

原 著

軟骨石灰化不全ラットにおける頭蓋底軟骨結合の
形態学的ならびに分子生物学的検索

竹 内 綾¹⁾ 永 山 元 彦²⁾ 田 中 政 巳³⁾
渡 辺 実⁴⁾ 天 野 均⁵⁾ 柴 田 俊 一⁶⁾ 北 井 則 行¹⁾

Morphological and Molecular biology Study of Cranial Base Synchondrosis in
Cartilage Calcification Insufficient Rat

TAKEUCHI AYA¹⁾, NAGAYAMA MOTOHIKO²⁾, TANAKA MASAMI³⁾,
WATANABE MINORU⁴⁾, AMANO HITOSHI⁵⁾, SHIBATA SHUNICHI⁶⁾, KITAI NORIYUKI¹⁾

CCI ラットは、全身性に長管骨の低成長など骨格的な形態異常を示す。これまでの兄妹交配では CCI ラットが約 25% の頻度で誕生することから、常染色体劣性遺伝性疾患である可能性が予測されたが、具体的な遺伝様式や病態解明には至っていない。そこで、軟骨内骨化を示す頭蓋底軟骨結合に着目し、SD ラットと CCI ラットを形態学的ならびに分子生物学的に比較検討した。マイクロ CT 画像、HE 染色および SOFG 染色の結果から、軟骨幅が増大し骨化が遅延することが低成長に繋がると考えられた。BMD 値、*DMP1* のリアルタイム PCR や ISH の結果から、骨密度や骨成熟については SD ラットと CCI ラット間に差がないと考えられた。BrdU 免疫染色から、CCI ラットでは軟骨細胞の過剰な増殖が認められた。また *Gli1* の発現分布を広範囲に認めることから、成長板軟骨における軟骨細胞の成熟異常が示唆された。しかし、*Ihh* の発現には差が認められないことから、CCI ラットの骨化は、*Ihh* シグナル系による骨化制御とは異なり、独立した *Gli1* が関連するシグナル系の異常である可能性が高いと考えられた。さらに、*DMP1* の発現減少が CCI ラットの肥大層軟骨細胞で認められることから、CCI ラットでは肥大層軟骨細胞のアポトーシスの異常が生じ、肥大層の幅が広がった可能性が高いと考えられる。

CCI ラットの形態異常は軟骨細胞の過剰増殖と肥大層軟骨細胞の未成熟によるもので、その発症機序には、*Gli1* や *DMP1* の発現と分布異常が関係している可能性が示唆された。

キーワード：軟骨石灰化不全ラット、CCI ラット、頭蓋底軟骨結合

CCI rats show skeletal morphological abnormality such as low growth of long tubular bone systemically. Since CCI rats are born at a frequency of about 25% in previous brother-sister breeding, it was pre-

¹⁾ 朝日大学歯学部口腔構造機能発育学講座歯科矯正学分野

²⁾ 朝日大学歯学部口腔病態医療学講座口腔病理学分野

³⁾ 聖マリアンナ医科大学薬理学教室

⁴⁾ 聖マリアンナ医科大学大学院実験動物飼育管理研究施設

⁵⁾ 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科口腔基礎工学分野

⁶⁾ 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科顎顔面解剖学分野

¹⁾ 〒 501-0296 瑞穂市穂積 1851

²⁾ 〒 501-0296 瑞穂市穂積 1851

³⁾ 〒 216-8511 神奈川県川崎市宮前区管生 2-16-1

⁴⁾ 〒 216-8511 神奈川県川崎市宮前区管生 2-16-1

⁵⁾ 〒 113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45

⁶⁾ 〒 113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45

¹⁾ Department of Orthodontics, Division of Oral Structure, Function and Development

²⁾ Department of Oral Pathology, Division of Oral Pathogenesis and Disease Control, Asahi University School of Dentistry

³⁾ Department of Pharmacology, St. Marianna University School of Medicine

⁴⁾ Institute for Animal Experimentation, St. Marianna University Graduate School of Medicine

⁵⁾ Department of Basic Oral Health Engineering, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

⁶⁾ Department of Maxillofacial Anatomy, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

¹⁾ 1851 Hozumi, Mizuho, Gifu 501-0296, Japan

²⁾ 1851 Hozumi, Mizuho, Gifu 501-0296, Japan

³⁾ 2-16-1 Kawasaki, Kanagawa, 216-8511, Japan

⁴⁾ 2-16-1 Kawasaki, Kanagawa, 216-8511, Japan

⁵⁾ 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8549 Japan

⁶⁾ 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8549 Japan

(令和元年 5 月 9 日受理)

dicted that it may be an autosomal recessive inherited disorder. However, specific genetic modalities and pathological conditions have not been elucidated. Therefore, I focused on cranial base synchondrosis showing intra-cartilage ossification, and compared the morphologically and molecular biologically the SD rats and CCI rats. From the results of micro CT images, HE staining and SOFG staining, it was considered that the increase in cartilage width and delayed ossification leads to low growth. Based on the BMD value and real time PCR of DMP 1 and ISH results, it was considered that there is no difference between SD rats and CCI rats concerning bone density and bone maturation. BrdU immunostaining showed excessive proliferation of chondrocytes in CCI rats. In addition, since the expression distribution of Gli1 was widely recognized, it was suggested that chondrocyte maturation in growth cartilage. However, since there is no difference in the expression of Ihh. These findings suggest that the ossification of CCI rats is highly likely to be an abnormality in the signal system associated with independent Gli1, unlike ossification control by the Ihh signal system. The morphological abnormality of CCI rats was due to hyperproliferation of chondrocytes and immature maturation of hypertrophic chondrocytes, suggesting the possibility that expression and distribution abnormality of Gli1 and DMP1 may be involved in the onset mechanism.

Key words : CCI Rat, Cranial base synchondrosis

緒 言

頭蓋顔面は20以上の骨から構成され、頭蓋骨、頭蓋底および顔面骨の3つに分けられる。頭蓋底は、篩骨、蝶形骨、側頭骨および後頭骨から構成され、脳を下部から支持する役割を持つ。また、頭蓋底は脳の成長に合わせた形態形成を示す¹⁾。骨化様式については、頭蓋骨と顔面骨は、間葉系細胞が骨に置き換わっていく膜性骨化様式により形成される。一方、頭蓋底は、軟骨原基が軟骨を形成した後に骨に置き換わっていく軟骨内骨化様式により形成される。すなわち、軟骨原基は軟骨細胞の増殖と軟骨細胞の細胞外基質産生を行い、骨組織の基本的な形を規定する²⁻⁴⁾。

頭蓋底を構成する骨間には、蝶形篩骨軟骨結合、蝶形骨間軟骨結合、蝶形後頭軟骨結合および後頭間軟骨結合が存在し、軟骨結合の骨化時期と量が頭蓋の前後径と幅径の成長に関与している。ヒトにおいては、蝶形篩骨軟骨結合は7歳頃に、蝶形骨間軟骨結合は出生時に、蝶形後頭軟骨結合は18歳から20歳頃に骨化し、軟骨結合の骨化時期がそれぞれ異なることは頭蓋顔面の成長に重要な意義を持つといわれている⁵⁾。

組織学的にみると、頭蓋底軟骨結合において、増殖層、前肥大層および肥大層の軟骨細胞が静止層の軟骨細胞を介して前後対称に存在している。また、軟骨結合における軟骨細胞の構成と配列方向が軟骨内骨化による骨の成長方向に関係するといわれている⁵⁻⁸⁾。しかし、軟骨内骨化のメカニズムについては明らかにされていない部分が多い。

