

## 論文要旨等報告書

氏名	村上隆
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3361 号
学位授与の日付	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	医歯学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	マウス下顎頭軟骨の分化段階におけるTen-m/Odz3の遺伝子発現

論文審査委員 教授 山城 隆 助教授 久保田聡 教授 窪木 拓男

### 学位論文内容の要旨

#### 【序言】

1994年、ショウジョウバエにおけるペアルール遺伝子として Ten-m/Odz が同定された。これまでに4種の遺伝子ファミリーが同定されているが、未だ機能は不明である。脊椎動物において、Ten-m/Odz 遺伝子は主に胎生期中枢神経系で発現している。一方、下顎頭軟骨は咀嚼など複雑な運動に対応しているだけでなく下顎骨の成長にも関与しており、長管骨の関節軟骨と成長板軟骨両方の機能を持つ特徴的な組織である。下顎骨は表層に存在する未分化な間葉系細胞が軟骨細胞に分化後、内軟骨性骨化により成長すると考えられている。これまで主に神経系組織での発現や機能が考えられていた因子が、骨・軟骨において増殖・分化に関与を示すことが多く報告されている。そこで本研究ではレーザーマイクロダイゼクション法を応用し、下顎頭軟骨の線維層と軟骨層における Ten-m/Odz3 遺伝子の発現量の比較検討を行った。さらに in situ ハイブリダイゼーションにより、下顎頭軟骨における Ten-m/Odz3 遺伝子の発現細胞を検索した。

#### 【材料および方法】

1. 組織切片作成および組織学的観察：1日、1週、3週および6週齢マウス下顎頭軟骨を用い、ヘマトキシリン-エオジン染色ならびにトルイジンブルー染色を行い、これを光学顕微鏡下にて観察した。
2. RNA 抽出：1日齢マウス下顎頭軟骨を用いて凍結切片を作成し、トルイジンブルー染色を行った。これをレーザーマイクロダイゼクションを用い、線維層と軟骨層とに切り分け、それぞれ RNA 抽出を行った。
3. RT-PCR：線維層および軟骨層からそれぞれ抽出した RNA を用いて、Ten-m/Odz3 および G3PDH プライマーを用いて RT-PCR を行い、下顎頭軟骨の2つの層における Ten-m/Odz3 遺伝子の発現量を比較検討した。
4. プロブ作成：DIG 標識された Ten-m/Odz3, I 型, II 型, X 型コラーゲン遺伝子の in situ ハイブリダイゼーション用 RNA プロブを作成した。

5. In situ ハイブリダイゼーション：1日, 1週, 3週および6週齢マウス下顎頭軟骨の連続切片を用いて in situ ハイブリダイゼーションを行い, 光学顕微鏡下で観察した。

#### 【結果】

1. レーザーマイクロダイゼクション及び RT-PCR：1日齢マウス下顎頭軟骨において Ten-m/Odz3 遺伝子の発現を認めた。さらにレーザーマイクロダイゼクションを応用し, 線維層と軟骨層それぞれの層における Ten-m/Odz3 遺伝子の発現比を比較したところ, 線維層に 1.5 倍多く発現を認めた。

2. 下顎頭軟骨の組織学的観察：1日, 1週, 3週および6週齢マウス下顎頭軟骨すべての週齢において表層に線維性組織が認められ, その下層にトルイジンブルー異染色性を示す軟骨組織, 軟骨細胞層の下には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て下顎頭に占める下顎頭軟骨の割合が減少するとともに内軟骨性骨化による骨組織の割合が増加していた。

