

〔原 著〕

成長期ラット顎関節円板におけるversican isoform mRNAの発現 —TaqMan probeを用いたreal-time quantitative PCRによる分析—

鳥谷 奈保子¹⁾, 荒川 俊哉²⁾, 田隈 泰信²⁾, 安彦 善裕³⁾, 溝口 到¹⁾¹⁾北海道医療大学歯学部矯正歯科学講座²⁾北海道医療大学歯学部口腔生化学講座³⁾北海道医療大学歯学部口腔病理学講座

mRNA expression for versican isoforms in temporomandibular joint discs of growing rats — Analysis using real-time quantitative PCR with the TaqMan probe —

Naoko TORIYA¹⁾, Toshiya ARAKAWA²⁾, Taishin TAKUMA²⁾,
Yshihiro ABIKO³⁾ and Itaru MIZOGUCHI¹⁾¹⁾Departments of Orthodontics, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido.²⁾Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido.³⁾Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido.

Abstract

Versican is a large chondroitin sulphate proteoglycan distributed in a variety of interstitial connective tissue. Versican is thought to be involved in extracellular matrix assembly and various biological cellular interactions. This study examined mRNA expression of versican isoforms in the temporomandibular joint (TMJ) disc of growing rats using a real-time quantitative PCR (QPCR). Male Wistar rats of 2, 4, 8, 16 and 24 weeks of age were used. Total RNA was isolated from the TMJ discs, and cDNA was generated by reverse transcriptase (RT) reaction. The quantitative analysis of mRNA expression of the target genes, QPCR, was performed using sequence specific TaqMan probes. The copy number of versican was calculated by an external standard (plasmid including target cDNA diluted serially in log steps from 10⁸ to 10 copies) and was normalized to a reference cDNA, GAPDH. The QPCR showed that expression for versican mRNA was highest at 2 weeks and decreased thereafter. With respect to mRNA expressions for each versican isoform, the mRNA expression of V0, V1, and V3 gradually decreased with the growth, while the expression of V2 increased up to 8 weeks and decreased after that. The mRNA expression of each versican isoform showed age-related changes in the TMJ discs of growing rats.

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

要 旨

Versicanは、大型のコンドロイチン硫酸proteoglycanで、様々な間質性結合組織に分布する。Versicanは、細胞外基質の構築や様々な生物学的細胞間相互作用に関係する。本研究では、成長期ラットの顎関節円板における

versican isoformのmRNA発現をreal-time quantitative PCR (QPCR)を用いて検討した。実験動物として、生後2週、4週、8週、16週、24週齢の雄性のWistar系ラットを用い、顎関節円板よりtotal RNAを抽出し、reverse transcriptase (RT)によりcDNAを調整した。目的遺伝子のmRNA発現のQPCRは、その遺伝子配列の特異的な

受付：平成17年3月31日

TaqMan probeを用いて行った。Versicanのコピー数は、目的遺伝子の配列を含んだplasmidを 10^6 から10コピーまで連続希釈して作製した標準試料とGAPDHによって計算した。QPCRによりversican mRNAの発現は、生後2週齢において最も高く、その後徐々に減少した。また、それぞれのversican isoformのmRNA発現は、V0, V1およびV3では成長に伴って徐々に減少し、一方、V2では生後8週齢まで増加し、その後減少した。ラット顎関節円板におけるversican isoformのmRNA発現は、成長に伴い変化することが明らかとなった。

緒 言

顎関節は、側頭骨と下顎骨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。解剖学的に顎関節は、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、靭帯等から構成される (Bell, 1990)。機能的にみると、顎関節は回転運動と前後的な滑走運動とを営むことから、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、側頭骨と下顎頭の間を介する線維性の緻密結合組織である。顎関節円板は、関節面を完全に被覆し、関節腔を上下に分けている。したがって、顎関節は、側頭骨と円板間の上関節、および円板と下顎頭間の下関節からなる複合関節であるとみなすことができ、上関節は主に滑走運動を、下関節は回転運動を営む (Bell, 1990)。関節円板は、顎関節の滑走、回転運動によって生じる複雑な機能力を吸収・分散し、関節の円滑な運動を可能としている (Osborn, 1985; Tanaka et al., 1994)。もし、顎関節円板

に基質的な変化 (脆弱化, 変形および転位) が生じた場合には、顎関節の円滑な運動が阻害され、顎関節症のひとつである顎関節内障 (internal derangement; I.D.) を生じる (Scapino, 1983; De Bont et al., 1986; Stegenga et al., 1991)。