頭蓋底は顔面中央部の骨と連続しているため、頭蓋底の成長は顔面骨格の成長に大きく影響を与えること

が知られている⁹⁻¹⁹⁾。しかし、頭蓋底の成長と頭蓋顔面の発育異常については分子レベルで因果関係を解明するまでに至っていない²⁰⁾。頭蓋顔面において、頭蓋底軟骨結合の発生と成長メカニズムを理解することは、発育異常と治療法の模索に役立つと考えられている²⁾。

軟骨内骨化の異常に伴う発育異常を検討するためには、自然発症型のモデルラットが必要となる。Tanakaら²¹⁾は、Sprague-Dawley (SD) ラットから軟骨石灰化不全 (Cartilage calcification insufficient, CCI) ラットの繁殖に成功した。CCI ラットはSD ラットと比較し、全身性の低成長、未熟な軟骨の残存による骨化不全および泉門開存など、顕著な形態異常を示す。また、異常形質発現については、兄妹交配によりCCI ラットが約25%の頻度で誕生することから、相同染色体がホモ接合による形質発現を示す劣性遺伝性様式をとることが予測されている²¹⁾。

そこで本研究では、軟骨内骨化の異常を示すCCI ラットの頭蓋底軟骨結合に着目し、SD ラットとCCI ラットを形態学的ならびに分子生物学的に比較検討し、軟骨結合の形態的発育異常とこれに関連する分子機構を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

1. 実験動物

実験には生後2週齢の雌性SD ラットとCCI ラット各20匹を用いた (図1)。CCI ラットについては、聖マリアンナ医科大学の動物研究センターにて系統維持されたラットを用いた²¹⁾。ラットは朝日大学歯学部実験動物飼育施設において以下の条件で飼育した。室温 (22 ± 2℃) と湿度 (55 ± 2%) は一定に保ち、明暗

周期は6時より18時まで点灯, 18時より6時まで消灯とした。ラットは固形飼料(オリエンタル酵母工業, 東京)と水道水を自由に摂取できる状態にした。なお, 実験は朝日大学歯学部動物実験倫理委員会の承認(承認番号: 14-001)を得て行った。

2. 形態学的検索

SD ラットと CCI ラットにイソフルラン (フォーレン[®] 吸入麻酔液, アボットジャパン, 東京) にて吸入麻酔をかけた後, ペントバルビタール (ソムノペンチル[®], 共立製薬, 東京) 40.0 mg/kg を腹腔投与し, 開胸後左心室から 10% ホルマリン (10% 中性緩衝ホルムアルデヒド液, ナカライテスク, 京都) を点滴注入して還流固定を行った。その後, 頭部を断頭し, マイクロ CT 装置 (ScanXmate-RB090SS, コムスキャンテクノ, 横浜) で撮影 (管電圧 90kV, 管電流 89 μ A, 倍率 2.6 倍) した。マイクロ CT スライス画像を軸方向からみて, 蝶形骨前方骨端部と蝶形骨後方骨端部のそれぞれ中点を結んだ直線距離を蝶形骨間軟骨結合 (IS) 間距離あるいは蝶形骨後方骨端部と後頭骨前方骨端部のそれぞれ中点を結んだ直線距離を蝶形後頭軟骨結合 (SO) 間距離として軟骨幅を計測した。

さらに, 三次元立体構築ソフトウェア (TriBON, ラトックシステムエンジニアリング, 東京) を用いてマイクロ CT スライス画像から立体構築像を作製し, 蝶形骨骨端部の骨密度 (Bone Mineral Density, BMD) の算出を行った。なお, それぞれの計測結果は Student's-*t* 検定により有意差検定 ($p < 0.01$) を行った。

3. 組織学的検索

1) 試料作製方法

摘出した頭部は 10% EDTA 脱灰液を用い, 4℃で 10 日間脱灰した。脱灰後の頭蓋底中央部をトリミング

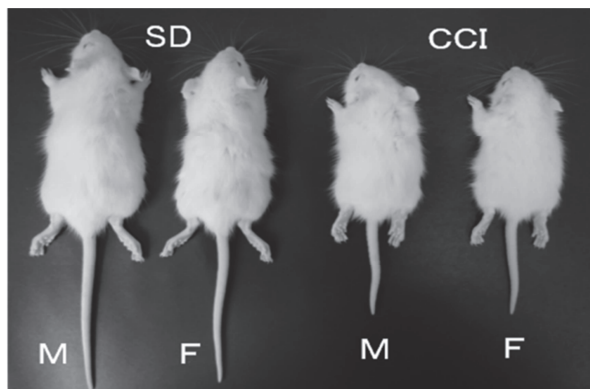


図1 SD ラットと CCI ラット
M: 雄性, F: 雌性を示す

した後, パラフィン包埋し滑走式ミクロトーム (Leica SM 2000R-Sliding Microtome, Leica Biosystems, Nussloch, Germany) を用いて, 矢状断で厚さ 4 μ m の連続切片を作製した。

2) Hematoxyline Eosine 染色

Hematoxyline Eosine (HE) 染色は, 脱パラフィン処理した切片を Mayer の Hematoxylin 液に室温で 5 分間染色し, 流水水洗した後, 室温にて Eosine 液で 3 分間染色し, 上昇エタノール系列脱水, キシレン透徹後に封入した。

3) Safranin O Fast green 染色

Safranin O Fast green (SOFG) 染色は, 脱パラフィン処理した切片を Mayer の Hematoxylin 液に室温で 5 分間染色し, 流水水洗した後, 0.05% Fast green 液で 5 分間染色後, Safranin O 液で 5 分間染色し, 上昇エタノール系列脱水, キシレン透徹後に封入した。

4. 分子生物学的検索

1) 5-bromo-2'-deoxyuridine 免疫染色

5-bromo-2'-deoxyuridine (以下, BrdU) は DNA のチミジンホモログとして S 期細胞核に取り込まれることから, 軟骨細胞の増殖が検出可能となる。SD ラットと CCI ラット各 4 匹について, ラット屠殺処置の 2 時間前と 1 時間前に, あらかじめ PBS で溶解した BrdU (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) を腹腔内に投与した後, 10% ホルマリンで還流固定し, 通法に従いパラフィン切片を作製した。脱パラフィン処理した切片を 0.3% 過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼ除去と 1% ウシ血清によるブロッキング処理を行い, BrdU 抗体 (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) を 4℃で一晩反応させた。その後, シンプルステインラット MAX-PO (M) (ニチレイバイオサイエンス, 東京) に 30 分間反応させて, 3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) による発色を行った。対比染色には Mayer の Hematoxylin を用いた。

2) Total RNA の抽出

SD ラットと CCI ラットの膝関節部骨端部軟骨より一次海綿骨の一部を含む軟骨を採取し, メスで細切した後, ホモジナイザー (POLYTRON PT1200; KINEMATICA, Lucerne, Switzerland) で粉碎し, ISOGEN (ニッポンジーン, 東京) を用いて total RNA を抽出した。

3) マイクロアレイ解析

SD ラットと CCI ラットから抽出した total RNA を用いてマイクロアレイ解析依頼 (GENEChip Exprssion Array 解析, タカラバイオ, 三重) を行った。