3. in situ ハイブリダイゼーション：1日齢マウス下顎頭軟骨においては, I型コラーゲン遺伝子は未分化間葉系細胞を含む線維層全域に発現し, 増殖軟骨細胞層にも発現していた。II型コラーゲン遺伝子は増殖軟骨細胞層および成熟軟骨細胞層特異的に発現を認めた。X型コラーゲン遺伝子は肥大軟骨細胞層に強く発現し, 成熟軟骨細胞層にも発現を認めた。Ten-m/Odz3 遺伝子は, 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型コラーゲン遺伝子とII型コラーゲン遺伝子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強く発現し, X型コラーゲン遺伝子も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を発現する肥大軟骨細胞ではほとんどその発現を認めなかった。1週齢マウス下顎頭軟骨においては, X型コラーゲン遺伝子は1日齢に比べ下顎頭軟骨に占める発現領域の割合が減少し, 肥大軟骨細胞特異的に発現を認め, 増殖軟骨細胞ではほとんど発現を認めなかった。Ten-m/Odz3 遺伝子は1日齢と同様, I型およびII型コラーゲン遺伝子と共発現した。3週齢および6週齢マウス下顎頭軟骨では, Ten-m/Odz3 遺伝子はI型コラーゲン遺伝子を発現している線維層の内, 表層に近い部分を除く下部に限局して発現するようになり, I型コラーゲン遺伝子とII型コラーゲン遺伝子を発現している増殖軟骨細胞層で強く発現を認めるようになった。そして, II型コラーゲン遺伝子を強く発現している成熟軟骨細胞層では弱い発現になり, X型コラーゲン遺伝子を発現している肥大軟骨細胞層ではほとんど発現を認めなかった。

#### 【考察および結論】

Ten-m/Odz3 がマウス下顎頭軟骨において発現を示すことが確認された。さらに, Ten-m/Odz3 がマウス下顎頭軟骨において軟骨細胞の初期分化段階にある未分化間葉系細胞および増殖軟骨細胞において発現し, 最終分化段階にある肥大軟骨細胞では発現をほとんど認めなかったことより, Ten-m/Odz3 のマウス下顎頭軟骨における初期分化および軟骨細胞増殖への関与が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

ショウジョウバエのペアルール遺伝子として知られている *Ten-m/Odz* 遺伝子は、さまざまな種において胎生期中枢神経系に発現する。この *Ten-m/Odz* 遺伝子ファミリーのうち *Ten-m/Odz3* 遺伝子が、中枢神経系以外においても脊索や肢芽で発現することが報告されている。一方、下顎頭軟骨は長管骨の関節軟骨と成長板軟骨の両方の機能を併せ持つ特徴的な軟骨組織であり、外表層に存在する未分化間葉系細胞が軟骨細胞へと分化する過程を容易に観察することができる。この下顎頭軟骨の形成および分化の過程には、多くの分子が関与しているが、この *Ten-m/Odz* 遺伝子の発現は今まで検討がなされてこなかった。そこで、本研究では、*Ten-m/Odz3* 遺伝子が下顎頭軟骨の未分化間葉系細胞から軟骨細胞への分化に関与する可能性が検討された。まず、*Ten-m/Odz3* 遺伝子の下顎頭軟骨における発現が、レーザーマイクロディセクション法および RT-PCR 法を用いて検証された。さらに、様々な成長段階にある生後1日齢、1週齢、3週齢のマウス下顎頭軟骨において、軟骨分化過程にある未分化間葉系細胞、増殖軟骨細胞、成熟軟骨細胞、肥大軟骨細胞の局在が、I型、II型、X型コラーゲン遺伝子をマーカーとして同定され、これらの細胞群における *Ten-m/Odz3* 遺伝子の発現が *in situ* ハイブリダイゼーションにより検索された。

その結果、*Ten-m/Odz3* 遺伝子がマウス下顎頭軟骨において発現すること、特に軟骨細胞の初期分化段階にある未分化間葉系細胞および増殖軟骨細胞において発現し、最終分化段階にある肥大軟骨細胞では発現をほとんど認めないことが見出された。このことから、今後の機能解析を待たねばならないが、*Ten-m/Odz3* 遺伝子がマウス下顎頭軟骨における軟骨細胞の初期分化および増殖へ関与する可能性が示唆されたと考える。

よって、本研究は下顎頭軟骨において初めて *Ten-m/Odz3* 遺伝子の発現を確認したという点において多大な新規性がある。また、本研究は軟骨分化に対する未知の新しい知見を知らしめる可能性のある新規性の高い基礎的研究であることが高く評価され、本論文審査委員会は、全会一致で、本学位申請論文が博士(歯学)の学位を授与されるに値する論文であると認めた。