

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791565
 研究課題名（和文） 下顎頭発生における初期軟骨での細胞接着因子 Odz3 の機能解析
 研究課題名（英文） Roles of Odz3 in primary cartilage during mandibular condylar development
 研究代表者
 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

研究成果の概要（和文）：

下顎頭の形成を制御するメカニズムの解析は、健全な顎関節の成り立ちを知る上で重要であるが、そのメカニズムの詳細は未だ不明な点が多い。本課題では、膜貫通型糖タンパク質である Odz3 が下顎頭形成において重要な働きを担う因子であると推論し、下顎頭形成における Odz3 の機能について系統的な解析を進めてきた。これまで得られた結果から、Odz3 が下顎頭軟骨の初期分化を制御する因子であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Mandibular condyle has been speculated to develop by differentiation of fibroblast-like cells covering the condyle to chondrocytes; however, the developmental mechanisms have not been revealed. We used laser-captured microdissection and cDNA microarray analysis to obtain the genes highly expressed in fibroblast-like cells; one of these genes was Odz3. The temporal and spatial expression of Odz3 mRNA was revealed in mandibular condylar cartilage during early developmental stage in mice and ATDC5 cells, a mouse chondrogenic cell line. These findings suggest that Odz3 might act as a regulatory factor in the early developmental stage 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	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正小児系歯学

キーワード：Odz3、下顎頭、軟骨、ATDC5

1. 研究開始当初の背景

下顎頭の発生を制御するメカニズムの解析は、健全な顎関節の成り立ちを知る上で重

要であり、過去多くの報告が為されてきたが、そのメカニズムの詳細は未だ不明である。脊椎動物の種々の臓器発生の過程において、

Odz ファミリーは分化の調節やパターンニングの決定に関与する重要な因子である。本研究において、Odz3 が下顎頭の軟骨組織に発現し、下顎頭発生において重要な働きを担う因子であると仮説を立て、その発現について検索を行った。

2. 研究の目的

In vivo、in vitro における Odz3 の発現を解析し、下顎頭発生における Odz3 の役割を検討する。

3. 研究の方法

(1) 組織切片の作製と組織学的解析

1日、1週、および3週齢マウスを、4%パラホルムアルデヒドにより灌流固定した後、下顎および大腿骨が摘出された。組織は20% EDTA を用いて脱灰処理が行われた後、パラフィン中に包埋された。7 μ m の厚みで作製された組織切片は、HE 染色、トルイジンブルー染色、in situ hybridization の試料として用いられた。

(2) laser-captured microdissection (LCM) による組織の単離と RNA の精製

LCM により、1日齢マウスの切片における線維層および軟骨層が切り出された。得られた組織片から acid-guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method により RNA を抽出した。

f, 線維層
c, 軟骨層



(3) cDNA マイクロアレイ解析

マウス下顎頭の線維層、軟骨層における遺伝子発現の差異を検討するために、cDNA マイクロアレイ解析を行った。(2) で得られた RNA から cDNA を合成し、試料として用いた。

(4) in situ hybridization

1日、1週、3週齢マウスの下顎頭における Odz3、Type I collagen、Type II collagen、Type X collagen mRNA の発現を in situ hybridization により解析した。それぞれの遺伝子を検出するための RNA プローブは、ジゴキシジェニンにより標識された。

(5) 細胞培養と RT-PCR

軟骨細胞様細胞株 ATDC5 を 5% FBS 含有 D-MEM/F-12 を用いて培養し、培養開始後 5、8、11、14、17、20、23、26 日に、RNA を抽出した。RNA から cDNA を合成し、それらを鋳型として RT-PCR を行い、in vitro における Odz3、Type I collagen、Type II collagen、Type X collagen mRNA の発現を解析した。

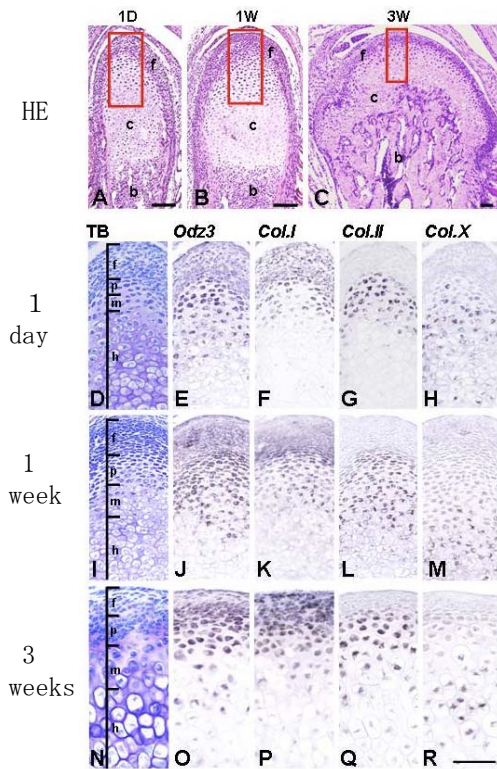
4. 研究成果

(1) マウス下顎頭軟骨における遺伝子発現プロファイル

マイクロアレイ解析により、下顎頭軟骨において、軟骨層に比べて繊維層で高い発現が認められる遺伝子を解析したところ、579 個の遺伝子が 2 倍以上高い発現を示した。それらには、転写、細胞接着、細胞内シグナリングに関与する遺伝子が含まれていた。それらの中で、Odz3 は特に高い発現が認められた。

