

学 位 論 文

変形性顎関節症における関節組織の破壊に関する
分子生物学的解析
：軟骨細胞における転写因子 HIF-1 活性化と
破骨細胞誘導機構

展開医科学専攻顎口腔頸部医科学講座歯科矯正学

白倉 麻耶

主任 　：　丹根一夫 教授

2008 年

目次

緒言	1
資料と方法	4
I. 動物モデルにおける TMJ-OA の発症機序の解析	
1. TMJ-OA モデルラットの作製	
2. TMJ-OA 病態の組織学的観察	
3. 下顎頭における HIF-1 α の局在についての検討	
4. 下顎頭における破骨細胞数の算定	
5. 下顎頭軟骨における <i>VEGF</i> 遺伝子の発現解析	
II. 軟骨分化誘導モデルを用いたマウスおよびヒト培養細胞における遺伝子の発現解析	
1. 用いた細胞と培養条件	
2. 定量 PCR 解析による遺伝子発現の検討	
3. ウェスタンブロット解析による蛋白発現の検討	
4. 低酸素培養	
5. HIF1A ノックダウンによる破骨細胞分化関連遺伝子発現についての検討	
結果	12
I. 動物モデルにおける TMJ-OA 病変の発現様相	
1. TMJ-OA 病変の経時的変化	
2. TMJ-OA モデルラット下顎頭における HIF-1 α の局在	
3. TMJ-OA モデルラット下顎頭における破骨細胞数の変化	
4. TMJ-OA モデルラット下顎頭における <i>VEGF</i> 遺伝子の発現変動	
II. 軟骨分化誘導モデルを用いたマウスおよびヒト培養細胞における遺伝子発現	
1. インスリンによる ATDC5 の分化誘導	
2. ATDC5 における HIF-1 α 蛋白の発現	
3. ATDC5 における HIF-1 標的遺伝子の発現変化	
4. ATDC5 における破骨細胞関連因子の発現	
5. HIF1A ノックダウンによる破骨細胞分化関連因子の遺伝子発現の変化	

考察	27
1. 機械的負荷による変形性顎関節症の病態形成について	
2. 変形性顎関節症の病態形成における HIF-1 の関与について	
3. 軟骨前駆細胞 ATDC5 について	
4. 低酸素培養および低酸素応答機構と軟骨変性について	
5. HIF-1 α と OPG の関係について	
6. 本研究の臨床的意義について	
総括	39
参考文献	41
謝辞	49

緒言

近年、歯科臨床においてしばしば遭遇する顎関節症（Temporomandibular joint disorder: TMD）は、顎関節部の疼痛、関節雑音、開口障害を主症状とする慢性疾患群であり、本邦においては、1956年に上野らによってはじめて提唱された（上野ら、1956）。一般母集団の10～30%にTMD関連症状が認められ、潜在的なTMD患者を含めるとその発現頻度はさらに高いと推測される（田中ら、1992）。

TMDの発症原因は多岐にわたるが、特定の咬合様式を有する患者群での発現が高いことから、その原因の一つとして咬合系、顎顔面骨格系の不調和が指摘されている（不島ら、1989；田中ら、1992）。一方、TMDの病態の一つである関節円板の転位による下顎頭への機械的負荷が、顎関節構成要素を障害する圧迫力となり、表層軟骨の変性や骨吸収を引き起こしうることが報告されている（Katzberg *et al.*, 1983; de Bont *et al.*, 1993; Tanimoto *et al.*, 2004; Ohno *et al.*, 2005）。さらに、TMDに伴う下顎頭吸収は、若年者では下顎骨成長の抑制、成人では下顎頭の変形、下顎枝の高さの減少を伴いながら下顎骨の後方回転を生じることが報告されている（Arnett *et al.*, 1996）。また、これらの変化が片側性に生じた場合には、下顎骨の非対称による顎偏位が見られる（野々山ら、1998）。これらの報告より、TMDが顎顔面骨格の成長に大きな影響を及ぼしている可能性が強く示唆される。

TMD病態のうち、変形性顎関節症（temporomandibular joint-osteoarthritis: TMJ-OA）は下顎頭軟骨層の破壊や骨の変形、円板の穿孔などを主徴とする慢性変性疾患である。その主な発症要因として、他の関節症と同様、関節表面に対する過剰あるいは異常な負荷（Hinton *et al.*, 1986; 覚道、1989; Ohashi *et al.*, 2002; Fujisawa *et al.*, 2003; Tanimoto *et al.*, 2004;

Ohno *et al.*, 2005) が挙げられている。また、ブラキシズムや外傷などとの関連性 (de Bont *et al.*, 1997)、下顎頭における骨棘の形成と Runt-related transcription factor-2 (Runx-2)、matrix metalloproteinase 13 (MMP13) の発現との関連性 (Kamekura *et al.*, 2006)、血管新生と炎症に関係するさまざまなサイトカインや増殖因子の関わり (Bonnet *et al.*, 2005) など、多岐にわたる検討がなされてきた。しかし、変形性顎関節症の発症については多因子的な要素が強く、未だ不明な点も多い (Kawaguchi, 2008)。一方、Tanaka ら (2005) は、強制開口による顎関節への持続的負荷が、下顎頭軟骨の退行性変化や、隣接する軟骨下骨における新生血管の増生や多数の破骨細胞の増加を引き起こすこと、病変部軟骨における血管新生因子 vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現が誘導されることを報告した。骨破壊の関連因子としては、骨芽細胞や破骨細胞の分化関連因子である osteoprotegerin (OPG)、receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK)、RANK ligand (RANKL) などが知られている (Hofbauer *et al.*, 2000; Boyce *et al.*, 2007)。さらに、VEGF が破骨細胞の遊走、誘導、分化を促進すること (Niida *et al.*, 1999; Nakagawa *et al.*, 2000) が知られており、TMJ-OA における骨吸収と VEGF との関連が強く推察される。

最近、軟骨の恒常性維持や TMJ-OA の病態変化に、低酸素刺激と hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) が重要な役割を果たしている可能性が報告された (Pfander and Gelse, 2007)。HIF-1 α は低酸素などの種々のストレス刺激により活性化される転写因子として知られており、VEGF などの血管新生因子やさまざまなストレス応答遺伝子発現を促進し、創傷治癒過程などで重要な働きをしている (Shibuya *et al.*, 2001; Bates *et al.*, 2003; Hoeben *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008)。例えば、創傷を受けた細胞における急性炎症反応のひとつとして、tumor necrosis factor- α (TNF- α) が HIF-1 α を誘導し、これが創傷の治癒と関係している (Albina *et*

al., 2001)。また、OA の関節軟骨において interleukin-1 β (IL-1 β) や低酸素ストレスが HIF-1 α を誘導し、軟骨細胞の維持に重要な役割を果たしていること (Yudoh *et al.*, 2004)、メカニカルストレスにより関節軟骨に HIF-1 α が発現し、それにより VEGF が誘導されること (Pufe *et al.*, 2004) などが明らかとなっている。

このように、HIF-1 α が OA において VEGF の誘導因子のひとつである可能性が示唆されており、TMJ-OA においても、HIF-1 α による VEGF 制御、ならびに HIF-1 α と骨破壊との関係が推察される。本研究では、TMJ-OA 発症の分子機構を解明することを目的として、TMJ-OA モデルラットおよび培養軟骨細胞を用いて HIF-1 α の関わりを詳細に検討した。

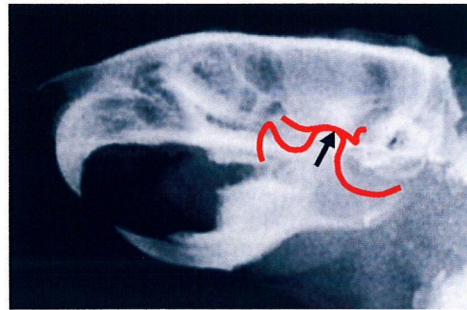
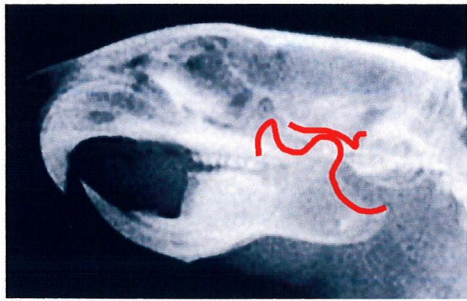
試料と方法

I. 動物モデルにおける TMJ-OA の発症機序の解析

1. TMJ-OA モデルラットの作製

実験には 13 週齢 Wistar 系雄性ラットを用いた。8×12×10mm の逆型斜面板を即時重合レジン（Orthofast®、GC、東京）を用いて作製し、ラットの上顎前歯部に装着した。本装置により咬合時に下顎を後上方へ誘導し、下顎頭へ過剰な負荷が加わるようにした（図 1）。

実験では、斜面板装着後 10 日間負荷を加えた 10 日群、20 日間負荷を加えた 20 日群、20 日間負荷を加えた後、斜面板を除去し顎関節への負荷を取り除き 10 日間の回復期間を与えた 10 日回復群、20 日間の回復期間を与えた 20 日回復群、負荷を加えなかった対照群の 5 群を設定した（図 2）。



下顎後退量 5mm

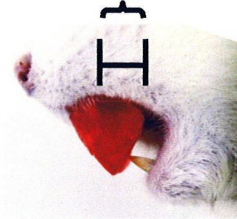


図1 ラット頭部側面X線写真と逆型斜面板装着時の写真
矢印は下顎頭圧迫方向を示す。

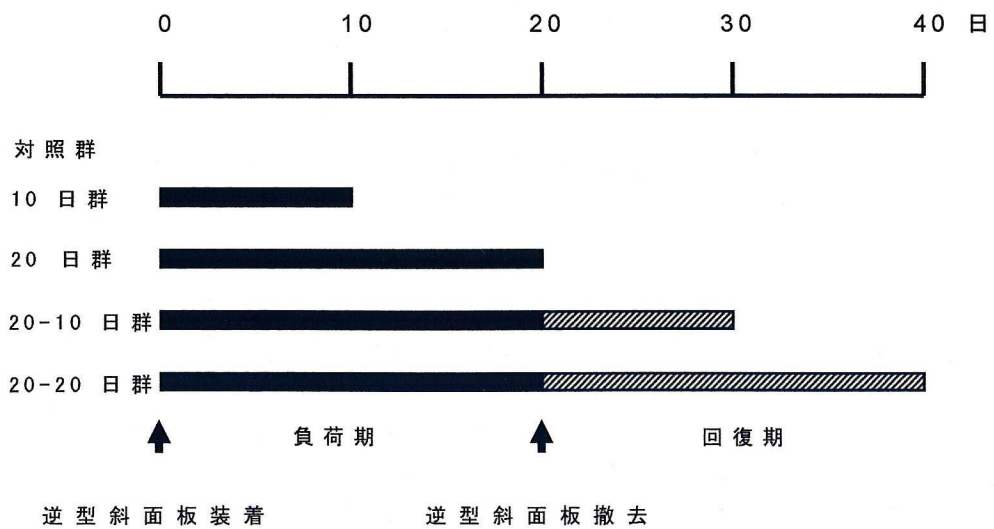


図2 実験群、対照群と各群の実験スケジュール

2. TMJ-OA 病態の組織学的観察

実験群 4 群うち 10 日群 6 匹（12 下顎頭）、20 日群 9 匹（18 下顎頭）、10 日回復群 3 匹（5 下顎頭）、20 日回復群 3 匹（6 下顎頭）と対照群 8 匹（16 下顎頭）を、ジエチルエーテル（ナカライテスク、京都）による吸入深麻酔下で屠殺した。次いで、頭部を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンにより 24 時間浸漬固定を行なった。顎関節を一塊として摘出後、エチレンジアミン四酢酸（10%EDTA）に浸漬し約 4 週間脱灰処理を行なった。脱灰終了後パラフィンに包埋し、ロータリーマイクロトーム（HM315, Microm Lab., Walldorf, Germany）により厚さ 4.5 μm の下顎頭矢状断連続切片を作製した。作製した切片のうち 1 関節につき 1 枚ずつヘマトキシリン - エオジン（H-E）染色を行い、下顎頭前方部、中央部、後方部において病理組織学的変化を光学顕微鏡（BX50、オリンパス光学工業、東京）により観察した。

統計解析は総計解析ソフト SPSS ver 11.0 を使用し、多群間での平均値の比較においては、one-way ANOVA を、2 群間の有意差検定には *t* 検定を用いた。

3. 下顎頭における HIF-1 α の局在についての検討

TMJ-OA モデルラットの下顎頭における HIF-1 α 蛋白の発現について検討した。前述の切片を用い、下降アルコール系による脱パラフィン処理を施した。Target Retrieval Solution[®]（DakoCytomation、京都）を用いて 1 時間湯煎にて抗原賦活処理を施した後、リン酸緩衝食塩水（PBS）により洗浄した。染色には CSA system[®]（DakoCytomation）を用い、一次抗体として 500 倍希釈したマウス anti-HIF-1 α monoclonal IgG2b 抗体（フナコシ、福岡）を 4 $^{\circ}\text{C}$ で 12 時間反応させた。二次抗体にはビオチン標識抗マウス IgG 抗体（DakoCytomation）を用いた。PBS で洗浄後、DAB（DakoCytomation）を用いて発色させた。ヘマトキシリンにて対比染色し、上昇アルコール系に

て脱水後、封入した。

乾燥後、光学顕微鏡(オリンパス)を用いて HIF-1 α の発現局在を観察し、下顎頭前方部、中央部、後方部における 450 μ m \times 900 μ m の検鏡範囲での全成熟細胞数中、細胞核に HIF-1 α 陽性像を示す細胞数の割合(HIF-1 α 陽性細胞率)を算出した。統計処理は実験 I -2 と同様の方法を用いた。

