

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10207

研究課題名(和文) Mechanosensitive microRNAによる下顎骨成長制御メカニズム

研究課題名(英文) Mechanisms of growth of mandibular condylar cartilage by mechanosensitive microRNA

研究代表者

高橋 一郎 (Takahashi, Ichiro)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：70241643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：下顎頭軟骨細胞の分化過程におけるmechanosensitive miRNAの働きを解明することを目的として研究を行った。スクリーニングにより5つの候補 miRNA を特定した。下顎頭軟骨細胞と軟骨細胞株 ATDC5 を用いて発現解析を行い、胎生期の下顎頭軟骨に高発現を示す miR-134 を細胞培養系に添加して検討した。下顎頭軟骨原器由来間葉系幹細胞ならびに ATDC5に miR-134 mimicを導入した場合、細胞の遊走、細胞増殖ならびに軟骨細胞分化が低下することが示唆された。軟骨細胞の機械的刺激により発現する miR-134 が軟骨細胞の分化抑制に寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、近年研究が進んでいる microRNA の機能解析を主な目的としているが、特に下顎頭軟骨におけるこうした分子の機能解析については、我々のグループが世界で先駆けて開始し、研究を進めている。また、歯科領域では、顎関節症が歯科の三大疾患の1つと言われ、多くの患者が苦しんでいるが、根本的な治療法は開発されていない。我々は、今回のような研究を通して、まず、分子レベルの基盤的研究を通して種々の可能性を探りながら、将来的にはそうした領域における治療法開発に貢献して行きたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study is to clarify the function of mechanosensitive microRNA (miRNA) during chondrogenesis derived from mandibular condyle. Firstly, 5 miRNAs were specified by screening. By using chondrocytes derived from mandibular condylar cartilage (MCC) and cartilaginous cell line, ATDC5 cells, we analyzed the expression patterns of miR-134, which is one of the specified miRNA. miR-134 was highly expressed in embryonic MCC. We transfected miR-134 to investigate the function of miR-134 during chondrogenesis in MCC derived stem cells and ATDC5 cells. We have found that miR-134 inhibited the proliferation, differentiation and migration of chondrogenic cells derived from MCC and ATDC5 in culture.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：mechanosensitive miRNA 下顎頭軟骨 軟骨細胞分化 顎顔面の成長発育 軟骨内骨形成

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 我々の研究グループでは長年にわたって下顎頭軟骨の細胞の機械的刺激応答について研究を続けてきた。当初は動物実験等を行っていたが、近年は器官培養や細胞培養技術、あるいは遺伝子導入技術なども採用して多面的に研究をすすめている。下顎頭軟骨はとの関節軟骨とは異なる二次軟骨として知られ、その細胞分化や基質代謝のメカニズムに特徴が認められることも知られる。こうしたことに着目して研究を進めてきた。

(2) 特に最近10年は、microRNAの機能に注目し、胎生期の未分化間葉系細胞からの細胞分化に伴う下顎頭軟骨の形態形成や、機械的刺激応答におけるmiRNAの機能について研究を継続している。

(3) 下顎頭軟骨は顎関節を構成する最も重要な構造体として、下顎の成長発育や顎関節症による破壊など、そのメカニズムが十分に解明されていないことが多く、特に歯科領域では臨床的な対応を十分に行うことができない状況が続いている。

## 2. 研究の目的

上述のような背景から、下顎頭軟骨細胞の分化および下顎頭軟骨の成長発育過程におけるメカニカルストレス応答性のmiRNAとしてmechanosensitive miRNAの働きを解明することを目的として研究を行った。本研究では機械的刺激応答に重要な役割を果たしていると考えられるmicroRNAを同定し、その機能を分子生物学的に検討することを目的として研究を進めることとした。こうした研究を進めることにより、下顎骨の成長発育に対する下顎頭軟骨の果たす役割とその制御機構を解明するとともに、この領域におけるトランスレーショナルサイエンスを進展させることにより、顎関節症の予防や治療法の開発を目的とした研究を展開したいと考えている。

## 3. 研究の方法

まず、胎齢14日のマウス下顎頭発生原器より細胞を採取し、下顎頭軟骨細胞のmicromass cultureを行った。軟骨細胞に分化しつつある培養細胞に対して、異なる培養期間を設定して機械的刺激を負荷し、機械的刺激を負荷しなかった対照群とともにmicroRNAの発現パターンの分析をマイクロアレイ解析によっておこなった。前述の研究結果より、5つのmiRNAが同定され、さらにそれらの発現パターンをマウス胎仔から成獣までの下顎頭軟骨を用いて解析した。その結果、胎生期の下顎頭軟骨分化初期に高発現している2つ、胎生期から出生後の下顎頭軟骨分化中期に高発現している2つ、ならびに、成獣に達してから高発現する1つのおおむね3種類に大別することができた。