4) Real time PCR

SD ラットと CCI ラットから抽出した $1\mu\text{g}$ の total RNA から High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits for 200 and 1000 Reactions (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) を用いて, cDNA を合成した。これを元に TaqMan[®] Fast Universal PCR Master Mix [2 ×] (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) と No AmpErase[®] UNG (Thermo Fisher Scientific, Waltham,

USA) を用いて Applied Biosystems StepOne[®] Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) にてリアルタイム PCR を行った。相対的定量解析には $\Delta\Delta\text{CT}$ 法を用いた。

リアルタイム PCR は, 表に示す β -actin を内在性コントロール遺伝子として, Dentin matrix acidic phosphoprotein1 (*DMP1*), Indian hedgehog (*Ihh*), Smoothed frizzled family (*Smo*), GLI family zinc finger 1 (*Gli1*) の各プライマーを目的遺伝子として使用した。

なお, それぞれの解析結果は Student's-*t* 検定により有意差検定 ($p < 0.01$) を行った。

表 1 使用したプライマー

	Gene	Assay ID
内在性遺伝子	β -actin	Rn00667869_m1
目的遺伝子	Dentin matrix acidic phosphoprotein 1 (<i>DMP1</i>)	Rn01450122_m1
	Indian hedgehog (<i>Ihh</i>)	Rn03810376_m1
	Smoothed, frizzled family (<i>Smo</i>)	Rn00563043_m1
	GLI family zinc finger 1 (<i>Gli1</i>)	Rn01504237_m1

5) *in situ* hybridization

in situ hybridization (ISH) には, 特異的制限酵素とプラスミドを用いてサブクローニングによるジゴキシゲニン (DIG) 標識した *Ihh* (nt.897-1954; NM_010544), *Gli1* (nt.1226-1580; NM_010296), *DMP1* (nt.12-1531; NM_203493) の 3'-5' 配列を *in vitro* transformation 法を用いて, anti-sense RNA プローブ (DIG 標識特異的プローブ) として使用した。脱パラフィン後の切片を下降エタノール系列 (100%, 90%, 80%, 70%, 50%) に 5 分間ずつ浸漬し 0.01M PBS で洗浄後, $10\mu\text{g/ml}$ Proteinase K (Roche, Mannheim, Germany) により 10 分間処理し, 0.01M PBS で 5 分間洗浄した。4% paraformaldehyde/PBS により後固定を行った後 0.01M PBS で 5 分間洗浄した。0.1M triethanolamine (pH=8.0) に浸漬して無水酢酸 1ml をシリンジで 3 分間滴下し, 15 分間攪拌した。2 × SSC (600mM NaCl, 60mM Sodium citrate) にて 10 分間洗浄後, Hybridization 溶液 (50% formamide, 5 × SSC, 5 × Denhardt 溶液, $500\mu\text{g/ml}$ サケ精子, $250\mu\text{g/ml}$ 酵母トランスファー RNA) を用いてプレハイブリダイゼーションを 55℃ で 1 時間行った。そして 250ng/ml の各 DIG 標識特異的プローブを含む Hybridization 溶液にてハイブリダイゼーションを 55℃ で 18 時間行った。その後, 2 × SSC で 5 分間, 0.2 × SSC (30mM NaCl, 3mM Sodium citrate) で 20 分間洗浄を 55℃ で 3 回行った。続いて

TBS (50mM Tris/HCl [pH=7.5], 150mM NaCl) にて 5 分間室温で静置し, 0.5% blocking reagent (Roche, Mannheim, Germany) を含む Blocking 溶液 / TBS に 30 分間反応させた後, Alkaline Phosphatase 標識抗 DIG 抗体 (Roche, Mannheim, Germany) を含む Blocking 溶液で 60 分間室温で反応させた。TNT バッファー (50 mM Tris/HCl [pH=7.5], 150mM NaCl, 0.05 % Tween20) を用いて 5 分間洗浄を 3 回行った後, 4-nitro blue tetrazolium chloride 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (Roche, Mannheim, Germany) を発色基質とし, 室温で 9 時間反応させ, 発色を行った。また, ネガティブコントロールには mRNA の 5'-3' 配列の sense プローブを同様に加えたもので ISH を行った。

結 果

1. マイクロ CT 所見

SD ラットでは頭蓋底を構成する骨間にスリット状の薄い軟骨層と思われるエックス線透過帯が認められた。これに対し, CCI ラットでは軟骨結合部のスリット幅は IS と SO のいずれにおいても SD ラットよりも CCI ラットで有意に大きく, SD ラットの約 3 倍であった (図 2, 3)。

蝶形骨部の BMD 画像と BMD 値においては, SD ラットと CCI ラットの間に有意差は認められなかった。

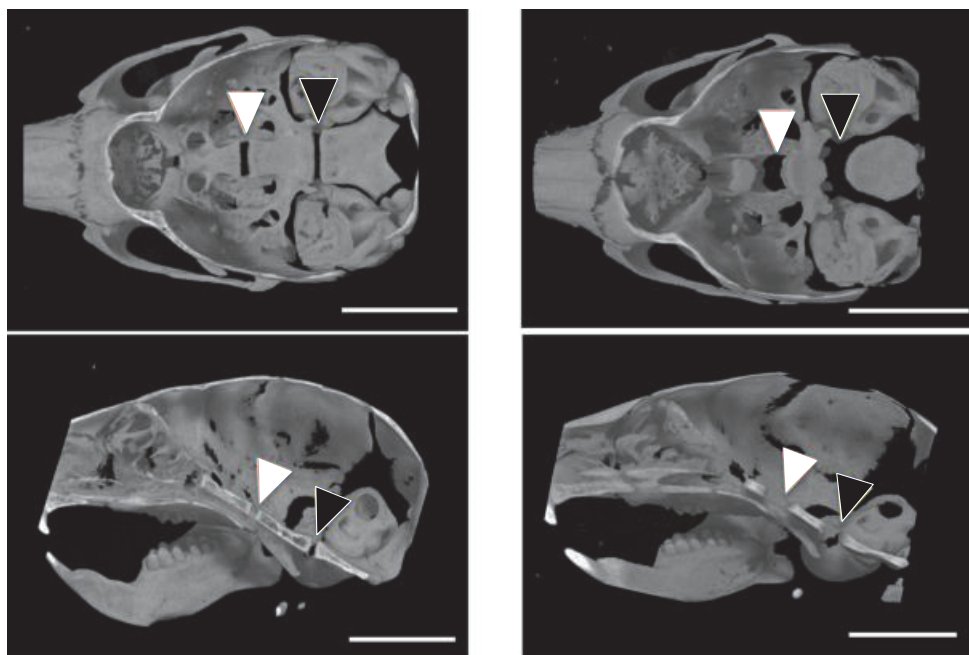


図2 頭蓋底軟骨結合部マイクロCT画像
白色矢頭は蝶形骨間軟骨結合 (IS) を, 黒色矢頭は蝶形後頭軟骨結合 (SO) を示す. (Bars=10.0mm)