4. 下顎頭における破骨細胞数の算定

TMJ-OA モデルの下顎頭における破骨細胞の出現状況を検討するため、tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色を行った。切片は下降アルコール系にて脱パラフィン処理を施し、流水下で 10 分水洗後、37 $^{\circ}$ C で 30 分 TRAP 反応液 (50mM sodium tartrate; Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA, 45mM sodium acetate; pH 7.5; ナカライテスク, 5mg Naphtol AS-MX phosphate; Sigma Aldrich Corp., 0.5ml N,N- dimethylformamide; ナカライテスク, 30mg Fast red violet LB salt; Sigma Aldrich Corp.) を作用させた。流水下で 10 分水洗した後、メチルグリーンにて対比染色し、上昇アルコール系にて脱水後、封入し、光学顕微鏡(オリンパス光学工業)で観察した。各下顎頭の肥大軟骨細胞に接した領域における破骨細胞数を測定し、関節あたりの平均を算出した。各 2 群間の破骨細胞数の有意差検定には、*t* 検定を用いた。

5. 下顎頭軟骨における VEGF 遺伝子の発現解析

各実験群および対照群の下顎頭軟骨を採取し、PBS にて洗浄後、液体窒素にて凍結し、-80 度にて保存した。これらの試料から RNeasy[®] (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA)を用いて RNA を抽出し、1 μ g を High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) にて逆転写し、TaqMan[®] Gene Expression Assay System (Applied Biosystems) を用い定量

RT-PCR 法により *VEGF* 遺伝子の発現解析を行った。

II. 軟骨分化誘導モデルを用いたマウスおよびヒト培養細胞における遺伝子の発現解析

1. 用いた細胞と培養条件

マウス胚性腫瘍細胞 (EC) 細胞株 AT805 から樹立されたマウスの胚性腫瘍細胞由来のクローン化細胞株、軟骨前駆細胞 ATDC5 (理化学研究所、筑波) を培養し、実験に供した。ATDC5 は、5% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS、第一化学、東京)、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ transferrin (Sigma Aldrich Corp.)、 3×10^{-8} M sodium selenite (Sigma Aldrich Corp.)、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシン (Sigma Aldrich Corp.) を含む Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM) mixture F-12 Ham (Sigma Aldrich Corp.) 中で 37°C、5% CO₂ 存在下にて培養を行い、培養液は 2 日毎に交換した。

直径 10 cm の培養皿 (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) に 3×10^5 個の ATDC5 を播種し、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ インスリン (Sigma Aldrich Corp.)、37.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アスコルビン酸 (ワコーケミカル、大阪) 含有の軟骨分化培養液を用いて軟骨分化誘導を開始した。培養液は 2 日毎に交換した。

2. 定量 PCR 解析による遺伝子発現の検討

直径 10 cm の培養皿に 3×10^5 個の ATDC5 を播種し、常酸素分圧下および低酸素分圧下 (1% O₂) で培養し、前述の分化誘導を行った。分化誘導開始直前および分化誘導開始後 4 日目、7 日目、10 日目、14 日目に細胞を回収した。また、分化誘導後 7 日目、14 日目に 12 時間低酸素処理を行い、細胞を回収した。回収した細胞から RNeasy[®] (Qiagen) を用い RNA を抽出し、1 μg の RNA を High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) にて逆転写し、TaqMan[®] Gene Expression Assay System (Applied

Biosystems)を用い定量 RT-PCR 法により、軟骨分化マーカーとして type II collagen (*COL2A1*) と type X collagen (*COL10A1*)、HIF-1 標的遺伝子として *VEGF*、adrenomedulin (*ADM*) と differentially expressed in chondrocytes 2 (*BHLHB2*)、破骨細胞分化関連遺伝子として osteoprotegrin (*OPG*) 遺伝子の発現解析を行った。遺伝子発現量についてはコントロールの *GAPDH* に対する比を算出し、比較検討した。

3. ウェスタンブロット解析による蛋白発現の検討

Urea lysis buffer (7M Tris, 10mM Tris-HCl; pH6.8, 10% Glycerol, 0.5mM PMSF, 1mM DTT, 1×Complete Mini; Roche Applied Science, Mannheim, Germany) を用いて ATDC5 の蛋白抽出を行った。総蛋白 20 μ g を 10% SDS-PAGE 上で電気泳動により分離後、ナイロンメンブレン (Immobilon-P, MILLIPORE, MA, USA) 上に転写した。メンブレンを 5% スキムミルク (ワコーケミカル) に浸漬し、1時間室温で処理した後、一次抗体として抗 HIF-1 α (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA, 1:1000)、および抗 Arnt (BD Pharmingen, 1:500)、または抗 β -actin (BD Pharmingen, 1:5000)、抗 OPG (Santa Cruz Biotech Inc., Santa Cruz, CA, USA, 1:500) を用い、4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。メンブレンを TBS-T wash buffer にて洗浄し、二次抗体として HRP 標識抗マウス IgG (GEヘルスケア バイオサイエンス、東京, 1:2000) により 90分室温にて処理した。その後、メンブレンを TBS-T wash buffer にて十分に洗浄し、検出試薬 ECL Plus (GEヘルスケア バイオサイエンス) を用いて化学発光させて X線フィルム (GEヘルスケア バイオサイエンス) に露光したものを現像した。

4. 低酸素培養

低酸素培養には低酸素チャンバー（ヒロセイ、広島）を用いた。酸素モニター（ドレーグル・セイフティージャパン、東京）を用い、1%酸素分圧下で12時間培養後、細胞回収を行なった（図3）。

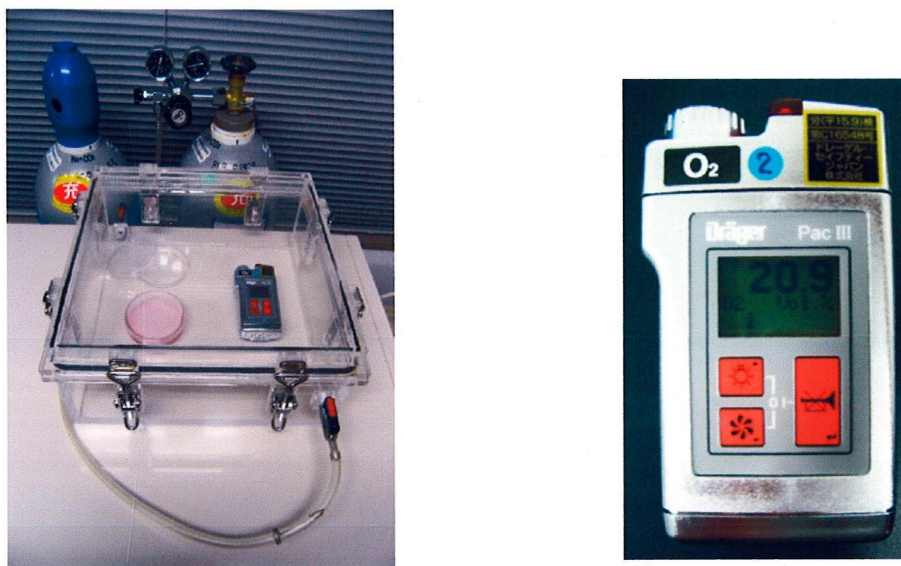


図3 低酸素培養システム

左：低酸素チャンバー 右：酸素モニター

5. *HIF1A* ノックダウンによる破骨細胞分化関連遺伝子発現についての検討

ヒト口腔扁平上皮癌細胞 HSC2 細胞に *HIF1A* siRNA を導入することにより、*HIF-1α* の発現を抑制した。10 cm 径培養ディッシュに 3×10^5 個の HSC2 を播種し、*HIF1A* 特異的 (si*HIF1A*)、または非特異的なコントロール (siNS) siRNA (QIAGEN) を TransIT[®]-siQUEST[™] Transfection Reagent (Mirus Corporation, Madison, Wisconsin, USA) を用いて導入12時間後、通常酸素、または低酸素分圧下でさらに24時間培養した。細胞を回収後、RNA を抽出し、*HIF1A* および *OPG* 遺伝子の発現解析を行った。コントロールとして *GAPDH* 発現を用いた。

結果

I. 動物モデルにおける TMJ-OA 病変の発症様相

1. TMJ-OA 病変の経時的変化

H-E 染色により組織学的な検討を行った結果、対照群では、前方部、中央部、後方部ともに正常な軟骨層構造を呈し、上方から線維層、増殖層、成熟層、肥大層と、肥大層下部に骨髓腔が侵入した軟骨下骨の存在が明確に観察された。また、下顎頭前方部に比べ後方部では各層の厚径は増大する傾向を示した（図4）。

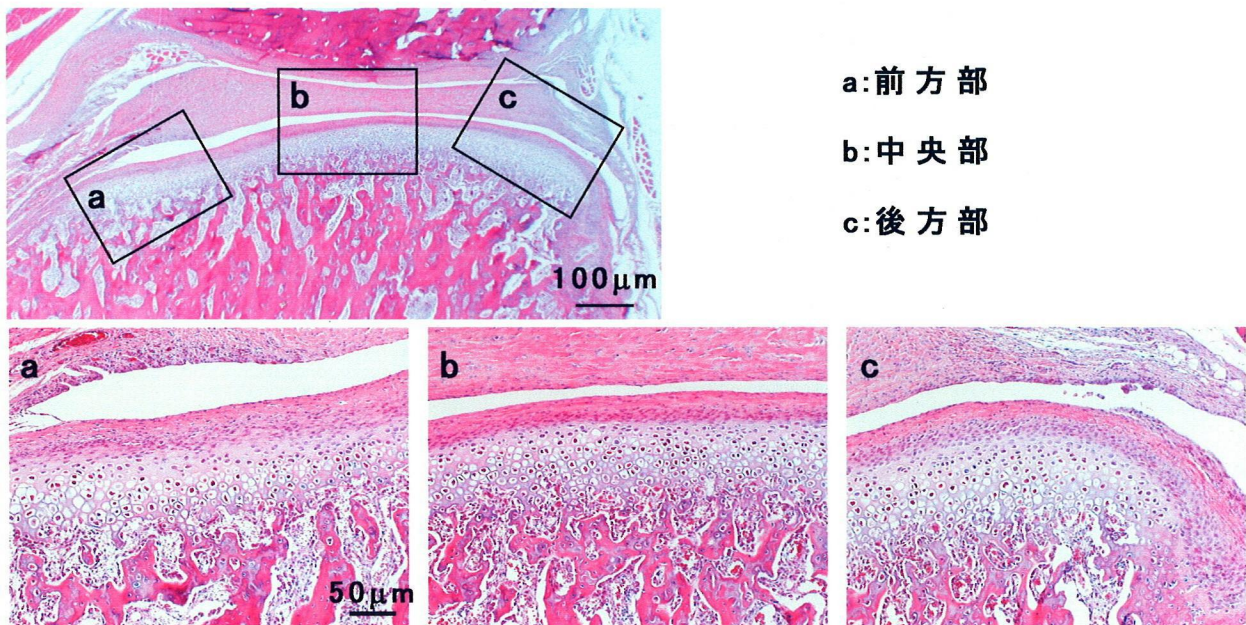


図4 対照群のH-E 染色像

前方、中央、後方とも、軟骨の層状構造が認められる。
上から、線維層、増殖層、成熟層、肥大層、軟骨下骨（層）

一方、実験群では、対照群と比較し下顎頭軟骨の層状構造の乱れおよび欠失、軟骨基質の硝子化、骨髓腔の減少などが観察された（図5, 6）。

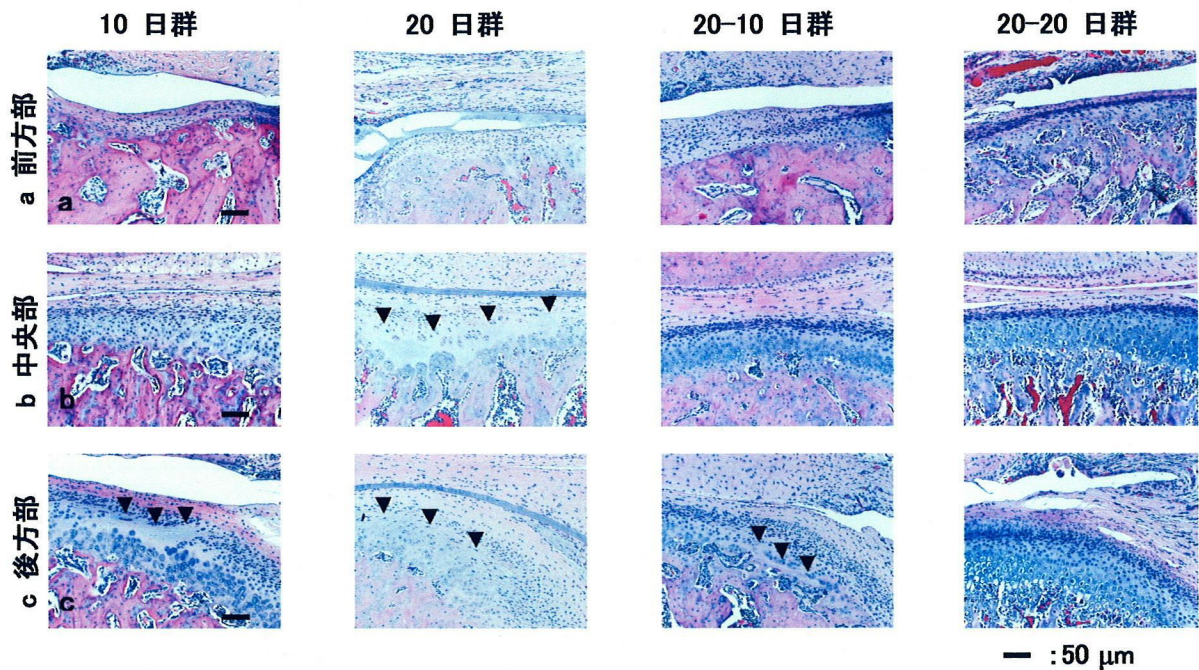


図5 実験群のH-E 染色像

10日群、20日群、10日回復群において、軟骨基質の硝子様変性が認められた（矢頭）。また、軟骨の層構造の乱れ、欠失が認められ、20日群、10日回復群では骨髓腔の減少も観察された。