マウス胎仔の下顎頭原器から軟骨細胞に分化する間葉系幹細胞を採取し、高密度培養法(micromass culture)を用いて軟骨細胞分化を促進する培養系、軟骨細胞様細胞株ATDC5を用いた同様の細胞培養系、さらには単層培養など、種々の培養系を用いて5つのmiRNAを遺伝子導入し、その軟骨細胞分化への影響をスクリーニングした。その結果miR-134が最も大きな影響を与えるmiRNAと同定されたため、以下の機能解析をおこなった。

まずmiR-134の発現パターンをマウス胎仔から成獣までの下顎頭軟骨で検討し、それとは別に胎齢期における脳、心臓、四肢胚、肝臓、ならびに胃における発現について検討した。次に、機能解析としては、軟骨細胞分化、細胞増殖、および細胞遊走に対する影響を検討するために以下の検討を行った。まず、軟骨細胞分化を検討するために、軟骨細胞分化に伴い特異的に発現する転写調節因子であるSox9、これによって転写調節を受けるII型コラーゲンに加え、アグリカンの遺伝子発現の変化をRT-qPCR法を用いて検討した。同時に、アルシアンブルー染色を用いて軟骨結節の形成についても検討した。さらに、細胞増殖アッセイや単層培養を用いたスクラッチアッセイなどを行い、細胞増殖への影響、あるいは細胞遊走への影響を検討した。

## 4. 研究成果

まず、マイクロアレイ法を用いて下顎頭軟骨原器由来間葉系幹細胞におけるmechanosensitive microRNAの発現解析を行ったところ、5つの候補miRNAを特定することが

できた。これら5つの候補 miRNA について下顎頭軟骨を用いて解析した。胎齢14日に形態形成が始まる下顎頭では、胎生期の下顎頭軟骨分化初期に高発現している2つ、胎生期から出生後の下顎頭軟骨分化中期に高発現している2つ、ならびに、成獣に達してから高発現する1つのおおむね3種類に大別することができた。ATDC5細胞も用いて発現解析をおこなったところ、5つのうち miR-134 が機械的刺激応答において重要な役割を果たしているのではないかと考えられたため、引き続き miR-134 の発現ならびに機能解析を進めることとした。

発現解析の結果、胎齢10.5日では心臓に高発現が認められ、胎齢11.5日では心臓、脳、四肢胚など多くの組織に発現していることが示された。また miR-134 は胎齢14, 16ならびに18日マウス下顎頭軟骨で高発現し、出生後には発現が低下していることが示された。

マウス下顎頭軟骨原器由来の間葉系幹細胞ならびに ATDC5 の micromass culture に miR-134 の導入により、軟骨結節の形成が抑制されるとともに、II型コラーゲン、アグリカンの遺伝子発現が抑制されることが示唆された。マウス下顎頭軟骨原器由来の間葉系幹細胞は定量解析を行うためには十分な細胞数を得ることが困難であったため、ATDC5細胞を主に使用してより詳細な機能解析をおこなった。

まず、ATDC5細胞における miR-134 の発現を検討したところ初期の軟骨分化に伴ってその発現が上昇することが示された。次に、ATDC5細胞に miR-134 mimic を遺伝子導入して、細胞数の計測ならびに Cell Counting Kit-8 を用いて細胞増殖を検討した結果、miR-134 mimic の遺伝子導入が細胞増殖を有意に抑制することが示された。さらに、スクラッチアッセイによって細胞遊走の抑制も認められた。次に、ATDC5細胞に miR-134 mimic を遺伝子導入して、RT-qPCR法を用いて Sox9、Col2a1 ならびに aggrecan の遺伝子発現を検討したところ、Sox9 ならびに Aggrecan の遺伝子発現の抑制は認められなかったものの Col12a1 の遺伝子発現が統計学的に有意に抑制された。

こうしたことから、miR-134 は軟骨細胞の分化・増殖に重要な役割を果たしているものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	寺尾 文恵  (Terao Fumie)  (10510018)	九州大学・歯学研究院・助教    (17102)	

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