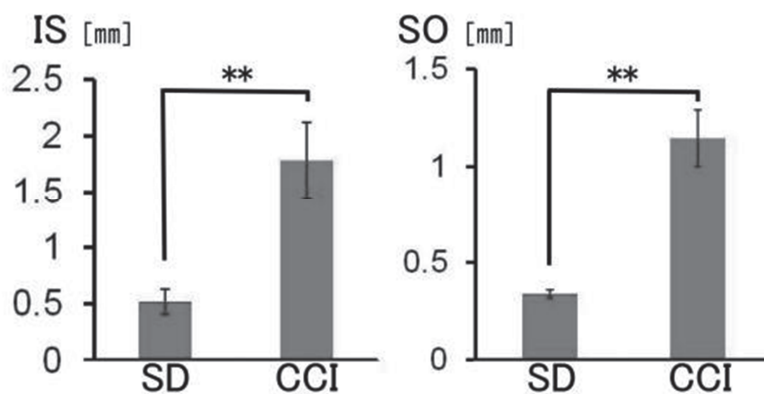


図3 ISとSOのスリット幅の比較 (** $p<0.01$)

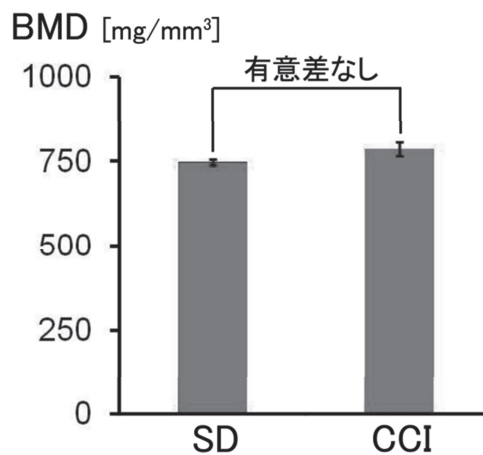


図4 蝶形骨骨端部におけるBMD値の比較

2. HE 染色と SOFG 染色

SD ラットと比較して CCI ラットの IS と SO は前後幅が長く (図 5), 静止層, 増殖層および肥大層の幅の増大が認められた (図 6). また, SD ラットでは軟骨から骨へのスムーズな移行像を示すが, CCI ラットでは軟骨細胞の前後方向への細胞配列に乱れがあり, 骨への不規則な移行像を示した (図 6).

3. BrdU 免疫染色

BrdU 陽性細胞の発現範囲は, SD ラットでは増殖層に限定した分布が認められるのに対し, CCI ラットでは増殖層から前肥大層にかけて広範囲に認められた (図 7).

4. マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析の結果, 多くの遺伝子について SD ラットと CCI ラットとの間で発現量に差が認められた (図 8, 表 2). さらに, KEGG pathway 解析の結果, 軟骨細胞の増殖に関係する *Ihh* シグナル経路の *Gli1* mRNA と *Smo* mRNA において差が認められた (図 9).

5. Real time PCR 解析

DMP1 mRNA と *Ihh* mRNA は SD ラットと CCI ラットとの間に有意な差が認められなかったが, *Gli1* mRNA と *Smo* mRNA は SD ラットと比較し CCI ラットで有意な差が認められた (図 10).

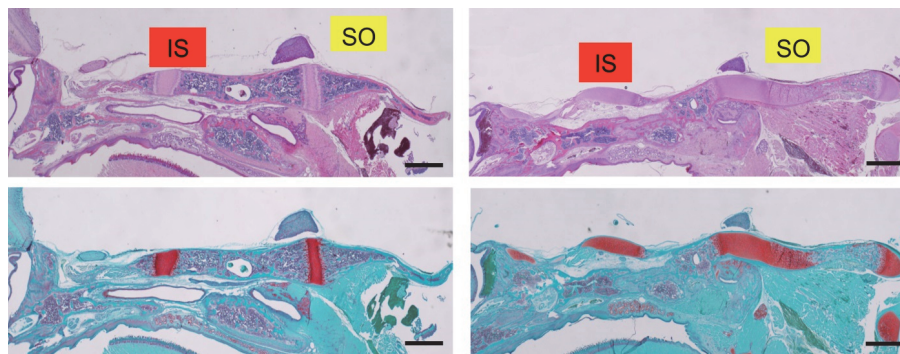


図 5 SO と IS における HE 染色と SOFG 染色
IS は蝶形骨間軟骨結合, SO は蝶形後頭軟骨結合をそれぞれ示す. (Bars=1.0mm)

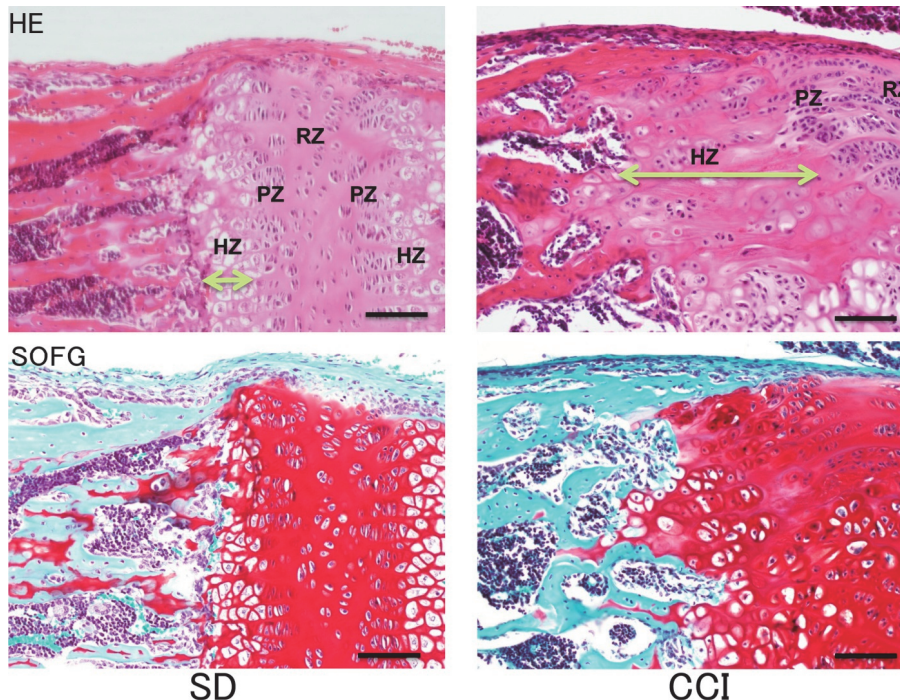


図 6 SO における HE 染色と SOFG 染色
静止層: RZ, 増殖層: PZ, 肥大層 (淡緑色両矢印): HZ (Bars=100 μ m)

6. *DMP1* mRNA 発現分布

SO における *DMP1* は SD ラットと CCI ラットともに骨細胞で発現していることが認められた。また SD ラットの肥大軟骨細胞層でもわずかな発現が認められたが、CCI ラットでは発現が認められなかった (図 11)。

7. *Ihh* mRNA 発現分布

SO における *Ihh* mRNA は SD ラットと CCI ラットともに前肥大層に認められ、肥大層においてはほとんど認められなかった (図 12)。

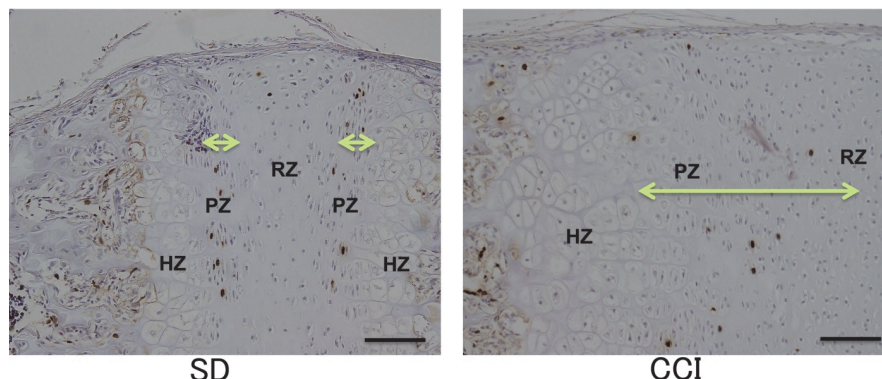


図 7 SO における BrdU 免疫染色
淡緑色両矢印は BrdU 陽性細胞の発現範囲を示す。(Bars=100 μ m)

