

機関番号：11301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592408

研究課題名 (和文) 下顎頭軟骨の形成、成長、機能維持における Ten-m/Odz3 の役割に関する研究

研究課題名 (英文) Role of Ten-m/Odz3 in the formation, growth and functional maintenance of mandibular condylar cartilage

研究代表者

福永 智広 (FUKUNAGA TOMOHIRO)

東北大学・病院・講師

研究者番号：70362994

研究成果の概要 (和文)：

下顎頭軟骨は、表層の未分化間葉系細胞が軟骨細胞に分化し成長するが、メカニズムは明らかになっていない。本研究では、1日、1週、3週齢マウスの下顎頭軟骨における Ten-m/Odz3 遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて明らかにした。Ten-m/Odz3 遺伝子は、表層の線維層、増殖および成熟軟骨細胞で発現し、肥大軟骨細胞では発現が認められなかった。マウス軟骨細胞前駆細胞株 ATDC5 細胞でも、Ten-m/Odz3 遺伝子は間葉系細胞から軟骨細胞へと分化する初期段階において発現した。以上より、Ten-m/Odz3 は下顎頭軟骨の初期分化に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

The mandibular condyle has been speculated to develop via the differentiation of the fibroblast-like cells covering the condyle into chondrocytes; however, the developmental mechanisms behind this process have not been revealed. We describe the temporal and spatial expression of Ten-m/Odz3 mRNA as determined by *in situ* hybridization in mouse mandibular condylar cartilage of 1 day, 1 week, and 3 week of age during the early stages of development. Ten-m/Odz3 was expressed in the fibrous layer and the proliferating and mature chondrocyte layers, but was not detected in the hypertrophic chondrocyte layer. Furthermore, we evaluated the *in vitro* expression of Ten-m/Odz3 using ATDC5 cells, a mouse chondrogenic cell line. Ten-m/Odz3 was expressed during the early stage of the differentiation of mesenchymal cells into chondrocytes. These findings suggest that Ten-m/Odz3 is involved in the differentiation of chondrocytes and that it acts as a regulatory factor in the early stages of the development of mandibular condylar cartilage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：マウス下顎頭軟骨、Ten-m/Odz3、細胞分化、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

| Ten-m/Odz3 遺伝子は、ショウジョウバエの体

筋形成遺伝子の中のペアルール遺伝子として同定され、ヒトからショウジョウバエまで様々な種で発現が認められており、主に神経系における発現について研究されてきた。脊椎動物における Ten-m/Odz 遺伝子の機能は不明であるが、神経系以外でもニワトリ肢芽の体軸決定に関与する apical ectodermal ridge、zone of polarizing activity や胎生マウスの顎顔面領域の間葉組織での発現が報告され、発生時期における形態形成への関与が考えられている。しかしながら、顎顔面領域における Ten-m/Odz3 の詳細な発現部位やその機能については不明である。

顎顔面骨格の一部である下顎頭軟骨は頭蓋骨とともに顎関節を構成し、咀嚼などの複雑な運動に適応しているだけでなく、下顎骨の成長にも寄与しており、長管骨の関節軟骨と成長板軟骨の両方の機能をもつ特徴的な組織である。構造的に四肢の関節軟骨や成長板軟骨が薄い軟骨膜におおわれているのに対し、下顎頭軟骨は間葉系組織でおおわれており、胎生および出生後の下顎骨の成長はこの下顎頭軟骨の表層に存在する未分化間葉系細胞が軟骨細胞に分化後、内軟骨性骨化が起こることによると考えられている。鰓弓症候群等の先天異常による小下顎症や顔面非対称、下顎骨の過成長による下顎前突症では、この特徴的な組織である下顎頭の形成不全や成長障害により、審美的のみならず咀嚼、発音、睡眠時無呼吸等、機能的にも著しい障害が発生する。下顎骨に起こる形態異常を理解するうえで、下顎骨の成長に関与する下顎頭表層の未分化間葉系細胞から下顎頭軟骨細胞への分化を分子レベルで解明することが非常に重要であるが、未だそのメカニズムは明らかとなっていない。