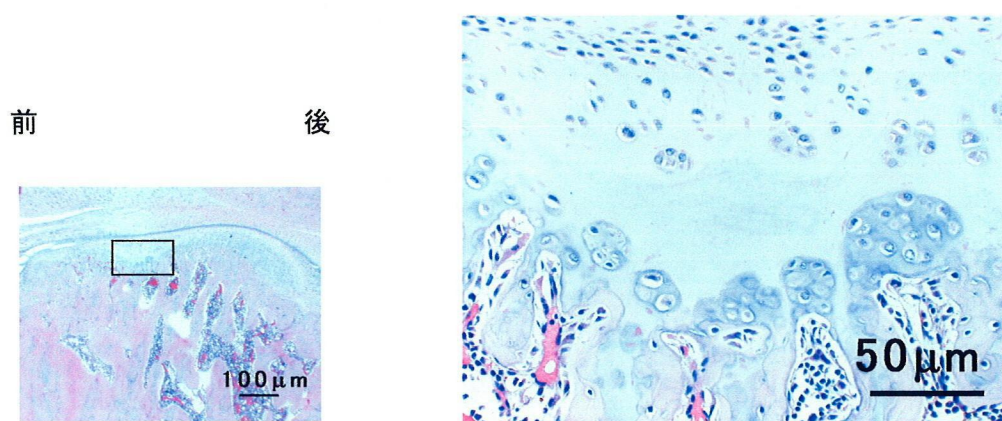


図6 20日群のTMJ-OA病変（硝子様変性）

左：弱拡大

右：強拡大

成熟軟骨層から肥大軟骨層にかけて細胞の欠失、硝子様変性が認められる。

また、軟骨が消失し、軟骨下骨の一部が吸収され、同部へ線維性結合組織の入り込んだ骨破壊の様子も観察された。さらに、その周囲に多数の破骨細胞が観察された（図7）。

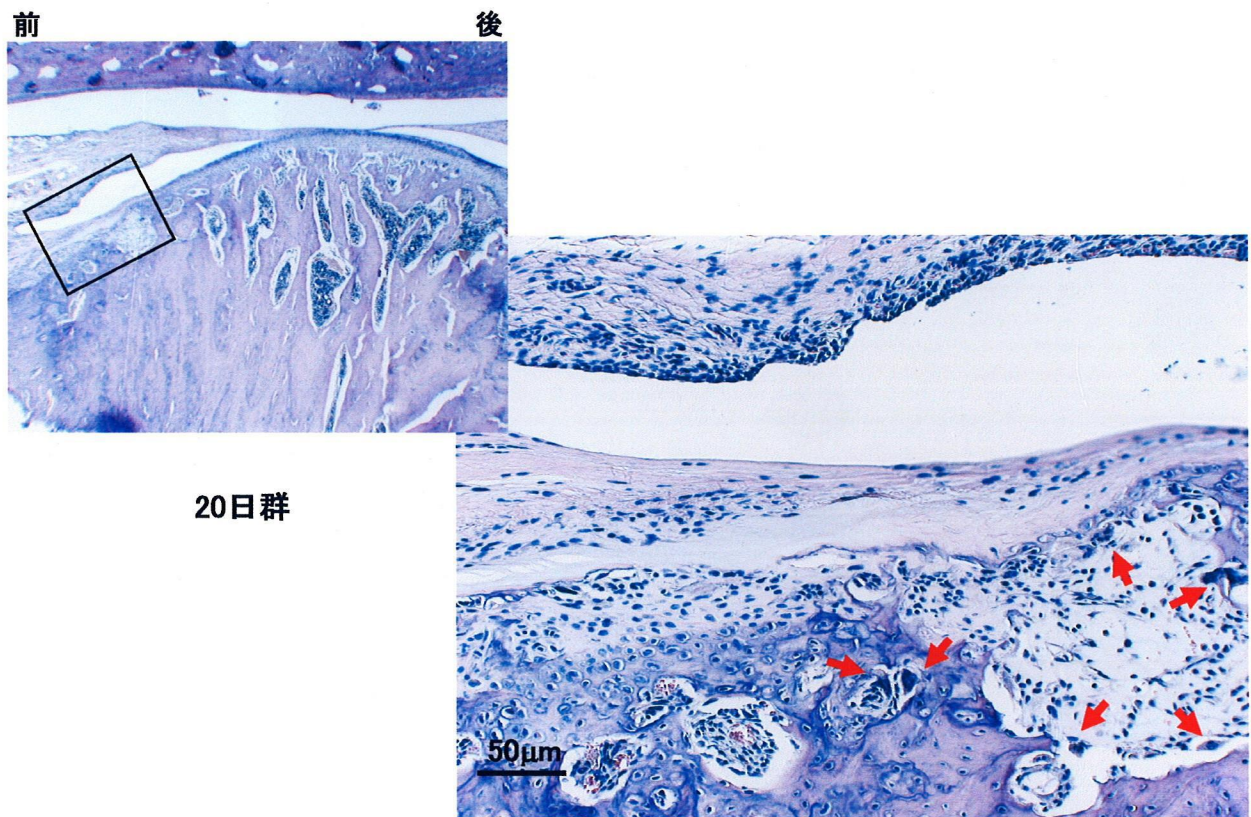


図7 20日群のTMJ-OA病変(初期骨吸収)

矢印は破骨細胞を示す。
骨吸収部位に線維性結合組織の浸潤と、その周囲に破骨細胞の出現が認められる。

軟骨の層構造の乱れや欠失、硝子様変性などの組織変性の認められた関節数を算定し比較したところ、組織変性像は10日群、20日群と経時的に有意に増加した。一方、負荷を除去すると安静期間に応じて減少し、20日間の回復期間を与えたものでは半数のものが正常な組織像を示した。部位別では後方になるにつれて変化が広範に認められる傾向は見られたが、有意差は認められなかった（表1）。

表1 各実験群における組織変性の頻度

		対照群	10日群	20日群	20-10日群	20-20日群	合計
下顎頭個数 (n)		16	12	18	5	6	57
組織変性のみられた 下顎頭個数 n (%)		2 (12.5)	8 (66.7)	18 (100.0)	4 (80.0)	3 (50.0)	35 (61.4)
Fisher's test (P)	vs 対照群		0.005	< 0.001	0.011	0.100	
	vs 20日群	< 0.001	0.018		0.217	0.010	
部位別分類 (下顎頭個数)							
	a 前方部	2	5	16	4	3	30
	b 中央部	1	4	17	3	2	27
	c 後方部	2	8	18	4	2	34

2. TMJ-OA モデルラット下顎頭における HIF-1 α の局在

TMJ-OA モデルラットの下顎頭における HIF-1 α の局在を調べるため、抗 HIF-1 α 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った結果、HIF-1 α 発現は下顎頭成熟軟骨層細胞核に特異的に観察された。また、HIF-1 α 陽性細胞数は対照群と比較し 10 日群、20 日群の順に増加し、10 日回復群、20 日回復群の順に減少する傾向を示した。特に、20 日群では最も強い染色像が観察された (図 8, 9)。

次いで、全成熟軟骨細胞に対する HIF-1 α 陽性細胞の割合、すなわち HIF-1 α 陽性細胞率を算出し、各群間での比較を行った結果、HIF-1 α 陽性細胞率は対照群と比較し、負荷期間の長さに応じて増加し、回復期間に比例して減少する傾向を示した。また、部位別で比較した場合でも、同様な経時的変化を示した。さらに、前方部と比較し後方部で陽性細胞率が高くなる傾向が認められた (図 10)。

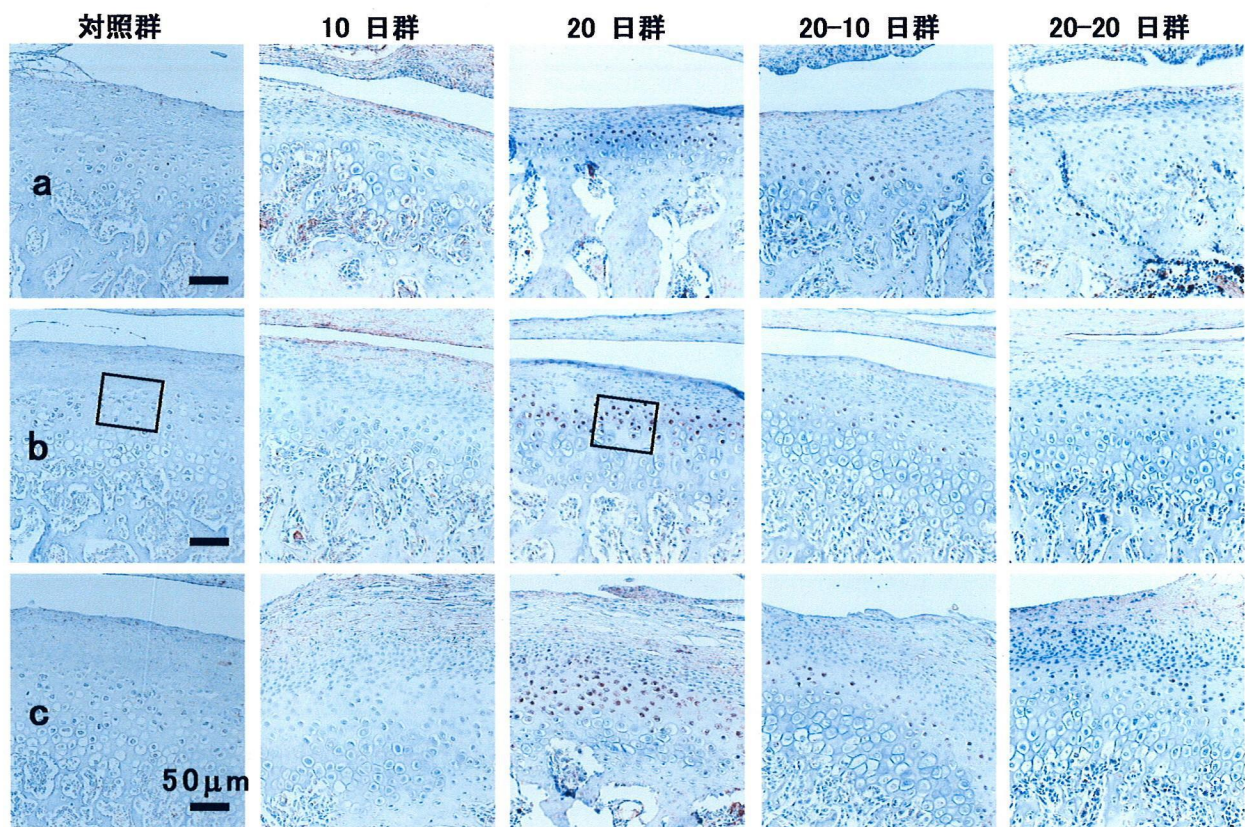
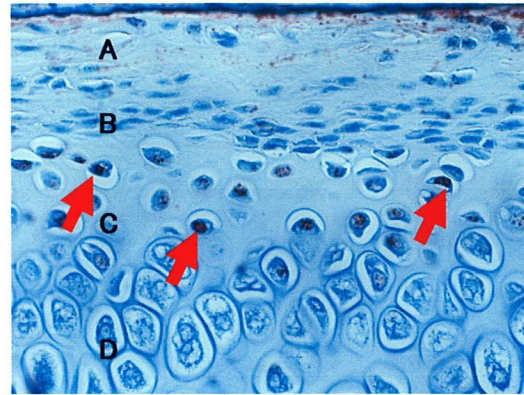
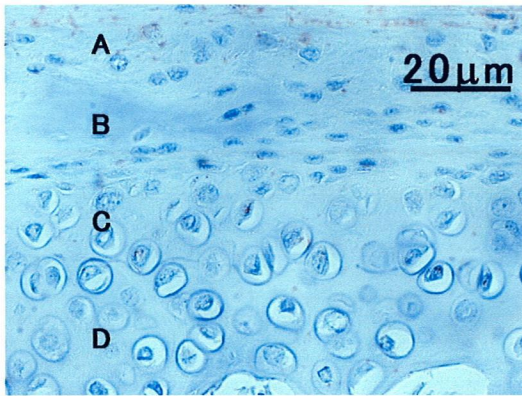


図8 TMJ-OAラット下顎頭におけるHIF-1 α の免疫組織化学染色像

20日群ではHIF-1 α 蛋白の強発現が認められ、その後回復期間とともに減少する傾向が認められた。



A: 線維層
B: 増殖層
C: 成熟層
D: 肥大層

対照群

20日群

図9 下顎頭成熟軟骨層におけるHIF-1α陽性細胞(拡大像)