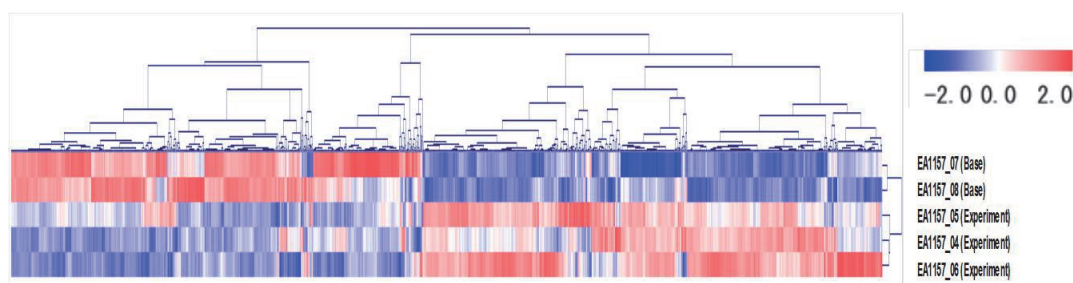


図 8 遺伝子クラスター解析結果
上 2 段が SD ラット (N=2) を、下 3 段が CCI ラット (N=3) を示す。(ピアソン相関係数)

表 2 マイクロアレイ解析結果

Rank	Path Name	pvalue
1	TGF-beta signaling pathway	0.0006
2	Proteoglycans in cancer	0.0006
3	Hippo signaling pathway	0.0009
4	pathways in cancer	0.0009
5	Focal adhesion	0.0018
6	Basal cell carcinoma	0.0023
7	Ubiquitin mediated proteolysis	0.004
8	Proximal tubule bicarbonate reclamation	0.0041
9	MicroRNAs in cancer	0.0048
10	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	0.0096
11	D-Glutamine and D-glutamate metabolism	0.0144
12	Vasopressin-regulated water reabsorption	0.0181
13	Glutamatergic synapse	0.0185
14	Hedgehog signaling pathway	0.0223
15	Cell cycle	0.023

上位ランクほど SD ラットと CCI ラットとの間で発現量に有意な差が認められることを示す。

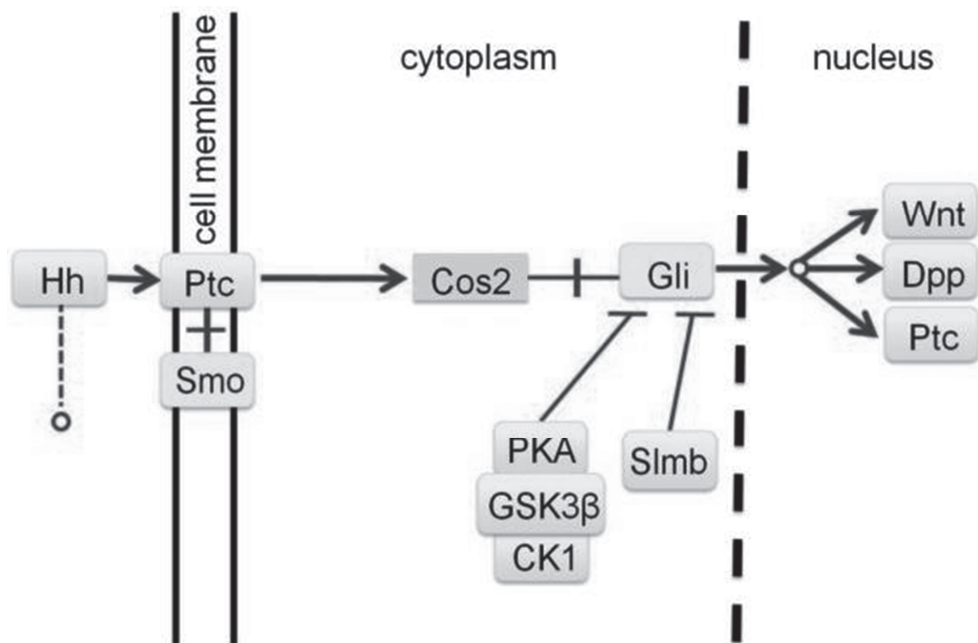


図9 Ihh シグナル経路における KEGG pathway
黄色は異常値を含む解析結果を示す.

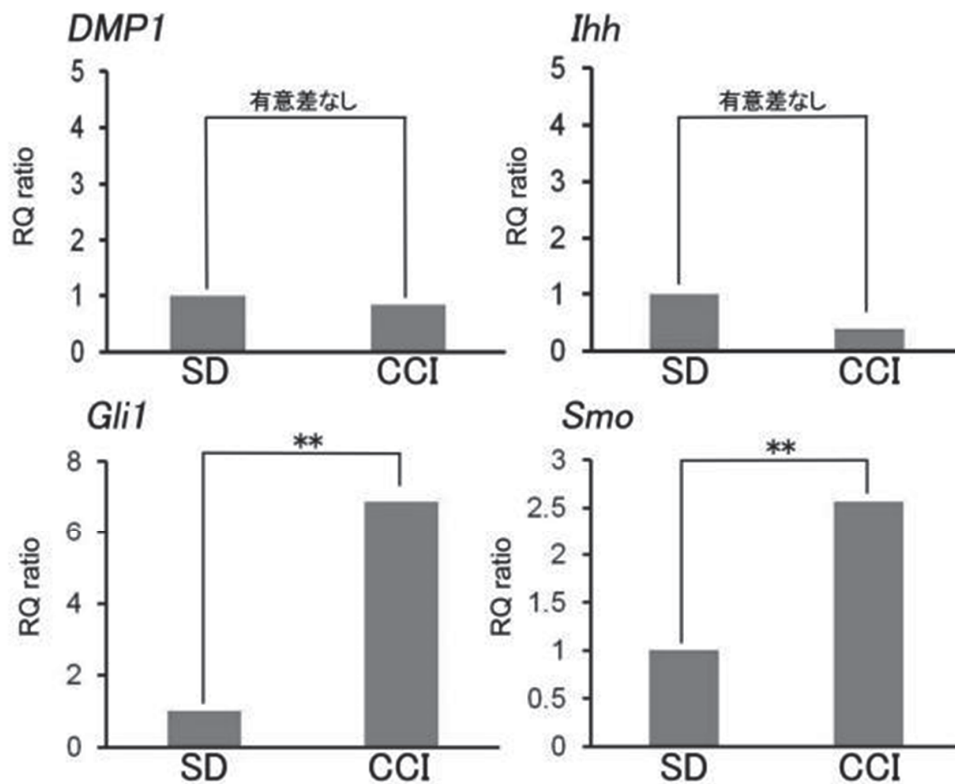


図10 *DMP1*, *Ihh*, *Gli1*, *Smo* mRNA の相対的定量
(N=6, ** $p<0.01$)