顎関節円板の主要な細胞外マトリックスはcollagenとproteoglycanである (Kopp, 1976; Mills et al., 1988; Fujita and Hoshino, 1989; Nakano and Scott, 1989; Scott et al., 1989; Gage et al., 1990; Milam et al., 1991; Nakano et al., 1993; Scott et al., 1995; Landesberg et al., 1996; Nakano and Scott, 1996; Mao et al., 1998; Mizoguchi et al., 1998; Sindelar, 2000; Kuwabara et al., 2002)。Proteoglycanは、core proteinとそれに付着する糖鎖 (glycosaminoglycan; GAG) からなり、core proteinの特徴から大きく2つのタイプ、すなわちmodular proteoglycanとsmall leucine-rich proteoglycanとに分けられる (Iozzo and Murdoch, 1996)。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550kD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、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, 1999)、細胞遊走 (LeBaron, 1992; Landolt et al., 1995) などの機能に関与していることが明らかとなった (Wight, 2002) (図1)。

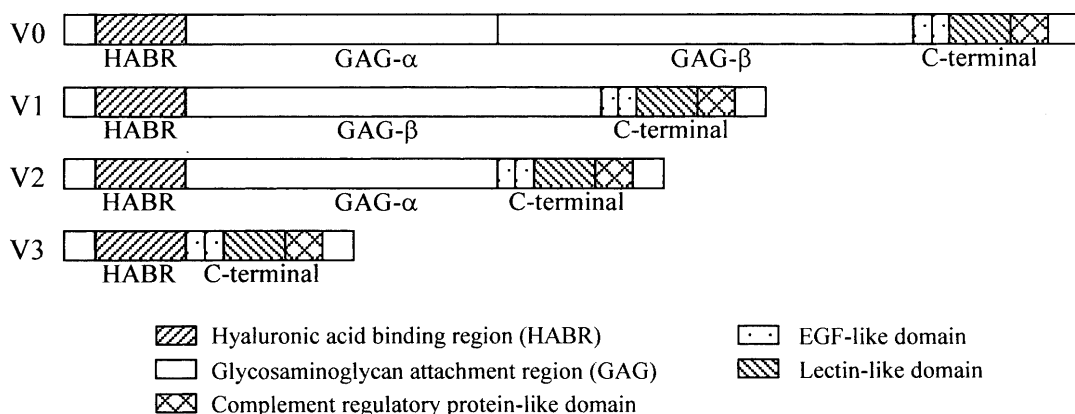


図1 Versicanの4つのisoformの模式図

VersicanはN-末端側からヒアルロン酸結合部位 (HABR)、グリコサミノグリカン鎖が結合するGAG- α domainとGAG- β domain、そしてEGF-like domain, complement regulatory protein-like domain, lectin-like domainから構成されるC-terminalから成り、グリコサミノグリカン鎖結合領域のsplicingによる4つのisoformのV0, V1, V2, V3が存在する。

表1 PrimerおよびTaqMan probeの設計

versican		GenBank accession #AF072892		
		sequence	Length (bp)	T _m (°C)
forward primer	VC-F	cctgcaagaagggaacagttg	21	58.5
	F-0	aaaacaactccaacccaagagft	26	55.8
	F-1	gggtgagaaccctgtatcgt	20	55.4
reverse primer	VC-R	ttccaaaggctggcattttc	22	54.8
	R-0	cctcactgtgatatactctatttcg	26	57.3
	R-2	gtaggatagcaggtgcctccat	22	60.4
TaqMan probe	Taq-VC	tgcggccaacccctgtttgt	20	62.5
	TaqR-116	tgtcagggtggaatttggtccctgcc	26	65.2
	TaqR-141	cagtaggcataaatctatcaggagagg	32	65.7
	Taq-183	tgatctctgcaaaacaacctatgcct	27	60.5

rat GAPDH		GenBank accession #AB017801		
		sequence	Length (bp)	T _m (°C)
forward primer	GAPDH-F	tgcaccaccaactgcttagc	20	58.4
reverse primer	GAPDH-R	ggcatggactgtggtcatgag	21	60.4
TaqMan probe	Taq-GAPDH	cctggccaaggctcatccatgacaactt	27	63.5

表2 PrimerとTaqMan probeとの組合せ

	primer combination	TaqMan 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
GAPDH	GAPDH-F and GAPDH-R	Taq-GAPDH	87