成熟軟骨層特異的にHIF-1α蛋白の発現が認められる。
矢印はHIF-1α陽性細胞を示す。

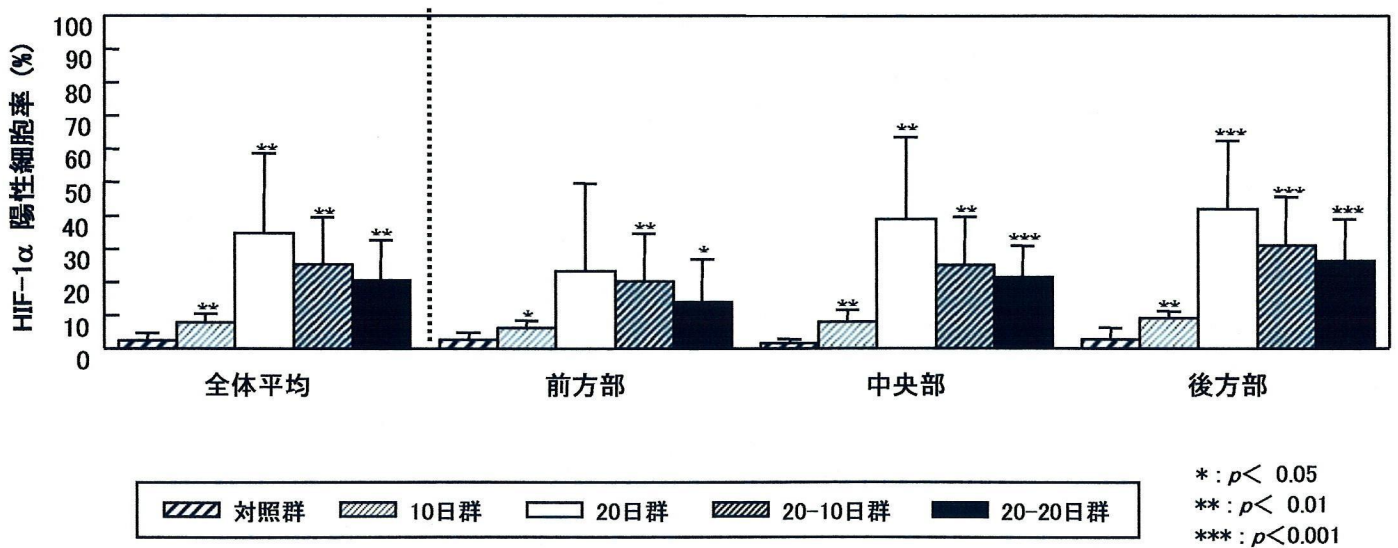


図10 各実験群におけるHIF-1α陽性細胞の数の変化

10日群、20日群の順に増加し、負荷を除去すると回復期間に応じて減少した。

3. TMJ-OA モデルラット下顎頭における破骨細胞数の変化

TMJ-OA モデルにおける HIF-1 α と破骨細胞の関係を調べるため、各実験群における破骨細胞数を算定し、各群間の比較、検討を行った。その結果、破骨細胞数は 20 日群、10 日回復群において大きな値を示し、全体でみると 10 日群と比べて有意差が認められた。また、部位別に比較すると、HIF-1 α 陽性細胞率と同様、中央部、後方部において破骨細胞数が多くなる傾向を示した (図 11)。

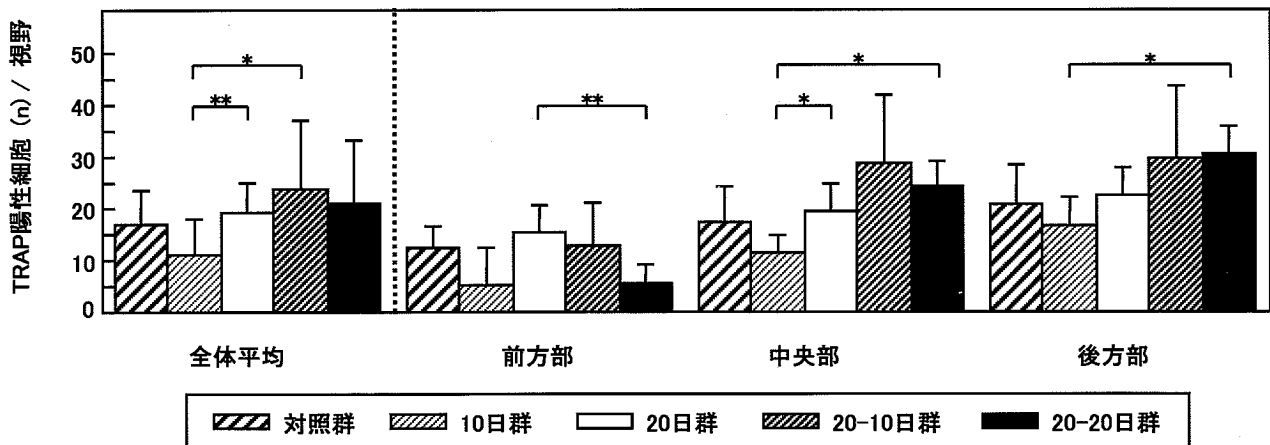


図11 各実験群における破骨細胞数の変化

* : $p < 0.05$
 ** : $p < 0.01$

20日群、10日回復群で大きな値を示し、10日群と比較して有意差が認められた。

4. TMJ-OA モデルラット下顎頭軟骨における *VEGF* 遺伝子の発現変動

TMJ-OA における HIF-1 α と *VEGF* 遺伝子発現の関係を調べるため、下顎頭軟骨組織における *VEGF* 遺伝子の発現変動を定量 RT-PCR を用いて検討した。その結果、下顎頭軟骨の *VEGF* 発現量は対照群と比較し、10 日群から 20 日群にかけて増加し、対照群と比べて有意に大きい値を示した。また、10 日回復群、20 日回復群では徐々に減少し、20 日群と比べて有意に小さい値を示した (図 12)。

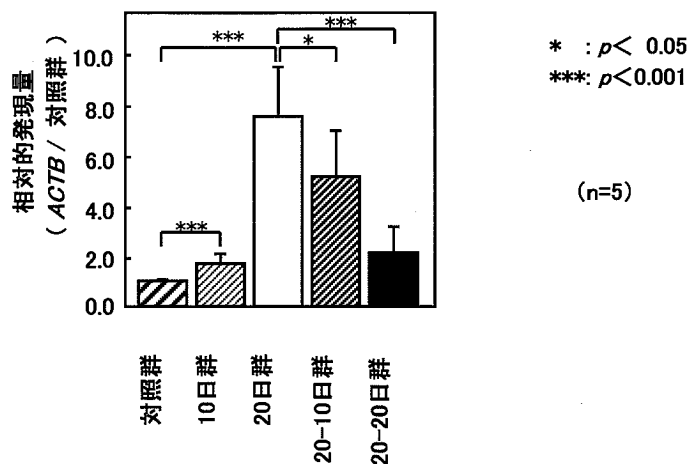


図12 下顎頭軟骨における *VEGF* 遺伝子の発現変動

対照群と比較し、10 日群から 20 日群にかけて増加し、有意に大きい値を示した。また、負荷除去後回復期間に応じて徐々に減少し、20 日群と比べて有意に小さい値に至った。

II. 軟骨分化誘導モデルを用いたマウス及びヒト培養細胞における遺伝子発現

1. インスリンによる ATDC5 の分化誘導

ラット下顎頭軟骨で観察された、表層から深層への軟骨層の分化過程を *in vitro* 実験系で再現する目的で、インスリンによる ATDC5 の分化誘導モデルを用いた。各分化段階を確認するため、軟骨分化マーカー *COL2A1* と *COL10A1* の遺伝子発現量を、定量 RT-PCR 法を用いて確認した。

その結果、軟骨分化マーカー *COL2A1* 遺伝子の発現は経時的に増加し、分化誘導開始 7 日目で頂点に達し、以降は減少した。一方、*COL10A1* 遺伝子の発現は観察期間中継続して経日的な増加を示した (図 13)。このことから、ATDC5 は誘導 7 日目頃に成熟細胞に、7 日以降から 14 日にかけて肥大細胞に分化していくと考えられる。

また、顕鏡下にて、分化誘導初期には細胞の増殖が認められ、分化が進むにつれ細胞周囲に細胞外器質の形成が観察された (図 14)。

このように、分化開始後の日数による細胞の変化が明確となり、下顎頭軟骨の表層から深層への分化過程が培養軟骨細胞の分化誘導により再現された。

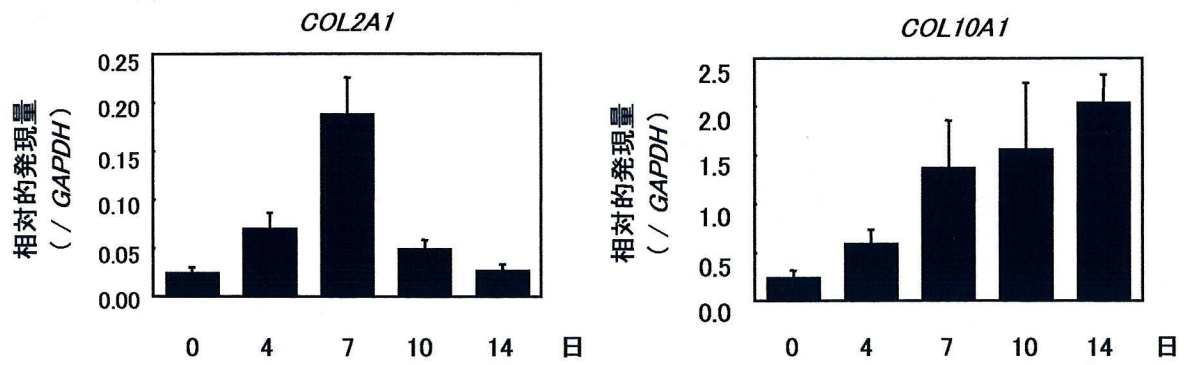


図13 軟骨分化マーカー遺伝子の発現変動

左: *COL2A1* 7日目に発現量が最も高くなった。
 右: *COL10A1* 経日的な増加を示した。

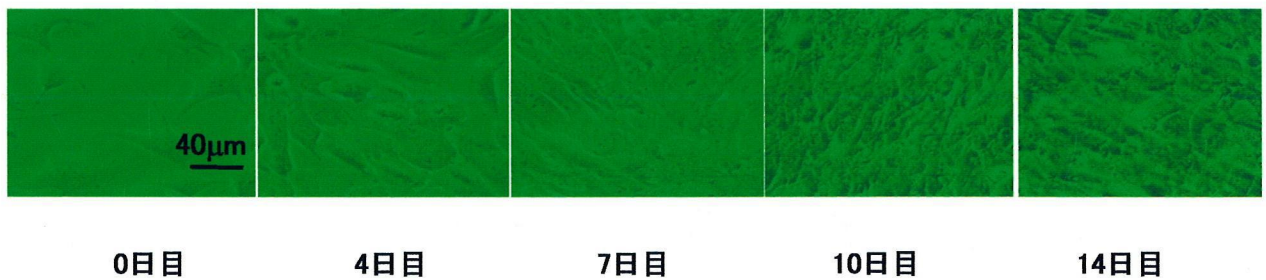


図14 分化誘導時の細胞形態

2. ATDC5 における HIF-1 α 蛋白の発現

軟骨の各分化段階における HIF-1 α 蛋白の発現を調べることを目的として、インスリンを用いた ATDC5 の分化誘導を行い、HIF-1 α 誘導刺激として低酸素処理を施した。24 時間後に細胞を回収、蛋白を抽出して、ウエスタンブロット解析にて HIF-1 α 発現解析を行った。

その結果、培養軟骨細胞に低酸素刺激を与えると、分化誘導 7 日目、14 日目において、HIF-1 α 蛋白の発現誘導が認められ、特に 7 日目の成熟軟骨細胞に強い発現が見られた (図 15)。一方、分化誘導前の軟骨前駆細胞では、低酸素刺激を与えたにも拘わらず、HIF-1 α 蛋白は検出されなかった。

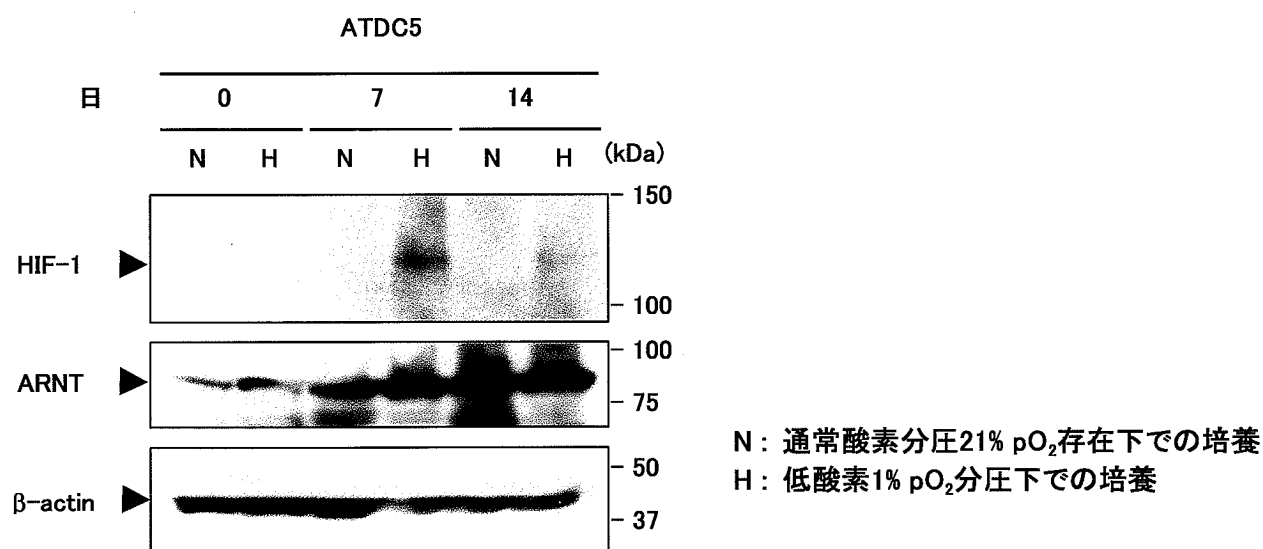


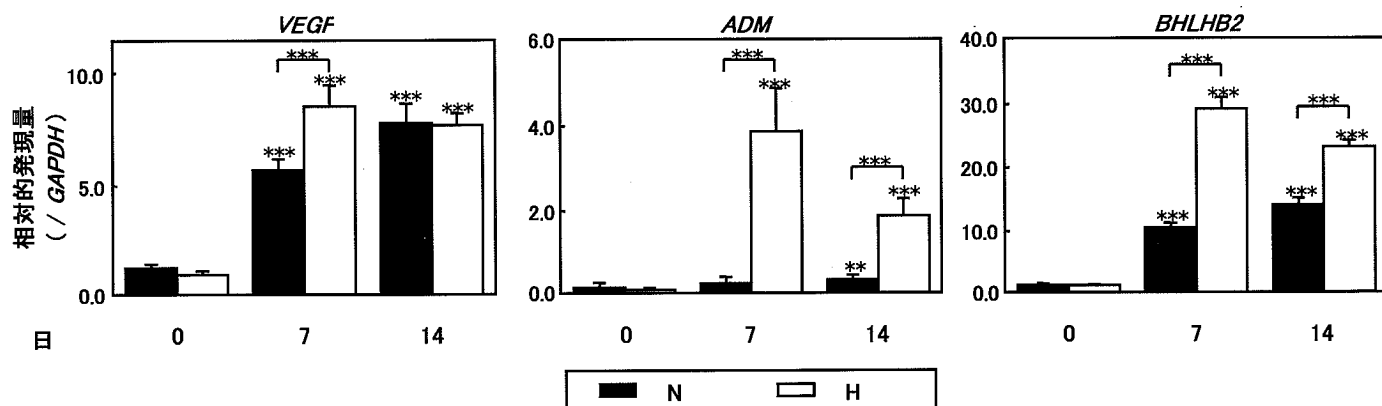
図15 軟骨分化過程におけるHIF-1 α 蛋白発現

誘導7日目に低酸素刺激によりHIF-1 α 蛋白の強発現が認められた。

3. ATDC5 における HIF-1 標的遺伝子の発現変化

HIF-1 α 蛋白の活性を調べるため、HIF-1 により誘導されることが知られている *VEGF*、*ADM*、*BHLHB2* 遺伝子の発現変化を定量 RT-PCR 法にて検討した (Semenza., 2001; Metzen *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Bani Hashemi *et al.*, 2008)。

