

論 文 要 旨

咬合改変による生力学環境変化が
成長期ラット関節円板の反応特性に及ぼす影響

平成 25 年度

北海道医療大学大学院歯学研究科

中尾友也

【緒言】

顎関節症は、齲蝕、歯周病に次ぐ主要な歯科疾患であり、顎関節症患者の増加とその若年化傾向が歯科全体で問題となっている。しかし、齲蝕や歯周病とは異なり、顎関節症の原因はいまだ不明な点が多い。顎関節症の病態は様々であるが、その多くは顎関節円板の転位や変形に起因するものが多い。顎関節円板は collagen と proteoglycan などの細胞外マトリックスから構成され、collagen 線維は牽引に対する抵抗性を、proteoglycan はそれに結合する硫酸鎖を介して剪断や圧縮に対する抵抗性を示すことが知られている。Proteoglycan は分子量の違いにより、Hyaluronan-binding proteoglycans (Modular proteoglycans) と small leucine rich proteoglycan (SLRP) に大別される。Hyaluronan-binding proteoglycans に属する aggrecan と versican は、N 末端にヒアルロン酸結合領域、中央部に GAG 鎖結合領域、C 末端に 1 つまたは 2 つの EGF 様構造、レクチン様構造、補体制御タンパク様構造という共通構造をもつ。SLRP には biglycan、decorin、fibromodulin、lumican、keratocan、mimecan などが含まれる。SLRP のコアタンパク質は、leucine に富んだ leucine rich repeat (LRR) を含み、LRR ドメインは、システインクラスターを含む N 末端と C 末端にはさまれている。またジスルフィド結合に関与している可能性のあるシステイン残基が、N 末端には 4 個、C 末端には 2 個存在する。本研究では、機械的刺激に対する顎関節円板の細胞外マトリックスの反応特性を明らかにすることを目的として、成長期ラットの咬合改変モデルを用いて、顎関節円板における proteoglycan の mRNA 発現量、関節円板形態の変化、GAG 量および免疫染色による versican の局在の変化について検討した。

【資料と方法】

本研究では、生後 7 週齢の Wistar 系雄性ラットを用い、顎関節部への機械的負荷を増大させるため、上顎切歯部にレジン製咬合板を装着し、咬合改変モデルを作製した。実験期間は 7、14、21、28 日とし、装置未装着同週齢ラットを対象群として用いた。

1) 関節円板の厚径計測

各実験期間終了後、摘出した組織を 4% paraformaldehyde (0.1 M PB, pH 7.4) で固定後、通法に従い厚さ 7 μm の連続組織切片を作製し、Lei Sun ら (2009) の方法に従って、顎関節円板の厚径を計測した。

2) 関節円板の各 Proteoglycan における mRNA 発現の定量

各実験期間終了後、採取した顎関節円板から total RNA を抽出し、RT 法により cDNA の調整を行った。各 proteoglycan 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 と GAPDH に対する primer および exonuclease probe (TaqMan probe) を作製し、Step One Real Time PCR System を用いて、qPCR 法による mRNA 発現量の定量を行った。

3) 関節円板の GAG の定量

各実験期間終了後、GAG を抽出するために、採取した顎関節円板をホモジナイズし、パパイン消化処理を 24 時間行った。その後、Dimethylmethylene-blue (DMB) 法を用いて定量した。計測条件は、吸光度 530 nm と 590 nm の 2 波長の差で計測した。

4) 関節円板における versican コアタンパク質の局在

各実験期間終了後、1)と同様の手順で連続切片を作製した。免疫染色には、抗 versican 抗体 (5D5) を用い、ABC 法にてタンパク質を検出した。

5) 統計学的処理

多変量分散分析 (MANOVA) と単変量 F 検定により解析した。

【結果】

1) 関節円板の厚径計測

関節円板の厚径は、対照群、実験群を比較すると前方肥厚部、中央狭窄部では有意な差は認められなかったのになが、実験群の後方肥厚部において有意な増加を認めた。

2) 関節円板の各 Proteoglycan における mRNA 発現の定量

各 Proteoglycan における mRNA 発現は、コンドロイチン硫酸鎖をもつ biglycan、decorin、versican と condroadherin の実験群において有意な増加を認めた。これに対し、同じくコンドロイチン硫酸鎖をもつ aggrecan は対照群と実験群を比べ有意な差は認めなかった。

3) 関節円板の GAG の定量

関節円板の GAG の変化は、対照群と比べ、実験群で有意に増加した。

4) 関節円板における versican コアタンパク質の局在

対照群では、関節円板中央狭窄部から前方肥厚部にかけて中等度の反応がみられたが、後方肥厚部での反応は弱かった。これに対し、実験群では後方肥厚部で反応を認めた。

【考察】

関節円板における主要な細胞外基質は collagen と proteoglycan である。関節円板には、I、II、III、IX、XII 型 collagen、decorin、biglycan、versican などの proteoglycan が存在することが報告されている。ウシ腱に圧縮力を負荷した *in vitro* の研究では、versican タンパク質の発現が増加することが報告されており、versican は組織への圧縮力に対する抵抗性を付与している可能性が考えられる。また、ラット関節円板に圧縮力を加えた *in vitro* の研究では、硫酸化 glycosaminoglycan が増加するという報告があり、圧縮力に対する抵抗性は proteoglycan および GAG の複雑なネットワークを介していることが推察される。本実験の咬合挙上板による切歯部咬合位では、下顎骨の後方回転に伴って、円板の後方肥厚部に機能圧が集中して負荷されると考えられる。その結果、円板の後方肥厚部に加わった機能圧は、円板の主要な細胞外マトリックスである 硫酸化 glycosaminoglycan と core protein である biglycan、decorin、condroadherin および versican の発現を増加させたと推察される。

【結論】

成長期ラット顎関節円板における細胞外マトリックスの反応特性は、切歯部咬合挙上による機械的刺激の負荷によって変化することが明らかとなった。これらの変化は、顎関節に生じる複雑な生体力学的な力を反映している。