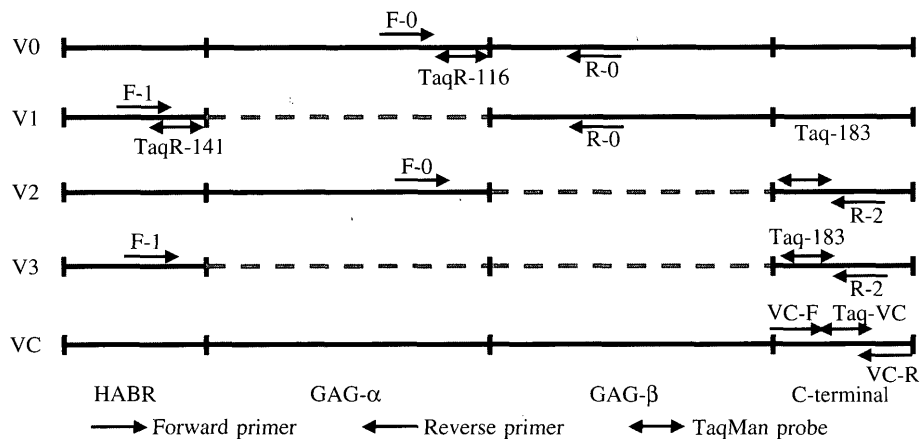


図2 PrimerとTaqMan probeの位置および組合せ

2種類のForward primer (F-0, F-1) と2種類のreverse primer (R-0, R-2) の計4種類のprimerの組合せにより, versican isoformの4種類を検出することができる。

Versicanは関節円板においても豊富に存在すること (Mao et al., 1998; Mizoguchi et al., 1998), および成長に伴いversicanのmRNAとタンパク質発現が減少することが明らかにされている (Toriya et al., 2005). しかし, 成長に伴うversicanの各isoformの遺伝子発現の変化に関しては不明である.

本研究では, 顎関節円板の細胞外マトリックスの特性を明らかにすることを目的として, hydrolysis probe (TaqMan probe) を用いたreal-time quantitative polymerase chain reaction (real-time QPCR) 法により, versican isoform mRNAの発現の変化を検討した.

なお, 本研究では, versican mRNAの定量実験に先立ち, real-time QPCRの2つの方法の定量性, 感度に関して比較検討も行った.

【実験動物および方法】

実験動物には, 生後2週, 4週, 8週, 16週および24週齢の雄性 Wistar系ラットを用いた. なお, 生直後 (0週齢) のラット顎関節円板については, mRNAの定量に必要な試料を採取することが困難であること, およびこの時期では円板と下顎頭軟骨線維層が癒合しており, 円板の摘出が困難であったことから, 実験対象から除いた.

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

生後2週齢から24週齢までのラットより採取した顎関節円板および生後8週齢のラット脳組織からRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてtotal RNAを抽出した.

表3 PCRの反応条件

	denaturation	annealing	extension
LightCycler	95°C, 2min	60°C, 15sec	72°C, 30sec
GeneAmp	95°C, 10min	60°C, 1min	95°C, 15sec

なお, genomic DNAの試量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Omniscrypt reverse transcriptase protocol (Qiagen) を用いてRT反応を行った.

2. PrimerおよびTaqMan probeの設計

次に, rat versican分子のC-terminal (VC), rat versican isoform (V0, V1, V2, V3) およびrat GAPDHを検出できるprimerとTaqMan probeを設計した (表1). Versican isoformの識別のためには, 4種類のprimerと3種類のTaqMan probeとの組合せを適用した (図2, 表2).

Amplicon sizeは, V0で286bp, V1で240bp, V2で161bp, V3で133bpである. 各primerを用いてPCRを行い, 調整したcDNAをそれぞれplasmid pDrive (Qiagen) にsubcloningし, mRNA定量のための標準試料を作製した.

なお, primerの設計には, Primer Expression software (version 1.0, Applied Biosystems, Foster, CA, USA) を用いた.

3. Real-time QPCR法の感度の検討

Real-time QPCR法によるmRNAの定量化の方法および条件を確立するため, VCとrat GAPDHの標準試料から, 10^1 から 10^8 コピー数の連続希釈系試料を作製した. この連続希釈系試料を用いてLightCyclerによるTaqMan probe法およびGeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) によるTaqMan probe法を適用し, 最適な反応条件および2つの方法の定量性と感度を検討した.

QPCR法の条件は表3に示す. また, DNAポリメラーゼとして, LightCyclerによるTaqMan probe法ではPlatinum Taq DNA Polymelase (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.), GeneAmp 5700 Sequence Detection SystemによるTaqMan probe法ではAmpliTaq Gold (Applied Biosystems) を用いた.

4. 顎関節円板におけるversican mRNAの定量

生後2週, 4週, 8週, 16週および24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TaqMan probeを用いたreal-time QPCRを行った. VC, versican isoformおよびGAPDHに対するcDNAの連続希釈系 10^1 から 10^8 コピー数の連続希釈系試料を用いて各分子のmRNAを定量化後, GAPDHのコピー数に対するversican cDNAのコピー数を算出した.

結 果

1. Real-time QPCR法の定量性と感度

LightCyclerにTaqMan probeを用いた方法では, 10^2 コピー数以上でDNA濃度とcycle数に直線的な関係が認められた. その相関係数は0.997, slope値は3.62であった (data not shown). 電気泳動の結果では, 10^1 およびnegative controlにおいて非特異的なPCR産物が生成されていたが, 蛍光反応は認められなかった.

GeneAmp 5700 Sequence Detection SystemにTaqMan probeを用いた方法では, 10^1 コピー数以上でDNA濃度とcycle数に直線的な関係が認められ, その相関係数は

0.999, slope値は 3.37 (data not shown). 電気泳動の結果では, 10⁴コピー以上の濃度で特異的なPCR産物が生成されていることが確認された. Negative controlでは, 非特異的なPCR産物が生成されていたが, 蛍光反応は認められなかった.

2. 顎関節円板におけるversican mRNAの発現

GAPDH 10⁴コピー当りの試料中のVC cDNA濃度を定量した結果, ラット顎関節円板におけるversican mRNAの総発現量は, 2週齢以降徐々に減少していき, 16週齢よりほぼ一定となる傾向が認められた(図3).

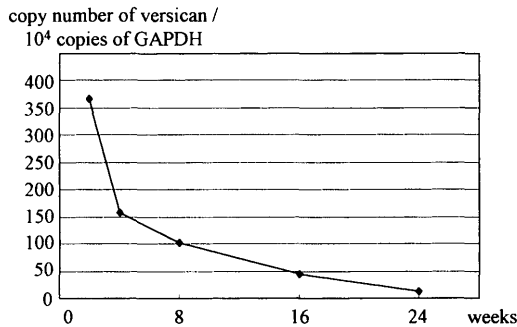


図3 Versican mRNAの総発現量の変化
ラット顎関節円板におけるversican mRNAの総発現量は, 2週齢以降徐々に減少していき, 16週齢よりほぼ一定となる傾向が認められた.

Versican isoform (V0, V1, V2, V3) それぞれのmRNA発現は, V0, V1, V3において生後2週より成長に伴い減少した(図4). V2のmRNA発現は生後8週まで増加し, その後減少した.

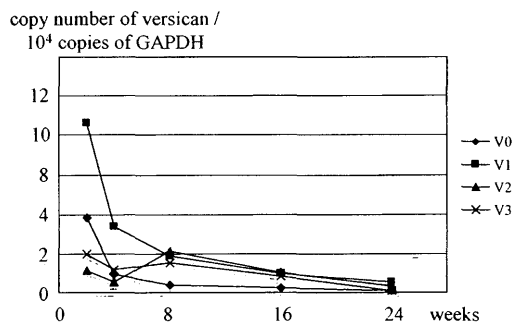


図4 Versican isoformのmRNAの発現量の変化
V0, V1, V3のmRNA発現は生後2週より成長に伴い減少した. V2のmRNA発現は生後8週まで増加し, その後減少した.

Versicanの4つのisoformの中で, V1のmRNA発現が生後2週から24週の期間を通してversican全体のmRNA発現に占める割合が大きかった(図5).

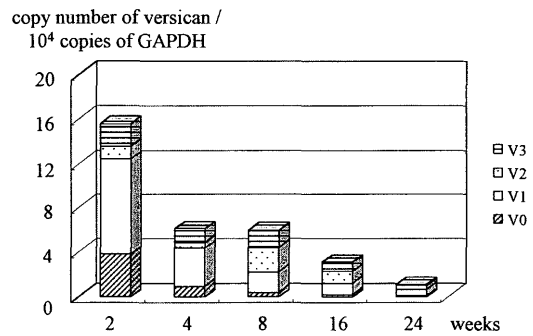


図5 Versican isoformのmRNA発現の割合
Versicanの4つのisoformの中で, V1のmRNA発現が生後2週から32週の期間を通してversican全体のmRNA発現に占める割合が大きかった.