その結果、通常酸素分圧下では分化誘導後 *VEGF* をはじめ *ADM* と *BHLHB2* の遺伝子発現が経目的に増加した (図 16)。また、分化誘導前の細胞では、いずれの遺伝子も低酸素による発現変動は認められなかったが、分化誘導開始 7 日目では低酸素刺激による遺伝子の発現増強がいずれの遺伝子でも認められ、成熟軟骨細胞において HIF-1 α により *VEGF* などの HIF-1 標的遺伝子の発現が誘導されることが示された。さらに、*ADM* と *BHLHB2* では誘導後 14 日目でも同様の低酸素刺激による遺伝子発現変動が認められたが、*VEGF* は大きな変化を示さなかった (図 16)。



** : $p < 0.01$

*** : $p < 0.001$

N : 通常酸素分圧21% pO₂存在下培養

H : 低酸素1% pO₂分圧下培養

注: S.D.バー上のアスタリスクは通常および低酸素培養それぞれの分化誘導開始直前との比較における有意差を示す。

図16 軟骨分化過程におけるHIF-1標的遺伝子の発現変化

誘導7日目に低酸素刺激による強い低酸素応答遺伝子の発現が認められる。

4. ATDC5 における破骨細胞関連因子の発現

実験 I でみられた下顎頭軟骨下骨における破骨細胞の出現メカニズムを明らかにするため、ATDC5 における破骨細胞分化抑制因子 OPG の遺伝子発現ならびに蛋白発現について、定量 RT-PCR 法とウエスタンブロット解析を用いてそれぞれ検討した。

その結果、OPG 遺伝子は軟骨分化と共に発現が増加し、特に誘導後 7 日で最も強い発現が認められ、その後低下した。また、同細胞に低酸素刺激が加わると、いずれの分化過程においても OPG の発現が抑制された。同様の OPG 発現変動は蛋白レベルでも確認された。(図 17)

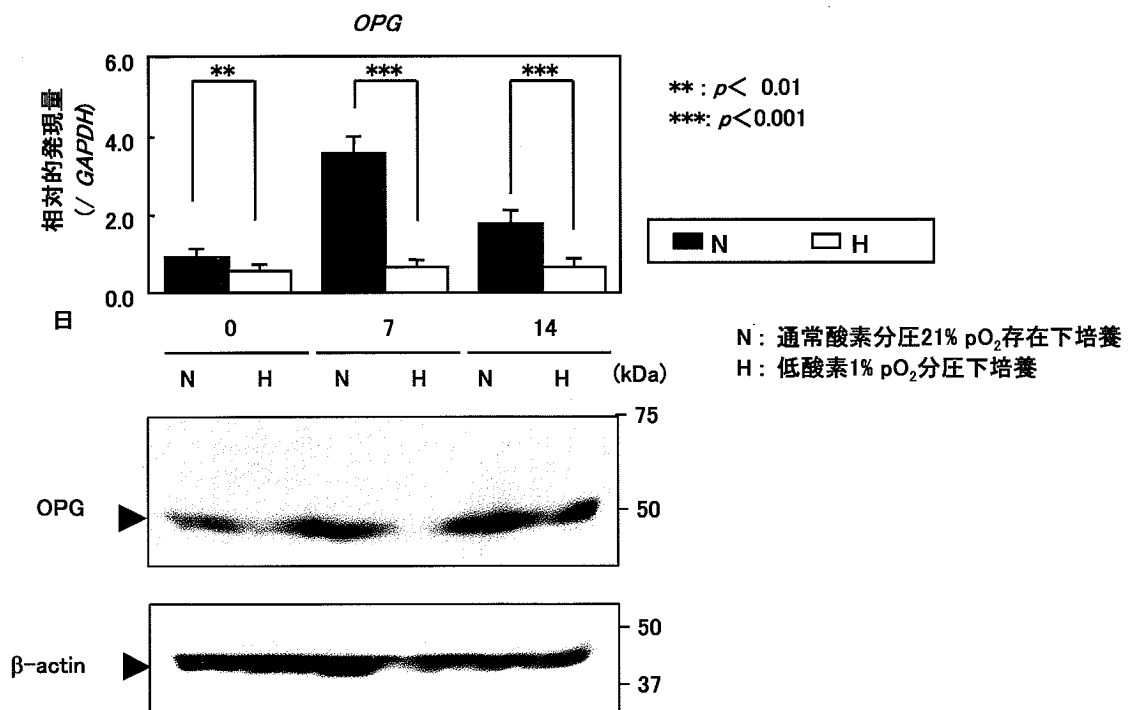


図17 軟骨分化過程における破骨細胞分化抑制因子OPGの遺伝子と蛋白の発現
 誘導7日目に低酸素刺激によるOPG遺伝子及び蛋白の発現抑制が認められる。

5. *HIF1A* ノックダウンによる破骨細胞分化関連因子の遺伝子発現の変化

低酸素下細胞での *OPG* 遺伝子発現低下における HIF-1 α の意義を調べることを目的として、siRNA により *HIF1A* をノックダウンし、定量 RT-PCR 法により *OPG* 遺伝子の発現解析を行なった。

その結果、*HIF1A* 特異的 siRNA 導入細胞では、*HIF1A* 発現が酸素分圧条件にかかわらず 30%以下に有意に抑制された。

一方、通常酸素分圧下では、siRNA 導入による *OPG* 発現変動は観察されなかったが、低酸素下では、*HIF1A* が抑制された細胞では、コントロールに比較して有意な *OPG* の発現上昇がみられた (図 18)。

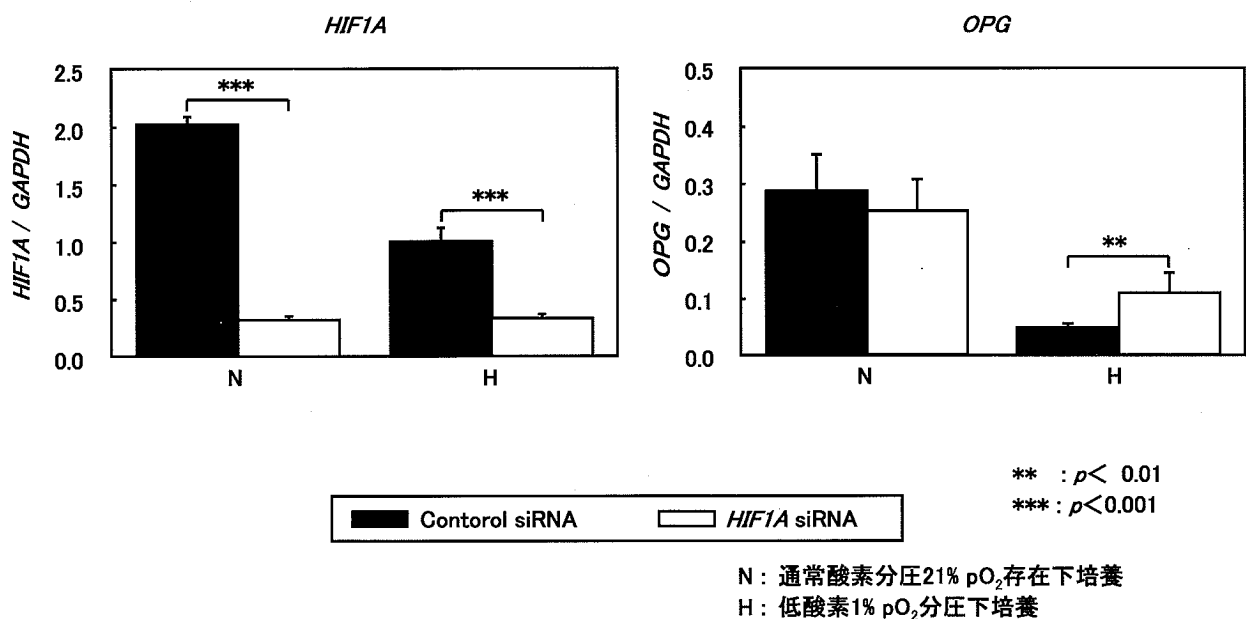


図18 siRNAによる*HIF1A*抑制と*OPG*遺伝子発現

通常酸素分圧下では、siRNA導入による*OPG*発現変動は観察されなかったが、低酸素下では、*HIF1A*が抑制された細胞では、コントロールに比較して有意に*OPG*の発現が増加した。

考察

1. 機械的負荷による変形性顎関節症の病態形成について

変形性顎関節症は、徐々に進行する関節の変性、破壊性疾患で、病理学的には下顎頭表層の骨皮質断裂、線維化、軟骨層の吸収や増殖あるいは変性、軟骨下骨にまで達する垂直性亀裂、骨の露出や吸収、骨棘の形成、骨髓の変性や壊死あるいは線維化、円板の穿孔、滑膜の炎症などが認められる（亀山、2003）。また、変形性顎関節症について、Lubsenら（1985）は下顎頭の変化は軟骨において始まり、骨における変化は二次的なものであることを報告した。さらに、Blackwoodら（1966）、Öbergら（1967）は軟骨増殖層の未分化間葉細胞が軟骨に分化し、軟骨層の肥厚に関与していることを示した。

このような関節組織の変化はさまざまな動物実験モデルでの再現が試みられ、変形性関節症の病態やこれに対する薬物の作用機序などの検討に用いられてきた。これらの検討に用いられる動物モデルは、変形性関節症様の変化が均質であり、かつ簡便な方法で再現可能なことが要求される。その作製方法には、膝関節半月板や靭帯の切除による方法（Yoshioka *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1997; Manicourt *et al.*, 1999）、関節腔内に化学物質を注入する方法（Kopp *et al.*, 1983; Inoue *et al.*, 1982; Van Kraan *et al.*, 1989; Ishimaru *et al.*, 1992）などが挙げられるが、ラットのような小動物の顎関節において円板や靭帯の切除を正確に行い、関節病変を惹起することはきわめて難しい。一方、これまでの研究で、動物に強制的な開口を持続的に施すことで、顎関節の滑膜炎や変形性関節症様の病態が起こることが示されている（江ら、1990; 武藤ら、1995,1996; 志賀ら、2001）。武藤ら（1995,1996）はラットに1日10回20mmの開口運動を10日間行なった

結果、滑膜炎や線維性滑膜癒着を呈することを示したが、その後自然治癒していることを明らかにした。一方、志賀ら（2001）は成熟ウサギに 1 日 3 時間 30mm の強制開口を 5 日間施した結果、実験終了直後の 1 日後より、顎関節軟骨層において MMP による細胞外基質の分解が活発に生じていることや軟骨層の厚さの減少がみられること、強制開口を施した 7 日後の組織像において病態が悪化しており、軟骨の硝子化、骨組織内での島状の軟骨組織残存、基質産生の低下など変形性関節症様の変化が起こったと述べている。さらに、Fujisawa ら（2003）は、志賀らと同様、ウサギを用いて 1 日 3 時間 5 日間の強制開口を行なった結果、明らかな TMJ-OA 病巣が引き起こされることを報告している。また、Tanaka ら（2005）はラットを用いて 1 日 1 時間 30mm の強制開口を行なうことで、ラット下顎頭で軟骨層の厚さの減少や下顎頭後方部の滑膜細胞の増殖、円板中央部の菲薄化と硝子化、圧迫部位である下顎頭の中央部から後方部の軟骨組織の壊死など、変形性関節症様の変化が見られたことを報告している。このように、実験的な過剰強制開口による変形性関節症様の病態形成は確立しており、臨床的に持続的な過剰開口が変形性顎関節症の原因となることは稀であると考えられるものの、顎関節への負荷を安定して与える方法として興味深い。一方、Chonlasueksa ら（2004）は、ラットの上顎前歯に modified guiding appliance（8×14×4mm）を装着することにより下顎頭へ非生理学的な負荷を加えた結果、下顎頭増殖軟骨層の菲薄化や肥大層における石灰化部の消失、神経の損傷が同時に起こったことから、機能性不正咬合による断続的な下顎の後方転位が関節軟骨の非機能性改造と神経損傷を引き起こすことを報告している。