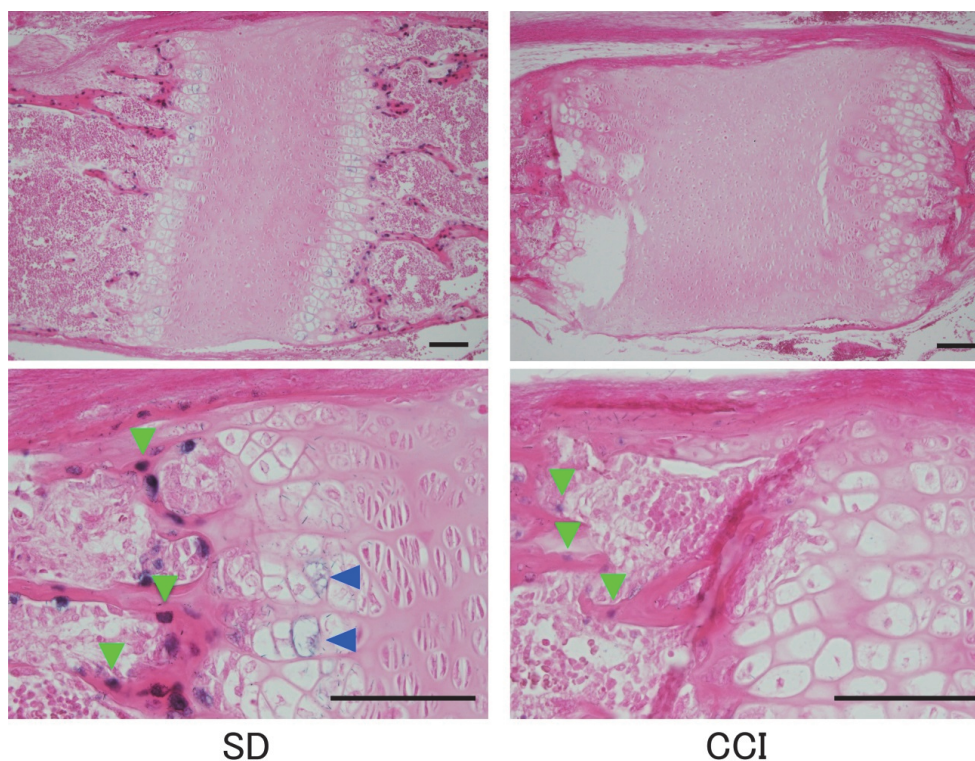


図 11 SO における *DMP1* mRNA 発現分布
下段は一部強拡大像を示す。緑色矢頭は骨細胞の陽性を、青色矢頭は軟骨細胞の陽性を示す。(Bars=50 μ m)

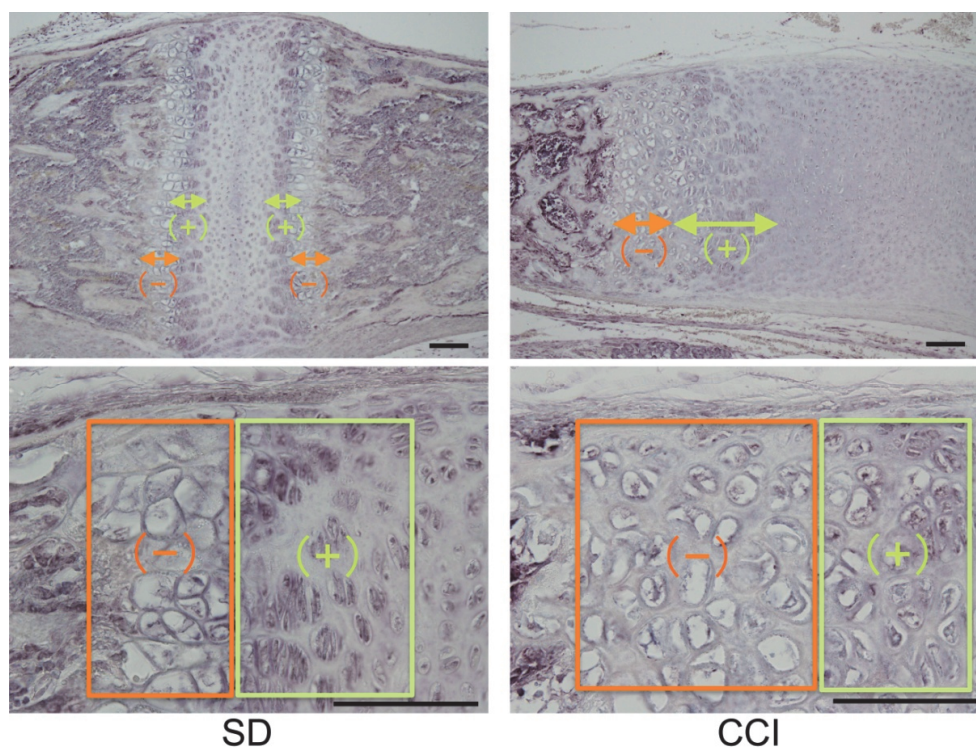


図 12 SO における *Ihh* mRNA の発現分布
下段は一部強拡大像を示す。+は mRNA の発現陽性を、-は陰性をそれぞれ示す。(Bars=0.1mm)

8. *Gli1* mRNA の発現分布

SO における *Gli1* mRNA はSD ラットでは静止層から増殖層にかけて認められたのに対し、CCI ラットでは静止層から肥大層にかけて広範囲にその発現が認められた (図 13)。

考 察

本研究では、CCI ラットの頭蓋底軟骨結合について形態学的な異常とこれを裏付ける分子メカニズムの検討を行った。

マイクロ CT 画像において、CCI ラットはSD ラットと比較し広い頭蓋底軟骨幅を示した。CCI ラットは顕著な低成長を示すことが報告されている²¹⁾。CCI ラットでは広い軟骨幅を示したことから、軟骨幅が増大し骨化が遅延するため低成長に繋がると考えられる。また、骨化度を検討するためのBMD値がCCI ラットとSD ラットとの間で有意差を認めなかったことから、骨の成熟についてはSD ラットとCCI ラットとの間で差がないと考えられる。

HE 染色とSOFG染色による組織学的検索において、CCI ラットの蝶形後頭軟骨結合では軟骨細胞配列の乱れと軟骨結合幅の増大が認められた。このことから、CCI ラットの頭蓋底軟骨結合では軟骨内骨化遅延が生

じている可能性が考えられる。

BrdU 免疫染色において、CCI ラットでは広範囲に BrdU 陽性軟骨細胞が認められた。BrdU は細胞周期における S 期細胞核に取り込まれることから、BrdU 陽性軟骨細胞が認められたことは、軟骨細胞が増殖していることを意味する。このため、CCI ラットでは軟骨細胞の過剰増殖が起きていると考えられる。

マイクロアレイ解析において、CCI ラットの *Ihh* シグナル関連分子に異常が認められた。さらに、分子間相互作用をみる KEGG pathway 解析において、*Ihh* シグナル分子である *Smo* mRNA と *Gli1* mRNA の変動が認められたことから、*Ihh* シグナル分子が軟骨細胞増殖に関係していると考えられる。