考 察

1. Real-time QPCRを用いたmRNAの定量

従来, mRNAの定量化を目的として, Northern blot法, RNase protection法およびcompetitive PCR法が一般的に用いられてきた(Yin et al., 2001). これらの方法は, 電気泳動, 膜転写, probe作製などの時間のかかる煩雑な過程があること, および比較的多量のcDNA試料を必要とするという欠点がある. 近年, 一塩基多型(SNP)の検出, 未知の疾患原因遺伝子の同定等を目的としてreal-time QPCRという新しい定量的PCR法が開発された. この方法は, (1)高い表面積をもつ硝子細管と定常的な温度域の無いkineticな温度変化による反応時間の短縮, (2)蛍光システムによるreal-timeでの計測, (3)反応のend pointではなく, 反応中の継続的な計測による正確な定量化という特徴を有し, 迅速で正確な定量化PCRを可能にしている(Wittwer et al., 2001).

Real-time QPCRには, 以下に示す3つの方法がある(Meuer et al., 2001). (1)dsDNA, すなわちPCR産物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(Yin et al., 2001), (2)forwardおよびreverse primer間に特異的な配列のprobeを設計し, その両端に蛍光色素とそのquencher色素を付けたprobeを反応させ, Taq polymeraseの5'-exonuclease活性によってprobeが加水分解され, 両端の色素が離れることによっ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である. TaqMan probe法では, dimerおよび非特異な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, 理論的には非特異な蛍光の発生は生じない(Kreuzer et al., 2000; Yin et al., 2001). 従って, 低濃度のcDNAをターゲットとする場合には, より感度の高

いTaqMan probe法を適用する必要があることが指摘されている (Yin et al., 2001). 本研究においてもGeneAmp 5700を用いてTaqMan probe法を適用した場合には、少なくとも 10^1 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。そこで本研究では、低濃度のcDNA数でも正確な定量が可能なGeneAmp 5700を用いたTaqMan probe法を適用した。

2. Versican isoformのmRNA発現の組織特異性

Modular proteoglycanであるversicanは、ヒアルロン酸結合領域 (Hyaluronate Binding Region ; HBR), GAG鎖が共有結合する α ドメイン (GAG- α), β ドメイン (GAG- β), および上皮成長因子様ドメイン (EGF-like domain), レクチン様ドメイン (lectin-like domain), 補体調節タンパク質様ドメイン (Complement regulatory protein-like domain) を含むC-terminalから構成される (Zimmermann and Ruoslahti, 1989). 分子生物学的解析から, versicanには, RNA splicingによる4つのisoformが存在することが明らかにされ, α および β ドメインを含む versican V0, α ドメインの欠如した V1, β ドメインが欠如した V2, および両ドメインが欠如した V3 が存在する (Shinomura et al., 1993; Zimmermann et al., 1994; Ito et al., 1995; Zako et al., 1995; Sztrolovics et al., 2002). このversican isoformの比率は, 組織によって異なる割合で存在する. たとえば, 線維性結合組織では V0 が, 脳組織では V2 (Schmalfeldt et al., 1998) が多く存在する. 本研究の結果から, 顎関節円板の主要なversican isoformは, 実験期間を通じて V1 であったが, このことは, 顎関節円板が主に線維芽細胞から構成されること (Mills et al., 1988) によるものと考えられる.

3. Versicanの顎関節円板における遺伝子発現の変化

本研究でのQPCRの結果から, versican mRNA発現が生後2週齢をピークとして加齢に伴い減少していた. この結果は, 他の結合組織である関節軟骨, 膝靭帯, 皮膚, 椎間板, 骨におけるすべてのisoformを含めたtotal versicanのmRNA発現に関する報告 (Melching et al., 1997; Hart et al., 1998; Carrino et al., 2000; Melrose et al. 2001; Grzesik et al. 2002) と一致していた.

一方, 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 (Milev et al., 1998). Versicanの α ドメインと β ドメインに対する2つの抗体を用いた生化学的研究 (Milev et al., 1998) によると, versicanの β ドメインを含む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. また, α ドメインを含む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った.

本研究での各isoformの発現の割合をみみると, 2週齢ではV0が24.5%, V1が55.2%, V2が7.4%, V3が12.9%であるのに対し, 24週齢ではV0が9.8%, V1が50.3%, V2が3.5%, V3が9.4%であり, V2の比率が加齢に伴い増加傾向を示し, 前述したMilevらの報告と類似した傾向を示した.

