

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：11301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23792411
 研究課題名（和文） 内軟骨性骨化と下顎頭軟骨のメカニカルストレス応答における Odz3 の機能解析
 研究課題名（英文） Evaluation of Odz3 function in endochondral ossification and response of mandibular condylar cartilage to mechanical stress.
 研究代表者
 竹下 信郎（NOBUO TAKESHITA）
 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）：脊椎動物の骨格のほとんどは内軟骨性骨化によって形成されるが、その分子制御機構の全容は未だ明らかではない。本研究では、Odz3が内軟骨性骨化を制御する因子であると推論し、その発現と機能の解析を軟骨細胞様細胞株ATDC5を用いて行った。その結果、軟骨細胞分化の充進に伴い、Odz3発現は減少した。また、Odz3の発現をノックダウンしたところ、Sox9の発現が充進した。これらの結果から、Odz3は軟骨細胞の分化を抑制的に制御する機能を有することが示唆される。

研究成果の概要（英文）：Most of vertebrate bones are formed by endochondral ossification. However, its molecular mechanisms are not fully understood. In this study, we examined expression and function of Odz3 in ATDC5 to elucidate the roles of Odz3 in endochondral ossification. As a result, expression of Odz3 was down-regulated during chondrogenic differentiation of ATDC5. In addition, expression of Sox9 was induced by knockdown of Odz3. These results suggest that Odz3 inhibitory regulates chondrogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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、内軟骨性骨化、ATDC5

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の骨格のほとんどは、内軟骨性骨化によって形成される。すなわち、間葉系細胞の凝集塊が軟骨へと分化した後骨に置換され、骨格は形成される。内軟骨性骨化における正常な軟骨分化は、促進的および抑制的な分子制御機構が最適なバランスを保つことにより達成される。促進的制御因子とし

ては、軟骨分化に必須の転写因子である Sox9 やその下流の Sox5、6 をはじめとする多種の因子が知られているが、抑制的制御因子としては AP-2 α など限られた因子が報告されるに止まっている。

骨格形成は、種々の液性因子によって制御されるとともに、メカニカルストレスの影響を受けることが知られている。下顎頭のメカニカルストレス応答に関する分子生物学的

解析により、メカニカルストレスにより下顎頭軟骨の初期肥大軟骨層で Sox9 の発現が減少すること (Papadopoulou et al, 2007, FEBS Lett) や、下顎頭軟骨におけるメカニカルストレスの応答を vimentin や RKIP が制御すること (Huang et al, J Cell Physiol, 2010) が報告されている。しかしながら、その制御機構の全容は未だ十分に明らかとなっていない。

膜貫通型タンパク質 Odz ファミリーは、細胞間結合、細胞骨格の形成、および転写因子の機能を有し、また神経の発生、分化を促す。これまで、Odz3 は下顎頭および長管骨の軟骨と軟骨細胞様細胞株 ATDC5 において発現すること、また Odz3 のノックアウトマウスにおいて骨格異常が認められることから、軟骨分化および内軟骨性骨化への関わりが示唆されるものの、軟骨分化における Odz3 の機能の詳細は未だ明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、Odz3 が軟骨分化を抑制的に制御することによって正常な内軟骨性骨化に寄与する因子であると推論した。また下顎頭において Odz3 と CTGF が類似した発現パターンを示すことから、両者が相互関係を持ちながら下顎頭軟骨の分化やメカニカルストレス応答を制御するのみならず、CTGF の軟骨再生能を Odz3 が修飾することを推論した。そこで本研究では、Odz3 の発現や機能を人為的に制御することによる効果的な骨・軟骨疾患の治療法開発を見据えた基礎研究として、内軟骨性骨化とメカニカルストレス応答に関わることが知られる CTGF との相互関係に着目し、Odz3 の発現と機能および分子生物学的な作用機序の解明を目的として、マウス由来軟骨細胞様細胞株 ATDC5 を用いた *in vitro* における系統的な解析を行った。

3. 研究の方法

(1) マウス由来軟骨細胞様細胞株 ATDC5 における Odz3 発現パターンの解析

マウス由来軟骨細胞様細胞株 ATDC5 を insulin、transferrin、sodium selenite が

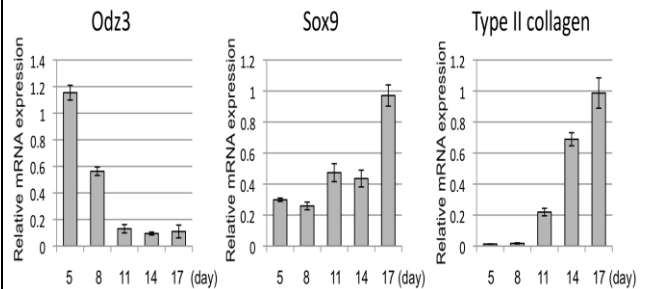
添加された分化誘導培地を用いて培養し、軟骨細胞分化を促した。3 日ごとに ATDC5 からトータル RNA を精製し、それらを鋳型に cDNA を合成した。得られた cDNA を、リアルタイム PCR の試料として用いて、Odz3 と軟骨細胞の分化マーカーとして知られる Sox9 および II 型コラーゲンの発現パターンを比較検討した。

