

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10178

研究課題名(和文) miRNAが支配する骨・軟骨分化方向決定メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of miRNA-regulated mechanisms determining the direction of bone and cartilage differentiation

研究代表者

伏見 滋子 (Shigeko, Fushimi)

岡山大学・歯学部・博士研究員

研究者番号：10850563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウスを用いたシームレスな骨・軟骨形成を行うことができる実験モデルを使用し、miR-140が、Wnt, TGF-, BMPの発現を通して、特定の条件下で骨芽細胞分化と、骨と軟骨の分化の切り替えに関与していることを示した。とくに細胞分化のスイッチに大きな役割を果たしているのが、スカフォールドの形状であることを明らかにした。骨・軟骨形成実験で使用しているスカフォールドの形態が細胞分化に影響を及ぼしており、特定の細胞分化に関連する遺伝子発現を誘導することを確認した。スカフォールドの形状は骨・軟骨を主体とする硬組織のみならず骨髄の形成誘導にも大きく関与することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は細胞の分化スイッチにmicroRNAの発現が関与することを示し、そのメカニズムを明らかにして骨や軟骨の選択的分化誘導や、様々な骨組織を意図的に作製することである。特殊な骨・軟骨形成モデルを使う点も他の研究とは一線を画している。硬組織の再生医療の領域では培養細胞の移植、サイトカインによる局所組織誘導が主体であるが、ここにmiRNAの応用と、特殊な形状のスカフォールドの応用は他に類がなく独創的な研究成果である。分子生物学的観点から臨床応用に道を開くものである。また、本研究により骨・軟骨疾患に苦しむ多くの患者に多大な恩恵となりうる可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Throughout the study period, using an experimental model of seamless bone and cartilage formation in mice, we showed that miR-140 is involved in the switch between osteoblast differentiation and bone and cartilage differentiation under certain conditions through the expression of Wnt, TGF-, and BMP. In particular, we showed that the scaffold shape plays a major role in the switch of cell differentiation. We confirmed that the morphology of the scaffold used in bone and cartilage formation experiments influences cell differentiation and induces gene expression related to specific cell differentiation. The shape of the scaffold was found to play a significant role in the induction of bone marrow formation as well as hard tissues, mainly bone and cartilage. In addition, bone marrow tissue formed within bone tissue was determined histologically and immunohistologically.

研究分野：口腔病理学

キーワード：硬組織 軟骨組織 再生 TCP

1. 研究開始当初の背景

骨芽細胞分化には、Wnt、TGF- β 、BMP、Ihh など多くのサイトカインやホルモンが関与し、これらの因子はそれぞれのシグナル伝達経路を介して細胞分化を制御している。その中で、Wnt/ β -catenin シグナルは骨芽細胞の増殖と分化に必須であり、多面的な作用をすることが知られている。特に Wnt3a は強い骨芽細胞分化活性を有するとされている。一方、近年の研究では遺伝子の発現は転写だけでなく、miRNA によっても制御されることが明らかになっている。miRNA は約 22 塩基からなる 1 本鎖の non-coding RNA で、標的となる遺伝子 mRNA の 3' UTR 領域に結合して遺伝子発現を負に制御し、細胞の発生、分化、増殖の調節に関与している。骨・軟骨細胞分化との関連では、miR-140 が軟骨細胞特異的に発現すること、転写因子 Sox9 によって発現され、内軟骨性骨化を調節することが報告されている。申請者は、骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞において miR-140-3p の標的遺伝子の 1 つが TGF- β 3 であることを明らかにしている。さらに、miR-140-3p の発現上昇は、TGF- β 3 発現抑制を介して Osteocalcin の発現を亢進することも明らかにしている (Fushimi S et al, GenesCells. 2018)。骨芽細胞分化と軟骨細胞分化の双方に影響する miRNA は他に報告が無く、申請者は *in vitro* の条件下、実際の生体内においても、miR-140 を介した骨細胞の分化調節が行われ、これらが骨・軟骨分化の切り替えに関与しているとの仮説を立てた。現在、日本国内に変形性関節症等、関節軟骨の障害を伴う患者は数百万人いるとされる。進行すると関節運動障害が生じ患者の QOL は著しく低下する。高齢化社会に伴って患者は増加しつつあり、新規治療法の開発は急務である。骨誘導性サイトカインの局所投与による再生治療では、生体内に骨や軟骨を形成するが関節などの機能的構造を作るための効果的な作り分けが課題となっている。miR-140 を介した骨・軟骨細胞の分化調節調整が可能であればこれを再生治療に用いることができるのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