4. 顎関節内障とversican

整形外科学の領域において関節内障 (Internal Derangement; I.D.) は, 「関節表層に介在する軟組織によって関節の円滑な運動が阻害された状態」と定義されている. 顎関節内障の原因としては, 円板の転位, 癒着, 退行性あるいは炎症性疾患などがあるが, 最も頻度の高い原因は円板の転位である (Scapino, 1983). 近年, 顎関節内障を含む顎関節症の患者の増加とその若年化傾向が歯科学全体での大きな問題となっており, その原因の究明が求められている. 矯正歯科の領域においても, 顎関節症の一つである下顎頭の退行性変化によって, 重度の骨格型の下顎後退症, あるいは非対称を引き起こすことが報告されているが (Schellhas et al., 1993), 顎関節内障の発症に関する正確なメカニズムは不明である.

近年, 顎関節内障のような慢性疾患では, 環境と宿主という2つの因子間における相互バランスの破綻によって発病するという考えが提唱されてきており, 環境要因として, パラファンクション, 慢性的外傷, 咬合異常等が危険因子として指摘されている (Osborn, 1985; Stegenga et al., 1991). 一方, 宿主要因として, 軟食摂取あるいは咀嚼機能の低下による顎関節組織の脆弱化, すなわち組織のメカニカルストレスに対する抵抗性の低下が指摘されているが (Osborn, 1985), この点に関する基礎的知見は極めて乏しい.

結合組織の粘弾性などの物理特性は, collagenやproteoglycanといった細胞外基質の組成によって決まっており (Jurvelin, 1988; Danielson et al., 1997; Tanaka et al., 2003), 円板の基質的变化を伴う顎関節内障の病態には, 細胞外基質の組成の変化が大きく関与していることが考えられる.

Versicanの機能に関しては, 細胞接着においてamino-terminal (G1) ドメインとの関連による非接着性 (Ang et al., 1999; Yang et al., 1999) およびG3ドメインによる接

着性促進 (Wu et al. 2002), また, 細胞増殖促進 (Zhang et al., 1998, 1999), 細胞移動 (Henderson et al., 1997; Camenisch et al., 2000), G1ドメインと hyaluronan の結合による細胞外マトリックスの構築 (Wight et al., 1991) などの生物学的機能が報告されている。さらに, 弾性線維構築への関連性として fibulin-1, fibulin-2 と相互作用 (Aspberg et al., 1999; Olin et al., 2001), fburilin と相互作用 (Isogai et al., 2002), 成長現象に関連する ECM の remodeling (Westergren-Thorsson et al., 1998), などの機能を有することも報告されている (Wight, 2002)。

Versican の機能のひとつとして, 他の細胞外マトリックス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 (LeBaron et al., 1992) が知られている。顎関節内障の原因の一つとして, ヒアルロン酸と磷脂質による関節潤滑システムの破綻が指摘されている (Nitzan and Etsion, 2002)。この仮説によれば, 関節に過剰な負荷が加わる条件下ではヒアルロン酸と磷脂質が破壊され, 関節面での摩擦抵抗が増加し, 円板周囲組織の緩みや円板の位置的変位, すなわち顎関節内障を引き起こすとしている。

ヒアルロン酸以外にも弾性線維系を構成するオキシラン線維, エロウニン線維, および弾性線維との組織学的共存から, versican との生物学的関連性が注目されている。弾性線維系は, elastin と microfibril から構成され, 前者の elastin は血管や肺などの繰り返しの伸展を営む組織において多く存在し, 組織に弾性を付与するタンパク質である。また, microfibril には microfibril-associated glycoprotein (MAGP) (Kumaratilake et al., 1994), および fibrillin-1 (Sakai et al., 1986) が含まれ, これらは弾性線維系における versican の ligand 候補としても考えられている (Zimmermann et al., 1994)。弾性線維系はヒト顎関節円板組織にも存在することが知られているが, 特に, 円板後部結合組織において最も密度が高いとされている (木野, 1989)。顎関節の前方, あるいは回転運動の際, 円板は顎頭に同調して前方に変位し, 円板後方付着部には繰り返しの伸展・復元運動が加わる。もし, 円板の弾性特性が低下すれば, 円板は復位性, あるいは非復位性の転位を示すことになり, 顎関節内障を引き起こす可能性が考えられる。Versican と組織の機械的強度との関係に関して, 動脈では 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事が報告されている (Theocharis et al., 2001)。また, 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が報告されている