Ihh は軟骨細胞において増殖と分化の調節因子として、胎生期から胎生後にかけて作用することが報告されている²²⁻²⁵⁾。成長板軟骨において産生された *Ihh* は静止層、増殖層および軟骨膜に存在する軟骨細胞膜にある。*Ihh* が *Patched* に結合すると、*Patched* に抑制されていた *Smo* は細胞膜から解離し、転写因子である *Gli* を核内へと移動させて、軟骨細胞の増殖を促進する。同時に、*Ihh* は他の軟骨細胞に作用して *Parathyroid hormone related protein* の産生を促す。*Parathyroid hormone related protein* は軟骨細胞の

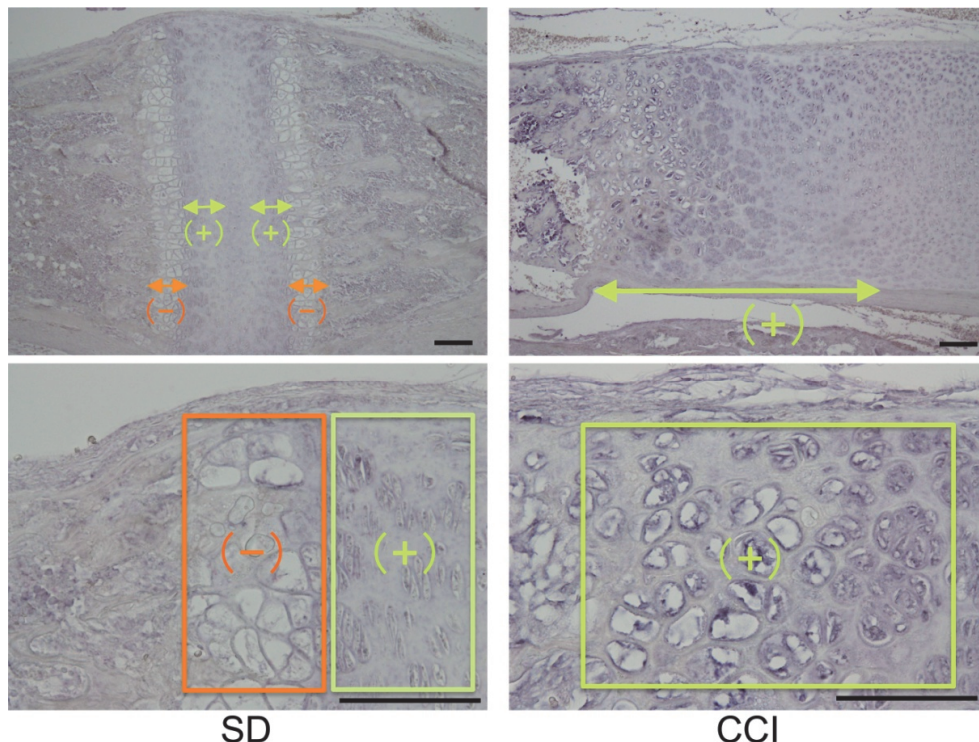


図 13 SO における *Gli1* mRNA の発現分布
+ は mRNA の発現陽性を、- は陰性をそれぞれ示す。(Bars=0.1mm)

Parathyroid hormone related protein レセプターに結合して軟骨細胞の増殖を促進し、その分化を抑制する。このため、カラム状の密な細胞配列を示す²⁴⁻²⁶⁾。マイクロアレイ解析の結果を元に、相対的定量解析を行ったところ、*Ihh* mRNA については、SD ラットと CCI ラットとの間に差が認められなかった。しかし、*Smo* mRNA と *Gli1* mRNA について、CCI ラットでは SD ラットの 2 倍以上の産生が認められたことから、CCI ラットの頭蓋底軟骨結合において、*Smo* mRNA と *Gli1* mRNA の過剰発現が軟骨細胞の増殖を促進している可能性が高いと考えられる。また、SD ラットと CCI ラットとの間で *Ihh* mRNA の発現量に差が認められず、*Smo* mRNA と *Gli1* mRNA の発現量に差を認めることは、*Smo* mRNA と *Gli1* mRNA が *Ihh* シグナル経路とは独立して発現した結果であると考えられる。*Ihh* シグナル経路から独立した *Gli* の活性は、腫瘍細胞などでも認められている²⁷⁾。

ISH において、*Ihh* mRNA は SD ラットと CCI ラットともに前肥大層軟骨細胞に認められた。*Gli1* mRNA は SD ラットでは前肥大層軟骨細胞に限定されているのに対し、CCI ラットでは前肥大層軟骨細胞に加えて肥大層軟骨細胞においても認められた。CCI ラットでは *Gli1* mRNA が広範囲に認められたことから、軟骨細胞の増殖が亢進していると考えられる。すなわち、CCI ラットにおける軟骨細胞の過剰増殖は *Gli1* mRNA 過剰発現が関連していると考えられる。

DMP1 mRNA について、マイクロアレイ、リアルタイム PCR および ISH の結果から、骨細胞における *DMP1* mRNA 発現は SD ラットと CCI ラットともに認められた。*DMP1* は非コラーゲン性骨基質タンパク質で、 Ca^{2+} 結合能を介した骨の石灰化に関与することから骨成熟マーカーとして知られている²⁸⁻³²⁾。骨細胞において *DMP1* mRNA が発現していることから、骨の成熟については SD ラットと CCI ラットとの間に差がないと考えられる。一方、CCI ラットの肥大層軟骨細胞においては、*DMP1* mRNA 発現が認められなかった。*DMP1* mRNA は肥大層軟骨細胞などに認められ、肥大層軟骨細胞のアポトーシスを介して軟骨内骨化に関わっていることが報告されている³³⁾。*DMP1* mRNA ノックアウトマウスでは、肥大層軟骨細胞のアポトーシス抑制と血管侵入遅延が起こる結果、幅広い成長板軟骨を示すことから^{33, 34)}、CCI ラットでも、*DMP1* mRNA ノックアウトマウスと同様に肥大層軟骨細胞のアポトーシス抑制が軟骨幅の増加に関与したと考えられる。以上のことから、CCI ラットにおける頭蓋底軟骨結合では軟骨細胞の過剰増殖とアポトーシスの抑制により幅の広い軟骨を示したと考えられる。

結 論

軟骨内骨化の異常を示す CCI ラットの頭蓋底軟骨結合に着目し、SD ラットと CCI ラットを比較検討することにより、軟骨結合の形態的発育異常とこれに関連する分子機構を明らかにすることを目的として実験を行ったところ、CCI ラットについて以下の結果を得た。

- 1) マイクロ CT 画像、HE 染色、SOFG 染色において、軟骨幅の増大が認められた。また、BrdU 免疫染色において、軟骨細胞の過剰増殖が認められた。
- 2) 軟骨細胞の増殖に関連する *Ihh* mRNA と *Gli1* mRNA の相対的定量解析と ISH において、*Gli1* mRNA の過剰発現と分布異常が認められた。
- 3) 軟骨細胞のアポトーシスに関連する *DMP1* mRNA の ISH において、肥大層軟骨細胞で発現が認められなかった。

以上のことから、CCI ラットは軟骨細胞の過剰増殖と肥大層軟骨細胞のアポトーシス抑制により頭蓋底軟骨結合の幅が増大し、軟骨内骨化が遅延した結果、低成長を示すと考えられる。その発症機序の一つに *Gli1* mRNA と *DMP1* mRNA の発現と分布の異常が関係していると考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご協力を賜りました。本研究は日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究（C）24592789, 15K11030）の支援のもとに行われた。

引用文献

- 1) Thorogood P. The developmental specification of the vertebrate skull. *Development*. 1988; 103: 141-153.
- 2) 永山元彦, Koyama Eiki, 渋川義宏, 中澤純子, 今泉佳宣, 塚原隆司, 日下義章, 大友克之, 竹内 宏. 頭蓋底軟骨結合—その成長を調節する分子メカニズムと異常—. 岐歯学誌. 2009; 35: 96-104.
- 3) Thilander B and Ingervall B. The human sphenoccipital synchondrosis. II. A histological and microradiographic study of its growth. *Acta Odontol Scand*. 1973; 31: 323-334.
- 4) Roberts GJ and Blackwood HJ. Growth of the cartilages of the mid-line cranial base: a radiographic and histological study. *J Anat*. 1983; 136: 307-320.
- 5) Ingervall B and Thilander B. The human sphenoccipital synchondrosis. I. The time of closure appraised macroscopically. *Acta Odontol Scand*. 1972; 30: 349-356.

