regulation of the small leucine rich proteoglycans. *Mol Vis* 10 : 758-772, 2004.
- Theocharis AD, Tsalakis I, Hjerpe A and Karamanos NK. Human abdominal aortic aneurysm is characterized by decreased versican concentration and specific downregulation of versican isoform V(0). *Atherosclerosis* 154 : 367-376, 2001.
- 鳥谷奈保子, 荒川俊哉, 田隈泰信, 安彦善裕, 溝口 到. 成長期ラット顎関節円板におけるversican isoform mRNAの発現. *北医療大歯誌* 24 : 31-39, 2005.
- Vogel KG, Paulsson M and Heinegard D. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J* 223 : 587-597, 1984.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN and Elenitoba-Johnson KS. Real-time multiplex PCR assays. *Methods* 25 : 430-442, 2001.
- Yamagata M, Suzuki S, Akiyama SK, Yamada KM and Kimata K. Regulation of cell-substrate adhesion by proteoglycans immobilized on extracellular substrates. *J Biol Chem* 64 : 8012-8018, 1989.
- Yamagata M, Saga S, Kato M, Bernfield M and Kimata K. Selective distributions of proteoglycans and their ligands in pericellular matrix of cultured fibroblasts. Implications for their roles in cell-substratum adhesion. *J Cell Sci* 106 : 55-65, 1993.
- Yamagata M and Kimata K. Repression of a malignant cell-substratum adhesion phenotype by inhibiting the production of the anti-adhesive proteoglycan, PG-M/versican. *J Cell Sci* 107 : 2581-2590, 1994.
- Yin JL, Shackel NA, Zekry A, McGuinness PH, Richards C, Putten KV, McCaughan GW, Eris JM and Bishop GA. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol Cell Biol* 79 : 213-221, 2001.
- Ying S, Shiraishi A, Kao CW, Converse RL, Funderburgh JL, Swiergiel J, Roth MR, Conrad GW and Kao WW. Characterization and expression of the mouse lumican gene. *J Biol Chem* 272 : 30306-30313, 1997.
- Zako M, Shinomura T, Ujita M, Ito K and Kimata K. Expression of PG-M(V3), an alternatively spliced form of PG-M without a chondroitin sulfate attachment in region in mouse and human tissues. *J Biol Chem* 270 : 3914-3918, 1995.
- Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT, Schubert M and Bruckner-Tuderman L. Versican is expressed in the proliferating zone in the epidermis and in association with the elastic network of the dermis. *J Cell Biol* 124 : 817-825, 1994.
- Zimmermann DR and Ruoslahti E. Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. *EMBO J* 8 : 2975-2981, 1989.



甲田 尚央

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

平成15年3月北海道医療大学歯学部卒業

平成16年4月北海道医療大学大学院歯学研究科入学

平成20年3月北海道医療大学大学院歯学研究科博士課程修了

平成20年4月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