(Hinek et al., 2004)。したがって, 円板における弾性線維系および versican の動態は, 顎関節内障の発症のメカニズムに関与している可能性がある。今後は, 弾性線維系分子, および他の主要な proteoglycan である decorin, biglycan, fibromodulin, lumican, chondroadherin, aggrecan, syndecan, perlecan などを指標として, ラット顎関節円板の成長変化, 食性あるいは顎関節の力学的環境の人為的改変などによる影響について検討していき, 顎関節内障の発症のメカニズムを解明していきたいと考えている。

結 論

ラット顎関節円板における versican isoform の mRNA 発現は, 成長に伴い変化することが明らかとなった。これには, ラットの成長に伴う顎機能系の発達による顎関節の力学的環境要因の変化が関与しているものと考えられる。

文 献

- 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.
- Aspberg A, Adam S, Kostka G, Timpl R and Heinegard D : Fibulin-1 is a ligand for the C-type lectin domains of aggrecan and versican. *J Biol Chem* 274 : 20444-20449, 1999.
- Bell WH (1990) Normal craniomandibular structure. In "Temporomandibular Disorders : Classification, Diagnosis, Management", ed. by W.E. Bell, Year Book Medical Publishers, London, Chicago : 18-37, 1999.
- Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T, Biesterfeldt J, Augustine ML, Calabro A, Jr., Kubalak S, Klewer SE and McDonald JA : Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest* 106 : 349-360, 2000.
- Carrino DA, Sorrell JM and Caplan AI : Age-related changes in the proteoglycans of human skin. *Arch Biochem Biophys* 373 : 91-101, 2000.
- 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.
- Fujita S, Hoshino K : Histochemical and immunohistochemical studies on the articular disk of the temporomandibular joint in rats. *Acta Anat* 134 : 26-30, 1989.
- Gage JP, Viridi AS, Triffitt JT, Howlett CR and Francis MJ : Presence of type III collagen in disc attachments of human temporomandibu-

- lar joint. *Arch Oral Biol* 35 : 283–288, 1990.
- Grzesik WJ, Frazier CR, Shapiro JR, Sponseller PD, Robey PG and Fedarko NS : Age-related changes in human bone proteoglycan structure. Impact of osteogenesis imperfecta. *J Biol Chem* 277 : 43638–43647, 2002.
- Hart DA, Sciore P, Boykiw R and Reno C : Pregnancy induces complex changes in the the pattern of mRNA expression in knee ligaments of the adolescent rabbit. *Matrix Biol* 17 : 21–34, 1998.
- Helen M. : The development of teeth in the albino rats. *Brit Dent J* 76 : 76–86, 1939.
- Henderson DJ, Ybot-Gonzalez P and Copp AJ : Over-expression of the chondroitin sulphate proteoglycan versican is associated with defective neural crest migration in the Pax3 mutant mouse (splotch). *Mech Dev* 69 : 39–51, 1997.
- 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, 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.
- Isogai Z, Aspberg A, Keene DR, Ono RN, Reinhardt DP and Sakai LY : Versican interacts with fibrillin-1 and links extracellular microfibrils to other connective tissue networks. *J Biol Chem* 277 : 4565–4572, 2002.
- 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.
- Jurvelin J, Saamanen AM, Arokoski J, Helminen HJ, Kiviranta I and Tammi M : Biomechanical properties of the canine knee articular cartilage as related to matrix proteoglycans and collagen. *Eng Med* 17 : 157–162, 1988.
- 木野孔司 : 円板後部結合組織における二層部の再検討. 第2報円板部結合組織の線維構成および円板との関係. *日顎関誌* 1 : 43–54, 1989.
- 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.
- Kreuzer KA, Bohn A, Lass U, Peters UR and Schmidt CA : Influence of DNA polymerases on quantitative PCR results using TaqMan probe format in the LightCycler instrument. *Mol Cell Probes* 14 : 57–60, 2000.
- 窪木拓男 : 顎関節部負荷ならびに顎関節構造の対負荷特性に関する生物力学的研究. *岡山歯誌* 9 : 179–195, 1990.
- Kumaratilake JS, Gibson MA, Fanning JC and Cleary EG : The tissue distribution of microfibrils reacting with a monospecific antibody to MAGP, the major glycoprotein antigen of elastin-associated microfibrils. *Eur J Cell Biol* 50 : 117–127, 1989.
- 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.
- Landesberg R, Takeuchi E and Puzas JE : Cellular, biochemical and molecular characterization of the bovine temporomandibular joint disc. *Arch Oral Biol* 41 : 761–767, 1996.
- 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.
- Mao JJ, Rahemtulla F and Scott PG : Proteoglycan expression in the rat temporomandibular joint in response to unilateral bite raise. *J Dent Res* 77 : 1520–1528, 1998.
- 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.
- 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, Scott PG : Changes in the chemical composition of the bovine temporomandibular joint disc with age. *Arch Oral Biol* 41 : 845–853, 1996.
- Nakano T, Scott PG : A quantitative chemical study of glycosaminoglycans in the articular disc of the bovine temporomandibular joint. *Arch Oral Biol* 34 : 749–757, 1989.
- Nitzan DW, Etsion I : Adhesive force : the underlying cause of the disc anchorage to the fossa and/or eminence in the temporomandibular joint—a new concept. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31 : 94–99, 2002.
- Olin AI, Morgelin M, Sasaki T, Timpl R, Heinegard D and Aspberg A : The proteoglycans aggrecan and Versican form networks with fibulin-2 through their lectin domain binding. *J Biol Chem* 276 : 1253–1261, 2001.
- Osborn JW : The disc of the human temporomandibular joint : design, function and failure. *J Oral Rehabil* 12 : 279–293, 1985.
- Sakai LY, Keene DR and Engvall E : Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol* 103 : 2499–2509, 1986.
- Scapino RP : Histopathology associated with malposition of the hu-