2. 研究の目的

下顎骨の成長に寄与している下顎頭軟骨表層の未分化間葉系細胞から軟骨細胞への分化を分子レベルで解明し、下顎頭軟骨の形成、成長、機能維持のメカニズムを究明することを目的とし、さらに、未分化間葉系細胞から軟骨細胞への分化、軟骨細胞の増殖・分化に対する Ten-m/Odz3 の役割についても検討する。

3. 研究の方法

(1) 新生仔期、成長期マウスの下顎頭軟骨、大腿骨関節軟骨、大腿骨成長板軟骨における Ten-m/Odz3 遺伝子発現の検索
生後 1 日齢、1 週齢、3 週齢の雄性 ICR マウスをジエチルエーテル全身麻酔下で 4% パラホルムアルデヒド (PFA) を用いて灌流固定を行った。下顎骨と大腿骨を摘出し、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) にて脱灰後、通法に従いパラフィン包埋した。マイクロトームを用い、

厚さ 7 μ m の連続切片を作成した。下顎頭軟骨、大腿骨関節軟骨、大腿骨成長板軟骨のそれぞれ特徴的な層構造を同定するために、連続切片を用いてヘマトキシリン-エオジン染色、トルイジンブルー染色および I 型、II 型、X 型コラーゲンの RNA プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法を行った。新生仔期および成長期で同定された各分化段階の軟骨細胞における Ten-m/Odz3 遺伝子の発現および分布を、連続切片を用いて *in situ* ハイブリダイゼーション法により検索した。プローブは Digoxigenin で標識し、ハイブリダイゼーション後の反応物の可視化は NBT/BCIP により行った。

(2) 下顎骨骨折モデルの作成

6 週齢雄 Wistar 系雄性ラットを腹腔内ペントバルビタール全身麻酔下にて右側下顎骨を経皮的に露出させ、下顎枝後縁の中央から下顎切痕にかけて骨折線を加え、下顎枝を骨折させた。下顎骨が完全に骨折していることを確認し、骨片を元の位置に戻し、切開した筋組織および皮膚を縫合した。

(3) 下顎骨骨折治癒過程における

Ten-m/Odz3 遺伝子発現の検索

右側下顎枝の骨折後、7、14 日にジエチルエーテル全身麻酔下で 4% PFA を用いて灌流固定した。右側下顎骨を摘出し、EDTA にて脱灰後、通法に従いパラフィン包埋した。マイクロトームを用い、厚さ 7 μ m の連続切片を作成した。Ten-m/Odz3、I、II、X 型コラーゲン遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法により検討した。

(4) マウス軟骨細胞前駆細胞株 ATDC5 における

Ten-m/Odz3 遺伝子発現の検索

マウス軟骨細胞前駆細胞株 ATDC5 を 2×10^4 cells/well の濃度で 24-well プレートに播種し、培養 5 日後に培養細胞がコンフルエントに達した後、軟骨への分化誘導のために Insulin-Transferrin-Selenium Supplement を添加した。培養開始後 5、8、11、14、17、20、23、26 日に細胞を回収し、RNA を抽出した。経時的に抽出した RNA から Ten-m/Odz3 と軟骨分化のマーカーである I 型、II 型、X 型コラーゲン遺伝子の発現を RT-PCR を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 下顎頭軟骨の形成過程における Ten-m/Odz3 の発現について

1 日齢、1 週齢、3 週齢マウスの下顎頭軟骨は、すべての週齢において表層に線維性組織が認められ、その下層に軟骨組織、続いて内軟骨性骨化による骨組織が存在していた。週齢を重ねるにつれ下顎頭は近遠心的幅径を増し、下顎頭に占める軟骨の割合が減少するとともに骨組織の割合が増加していた。Ten-m/Odz3 遺伝子の発現は、1 日齢マウス下

