

## 鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

## 内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍) 宮本 豊(茨城県)  
 博士の専攻分野 博士(歯学)  
 学位記番号 乙第263号  
 学位授与年月日 平成30年10月18日  
 学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当  
 学位論文題目 Asporin stably expressed in the surface layer of mandibular condylar cartilage and augmented in the deeper layer with age  
 (Asporinは下顎頭軟骨に強発現しており、加齢とともにその発現はさらに増加する)  
 Bone Reports 第7巻 41頁～50頁掲載 平成29年7月23日発行  
 論文審査委員 主査 教授 花田 信弘  
 副査 教授 濱田 良樹 副査 教授 大久保 力廣

## 内容の要旨

## 【背景および目的】

歯科矯正治療において、下顎骨の成長のコントロールは重要な要素である。歯科矯正学はこの顎顔面の成長を扱う分野であるが、これまでは矯正装置による物理的な力でのみ顎骨の成長のコントロールを行ってきた。しかしながら、その効果は個体が持っている成長のポテンシャルによって大きく左右されるため、その成長の本質を把握することが重要であると考えられる。

下顎頭軟骨は、下顎骨の成長と関節軟骨の2つの役割を担っている。過去に下顎頭軟骨を含む軟骨組織の成長分化に関与するTGF- $\beta$ 1と直接結合することで、inhibitorとして働く分子であるAsporinが発見されている。Asporinは、class I small leucine-rich proteoglycan familyの1つである細胞外基質タンパクであり、2001年に初めて報告された分子である。Asporinは、380個のアミノ酸から構成され、TGF- $\beta$ 1に直接結合し、TGF- $\beta$ /Smadシグナリングを競合的に阻害する分子であると報告されている。軟骨細胞の分化や基質産生には、TGF- $\beta$ のシグナル伝達が重要な役割を果たしており、TGF- $\beta$ が軟骨細胞の細胞膜にある受容体に結合すると、細胞内のSmad2/3のリン酸化が促され、核内のDNAから軟骨基質タンパクが産生される。Asporinは、TGF- $\beta$ 1と結合することによってそのシグナリングを抑制する。Asporinは長管骨関節軟骨で発現し、骨端軟骨では発現しないと過去に報告されているが、下顎頭軟骨でのAsporin発現について報告は少ない。本研究の目的は、成長過程の下顎頭軟骨におけるAsporin発現とその局在について経時的に解析し、下顎頭軟骨と脛骨骨端軟骨の成長の本質的な違いを遺伝子レベルおよびタンパクレベルで解明することである。

## 【試料および方法】

5週齢のICR系雄性マウスから下顎骨と脛骨近心骨端部を採取し、凍結包埋固定を行った。5  $\mu$ mの非脱灰未固定連続凍結切片を作製し、laser capture microdissection法を用いて、脛骨は骨端軟骨の静止細胞層を、下顎頭は線維細胞層を分取した。それらのサンプルを用いてmicroarrayにより両者の発現遺伝子の網羅的比較を行った。

次に1, 3, 5, 10, 20週齢のICR系雄性マウスを用いて、同様に非脱灰未固定連続凍結切片を作製し、下顎頭軟骨においては線維細胞層、増殖軟骨細胞層、肥大軟骨細胞層を、脛骨骨端軟骨においては静止細胞層、増殖軟骨細胞層、肥大軟骨細胞層を分取した。それぞれの週齢および軟骨層において、Real-time RT-PCR法を用いてAsporinの遺伝子発現量の比較を行った。また同じ切片を用いて、免疫組織化学染色法によりAsporinタンパクの局在を観察した。またTGF- $\beta$ 1およびそのシグナル分子であるp-Smad2/3についてもタンパクの局在を観察した。

**【結果および考察】**

Microarray の結果では、脛骨骨端軟骨に対して下顎頭軟骨において強発現した全遺伝子の中で、Asporin は 27 番目に強発現していた。

5 週齢における脛骨骨端軟骨と下顎頭軟骨の各層における Asporin 遺伝子発現量の比較では、すべての層において、脛骨骨端軟骨よりも下顎頭軟骨で Asporin の強い発現がみられた。軟骨組織表層における Asporin 遺伝子発現量の経時的比較では、すべての週齢において下顎頭軟骨で Asporin の強い発現がみられた。下顎頭軟骨の各層ごとの Asporin 発現量の経時的比較では、1, 3, 5 週齢においては下顎頭軟骨表層で Asporin の強い発現がみられ、10, 20 週齢においてはその下層においても強い発現がみられた。