(2) マウス由来軟骨細胞様細胞株 ATDC5 における Odz3 の発現抑制が軟骨細胞分化におよぼす影響の解析

マウス Odz3 の siRNA をマウス由来軟骨細胞様細胞株 ATDC5 に試薬を用いて遺伝子導入した。それらの細胞からトータル RNA を精製し、それらを鋳型に cDNA を合成した。得られた cDNA を、リアルタイム PCR の試料として用いて、Odz3 と軟骨細胞の分化マーカーとして知られる Sox9 および II 型コラーゲンの発現パターンを解析した。

4. 研究成果

(1) ATDC5 における Odz3 発現パターンの解析

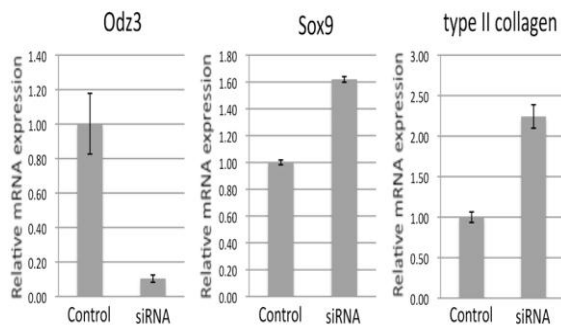


マウス由来軟骨細胞様細胞株 ATDC5 において、Odz3 は培養初期に高い発現を示したが、その発現は経時的に減少し、培養 11 日目以降は、ほぼ同じレベルの低い発現を示した。一方、軟骨細胞の初期分化を促すことが知られる転写因子 Sox9 の遺伝子発現は、培養初期に発現が認められ、それらの発現は経時的に増加し、培養 17 日目には 5 日目と比べて約 3 倍の発現の増加を示した。また、軟骨細胞が産生する細胞外基質である II 型コラーゲンの遺伝子発現は、培養初期にはほとんど

発現は認められなかったが、11日目以降発現の上昇が認められ、以後経時的に発現が増加した。

以上の結果から、Odz3は軟骨分化の亢進に伴い発現が減少することが明らかとなった。このことから、Odz3が初期の軟骨細胞分化を制御する機能を有することが示唆された。

(2) ATDC5におけるOdz3の発現抑制が軟骨細胞分化におよぼす影響の解析



Odz3 siRNAをATDC5細胞に遺伝子導入した後、Odz3の遺伝子発現を解析した結果、Odz3の顕著な発現の減少が認められた。このことから、本実験系においてsiRNAによるOdz3発現の抑制が達成されたことが示された。さらに、Odz3の発現がノックダウンされたATDC5細胞におけるSox9とII型コラーゲンの遺伝子発現をリアルタイムPCRにより解析した結果、いずれの因子もOdz3のノックダウンにより、有意なmRNA発現の上昇を示した。

これらの結果から、Odz3は軟骨細胞分化を抑制的に制御する役割を担うことが示唆された。

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2件)

1. Takeshita N, Ishida H, Hashimoto T, Daimaruya T, Hasegawa M, Takano-Yamamoto T. Improvement of asymmetric stomatognathic functions, unilateral crossbite, and facial

esthetics in a skeletal Class III case with mandibular asymmetry treated by orthognathic surgery, *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 査読有, 2013, in press.

2. Takeshita N, Takahashi I, Mori S, Aonuma T, Goto S, Takahashi T, Takano-Yamamoto T. Interdisciplinary approach including orthodontic treatment with skeletal anchorage and autotransplantation for an adult patient with periodontitis, *Tohoku University Dental Journal*, 査読有, 31, 2012, 79-86.

[学会発表] (計3件)

1. 竹下信郎, 長谷川正和, 佐々木紀代, 関大輔, 宮島悠旗, 宮下俊郎, 山本照子. 頭蓋縫合におけるメカニカルストレス初期応答としてのCTGFとVEGFの発現, 第13回運動器科学研究会, 2012年09月14日-15日, 京都
2. 黒木毅, 竹下信郎, 高橋一郎, 山本照子. 外科的矯正歯科治療を適応した顔面非対称症例-口腔顔面形態と顎口腔機能の総括的評価-, 第71回日本矯正歯科学会大会, 2012年9月26-28日, 盛岡
3. 竹下信郎, 渡辺壽子, 橋本隆志, 山本照子. 外科的矯正歯科治療により形態および顎機能の改善が認められた骨格性III級の下顎偏位症例, 第70回日本矯正歯科学会大会, 2011年10月17-20日, 名古屋

[図書] (計1件)

1. Takeshita N, Murakami T, Fukunaga T, Hiratsuka K, Abiko Y, Yamashiro T, Takano-Yamamoto T. Expression of Ten-m/Odz3 in the fibrous layer of mandibular concylar cartilage and the

early stage of chondrogenic differentiation of ATDC5 cells, Interface Oral Health Science 2011, Springer, 2012, 102-103.

研究者番号：

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹下 信郎 (NOBUO TAKESHITA)

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()