顎頭軟骨では、I型コラーゲン遺伝子を発現している線維層全域およびI型コラーゲンとII型コラーゲン遺伝子の両方を発現している増殖軟骨細胞に強く発現していた。また、II型コラーゲン遺伝子が発現していた成熟軟骨細胞ではTen-m/Odz3遺伝子の弱い発現を認めた。しかし、X型コラーゲン遺伝子が発現していた肥大軟骨細胞にはほとんどその発現を認めなかった。1週齢マウス下顎頭におけるTen-m/Odz3遺伝子の発現は、1日齢マウス下顎頭軟骨と同様に、線維層および増殖軟骨細胞層で強く認められ、成熟軟骨細胞でも認められた。しかしながら、3週齢マウス下顎頭軟骨では、Ten-m/Odz3遺伝子は、1日齢および1週齢にマウス下顎頭軟骨と異なり、線維層下部、増殖軟骨細胞層、成熟軟骨細胞層で強く発現したが、線維層の上部ではほとんど発現が認められなかった。大腿骨でも同様であった。

(2) 下顎枝骨折モデルを用いた軟骨分化過程におけるTen-m/Odz3遺伝子の発現について

骨折後7日では、骨折部周囲にII型コラーゲン遺伝子を発現する軟骨細胞が認められ、その周囲にはI型コラーゲン遺伝子を発現する凝集した間葉系細胞が認められた。Ten-m/Odz3遺伝子は、I型コラーゲン遺伝子を発現する間葉系細胞に強く発現したが、II型コラーゲン遺伝子を発現する軟骨細胞での発現は弱くなっていた。骨折後14日では、骨折治癒が進み軟骨形成部にI型コラーゲン遺伝子を発現する間葉系細胞は認められなくなり、II型コラーゲン遺伝子を発現する成熟軟骨細胞とX型コラーゲン遺伝子を発現する肥大軟骨細胞が認められた。Ten-m/Odz3遺伝子は、引き続き軟骨細胞に発現していたが、軟骨分化に伴いその発現は弱くなり、最終分化した肥大軟骨細胞にはあまり発現が認められなかった。以上より、ラット下顎枝骨折治癒過程において、Ten-m/Odz3遺伝子は軟骨細胞に分化前の凝集した間葉系細胞に強く発現し、軟骨分化と共に発現が弱くなっており、軟骨の初期分化に関与している可能性が示唆された。

(3) マウス軟骨細胞前駆細胞株ATDC5細胞を用いた軟骨細胞の分化過程におけるTen-m/Odz3遺伝子の発現について

I型コラーゲン遺伝子は、ATDC5細胞の培養5, 8, 11, 14日目に発現が認められた。II型コラーゲン遺伝子は、培養5, 8日には発現が認められなかったが、11日以降に発現していた。X型コラーゲン遺伝子の発現は、17日に認められ、それ以降、発現が増強していた。Ten-m/Odz3遺伝子の発現は、培養5, 8, 11日に強く認められた。従って、Ten-m/Odz3遺伝子は、ATDC5細胞において、I型コラーゲン遺伝子の発現と同様に未分化な細胞か

ら軟骨細胞へと分化する初期段階に発現を認めた。以上より、Ten-m/Odz3は、軟骨細胞の分化に関与し、下顎頭軟骨の初期分化の調節因子として働いている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