申請者が発見した miR-140 による骨細胞分化調整機構が実際の生体内で機能していることを確認することを第一の目的とする。この際、特定の場所にシームレスに骨と軟骨を連続的に形成する骨誘導実験モデルを用いて細胞分化過程を検討する。この特殊な骨軟骨誘導モデルを用いることで細胞分化の切り替わりとそれに付随する miR-140 とその関連因子の消長を検討する。本実験系を用いた miR-140 の機能解析は申請者ら独自のもので他に類がない。現在、miRNA をターゲットにした治療としてはおもに癌遺伝子の抑制などを主体としたものがある。再生医学の領域で細胞分化のコントロールに miR-140 を用いるアイデアは存在していない。本研究により miR-140 の骨細胞の分化調節機能が明らかになり、骨と軟骨の選択的な分化誘導に用いることができれば、骨・軟骨再生医療の分野で画期的な成果となり得る。現在関節障害で苦しむ多くの患者の治療に応用できると考えた。

3. 研究の方法

本申請課題では、miR-140 による骨・軟骨細胞分化調整機構が生体内で機能していることを確認することを目的として、マウス組織内に誘導した骨・軟骨組織に対して細胞分化の切り替わりとそれに付随する miR-140 とその関連因子の消長を免疫組織化学的、および遺伝子組織化学的に検討すること、および miR-140 を用いた骨・軟骨疾患の治療に応用可能な新規軟骨再生法の可能性を検討する。具体的には以下の 3 つの実験計画を設定した。

1. マウスを用いたシームレスな骨・軟形成モデルの作製

申請者らはこれまでの研究でウサギ組織内に BMP とハニカム TCP で作成した特殊な環境下において骨組織と軟骨組織をシームレスに連続した状態で誘導することに成功している (シームレス骨・軟骨分化誘導モデル)。この実験系を元に同様の組織をマウスを使って再現する。様々な孔径を有するハニカム TCP をマウスの結合組織内へ埋入し、シームレスな骨・軟骨組織誘導に最適なハニカム TCP の孔径を決定する。同時に、各種成長因子の種類・濃度の選定も行う。孔径 75, 300, 500, 1600 μ m の 4 種類のハニカム TCP に、骨組織誘導因子である BMP-2 を 10, 20, 40, 80 μ g/ml を含浸させ、マウス頭蓋骨骨膜下およびマウス筋組織内に埋入し、骨組織と軟骨組織がシームレスに形成される条件を決定する。

2. シームレス骨・軟骨誘導組織を用いた miR-140 および関連分化因子の発現の検討
マウス組織内に誘導したシームレスな骨・軟骨組織を用いて、未分化な状態から成熟した骨、軟骨へと分化する過程の組織上で miR-140 と骨軟骨関連分化因子 (Wnt, TGF- β , Runx2, Osterix, Sox9, Osteocalcin, ALP) の発現状況を確認し、未分化な細胞が骨と軟骨へ分化する過程での作用を組織細胞化学的、免疫組織化学的に検討する。分子病理学的観点から解析を行い、miR-140 がコントロールする骨・軟骨組織誘導メカニズムについて明らかにする。