これらの方法を参考にして、本研究においてはラットに対し下顎の咬合挙上量 7mm、後退量 5mm の逆型斜面板を作製し、ラットの上顎前歯部に装着することで、咬合干渉を生じさせた。これにより正常ラット（対照群）

では下顎第1大臼歯が上顎第1大臼歯の近心に位置するのに対し、実験群の下顎第1大臼歯は明らかに遠心に位置していた。咀嚼時の顎関節への負荷の大きさを測定することは困難であり、また、個々のラットの咬合に関する個性を反映すると考えられるために、本実験における下顎頭への負荷量は不明であるが、その結果として、下顎頭で軟骨層の厚さの減少や滑膜細胞の増殖、軟骨の硝子化、線維性結合組織の増生を伴う骨吸収と破骨細胞の出現、骨組織内での島状の軟骨組織残存、基質産生の低下、骨髓腔の減少など変形性関節症様の組織変化が本実験期間内に観察されたことから、前述の強制開口実験と同等かそれ以上の負荷が加わっていたことが推察される。一方で、組織変性、破骨細胞の出現や HIF-1 α 蛋白の発現が観察された部位は、下顎頭後方で強い傾向は観られたものの、部位による有意な差はなく、前方部にも多く観察されたことから、負荷が一定の方向ではなかったことが推察され、結果のばらつきの原因になったと考えられた。以上のことから、逆型斜面板を用いた咬合干渉を施すことにより、臨床でみられるような咬合不全による顎関節症により近い軟骨組織の変性を再現できる実験モデルが確立されたと考えられたが、より明瞭な結果を得るためには負荷量や方向性を考慮した実験方法への改善も必要と考えられた。また、これらの組織学的変化は、咬合干渉除去後10日目においては、依然認められたものの、20日目においては、骨髓の増生、軟骨層の肥厚など、正常な下顎頭の軟骨・骨構造に回復する傾向が認められた。TMJ-OAは無症状な疾患のために自覚なしに進行し、歯科処置時などに画像診断を行なって初めて発見されることも多く、早期発見・早期治療の難しさが指摘されている。しかしながら、本実験により、早期に安静を保てれば組織変化の進行を食い止め、回復させることが可能であることが示唆され、本TMJ-OAモデルは発症・進行の分子機構の解明のみならず、治癒過程に関連する分子機構の解明にも有効であると考えられた。また、本TMJ-OA

モデルを用いた発症・進行に関与する分子機構の解明が、早期病態の分子マーカーを用いた診断法や分子阻害剤や抗体などを用いた発症予防法や治療法の開発へ応用展開が強く期待される。

2. 変形性顎関節症の病態形成における HIF-1 の関与について

転写因子 HIF-1 は、低酸素などのさまざまなストレス刺激により安定化した HIF-1 α と恒常的な Arnt の二量体で構成され、ターゲット遺伝子プロモーター領域に存在する hypoxia response element (HRE) に結合して遺伝子の転写を促進する蛋白として知られている (Wang *et al.*, 2005; Semenza., 2001; Metzen *et al.*, 2004)。Pfander and Gelse (2007) は、軟骨の恒常性維持や OA の病態変化に伴う軟骨細胞の挙動に、低酸素刺激と HIF-1 α が重要な役割を果たしている可能性を報告した。また、損傷を受けた組織における急性炎症反応のひとつとして、TNF- α が HIF-1 α を誘導することが創傷の治癒と関係していること (Albina *et al.*, 2001)、OA の関節軟骨において IL-1 β 刺激や低酸素ストレスによる HIF-1 α の誘導が軟骨細胞の維持に重要な役割を果たしていること (Yudoh *et al.*, 2004) などが報告され、OA の発症や病態進行における HIF-1 の重要性が注目されつつある。また、Pufe ら (2004) は、ウシ軟骨細胞を用いた実験において、過剰な機械的刺激 (圧迫刺激) により軟骨細胞に HIF-1 α 蛋白が発現したことを報告した。同報告では、ウシの軟骨成長板を用い、ELISA により VEGF、HIF-1 α 、MMP-1、MMP-3、MMP-13、TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase) -1、TIMP-2 の分泌量を検討し、軟骨への過剰な機械的刺激により VEGF、HIF-1 α 、MMP 群の分泌量が増加したこと、逆に TIMP 群が減少したことから、OA の進行に、低酸素以外の刺激として、機械的刺激による HIF-1 や VEGF の活性化が関与していることを示唆した。

本研究においても、モデルラットを用いた *in vivo* 実験において、咬合

干渉により組織変性が見られた下顎頭の成熟軟骨細胞層に HIF-1 α が強く検出されたことから、顎関節への過剰負荷により HIF-1 α 誘導が引き起こされることが示された。また、HIF-1 標的遺伝子のひとつである VEGF 発現解析から、誘導された HIF-1 α が活性化し機能していることも明らかとなった。さらに、軟骨前駆細胞を用いた *in vitro* 実験において軟骨成熟層に相当する軟骨分化細胞にのみ HIF-1 α 蛋白や標的遺伝子発現の低酸素誘導が強く認められたことから、ラット下顎頭への機械的刺激により成熟軟骨細胞層においてのみ HIF-1 α が検出された機構が推察された。すなわち、未分化な軟骨前駆細胞では HIF-1 α 誘導刺激が加わっても蛋白の安定化が起こらないような何らかの抑制機構が存在し、分化が進むことにより、その抑制機構が減弱、消失していくものと考えられた。

岩田ら（1989）は変形性顎関節症では、①軟骨表面の線維化と亀裂、軟骨細胞の活動性の増加、集簇化、②軟骨下骨からの血管の侵入、③関節軟骨の消失、軟骨下骨組織の露出、という進展が見られ、常に崩壊（軟骨層の亀裂、軟骨細胞の線維化、軟骨細胞死、滑膜炎）と修復（軟骨細胞の集簇化、硝子軟骨への変化、肉芽形成）が共存していることを述べている。

Tanaka ら（2005）は、下顎頭への過剰負荷が長期にわたると、下顎頭軟骨の壊死部周辺の VEGF 発現は増強されるものの、軟骨細胞の増殖促進よりも負荷による軟骨細胞の壊死や VEGF による破骨細胞の誘導、活性化による軟骨組織の破壊、吸収が勝り、軟骨層が菲薄化することによって、顎関節症様の病態が現れることを示唆している。Pfander(2001)らは正常な関節軟骨においてほとんど発現が見られない VEGF が、変形性顎関節症患者の軟骨組織において強く発現することや、症状の進行と VEGF の発現に正の相関があることを示した。また、Ohashi ら(2002)は持続的に強い圧縮力を加えたラットの肘頭軟骨において、通常よりも肥大軟骨細胞の層が厚くなり VEGF が強発現すること、正常な軟骨内骨化が阻害され、圧縮処置を

中止した 7 日後においても回復しないことを示した。さらに Wong ら (2003) は、ウシ上腕骨頭軟骨培養細胞に引っ張りもしくは圧縮負荷をかけたとき、無負荷の対照群と比べて有意に VEGF の分泌が増加していることを示した。これらのことから、成熟した軟骨における VEGF の発現が異常な力学的環境での軟骨細胞の増殖や吸収に関連することが示唆されている。

本研究において、10 日群、20 日群と経時的にラット下顎頭の VEGF 遺伝子発現が増加し、負荷の除去に伴い減少した。また、10 日群では下顎頭軟骨細胞数は増加傾向が認められ、OA の初期段階である軟骨細胞の活動性の増加が起こっており、この時点では VEGF は負荷のかかった軟骨細胞を増殖させることにより、異常な力学的環境に適応することに寄与していると考えられる。これに対し、20 日群では、負荷による軟骨の圧迫壊死が起こっており、軟骨細胞数が減少していた。また、軟骨下骨における破骨細胞数は 20 日以降増加する傾向が認められた。Engsig ら (2000) は、軟骨組織への血管侵入が起こる際に、破骨細胞が MMP-9 を産生することで軟骨を破壊し、血管が侵入しやすくすることを明らかにしており、このことから本研究においても、軟骨下骨の石灰化の進行が認められた 20 日群以降で、破骨細胞が VEGF により誘導され増加し、軟骨組織の破壊、吸収を起こし、OA の第 2 段階である、軟骨下骨からの血管の侵入が起こりやすくしていると考えられる。以上のことから、負荷が長期にわたると壊死部周辺の VEGF 発現は増強されるものの、軟骨細胞の増殖促進よりも負荷による軟骨細胞の壊死や VEGF による破骨細胞の誘導、活性化による軟骨組織の破壊、吸収が勝り、軟骨層が菲薄化することによって、顎関節症様の病態が現れることが示唆された。

本研究において、20 日群の成熟軟骨特異的に発現した HIF-1 α と、ラット下顎頭の VEGF 遺伝子発現や破骨細胞数の時間経過依存的な変動の傾

向が、成熟軟骨細胞に特異的に発現した HIF-1 α 発現変動と同様な傾向を示したことから、HIF-1 α が下顎頭への負荷（ストレス）に対する生体反応として発現し、*VEGF*などの標的遺伝子発現を誘導することにより、OAの進行に関与していることが示唆された。

3. 軟骨前駆細胞 ATDC5 について

本研究に使用した軟骨前駆細胞 ATDC5 はインスリンの存在下で未分化細胞から軟骨細胞に分化するだけでなく、肥大化、石灰化までも観察することができ、軟骨分化過程を解析するのに非常に有用な細胞である (Akiyama *et al.*, 1996; Shukunami *et al.*, 1997)。また、アスコルビン酸存在下で分化の速度が亢進することが報告されている (Altaf *et al.*, 2006)。

本実験の ATDC5 分化過程において、II 型コラーゲンの遺伝子発現は、培養開始 4 日目から 7 日目にかけて亢進した。前軟骨細胞が軟骨細胞に分化した後、増殖軟骨細胞によって II 型コラーゲンが合成されること (Kosher *et al.*, 1986; Shukunami *et al.*, 1996; Enomoto *et al.*, 2000; Fujita *et al.*, 2004; Tanne *et al.*, 2008) から、ATDC5 の培養開始 4 日目から 7 日目の期間に、軟骨細胞への分化が完了し、増殖期が開始していることが確認された。また、軟骨最終分化マーカーである X 型コラーゲン (Enomoto *et al.*, 2000; Shukunami *et al.*, 1997; Tanne *et al.*, 2008) の遺伝子発現が、培養開始 7 日目から 14 日目にかけて亢進したことから、培養開始 7 日目以降 ATDC5 の肥大期が開始すると考えられた。同軟骨分化誘導モデルにより、*in vivo* における下顎頭軟骨の表層から深層へ向けての分化、すなわち、線維層、増殖層、成熟層、肥大層、そして石灰化層という軟骨層を分化誘導時間にて再現できることが確認され、各段階における遺伝子および蛋白発現の検討を通して、本研究の *in vivo* 実験にて観察された軟骨分化過程に特有の様式を示した HIF-1 α 発現、すなわち未分化軟骨における HIF-1 α 抑制およ

び成熟期軟骨での HIF-1 α 誘導性が裏付けされた。簡便で正確な ATDC5 を用いた本培養モデルは、OA 病態の分子機構の中でも軟骨における、または軟骨からの病態関連分子変動の解明に有用であることが確認された。

4. 低酸素下培養および低酸素応答機構と軟骨変性について

OA における HIF-1 α の発現誘導因子として、低酸素、TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカイン刺激、メカニカルストレスなどが示唆されている (Pfander and Gelse, 2007; Albina *et al.*, 2001; Yudoh *et al.*, 2004; Pufe *et al.*, 2004)。本研究においてラットを用いた *in vivo* 実験で観察された下顎頭軟骨成熟層における HIF-1 α 誘導因子は不明ままである。軟骨はそれ自体が無血管臓器であり、組織内が低酸素になっていると考えられるため、本実験における誘導因子として低酸素刺激は考えにくい。また、組織変化や HIF-1 α 誘導部位が関節頭に均一に観察されるわけでもなく、滑液を介した炎症性サイトカイン刺激による誘導でもないと考えられ、関節頭圧迫による機械的刺激が HIF-1 α 誘導因子として予想される。一方、活性化した HIF-1 下流シグナルはその活性化機構 (因子) によらず遺伝子発現誘導を介して同様に伝達されると考えられており、HIF-1 活性化による下流シグナルの解析を ATDC5 軟骨分化誘導モデルにおいて行うにあたり、低酸素下培養を用いた。予備実験において 1%酸素分圧下での培養により HIF-1 α が最も反応が強いこと、生体内組織における低酸素として 1 ~ 2%酸素分圧が観察されている (広田、2008) ことから、本研究においても ATDC5 の HIF-1 α 誘導に 1%酸素分圧下での培養を用いた。また、低酸素培養実験で低酸素応答のマーカーとして用いた *ADM* や *BHLHB2* 遺伝子は、それぞれ、血管新生や軟骨の分化に関与することが報告されており、石灰化軟骨への血管の侵入とそれによる骨・骨髄形成、軟骨分化のスピードのアンバランスによる軟骨層の乱れに関係している可能性も考えられた。

また、本研究では、HIF-1 α が活性化することによって VEGF が誘導され、血管新生や破骨細胞の誘導、活性化による軟骨・骨組織の破壊、吸収が起こり、軟骨層が菲薄化することによって、顎関節症様の病態が現れることが想定されたが（図 18）、HIF-1 経路はストレスに対する生存シグナルとしてよく知られており、一方で、実験群の中には成熟層および肥大層が薄くなり硝子様変性が見られるものが多くあり、HIF-1 α がストレス刺激を受けた軟骨細胞のアポトーシス（Carmeliet *et al.*, 1998; Piret *et al.*, 2002; Graham *et al.*, 2004; Greijer *et al.*, 2004; Krick *et al.*, 2005; Malhotra *et al.*, 2008）にも関係している可能性も考えられ、骨破壊だけでなく軟骨の変性にも関与していることが示唆された。

