

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 20日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659376

研究課題名（和文） 下顎頭軟骨における microRNA による遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名（英文） Profiling of microRNAs in mouse mandibular condylar cartilage during development

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

研究成果の概要（和文）：

胎生期のマウス下顎頭を用いたマイクロアレイ解析により、経時的に顕著な発現の減少を示す microRNA-200a に注目した。miR-200a の阻害剤および mimic を導入実験により、miR-200a は下顎頭軟骨において増殖を促進し、軟骨細胞分化を抑制することがわかった。

研究成果の概要（英文）：

We focused on miR-200a by microarray analysis of developing mandibular condylar cartilage (MCC) in mouse. Transfection experiments of miR-200a inhibitor or mimic were performed and demonstrated that miR-200a contributes to chondrogenesis in developing MCC through the control of proliferation and differentiation in MCC cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2200,000	0	2200,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3200,000	300,000	3500,000

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：microRNA、下顎頭軟骨、歯科矯正学、軟骨細胞分化

1. 研究開始当初の背景

(1) 下顎頭軟骨 (Mandibular condylar cartilage; MCC) の形成

歯科矯正学においては、下顎骨の成長発育において重要な役割を果たす MCC の機能や細胞分化のメカニズムについて多くの研究が行われてきた。これまで申請者らは、機械的刺激による軟骨細胞の分

化制御のメカニズムや、成長期から成熟期に至る MCC における種々の細胞外基質、その分解酵素、ならびに、その阻害分子の遺伝子発現やタンパクの局在について数多くの報告を行ってきた。

(2) microRNA (miRNA) と軟骨分化

1990 年代後半、タンパク質をコードしない RNA (non-coding RNA) が、遺伝子の転写後の発現調節に関与することが示された。特に

miRNA は、標的 RNA の翻訳を阻害すること、あるいは、直接、標的 RNA の分解に寄与することが知られており、ヒトではタンパク質をコードする遺伝子の 30%以上が miRNA にその発現を post-transcriptional に制御されていると推測されている。このように、microRNA は個体の発生過程や細胞の分化に必須の役割を果たしていることが知られるようになった。哺乳動物の発生・分化においては脂質形成に関わる miR-143 や、筋形成などに関わる miR-181 などのような miRNA が報告されており、組織発生・分化への深い関与が指摘されているが、200 種類以上確認されている miRNA のうちのいくつかを除き、ほとんどの miRNA の分子機能は明らかになっていない。

2. 研究の目的

(1) 下顎頭軟骨組織における miRNA の発現に関する基礎的情報が全く存在しない MCC における種々の遺伝子発現を post-transcriptional に制御する miRNA の発現データベースを作成する。
(2) MCC の発生期に伴い、顕著な発現変動を示す miRNA について、その機能を解明する。

3. 研究の方法

(1) マイクロアレイによる大規模発現解析
胎齢 14, 16 および 18 日のマウス下顎頭軟骨より total RNA を採取し、それぞれの細胞層に特異的あるいは共通の miRNA の発現が認められるかを検討した。

(2) miRNA の選択

マイクロアレイの解析結果より、下顎頭軟骨の発生に深く関与すると思われる miRNA を選択する。

(3) miRNA の機能解析

① 器官培養実験

胎生 14 日の下顎頭軟骨にエレクトロポレーション法によりターゲットとする miRNA の阻害剤および mimic を導入した。無血清 DMEM 培地により器官培養を行い、培養 3 日目に固定後、I、II、X 型コラ

ーゲンおよび PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) の免疫組織学的検討を行った。

② 単層培養実験

また、下顎頭軟骨より分離した細胞とマウス軟骨前駆細胞(ATDC5)を単層培養し、ターゲットとする miRNA の阻害剤および mimic を導入後、Cell Counting Kit-8 (Dojindo)を用いて増殖実験を行った。

③ ATDC5 細胞の高密度培養実験

ターゲットとする miRNA の阻害剤および mimic を導入した ATDC5 の高密度培養における軟骨形成能を検討した。

4. 研究成果

(1) mRNA のマイクロアレイ解析

miRNA の成長・加齢に伴う経時的発現パターンの変化を messenger RNA (mRNA) の発現パターンと比較しながら検討した。

下顎頭軟骨の形成につれ、Dlx1、5、および 6、および Pitx2 について経時的変動が認められた。軟骨細胞の分化指標となる II 型コラーゲン、および Sox9 および、Dlx1、5、および 6、および Pitx2 について解析を加えた。この解析により、マウス下顎頭軟骨において胎齢 16 日齢に Pitx2 の mRNA の発現上昇が認められ、胎齢 18 日齢に Dlx1、Dlx6 の mRNA の発現上昇が認められた。