3 . miR-140 による細胞分化調節の検討

上述の骨・軟骨誘導実験系を用いて局所に miR-140 を直接投入、もしくは miR-140 の発現を誘導する Wnt3a およびそのアンタゴニストを作用させて選択的な骨軟骨組織誘導実験を行う。これにより、組織レベルで骨分化調節機構に miR-140 を介した介入が可能であることを検証する。

4 . 研究成果

本研究の目的は細胞の分化スイッチに microRNA の発現が関与することを示し、そのメカニズムを明らかにして骨や軟骨の選択的分化誘導や、様々な骨組織を意図的に作製することである。研究期間を通じて、マウスを用いたシームレスな骨・軟骨形成を行うことができる実験モデルを使用して、miR-140 が、Wnt , TGF- , BMP の発現を通して、特定の条件下で骨芽細胞分化と、骨と軟骨の分化の切り替えに関与していることを示した。

上記に関連して、とくに細胞分化のスイッチに大きな役割を果たしているのが、スカフォールドの形状であることを明らかにした。研究期間中、様々な形状のスカフォールドを用いて細胞の分化方向の決定に関与する細胞の動態と分化状態の検討を行った。最終年度は、骨形成、軟骨形成の細部について、骨・軟骨分化における各種分化因子や細胞特異的マーカーを使用し、これら細胞の動態について組織学的に検討を行った。ハニカム CTP は孔径の異なる種類を用い、濃度の異なる BMP-2 を含浸させ同所性および異所性に結合組織内へ埋入し、骨・軟骨誘導をおこなった。最終年度では骨・軟骨形成実験で使用しているスカフォールドの形態が細胞分化に影響を及ぼしており、特定の細胞分化に関連する遺伝子発現を誘導することを確認した。スカフォールドの形状は骨・軟骨を主体とする硬組織のみならず骨髄の形成誘導にも大きく関与することが判明した。最終年度では骨髄を含めた完全な骨軟骨組織の形成について実施し、このような骨を形成するスカフォールドの構造についてあらたな知見を得た。また、骨組織内に形成される骨髄組織を組織学的、免疫組織学的に確定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Maria F Moreno Garcia, Alfredo Martin, Shigeko Fushimi, Sara Feldman, Nina F Pastorino, Jorge N Juarez, Maria V Jammal and Lilitiana R Missana	4. 巻 31
2. 論文標題 Optimization for Bone Samples Embedded in Methyl Methacrylate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 181 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2485/jhtb.31.181	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Maria Cecilia Socci, Gabriela Rodriguez, Emilia Oliva, Shigeko Fushimi, Kiyofumi Takabatake, Hitoshi Nagatsuka, Carmelo Jose Felice, Andrea Paola Rodriguez	4. 巻 10
2. 論文標題 Polymeric Materials, Advances and Applications in Tissue Engineering: A Review	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioengineering	6. 最初と最後の頁 218 ~ 218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/bioengineering10020218	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Shan Qiusheng, Takabatake Kiyofumi, Kawai Hotaka, Oo May, Inada Yasunori, Sukegawa Shintaro, Fushimi Shigeko, Nakano Keisuke, Nagatsuka Hitoshi	4. 巻 47
2. 論文標題 Significance of cancer stroma for bone destruction in oral squamous cell carcinoma using different cancer stroma subtypes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2022.8292	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kawai Hotaka, Oo May Wathone, Takabatake Kiyofumi, Tosa Ikue, Soe Yamin, Eain Htoo Shwe, Sanou Sho, Fushimi Shigeko, Sukegawa Shintaro, Nakano Keisuke, Takeshi Takarada, Nagatsuka Hitoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Enzyme Cleaved Bone Marrow Transplantation Improves the Engraftment of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JBMR Plus	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm4.10722	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takabatake Kiyofumi, Tsujigiwa Hidetsugu, Yoshida Aki, Furumatsu Takayuki, Kawai Hotaka, Oo May Wathone, Nakano Keisuke, Nagatsuka Hitoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 A Pilot Study of Seamless Regeneration of Bone and Cartilage in Knee Joint Regeneration Using Honeycomb TCP	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 7225 ~ 7225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma14237225	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takabatake Kiyofumi, Matsubara Masakazu, Yamachika Eiki, Fujita Yuki, Arimura Yuki, Nakatsuji Kazuki, Nakano Keisuke, Nagatsuka Hitoshi, Iida Seiji	4. 巻 22