Asporin タンパク局在の観察においては、脛骨骨端軟骨には Asporin タンパクの局在はみられず、1, 3, 5 週齢の下顎頭軟骨表層に局在し、10, 20 週齢においては深層にも局在が観察された。

TGF- $\beta$ 1 遺伝子の発現解析では、TGF- $\beta$ 1 は脛骨骨端軟骨と下顎頭軟骨に発現していたが、下顎頭軟骨の発現が弱い傾向にあった。TGF- $\beta$ 1 タンパクは、脛骨骨端軟骨と下顎頭軟骨において局在がみられたが、10, 20 週齢の下顎頭軟骨においては局在がみられなかった。Asporin と TGF- $\beta$ 1 の蛍光二重染色では、Asporin, TGF- $\beta$ 1 とともに下顎頭軟骨表層で発現しており、Asporin と TGF- $\beta$ 1 は、線維細胞層で共局在していることがわかった。

p-Smad2/3 タンパクにおいて、脛骨骨端軟骨ではすべての週齢で p-Smad2/3 の局在がみられたが、下顎頭軟骨では 3, 5 週齢で深層に p-Smad2/3 の局在がみられ、表層ではみられなかった。10, 20 週齢ではすべての層に局在はみられなかった。

以上の結果より、Asporin は若齢から下顎頭軟骨で強い発現を示し、加齢とともにさらに増加していた。またそれに応じて TGF- $\beta$ 1, p-Smad2/3 の発現は減少していたことがわかった。

本研究において、骨端軟骨では TGF- $\beta$  シグナリングによって軟骨細胞分化、基質産生等が行われていることに対して、下顎頭軟骨表層ではそれが Asporin によって抑制されていることが示唆された。これは、下顎頭軟骨表層が骨端軟骨とは異なり、関節軟骨としての機能を担っているということから、Asporin が下顎頭軟骨表層の分化に対して何らかの影響を与えている可能性が考えられる。また、成体になると下顎頭軟骨深層でも Asporin の発現が高まることから、加齢に伴い Asporin 発現が増加することで下顎骨の成長が抑制されると考えられる。

**【結 論】**

下顎頭軟骨において Asporin は TGF- $\beta$ 1 シグナルを制御することで軟骨内骨化の制御を行っていることが示唆された。

**審査の結果の要旨**

軟骨細胞の分化や基質産生には TGF- $\beta$ /Smad シグナリングが重要な役割を果たしている。TGF- $\beta$  が軟骨細胞の細胞膜にある受容体に結合すると、細胞内の Smad2/3 のリン酸化が促進され、核内の DNA から軟骨基質タンパクが産生される。TGF- $\beta$  は軟骨細胞が存在する下顎頭においても Smad2/3 のリン酸化を通してその成長分化に関与する。

Asporin は 380 個のアミノ酸で構成される細胞外基質タンパクで、class I small leucine-rich proteoglycan family の一つである。Asporin は TGF- $\beta$ 1 と直接結合することで、その inhibitor として機能している。

Asporin は長管骨関節軟骨で発現し、骨端軟骨では発現しないと過去に報告されており、下顎頭軟骨での Asporin の報告は少ない。

宮本氏は、成長過程の下顎頭軟骨における Asporin の発現とその局在について経時的に解析し、下顎頭軟骨と脛骨骨端軟骨の成長の本質的な違いを遺伝子およびタンパク質レベルで解明することを試みた。

まず、Microarray のアッセイ法で、脛骨骨端軟骨よりも下顎頭軟骨において Asporin 遺伝子が強発現していることを明らかにした。

タンパクの局在解析において、マウスの脛骨骨端軟骨には Asporin の局在は見られず、下顎頭軟骨の表層に局在していた。さらに 10, 20 週齢のマウスにおいては表層だけでなく深部にも局在が観察された。そのほかにも、TGF- $\beta$ 1 遺伝子の発現解析、Asporin と TGF- $\beta$ 1 の蛍光二重染色、p-Smad2/3 タンパクの局在解析を通して、加齢に伴い Asporin 発現が増加することで下顎頭の成長が抑制される事を明らかにした。

本研究は今後、歯科矯正患者に対する薬物療法を開発する上で、極めて重要な知見を提供するものと考えられる。よって、本論文は博士（歯学）の学位を請求する価値が十分にあるものと判定した。