- man temporomandibular joint disc. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 55 : 382–397, 1983.
- Schellhas KP, Pollei SR and Wilkes CH : Pediatric internal derangements of the temporomandibular joint : effect on facial development. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 104 : 51–59, 1993.
- Schmalfeldt M, Dours–Zimmermann MT, Winterhalter KH and Zimmermann DR : Versican V2 is a major extracellular matrix component of the mature bovine brain. *J Biol Chem*. 273 : 15758–15764, 1998.
- Scott PG, Dodd CM, Ghahary A, Shen YJ and Tredget EE : Fibroblasts from post–burn hypertrophic scar tissue synthesize less decorin than normal dermal fibroblasts. *Clin Sci* 94 : 541–547, 1998.
- 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.
- Sindelar BJ, Evanko SO, Alonza T, Herring SW and Wight T : Effects of intraoral splint wear on proteoglycans in the temporomandibular joint disc. *Arch Biochem Biophys* 379 : 64–70, 2000.
- 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.
- Sztrvolovics 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.
- 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.
- Toriya N, Takuma T, Arakawa T, Abiko T, Sasano Y, Takahashi I, Sakakura Y, Rahemtulla F and Mizoguchi I : Expression and localization of versican during postnatal development of rat temporomandibular joint disc. *Histochem Cell Biol*, in press, 2005
- Westergren–Thorsson G, Norman M, Bjornsson S, Endresen U, Stjernholm Y, Ekman G and Malmstrom A : Differential expressions of mRNA for proteoglycans, collagens and transforming growth factor–beta in the human cervix during pregnancy and involution. *Biochim Biophys Acta* 1066 : 203–213, 1998.
- Wight TN, Heinegard D and Hascall V : Proteoglycans : structure and function. In *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Edited by Hay E. Plenum Press, New York, USA, pp 39–50, 1991.
- Wight TN : Versican : a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol* 14 : 617–623, 2002.
- Wittwer C : Rapid cycle real–time PCR : Methods and applications. In : Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K(eds) *Rapid cycle real–time PCR : Methods and applications*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York : 1–8, 2001.
- Wu Y, Chen L, Zheng PS and Yang BB : beta1–Integrin–mediated glioma cell adhesion and free radical–induced apoptosis are regulated by binding to a C–terminal domain of PG–M/versican. *J Biol Chem* 277 : 12294–12301, 2002.
- 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*. 264 : 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, 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.
- Yang BL, Zhang Y, Cao L and Yang BB : Cell adhesion and proliferation mediated through the G1 domain of versican. *J Cell Biochem* 72 : 210–220, 1999.
- 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.
- 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.
- Zhang Y, Cao L, Kiani C, Yang BL, Hu W and Yang BB : Promotion of chondrocyte proliferation by versican mediated by G1 domain and EGF–like motifs. *J Cell Biochem* 73 : 445–457, 1999.
- Zhang Y, Cao L, Yang BL and Yang BB : The G3 domain of versican enhances cell proliferation via epidermal growth factor–like motifs. *J Biol Chem* 273 : 21342–21351, 1998.
- 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, Ruoslahti E : Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. *EMBO J* 8 : 2975–2981, 1989.