2. 論文標題 Comparing the Osteogenic Potential and Bone Regeneration Capacities of Dedifferentiated Fat Cells and Adipose-Derived Stem Cells In Vitro and In Vivo: Application of DFAT Cells Isolated by a Mesh Method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12392 ~ 12392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222212392	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takabatake Kiyofumi, Nakano Keisuke, Kawai Hotaka, Inada Yasunori, Sukegawa Shintaro, Qiusheng Shan, Fushimi Shigeko, Tsujigiwa Hidetsugu, Nagatsuka Hitoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Preparation of Absorption-Resistant Hard Tissue Using Dental Pulp-Derived Cells and Honeycomb Tricalcium Phosphate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 3409 ~ 3409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma14123409	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Toshiyuki, Takabatake Kiyofumi, Tsujigiwa Hidetsugu, Watanabe Satoko, Nakagiri Ryoko, Nakano Keisuke, Nagatsuka Hitoshi, Kimata Yoshihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Effect of Honeycomb -TCP Geometrical Structure on Bone Tissue Regeneration in Skull Defect	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 4761 ~ 4761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma13214761	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takabatake Kiyofumi, Tsujigiwa Hidetsugu, Nakano Keisuke, Inada Yasunori, Qiusheng Shan, Kawai Hotaka, Sukegawa Shintaro, Fushimi Shigeko, Nagatsuka Hitoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Geometrical Structure of Honeycomb TCP to Control Dental Pulp-Derived Cell Differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 5155 ~ 5155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma13225155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 稲田靖則, 高島清文, 藤井昌江, PiaoTianyan, ChangAngi, 河合穂高, 中野敬介, 長塚 仁
2. 発表標題 エナメル上皮腫開窓術における HIF-1 を介した腫瘍縮小メカニズムの解明
3. 学会等名 第30回硬組織再生生物学会学術大会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲田靖則, 武部祐一郎, 高島清文, 河合穂高, 中野敬介, 長塚 仁
2. 発表標題 エナメル上皮腫が分泌するCCN2による腫瘍間質を介した顎骨吸収メカニズムの検討
3. 学会等名 第13回日本 CCN ファミリー研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲田靖則, 高島清文, 辻極秀次, 河合穂高, 中野敬介, 長塚 仁
2. 発表標題 新規生体材料ハニカム TCP を用いた細胞外微小環境再現による象牙質再生
3. 学会等名 第29回硬組織再生生物学会学術大会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲田靖則、高島清文、辻極秀次、河合穂高、中野敬介、長塚仁
2. 発表標題 新規生体材料の幾何学的構造制御による象牙質再生
3. 学会等名 第42回岡山歯学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rina Muraoka, Keisuke Nakano, Yoshimi Kawahara, Toru Kageyama, Kazuhiro Yamada, Norimasa Okafuji
2. 発表標題 HSP70 act as a molecular chaperone in the periodontal ligaments remodeling due to orthodontic force
3. 学会等名 The 9th International Orthodontic Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中野 敬介 (Keisuke Nakano) (10325095)	岡山大学・医歯薬学域・准教授 (15301)	
研究分担者	河合 穂高 (Hotaka Kawai) (10803687)	岡山大学・医歯薬学域・研究准教授 (15301)	
研究分担者	長塚 仁 (Hitoshi Nagatsuka) (70237535)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	辻極 秀次 (Hidetsugu Tsujigiwa) (70335628)	岡山理科大学・理学部・教授 (35302)	
研究分担者	高畠 清文 (Kiyofumi Takabatake) (70736537)	岡山大学・医歯薬学域・助教 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関