5. HIF-1 α と OPG の関係について

骨のリモデリングには OPG/RANKL/RANK システムが重要な役割を果たしていることが知られている（Hofbauer *et al.*, 2000; Boyce *et al.*, 2007）。RANKL は破骨細胞形成に必要な因子であり、間葉系幹細胞や骨芽細胞から分泌される。また、OPG も同様に間葉系幹細胞や骨芽細胞から分泌され、RANK に結合することで RANKL の破骨細胞へのシグナルを競合阻止する役割を有する（Udagawa *et al.*, 2000; Baron, 1993）。

OA では、メカニカルストレスの蓄積などによって軟骨変性と関節変形が進行する。顎関節内障や変形性関節症患者には、関節滑液中のヒアルロン酸（hyaluronan: HA）が強く関係しているといわれている。HA の機能はその分子量の大きさによって異なり、高分子量 HA が細胞増殖、分化などの細胞の同化反応に関与する（McKee *et al.*, 1996; Tanimoto *et al.*, 2004）のに対して、低分子量 HA は炎症性メディエーターの産生亢進などの細胞の異化反応に関与するとの報告（Ng *et al.*, 1992; McKee *et al.*, 1996; Ohno *et al.*, 2005）がなされている。正常関節滑液においては、HA は高分子で存

在しているが、顎関節内障や変形性関節症患者の関節滑液においては低分子量HAが増加し、それにより滑液粘性は正常の1/6～1/14にまで低下すると報告されている (Bjelle *et al.*, 1983; Dahl *et al.*, 1985; 安藤ら、1997)。これらの所見から、顎関節病変部位での低分子量HAの発現亢進が、下顎頭軟骨の分化に対して何らかの影響を及ぼしていると考えられている。このように、OAの発症、進行は表層の滑膜および関節滑液との関係が深い。一方で、OAでは関節軟骨の変性・破壊とともに、骨棘の形成、軟骨下骨の硬化など関節軟骨周囲の骨組織の変化が認められる。OAの軟骨下骨では骨代謝が亢進した状態にあり、軟骨下骨のリモデリング異常は関節形態の変化や軟骨変性に関与すると考えられているが、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。Sakaoら (2008) は、OAの硬化した軟骨下骨ではIL-6およびRANKLを介した骨リモデリングの変化が生じていること、また、炎症性サイトカイン以外の他の因子によるRANKLの亢進やosteopontin (OPN) の発現が加わることによって、骨リモデリングがさらに増強されて骨棘形成や関節形態の変化が生じると報告した。このように、近年、TMJ-OAの進行に軟骨表層からの破壊とは別のメカニズムの関与の可能性が示唆されつつある。

本実験においても、負荷を受けたラット関節頭内部 (軟骨成熟層) にHIF-1 α が発現することが確認され、病態進行にその下流シグナルの様々な遺伝子発現変動が予想された。なかでも、ATDC5のHIF-1 α を誘導するとOPG発現が抑制されることが初めて見いだされた。OPGの抑制は遺伝子レベルだけでなく蛋白レベルでも確認されたが、siRNA導入によるHIF1A抑制により低酸素下でのOPG発現が有意に増加したことから、HIF-1経路の下流で転写調節されている可能性が示された。すなわち、通常は軟骨からOPGが分泌され周辺の骨破壊が抑制されているのに対し、低酸素などのHIF-1誘導ストレスが加わると、HIF-1 α が活性化すること

により骨破壊制御システムの抑制が起こり、周辺の骨破壊促進に寄与する可能性が示唆され、新しい分子機構の一つとして興味を持たれた。

6. 本研究の臨床的意義について

本研究において、咬合干渉に伴った下顎頭への過剰負荷により、下顎頭軟骨成熟層に特異的に HIF-1 α 蛋白が発現することが示され、TMJ-OA の発症メカニズムのひとつとして、HIF-1 α の発現とそれに伴う VEGF の血管新生及び破骨細胞誘導機構の関与、ならびに破骨細胞分化抑制因子 OPG の発現抑制による破骨細胞の分化促進に起因した骨破壊の可能性が示唆された（図 18）。

現在、顎関節病態の治療法にはスプリント療法、薬物療法や理学療法、外科的療法が用いられているものの、すべてが対症療法であり、発症機序を標的とした根治療法は確立されていない。本研究では、咬合干渉が顎関節症の発症要因のひとつであることが示されたとともに、顎関節症の発症の分子機構の一端が明らかとなり、HIF-1 もしくは HIF-1 誘導因子を標的とした核酸、抗体や化合物を用いた分子標的治療開発の可能性も示された。

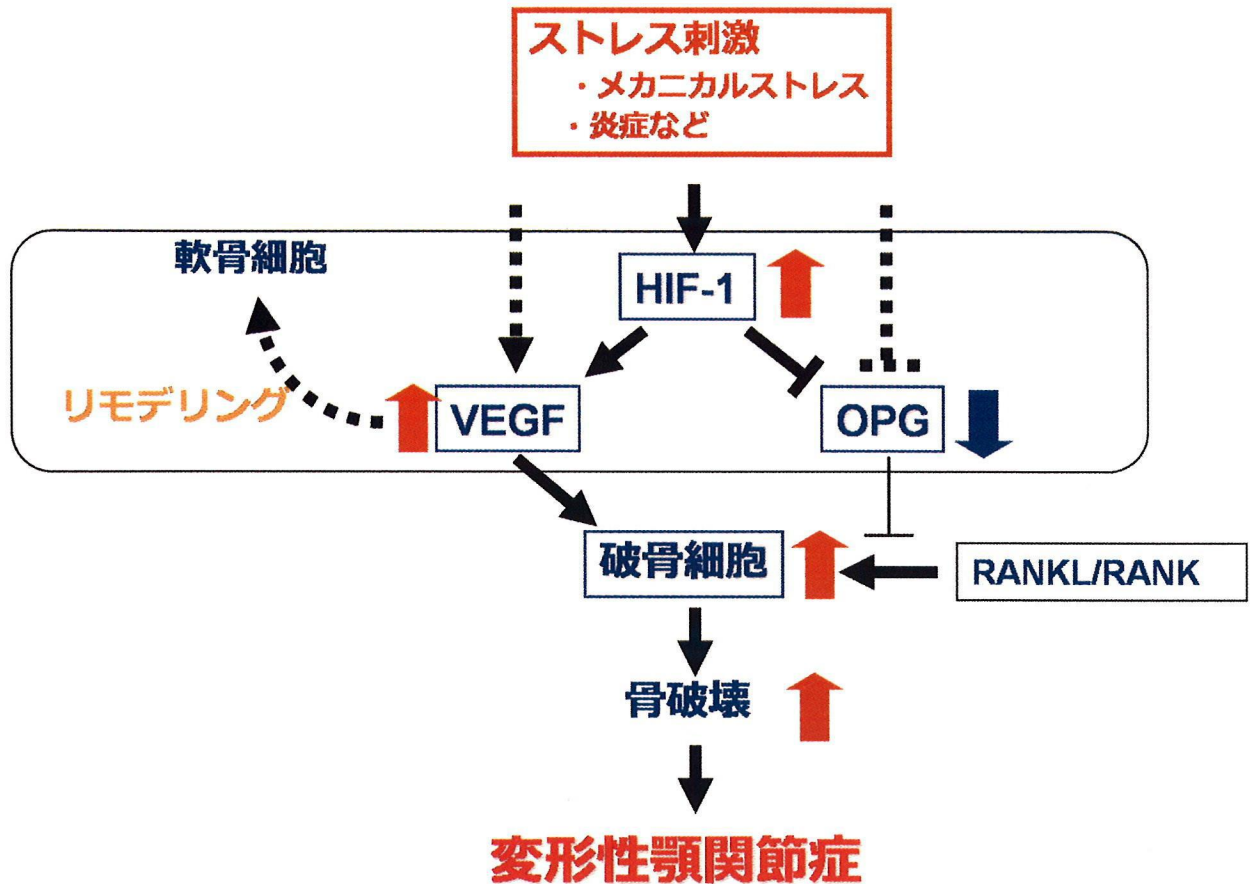


図18 変形性顎関節症とHIF-1との関わり

メカニカルストレスや炎症、虚血に伴う低酸素状態が下顎頭軟骨細胞においてHIF-1を活性化し、HIF-1によってVEGFの誘導やOPGの抑制が起こることから、破骨細胞が活性化され、骨破壊が起こる。

総括

本研究では、VEGF 誘導の重要な機構のひとつである HIF-1 経路に着目し、TMJ-OA モデル及び培養軟骨細胞における HIF-1 と破骨細胞分化関連因子の発現変動及びその制御機構の解明を目的として、TMJ-OA ラットモデルと、軟骨分化モデルとして確立されているマウス軟骨前駆細胞 ATDC5 実験系を用いて一連の検討を行い、以下の結果を得た。

1. 過剰負荷を受けたラット下顎頭軟骨成熟層に特異的な HIF-1 α 発現が観察され、*VEGF* 遺伝子発現変動や TRAP 陽性の破骨細胞数の変動、さらに組織学的な変化との関係から、HIF-1 が *VEGF* 遺伝子などの誘導を介して、骨や軟骨破壊に関与している可能性が示された。
2. 培養軟骨細胞を用いた実験により、軟骨分化過程の細胞では、HIF-1 活性化刺激が加わった場合でも、未分化な前駆軟骨細胞では HIF-1 α 誘導は観察されなかったが、成熟期以降の成熟軟骨細胞特異的に活性化することが明らかとなり、ラット下顎頭軟骨における発現分布が再現された。
3. 軟骨細胞における HIF-1 の活性化は、VEGF などの増殖因子による破骨前駆細胞の誘導とともに、破骨細胞分化抑制因子 OPG の抑制を介した破骨細胞分化誘導によって周辺骨の吸収を促進する可能性が示唆された。

以上のことより、過剰負荷が加わった下顎頭軟骨の成熟軟骨細胞では HIF-1 α が活性化し、VEGF の発現誘導や OPG の発現抑制を通じて破骨細胞の誘導シグナルを発して、関節頭の骨や軟骨の破壊に関与している可能性が示された。

今回の実験で TMJ-OA 発症の分子機構の一部が明らかとなり、TMJ-OA の新しい治療法開発への応用展開が強く期待される結果となった。

参考文献

Akiyama H, Hiraki Y, Shigeno C, Kohno H, Shukunami C, Tsuboyama T, Kasai R, Suzuki F, Konishi J, Nakamura T. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits cell growth and chondrogenesis of a clonal mouse EC cell line, ATDC5. *J Bone Miner Res* 1996; **11**: 22-28.

Albina J, Mastrofrancesco B, Vessella J, Louis C, Henry W, Reichner J. HIF-1 expression in healing wounds: HIF-1 α induction in primary inflammatory cells by TNF- α . *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; **281**: C1971-C1977.

Altaf FM, Hering TM, Kazmi NH, Yoo JU, Johnstone B. ASCORBATE-ENHANCED CHONDROGENESIS OF ATDC5 CELLS. *Eur cell mater* 2006; **12**: 64-70.

安藤 聡、覚道健治. 顎関節症患者における顎関節滑液ヒアルロン酸分子量ならびに N-アセチル- β グルコサミニダーゼ活性について. *日顎誌* 1997; **9**: 49-59.

Arnett GW, Milam SB, Gottesman L. Progressive mandibular retrusion-idiopathic condylar resorption Part I. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1996; **110**: 8-15.

Bani Hashemi S, Braun J, Bernhardt WM, Rascher W, Dötsch J, Trollmann R. HIF-1 α subunit and vasoactive HIF-1-dependent genes are involved in carbon monoxide-induced cerebral hypoxic stress response. *Eur J Appl Physiol* 2008; **104**: 95-102.

Baron, R. Biology of the osteoclast. In *Handbook of Experimental Pharmacology: Physiology and Pharmacology of Bone* 1993; **107**: 111-148.

Bates DO, Jones RO. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds* 2003; **2**: 107-120.

Bjelle A, Andersson T, Granath K. Molecular weight distribution of hyaluronic acid of human synovial fluid in rheumatic diseases. *Scand J Rheumatol* 1983; **12**: 133-138.

Blackwood HJ. Growth of the mandibular condyle of the rat studied with tritiated thymidine. *Archs Oral Biol* 1966; **11**: 493-500.

Bonnet CS, Walsh DA. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)*

2005 ; **44**: 7-16.

Boyce BF, Yao Z, Zhang Q, Guo R, Lu Y, Schwarz EM, Xing L. New roles for osteoclasts in bone. *Ann N Y Acad Sci* 2007; **1116**: 245-254.

Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998; **394**: 485-490.

Chen L, Fink T, Ebbesen P, Zachar V. Temporal transcriptome of mouse ATDC5 chondroprogenitors differentiating under hypoxic conditions. *Exp Cell Res* 2006; **312**: 1727-1744.

江 國銘、覚道健治. 過開口がラット顎関節滑膜に及ぼす影響に関する電子顕微鏡的研究. 日口外誌 1990; **36**: 2738-2751.

Cholasueksa P, Warita H, Soma K. Alterations of the Rat Temporomandibular Joint in Functional Posterior Displacement of the Mandible. *Angle Orthod* 2004; **74**: 677-683.

Dahl IM, Husby G. Hyaluronic acid production in vitro by synovial lining cells from normal and rheumatoid joints. *Ann Rheum Dis* 1985; **44**: 647-657.

de Bont LG, Stegenga B. Pathology of temporomandibular joint internal derangement and osteoarthritis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1993; **22**: 71-74.

de Bont LG, Dijkgraaf LC, Stegenga B. Epidemiology and natural progression of articular temporomandibular disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997; **83**: 72-76.