1. Shintaku Y, Murakami T, Yanagita T, Kawanabe N, Fukunaga T, Matsuzaki K, Uematsu S, Yoshida Y, Kamioka H, Takano-Yamamoto T, Takada K, Yamashiro T: Sox9 expression during fracture repair. Cells Tissues Organs, 2011年、印刷中、査読有
2. Murakami T, Fukunaga T, Takeshita N, Hiratsuka K, Abiko Y, Yamashiro T, Takano-Yamamoto T: Expression of Ten-m/Odz3 in the fibrous layer of mandibular condylar cartilage during postnatal growth in mice. Journal of Anatomy, 217, 236-244, 2010, 査読有
3. Fujihara C, Yamada S, Ozaki N, Takeshita N, Kawaki H, Takano-Yamamoto T, Murakami S: Role of mechanical stress-induced glutamate signaling-associated molecules in cytodifferentiation of periodontal ligament cells. J Biol Chem, 2010, 28286-28297, 2010, 査読有
4. Hashimoto T, Fukunaga T, Kuroda S, Sakai Y, Yamashiro T, Takano-Yamamoto T: Mandibular deviation and canted maxillary occlusal plane treated with miniscrews and intraoral vertical ramus osteotomy: functional and morphologic changes. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 136, 868-877, 2009, 査読有
5. Okamoto A, Ohnishi T, Bandow K, Kakimoto K, Chiba N, Maeda A, Fukunaga T, Miyawaki S, Matsuguchi T: Reduction of orthodontic tooth movement by experimentally induced periodontal inflammation in mice. Eur J Oral Sci, 117, 238-247, 2009, 査読有
6. Taira K, Iino S, Kubota T, Fukunaga T, Miyawaki S: Effects of mandibular advancement plus prohibition of lower incisor movement on mandibular growth in rats. Angle Orthod, 79, 1095-1101, 2009, 査読有
7. Sakai Y, Balam TA, Kuroda S, Tamamura N, Fukunaga T, Takigawa M,

Takano-Yamamoto T: CTGF and apoptosis in mouse osteocytes induced by tooth movement. J Dent Res, 88, 345-350, 2009, 査読有

8. Fukunaga T, Murakami T, Tanaka H, Miyawaki S, Yamashiro T, Takano-Yamamoto T: Dental and craniofacial characteristics in a patient with leprechaunism treated with IGF-I. Angle Orthod, 78, 745-751, 2008, 査読有

[学会発表] (計7件)

1. 福永智広、本城正、酒井雄一、山本照子、山城隆、成人両側性口唇口蓋裂症例の形態的、機能的改善と長期保定、第69回日本矯正歯科学会大会、2010年9月27日-29日、横浜
2. 福永智広、矯正治療における痛みに関するエビデンスについて、第5回九州矯正歯科学会学術大会、2010年1月31日、鹿児島
3. 石原嘉人、黒田晋吾、福永智広、菅原康代、山本照子、山城隆、多発性顎顔面骨折受傷に起因した顔面非対称を伴う骨格性開咬患者に外科的矯正治療を行った一症例、第68回日本矯正歯科学会大会、2009年11月16日-18日、福岡
4. 岡本敦子、飯野祥一郎、福永智広、杉原一正、宮脇正一、多数歯欠如を伴う骨格性下顎前突の1症例、第68回日本矯正歯科学会大会、2009年11月16日-18日、福岡
5. 福永智広、村上隆、玉村長都、酒井雄一、窪田健司、宮脇正一、山城隆、山本照子、ラット下顎骨骨折治癒過程におけるTen-m/0dz3の発現、第67回日本矯正歯科学会大会、2008年9月16日-18日、千葉
6. 岡本敦子、大西智和、福永智広、前田綾、宮脇正一、松口徹也、歯周炎モデルマウスにおける矯正的歯の移動度の減弱、第67回日本矯正歯科学会大会、2008年9月16日-18日、千葉
7. 竹下信郎、村上隆、福永智広、山城隆、宮脇正一、山本照子、下顎頭の軟骨細胞分化における0dz3の役割、第67回日本矯正歯科学会大会、2008年9月16日-18日、千葉

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福永 智広 (FUKUNAGA TOMOHIRO)
東北大学・病院・講師

研究者番号：70362994

(2) 研究分担者

竹下 信郎 (TAKESHITA NOBUO)
東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：50431515

(3) 連携研究者
()

研究者番号：