(2) miRNA のマイクロアレイ解析とターゲットとする miRNA の抽出

マイクロアレイ解析より、下顎頭軟骨の発生に伴い、顕著な発現変動を示す miRNA を抽出したところ、miRNA-200 ファミリーに顕著な発現の減少がみとめられた。そのなかでも、miR-200a について発現解析を進めることとした。

(3) miRNA の機能解析

① 器官培養実験

miR-200a の機能解析の為に胎生期マウス下顎頭軟骨の器官培養を行った。miRNA Mimics および阻害剤を用い、miR-200a を過剰発現させた状態を観察し、さらに阻害剤を用い miR-200a が阻害された状態を観察することで下顎頭軟骨に対する miR-200a の機能解析を行った。

Hematoxylin and Eosin (H&E) 染色と免疫組

織学的検討により、miR-200a 阻害群では、軟骨中心部での X 型コラーゲン陽性の肥大軟骨層が拡大した。一方、mimic 導入群の中心部には未分化線維性組織の侵入が認められた (図 1)。また、PCNA の陽性細胞率は miR-200a mimic 導入群において有意に増加を示した。

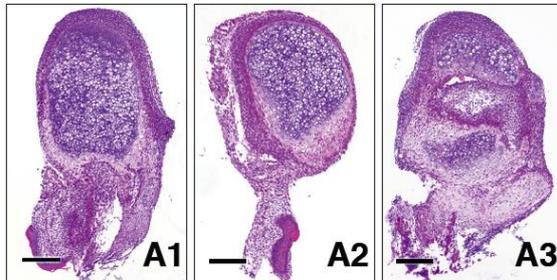


図 1 : 器官培養 3 日目のマウス下顎頭軟骨の H&E 染色。

A1: 対照群, A2: miR-200a 阻害剤導入群, A3: miR-200a mimic 導入群

② 単層培養実験

下顎頭由来細胞の単層培養においても、miR-200a mimic 導入群で細胞増殖活性が高いことが確認された。

③ ATDC5 細胞の高密度培養実験

miR-200a mimic を導入した ATDC5 の高密度培養において、アルシアンブルー陽性軟骨ノジュール形成が抑制された。

以上の結果より、胎生期 MCC において、miR-200a は増殖を促進し、軟骨分化を抑制することが示唆された。

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 10 件)

- ① Yoshihara M, Terajima M, Yanagita N, Hyakutake H, Kanomi R, Kitahara T, Takahashi I. : Three-dimensional analysis of the pharyngeal airway morphology in growing Japanese females with and without cleft lip and palate. *Am J Orthod Dentofacial Orthopedics* 141(4):S92-S101. 2012. 4 査読有り
- ② Nomura S, Tsuru K, Valanezhad A, Matsuya S, Takahashi I., Ishikawa K. : Fabrication of carbonate apatite

block from calcium sulfate by hydrothermal treatment. *Key Engineering Materials* 493-494:139-142, 2012. 4 査読有り

- ③ Deguchi T, Kurosaki H, Oikawa H, Kuroda S, Takahashi I., Yamashiro T, Takano-Yamamoto T. Comparison of orthodontic treatment outcomes in adults with skeletal open bite between conventional edgewise treatment and implant-anchored orthodontics. *Am J Orthod Dentofacial Orthopedics* 139(4):S60-S68, 2011. 4 査読有り
- ④ Nagata M, GH.Nuckolls, X Wang, L Shum, Seki Y, Kawase T, Takahashi K, Nonaka K, Takahashi I., AA.Nomar, Suzuki K, Slavkin HC. The primary site of the acrocephalic feature in Apert syndrome is a dwarf cranial base with accelerated chondrocytic differentiation due to aberrant activation of the FGFR2 signaling. *Bone* 48:847-856. 2011. 4 査読有り
- ⑤ Hayashida H, Ioi H., Nakata S, Takahashi I., Counts AL. Effects of retraction of anterior teeth and initial soft tissue variables on lip changes in Japanese adults. *Eur J Orthod* 33(4): 419-26. 2011. 8 査読有り
- ⑥ Tsutsumi K, Matsuda M, Kotani M, Mizokami A, Murakami A, Takahashi I., Terada Y, Kanematsu T, Fukami K, Takenawa T, Jimi E, Hirata M. Involvement of PRIP, phospholipase C-related, but catalytically inactive protein, in bone formation. *J Biol Chem* 286(35): 31032-42, 2011. 9 査読有り
- ⑦ Endo M, Terajima M, Goto T, Tokumori K, Takahashi I. Three-dimensional analysis of the temporomandibular joint and fossa-condyle relationship. *Orthodontics* 12(3):210-221, 2011. Fall 査読有り
- ⑧ Hagiwara Y, Ando A, Chimoto E, Tsuchiya M, Takahashi I., Sasano Y, Onoda Y, Suda H, Itoi E. Expression of collagen type 1 and 2 on articular cartilage in a rat knee contracture model, *Connective Tissue Research* 51:22-30, 2010. 査読有り
- ⑨ Shimonishi M, Takahashi I., Terao F., Komatsu M, Kikuchi M. Induction of MMP-2 at the interface between epithelial cells and fibroblasts from human periodontal ligament. *J Periodont Res* 45: 309-316, 2010. 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