- 6) Orkin RW, Williams BR, Cranley RE, Poppke DC and Brown KS. Defects in the cartilaginous growth plates of brachymorphic mice. *J Cell Biol.* 1977; 73: 287-299.
- 7) Vanky P, Brockstedt U, Nurminen M, Wikstrom B and Hjerpe A. Growth parameters in the epiphyseal cartilage of brachymorphic (bm/bm) mice. *Calcif Tissue Int.* 2000; 66: 355-362.
- 8) Kjaer I. Radiographic determination of prenatal basicranial ossification. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1990; 10: 113-123.
- 9) Evans CA and Christiansen RL. Cephalic malformations in Saethre-Chotzen syndrome. Acrocephalosyndactyly type III. *Radiology.* 1976; 121: 399-403.
- 10) Cohen MM, Jr., Walker GF and Phillips C. A morphometric analysis of the craniofacial configuration in achondroplasia. *J Craniofac Genet Dev Biol Suppl.* 1985; 1: 139-165.
- 11) Kolar JC, Munro IR and Farkas LG. Anthropometric evaluation of dysmorphology in craniofacial anomalies: Treacher Collins syndrome. *Am J Phys Anthropol.* 1987; 74: 441-451.
- 12) Carinci F, Avantiaggiato A and Curioni C. Crouzon syndrome: cephalometric analysis and evaluation of pathogenesis. *Cleft Palate Craniofac J.* 1994; 31: 201-209.
- 13) Brkic H, Kaic Z, Poje Z and Singer Z. Shape of the craniofacial complex in patients with Klinefelter syndrome. *Angle Orthod.* 1994; 64: 371-376.
- 14) Kreiborg S and Cohen MM, Jr. Is craniofacial morphology in Apert and Crouzon syndromes the same?. *Acta Odontol Scand.* 1998; 56: 339-341.
- 15) Cohen MM, Jr. Achondroplasia, hypochondroplasia and thanatophoric dysplasia: clinically related skeletal dysplasias that are also related at the molecular level. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1998; 27: 451-455.
- 16) Kreiborg S, Jensen BL, Larsen P, Schleidt DT and Darvann T. Anomalies of craniofacial skeleton and teeth in cleidocranial dysplasia. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1999; 19: 75-79.
- 17) Andersen E, Sonnesen L, Kjaer MS, Fischer Hansen B and Kjaer I. The prenatal cranial base complex and hand in Turner syndrome. *Eur J Orthod.* 2000; 22: 185-194.
- 18) Axelsson S. Variability of the cranial and dental phenotype in Williams syndrome. *Swed Dent J Suppl.* 2005; 170: 3-67.
- 19) Alio JJ, Lorenzo J and Iglesias C. Cranial base growth in patients with Down syndrome: a longitudinal study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008; 133: 729-737.
- 20) Liu Y, Liu F, Zheng Y and Yu X. Morphological characteristics of the cranial base in sagittal malocclusion. *J Hard Tissue Biology.* 2013; 22: 249-254.
- 21) Tanaka M, Watanabe M, Yokomi I, Matsumoto N, Sudo K, Satoh H, Igarashi T, Seki A, Amano H, Ohura K, Kakei R, Shibata S, Nagayama M and Tanuma J. Establishment of a novel dwarf rat strain, cartilage calcification insufficient (CCI) rats. *Exp Anim Tokyo.* 2015; 64: 121-128.
- 22) Lui JC, Andrade AC, Forcinito P, Hegde A, Chen W, Baron J and Nilsson O. Spatial and temporal regulation of gene expression in the mammalian growth plate. *Bone.* 2010; 46: 1380-1390.
- 23) Chau M, Forcinito P, Andrade AC, Hegde A, Ahn S, Lui JC, Baron J and Nilsson O. Organization of the Indian hedgehog-parathyroid hormone-related protein system in the postnatal growth plate. *J Mol Endocrinol.* 2011; 47: 99-107.
- 24) Young B, Minugh-Purvis N, Shimo T, St-Jacques B, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M, Koyama E and Pacifici M. Indian and sonic hedgehogs regulate synchondrosis growth plate and cranial base development and function. *Dev Biol.* 2006; 299: 272-282.
- 25) Koyama E, Young B, Nagayama M, Shibukawa Y, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Maeda Y, Lanske B, Song B, Serra R and Pacifici M. Conditional *Kif3a* ablation causes abnormal hedgehog signaling topography, growth plate dysfunction, and excessive bone and cartilage formation during mouse skeletogenesis. *Development.* 2007; 134: 2159-2169.
- 26) Chung UI, Schipani E, McMahon AP and Kronenberg HM. Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. *J Clin Invest.* 2001; 107: 295-304.
- 27) Nolan-Stevaux O, Lau J, Truitt ML, Chu GC, Hebrok M, Fernandez-Zapico ME and Hanahan D. GLI1 is regulated through Smoothened-independent mechanisms in neoplastic pancreatic ducts and mediates PDAC cell survival and transformation. *Genes Dev.* 2009; 23: 24-36.
- 28) Ogbureke KU and Fisher LW. Expression of SIBLINGs and their partner MMPs in salivary glands. *J Dent Res.* 2004; 83: 664-670.
- 29) Ogbureke KU and Fisher LW. Renal expression of SIBLING proteins and their partner matrix metalloproteinases (MMPs). *Kidney Int.* 2005; 68: 155-166.
- 30) Ogbureke KU and Fisher LW. SIBLING expression patterns in duct epithelia reflect the degree of metabolic activity. *J Histochem Cytochem.* 2007; 55: 403-409.

- 31) Terasawa M, Shimokawa R, Terashima T, Ohya K, Takagi Y and Shimokawa H. Expression of dentin matrix protein 1 (DMP1) in nonmineralized tissues. *J Bone Miner Metab.* 2004; 22: 430-438.
 - 32) Toyosawa S, Shintani S, Fujiwara T, Ooshima T, Sato A, Ijuhin N and Komori T. Dentin matrix Protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 2001; 16: 2017-2026.
 - 33) Qin C, D'Souza R and Feng JQ. Dentin matrix protein 1 (DMP1): new and important roles for biomineralization and phosphate homeostasis. *J Dent Res.* 2007; 86: 1134-1141.
 - 34) Ye L, Mishima Y, Chen D, Huang H, Dallas SL, Dallas MR, Sivakumar P, Kunieda T, Tsutsui TW, Boskey A, Bonewald LF and Feng JQ. *DMP1*-deficient mice display severe defects in cartilage formation responsible for a chondrodysplasia-like phenotype. *J Biol Chem.* 2005; 280: 6197-6203.
-

