

## 論 文 内 容 要 旨

受 付 番 号	① 乙	第 4 1 7 号	氏 名	竹 内 綾
論文審査委員	主 査	朝日大学歯学部	教授	北井 則行
	副 査	朝日大学歯学部	教授	田沼 順一
	副 査	朝日大学歯学部	教授	永山 元彦
	外部審査	大阪大学大学院	教授	豊澤 悟
論 文 題 目	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			
<p>(論文内容の要旨)</p> <p><b>【目的】</b>軟骨石灰化不全 (Cartilage calcification insufficient, CCI) ラットは Sprague-Dawley (SD) ラットから自然発症する。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。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。</p> <p><b>【方法】</b>生後 2 週齢の SD ラットと CCI ラットを 10% ホルマリンで還流固定後、マイクロ CT エックス線撮影装置で頭部を撮影し、三次元構造解析ソフトウェアを用いて蝶形骨部の骨密度 (bone mineral density, BMD) を算出した。その後、頭部を 10% EDTA で 10 日間脱灰し、厚さ 4 μm の矢状断パラフィン切片を作製した。Hematoxyline・Eosin (HE) 染色と Safranin O Fast Green (SOFG) 染色により軟骨結合部の形態を観察した。また、5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 免疫染色により軟骨細胞の増殖を観察した。さらに、成長板軟骨を含む膝関節から抽出したトータル RNA により cDNA マイクロアレイ解析を行った。この結果を元に CCI ラットの形質発現に有力な候補遺伝子である Dentin matrix acidic phosphoprotein 1 (<i>DMP1</i>), Indian hedgehog (<i>Ihh</i>), Smoothed frizzled family (<i>Smo</i>), GLI family zinc finger 1 (<i>Glil</i>) について、リアルタイム PCR (ΔΔCT 法) と <i>in situ</i> hybridization (ISH) により mRNA の発現を観察した。</p> <p><b>【結果】</b>マイクロ CT 画像により、SD ラットでは頭蓋底中央部骨間にスリット状の薄い軟骨結合部が、CCI ラットでは軟骨結合部の前後方向への広がり認められた。一方、BMD 値により、SD ラットと CCI ラット間で骨密度に有意な差は認められなかった。</p> <p>HE 染色と SOFG 染色により、CCI ラットでは成長板軟骨において軟骨細胞の配列の乱れや軟骨基質の分布異常が認められた。また、BrdU 免疫染色により、CCI ラットでは SD ラットと比較して BrdU 陽性軟骨細胞が広範囲に認められた。</p> <p>リアルタイム PCR により、<i>Glil</i> mRNA と <i>Smo</i> mRNA については CCI ラットで SD ラットと比較して有意な差が認められた (<math>p &lt; 0.01</math>) が、<i>DMP1</i> mRNA と <i>Ihh</i> mRNA については有意な差が認められなかった。</p>				

ISHにより、*DMP1* mRNAについては骨細胞ではSDラットとCCIラットともに発現が認められたが、成長板軟骨ではSDラットの肥大層にわずかな発現が認められ、CCIラットで発現が認められなかった。*Ihh* mRNAについてはSDラットとCCIラットともに成長板軟骨の静止層から前肥大層にかけて発現が認められた。*Gli1* mRNAについてはSDラットでは静止層の一部から増殖層に限定した発現が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く発現が認められた。

【考察および結論】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ため低成長に繋がると考えられる。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* mRNA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* mRNA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* mRNA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* mRNA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* mRNAと*DMP1* mRNAの発現と分布異常が関係している可能性が示唆された。