- ① Umeda M, Terao F, Yoshizaki K, Takahashi I, Profiling MicroRNA Expression in Mouse Mandibular Condylar Cartilage during Development, General Session of International Association for Dental Research, 2013年3月21日, シアトル・アメリカ合衆国
- ② Terao F, Umeda M, Yoshizaki K, Takahashi I, Real-time Monitoring of Intracellular ERK in ATDC5 Under Mechanical Stress, General Session of International Association for Dental Research, 2013年3月23日, シアトル・アメリカ合衆国
- ③ Shiotsuka M, Wada H, Kiyoshima T, Kobayashi I, Nagata K, Fujiwara H, Takahashi I, Sakai H. Expression pattern and possible function of thymosin beta-10 in developing tooth germ compared with thymosin beta-4. The 6th International Joint Symposium on “Dental and Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration” and “Oral Health Science” (第6回国際シンポジウム) 2011. 3. 4-5, Fukuoka.
- ④ Murata N, Ioi H, Ohuchi M, Takao T, Oida H, Yamaza T, Takahashi I, Kido MA. Effects of allergic inflammation on orthodontically induced tooth root resorption. The 6th International Joint Symposium on “Dental and Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration” and “Oral Health Science” (第6回国際シンポジウム) 2011. 3. 4-5, Fukuoka.
- ⑤ Ioi H, Kang S, Shimomura T, Kim S, Park S, Son W, Takahashi I, Counts AL. Effects of buccal corridors on smile esthetics in Korean and Japanese orthodontic patients. American Association of Orthodontists, Chicago, IL, 2011. 5. 14.
- ⑥ Nomura S, Tsuru K, Valanezhad A, Matsuya S, Takahashi I, Ishikawa K. Fabrication of Carbonate Apatite

Block from Calcium Sulfate by Hydrothermal Treatment. BIOCERAMICS 23, Istanbul, Turkey 07.11.2011

- ⑦ 寺尾文恵、高橋一郎、三谷英稔、春山直人、笹野泰之、鈴木治、山本照子 胎生期下顎形成期におけるFGF10によるメッケル軟骨形態の制御、第29回日本骨代謝学会学術集会、2011.7.28-30, 大阪市
- ⑧ Terao F. FGF10 contributes Meckel's cartilage formation in early mandibular development. The 6th International Workshop on Nano-, Bio- and Amorphous Materials, Zao, Miyagi, 2011. 8. 8-9.
- ⑨ Takahashi I: Mechano-Biology of cytoskeletal reorganization in differentiating chondrocytes. International Workshop on Nano, Bio and Amorphous Materials, Miyagi-Zao, 2010. 8. 9-10
- ⑩ 本田淳也, 小林家吉, 坂井英隆, 高橋一郎: 歯胚における phosphoglycerate kinase (Pgk)1 タンパクの局在とその新しい役割について. 第69回日本矯正歯科学会大会, 横浜市, 2010. 9. 27-29.

[図書] (計 2 件)

- ① 高橋一郎、梅田まりこ、寺尾文恵: 顎顔面の成長発育-下顎頭軟骨の成長メカニズム、2012 歯科医療秋号 P15-掲載
- ② 高橋一郎: 口腔顎顔面成長発育の生物学-細胞外基質代謝と機械的刺激応答-、2012. 12. 21 発行 東北矯正歯科学会雑誌 第20巻1号掲載

[その他]

<http://www.ortho.dent.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 一郎 (TAKAHASHI ICHIRO)
九州大学・大学院歯学研究院・教授
研究者番号: 70241643

(2) 研究分担者

寺尾 文恵 (TERAO FUMIE)
九州大学・大学院歯学研究院・助教
研究者番号: 10510018