Engsig MT, Chen QJ, Vu TH, Pedersen AC, Therkidsen B, Lund LR, Henriksen K, Lenhard T, Foged NT, Werb Z, Delaissé JM. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J Cell Biol* 2000; **151**: 879-889.

Enomoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Nomura S, Himeno M, Kitamura Y, Kishimoto T, Komori T. Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J Biol Chem* 2000; **275**: 8695-8702.

Fujita T, Fukuyama R, Enomoto H, Komori T. Dexamethasone inhibits insulin-induced

chondrogenesis of ATDC5 cells by preventing PI3K-Akt signaling and DNA binding of Runx2. *J Cell Biochem* 2004; **93**: 374-383.

Fujisawa T, Kuboki T, Kasai T, Sonoyama W, Kojima S, Uehara J, Komori C, Yatani H, Hattori T, Takigawa M. A repetitive, steady mouth opening induced an osteoarthritis-like lesion in the rabbit temporomandibular joint. *J Dent Res* 2003; **82**: 731-735.

不島健持、秋本 進、高本建雄、亀井照明、佐藤貞雄、鈴木祥井. 不正咬合患者における顎関節症状の発現—顎関節症の成立機転に関する一考察—. *日顎誌* 1989; **1**: 40-50.

Graham RM, Frazier DP, Thompson JW, Haliko S, Li H, Wasserlauf BJ, Spiga MG, Bishopric NH, Webster KA. A unique pathway of cardiac myocyte death caused by hypoxia-acidosis. *J Exp Biol* 2004; **207**: 3189-3200.

Greijer AE, van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol* 2004; **57**: 1009-1014.

Hinton RJ, Carlson DS. Response of the mandibular joint to loss of incisal function in the rat. *Acta Anat (Basel)* 1986; **125**: 145-151.

広田喜一. Lack of oxygen and beyond—序にかえて. *医学のあゆみ* 2008; **225**: 1283-1286.

Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004 ; **56**: 549-580.

Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000; **15**: 2-12

Huang MH, Ding HJ, Chai CY, Huang YF, Yang RC. Effects of sonication on articular cartilage in experimental osteoarthritis. *J Rheumatol* 1997; **24**: 1978-1984.

Inoue S, Glimcher MJ. The reaction of cartilage and osteophyte formation after the intraarticular injection of papain. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 1982; **56**: 415-430.

Ishimaru J, Goss AN. A model for osteoarthritis of the temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg* 1992; **50**: 1191-1195.

岩田 久、水谷英樹. 変形性顎関節症の発症メカニズム. *歯界展望 別冊顎関節症の臨*

床(岡達、藍稔編)医歯薬出版、東京 1989: 73-78.

Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K, Shimoaka T, Chikuda H, Maruyama Z, Komori T, Sato S, Takeda S, Karsenty G, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum* 2006; **54**: 2462-2470.

Kawaguchi H. Endochondral ossification signals in cartilage degradation during osteoarthritis progression in experimental mouse models. *Mol Cells* 2008; **25**: 1-6.

Katzberg RW, Keith DA, Guralnick WC, Manzione JV Jr, Ten Eick WR. Internal derangements and arthritis of the temporomandibular joint. *Radiology* 1983; **146**: 107-112.

覚道健治. 咬合異常により起こる滑膜, 関節軟骨, 関節円板の変化. 歯界展望 別冊 顎関節症の臨床 (岡達、藍稔編) 医歯薬出版、東京 1989 : 66-72

亀山洋一郎. 変形性顎関節症の病態. 日顎誌 2003; **15**: 76-77.

Kopp S, Mejersjo C, Clemensson E. Induction of osteoarthrosis in the guinea pig knee by papain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983; **55**: 259-266.

Kosher RA, Kulyk WM, Gay SW. Collagen gene expression during limb cartilage differentiation. *J Cell Biol* 1986; **102**: 1151-1156.

Krick S, Eul BG, Hänze J, Savai R, Grimminger F, Seeger W, Rose F. Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; **32**: 395-403.

Liu Y, Kudo K, Abe Y, Aoki M, Hu DL, Kijima H, Nakane A. Hypoxia expression in radiation-induced late rectal injury. *J Radiat Res (Tokyo)* 2008; **49**: 261-268.

Lubsen CC, Hansson TL, Nordström BB, Solberg WK. Histomorphometric analysis of cartilage and subchondral bone in mandibular condyles of young human adults at autopsy. *Archs Oral Biol* 1985; **30**: 129-136.

Malhotra R, Tyson DW, Rosevear HM, Brosius FC 3rd. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a critical mediator of hypoxia induced apoptosis in cardiac H9c2 and kidney epithelial HK-2 cells. *BMC Cardiovasc Disord* 2008; **8**: 9.

Manicourt DH, Altman RD, Williams JM, Devogelaer JP, Druetz-van Egeren A, Lenz ME,

Pietryla D, Thonar EJ. Treatment with calcitonin suppresses the responses of bone, cartilage, and synovium in the early stages of canine experimental osteoarthritis and significantly reduces the severity of the cartilage lesions. *Arthritis Rheum* 1999; **42**: 1159-1167.

McKee CM, Penno MB, Cowman M, Burdick MD, Strieter RM, Bao C, Noble PW. Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages, The role of HA size and CD44. *J Clin Invest* 1996; **98**: 2403-2413.

Metzen E, Ratcliffe PJ. HIF hydroxylation and cellular oxygen sensing. *Biol Chem* 2004; **385**: 223-230.

武藤寿孝、川上譲治、道谷弘之、金澤正昭．ラット下顎頭の過剰運動に伴う顎関節滑膜の病理組織学的変化．日顎誌 1995; **7**: 355-364.

武藤寿孝、川上譲治、金澤正昭．ラット下顎頭の過剰運動に伴う顎関節滑膜の病理組織学的変化，第2報：長期観察．日顎誌 1996; **8**: 75-83.

Nakagawa M, Kaneda T, Arakawa T, Morita S, Sato T, Yomada T, Hanada K, Kumegawa M, Hakeda Y. Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. *FEBS Lett* 2000; **473**: 161-164.

Ng CK, Handley CJ, Preston BN, Robinson HC. The extracellular processing and catabolism of hyaluronan in cultured adult articular cartilage explants. *Arch Biochem Biophys* 1992; **298**: 70-79.

Niida S, Kaku M, Amano H, Yoshida H, Kataoka H, Nishikawa S, Tanne K, Maeda N, Nishikawa S, Kodama H. Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J Exp Med* 1999; **190**: 293-298.

野々山大介、小澤 奏、宮脇 綾、本田康文、丹根一夫．顎変形症患者における顎関節病態と顎顔面形態との関連性．日顎変形誌 1998; **8**: 57-66.

Oberg T, Fajers CM, Lohmander S, Friberg U. Autoradiographic studies with H3-thymidine on cell proliferation and differentiation in the mandibular joint of young guinea pigs. *Odontol Revy* 1967; **18**: 327-344.

Ohashi N, Robling AG, Burr DB, Turner CH. The effects of dynamic axial loading on the rat growth plate. *J Bone Miner Res* 2002; **17**: 284-292.

Ohno S, Im HJ, Knudson CB, Knudson W. Hyaluronan oligosaccharide-induced activation of transcription factors in bovine articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2005; **52**: 800-809.

Pfander D, Körtje D, Zimmermann R, Weseloh G, Kirsch T, Gesslein M, Cramer T, Swoboda B. Vascular endothelial growth factor in articular cartilage of healthy and osteoarthritic human knee joints. *Ann Rheum Dis* 2001; **60**: 1070-1073.

Pfander D, Gelse K. Hypoxia and osteoarthritis: how chondrocytes survive hypoxic environments. *Curr Opin Rheumatol* 2007; **19**: 457-462.

Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C. Is HIF-1alpha a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochem Pharmacol* 2002; **64**: 889-892.

Pufe T, Lemke A, Kurz B, Petersen W, Tillmann B, Grodzinsky AJ, Mentlein R. Mechanical Overload Induces VEGF in Cartilage Discs via Hypoxia-Inducible Factor. *Am J Pathol* 2004; **164**: 185-192.

Sakao K, Takahashi KA, Mazda O, Arai Y, Tonomura H, Inoue A, Saito M, Fujioka M, Takamiya H, Imanishi J, Kubo T. Enhanced expression of interleukin-6, matrix metalloproteinase-13, and receptor activator of NF-kappaB ligand in cells derived from osteoarthritic subchondral bone. *J Orthop Sci* 2008; **13**: 202-210.

Santos SC, Miguel C, Domingues I, Calado A, Zhu Z, Wu Y, Dias S. VEGF and VEGFR-2 (KDR) internalization is required for endothelial recovery during wound healing. *Exp Cell Res* 2007 ; **313**: 1561-1574.

Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med* 2001; **7**: 345-350.

Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 2001; **26**: 25-35.

志賀貴之. 過剰な開口負荷がウサギ顎関節に及ぼす影響に関する組織学的、免疫組織学的研究. *鶴見歯学* 2001; **27**: 25-44.

Shukunami C, Shigeno C, Atsumi T, Ishizeki K, Suzuki F, Hiraki Y. Chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic cell line ATDC5 in vitro: differentiation-dependent gene expression of parathyroid hormone (PTH) /PTH-related peptide receptor. *J Cell Biol* 1996; **133**: 457-468.

Shukunami C, Ishizeki K, Atsumi T, Ohta Y, Suzuki F, Hiraki Y. Cellular hypertrophy and calcification of embryonal carcinoma-derived chondrogenic cell line ATDC5 in vitro. *J Bone Miner Res* 1997; **12**: 1174-1188.

Tanaka E, Aoyama J, Miyauchi M, Takata T, Hanaoka K, Iwabe T, Tanne K. Vascular endothelial growth factor plays an important autocrine/paracrine role in the progression of osteoarthritis. *Histochem Cell Biol* 2005; **123**: 275-281.

田中栄二、丹根一夫、作田 守. 不正咬合患者の矯正科初診時における顎関節症の統計学的研究. 日顎誌 1992; **4**: 19-31.

Tanimoto K, Suzuki A, Ohno S, Honda K, Tanaka N, Doi T, Yoneno K, Ohno-Nakahara M, Nakatani Y, Ueki M, Tanne K. Effects of TGF-beta on hyaluronan anabolism in fibroblasts derived from the synovial membrane of the rabbit temporomandibular joint. *J Dent Res* 2004; **83**: 40-44.

Tanne Y, Tanimoto K, Tanaka N, Ueki M, Lin YY, Ohkuma S, Kamiya T, Tanaka E, Tanne K. Expression and activity of Runx2 mediated by hyaluronan during chondrocyte differentiation. *Arch Oral Biol* 2008; **53**: 478-487.

Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, Mizuno A, Itoh K, Ueno Y, Shinki T, Gillespie MT, Martin TJ, Higashio K, Suda T. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology* 2000; **141**: 3478-3484.

上野 正、岡 達、中村充也. 顎関節症の研究 (第 1 報) 臨床的所見. 日科誌 1956; **5**: 284.

van der Kraan PM, Vitters EL, van de Putte LB, van den Berg WB. Development of osteoarthritic lesions in mice by “metabolic” and “mechanical” alterations in the knee joints. *Am J Pathol* 1989; **135**:1001-1014.

Yodoh K, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K. Catabolic stress induces expression of Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α in articular chondrocytes: involvement of HIF-1 α in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2005; **7**: R904-914.

Yoshioka M, Shimizu C, Harwood FL, Coutts RD, Amiel D. The effect of hyaluronan during the development of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1997; **5**: 251-260.

Wang M, Kirk JS, Venkataraman S, Domann FE, Zhang HJ, Schafer FQ, Flanagan SW, Weydert

CJ, Spitz DR, Buettner GR, Oberley LW. Manganese superoxide dismutase suppresses hypoxic induction of hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor. *Oncogene* 2005; **24**: 8154-8166.

Wong M, Siegrist M, Goodwin K. Cyclic tensile strain and cyclic hydrostatic pressure differentially regulate expression of hypertrophic markers in primary chondrocytes. *Bone* 2003; **33**: 685-693.

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻ならびに御支援を賜りました広島大学大学院医歯薬総合研究科展開医科学専攻顎口腔頸部医科学講座（歯科矯正学）丹根一夫教授に謹んで感謝の意を表します。また、本論文作成にあたり、御助言、御校閲を賜りました同研究科創生医科学専攻探索医科学講座（口腔生化学）加藤幸夫教授、同先進医療開発科学講座（口腔顎顔面病理病態学）高田 隆教授、同研究科展開医科学専攻顎口腔頸部医科学講座（小児歯科学）香西克之教授、ならびに同顎口腔頸部医科学講座（口腔外科学）鎌田伸之教授に深謝申し上げます。

本研究の計画、遂行において貴重な御助言を頂くと共に、直接御指導を賜りました原爆放射線医科学研究所（遺伝子診断治療開発）谷本圭司助教、徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部（口腔顎顔面矯正学）田中栄二教授、貴重な御助言を頂きました顎口腔頸部医科学講座（歯科矯正学）谷本幸太郎助教、田中伸明助教、ならびに川合暢彦助教、先進医療開発学講座（口腔顎顔面病理病態学）宮内睦美准教授、原爆放射線医科学研究所（遺伝子診断治療開発）檜山桂子准教授、中村秀明博士、また、本研究の遂行に御理解御協力を頂いた顎口腔頸部医科学講座（歯科矯正学）、原爆放射線医科学研究所（遺伝子診断治療開発）、先進医療開発学講座（口腔顎顔面病理病態学）の皆様ならびに関係各位に厚く御礼申し上げます。また、埼玉医科大学（国際医療センター）江口英孝准教授にご助言いただきましたこと、厚く御礼申し上げます。

最後に、本学での勉学において長年にわたり支え励ましてくれた家族や友人に心より感謝します。