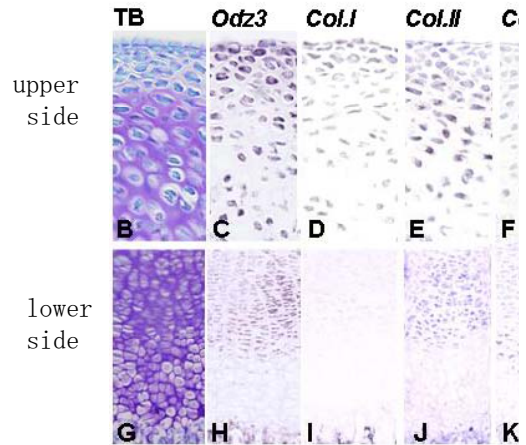
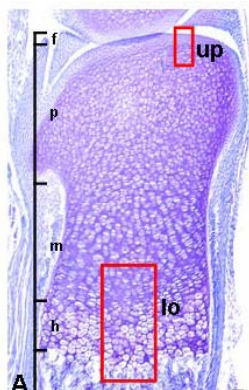
(2) 下顎頭軟骨における Odz3 の発現パターン

1日、1週、3週齢マウスの下顎頭における Odz3 と各種軟骨マーカー遺伝子の発現を in situ hybridization により解析した。Type I collagen は、未分化間葉細胞を含む線維層と増殖層において発現が認められた。Type II collagen は、増殖および成熟軟骨細胞層において発現が認められた。Type X collagen は、肥大軟骨層において強い発現が認められた。Odz3 は、Type I collagen が発現する線維層と Type II collagen が発現する増殖層において発現が認められたが、Type X collagen が発現する肥大層には発現が認められなかった。これらの遺伝子の発現様式は、1日、1週、3週齢において同様であった。



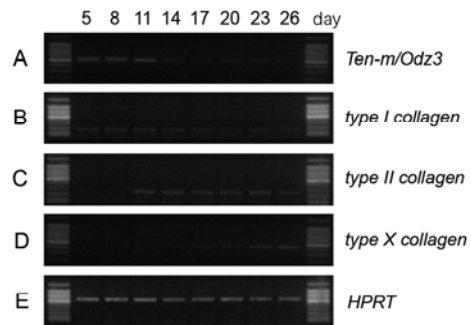
(3) 大腿骨の軟骨における Odz3 の発現パターン

1日齢マウス的大腿骨におけるOdz3の発現様式を *in situ* hybridizationにより検討した。Type I collagen は、下顎頭軟骨での発現とは異なり、線維層において弱い発現が認められた。Type II collagen は、増殖および成熟軟骨細胞層において発現が認められた。Type X collagen は、成熟及び肥大軟骨層において強い発現が認められた。Odz3 は、線維層、増殖層に強い発現が、成熟細胞層に中等度の発現が認められた。この大腿骨の軟骨における Odz3 の発現様式は、下顎頭軟骨とほぼ同様であった。



(4) 軟骨細胞様細胞株 ATDC5 における Odz3 の発現パターン

マウス由来軟骨細胞様細胞株 ATDC5 は、分化段階に応じて軟骨細胞の分化マーカーである Type I collagen、Type II collagen、Type X collagen を発現することが知られている。ATDC5 における Odz3 および軟骨細胞分化マーカー遺伝子の発現を RT-PCR により検討した。Type I collagen は培養 5 日から 11 日目に強く発現したが、以後発現レベルは減弱するものの持続的な発現が認められた。Type II collagen は、培養開始後 11 日から発現が認められ、以後持続的な発現を示した。Type X collagen は、培養 17 日目に発現が検出され、以後経時的に発現が上昇した。Odz3 は、培養 5 日から 11 日目に強く発現し、その後は低いレベルで発現が持続した。



(5) 考察

これまで行った *in vivo* および *in vitro* 実験の結果から、Odz3 の発現は Type I collagen と類似することが明らかとなり、Odz3 が軟骨の初期分化に関与していることが示唆された。

本研究により得られた成果は、現在国際誌

に投稿中である。

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1件)

① Williams JA, Kondo N, Okabe T, Takeshita N, Pilchak DM, Koyama E, Ochiai T, Jensen D, Chu ML, Kane MA, Napoli JL, Enomoto-Iwamoto M, Ghyselinck N, Chambon P, Pacifici M, Iwamoto M, Retinoic acid receptors are required for skeletal growth, matrix homeostasis and growth plate function in postnatal mouse., Dev Biol., 査読有, 328, 2009, 315-327

[学会発表] (計2件)

- ① Murakami T, Fukunaga T, Takeshita N, Hiratsuka K, Yamashiro T, Abiko Y, Takano-Yamamoto T, Novel roles of Ten-m/Odz3 in development of mandibular condylar cartilage, 86th General Session & Exhibition of the IADR, 2008.7.2, Tronto Canada
- ② 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Odz3の役割, 第67回日本矯正歯科学会, 2008年9月16日, 千葉

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし: