

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593042

研究課題名(和文) microRNAに着目した歯の移動における周期的変動制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Development of a New Treatment in Orthodontics by Focusing on Clock Genes which are Regulated by microRNAs.

研究代表者

鍵谷 忠慶 (KAGIYA, TADAYOSHI)

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：30405774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、microRNAに着目し、生物リズムの「周期性」という概念を取り入れた新規歯科矯正学治療法開発することを目的とする。今回は特に、歯の移動で重要な役割を担う破骨細胞に注目して研究を進めた。破骨細胞分化に重要なmicroRNAとしてlet-7e, miR-21, miR-33, miR-155, miR-210, miR-223, miR-378, miR-1224等が考えられた。この8種類のmicroRNAについて調べたところ、細胞内で発現している全てのmicroRNAが、Extracellular Microvesicles内に存在するとは限らないことが判った。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop a new treatment in orthodontics by focusing on clock genes which are regulated by microRNAs. Then we investigated osteoclasts, which play an important role in orthodontics. Specifically, we investigated eight miRNAs deemed important for osteoclastogenesis in our study: let-7e, miR-21, miR-33, miR-155, miR-210, miR-223, miR-378, and miR-1224. The results suggest that osteoclasts secrete extracellular microvesicles containing specific miRNAs, but that they do not contain the entire set of intracellular miRNAs.

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 Exosomes Microvesicles Osteoclasts Osteoblasts Macrophages Microarray Orthodontics

1. 研究開始当初の背景

生物リズムは、睡眠、体温、血圧、内分泌等にみられる周期的変動である。近年、このような生物リズムを利用した「時間治療」が注目されている。歯科矯正学にこの考えを当てはめると、歯や顎骨に外力を加えた場合、それに対する反応（歯の移動量等）に周期性が存在するので、それに応じた最適な外力で効率よく治療することができないかということになる。本研究では、遺伝子発現を翻訳レベルで制御する microRNA に着目し、「周期性」という概念を取り入れた新規治療法開発の基盤を形成することを目的とする。

2. 研究の目的

歯に外力を加えた場合、牽引側で骨芽細胞、圧迫側で破骨細胞が出現することは、よく知られている。microRNA 研究分野では、骨芽細胞で研究が進んでいる一方、破骨細胞については、あまり進んでいない。そこで、破骨細胞分化を誘導した時の細胞内外で発現する microRNA を中心に周期性との関わりを検討することにした。

3. 研究の方法

(1) 破骨細胞分化に重要な microRNA を見つけるために、RAW264.7 を用いて、RANKL 単独と TNF- α と RANKL の組合せの 2 通りで破骨細胞を誘導して検討した。RANKL 単独または、TNF- α /RANKL を作用させてから 0, 24, 82 時間後に total RNA を回収し、マイクロアレイ解析を行った。また、発現変動の大きかった microRNA について、qRT-PCR 法によって、アレイ解析の結果を検証した。更に、マウス初代骨髄細胞を使って破骨細胞を誘導する系でも、qRT-PCR 法でその結果を検証した。

(2) microRNA は細胞内に存在するだけでなく、細胞が分泌する Extracellular Microvesicles 内にも存在することが一部の細胞で報告されている。破骨細胞が単球やマクロファージから分化することを踏まえて

マクロファージと破骨細胞が分泌する Extracellular Microvesicles での microRNA 発現について以下の方法で検討した。

① ヒト単球様細胞株 THP-1 を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 存在下で培養し、ヒトマクロファージ様細胞を得た。この細胞を 72 時間培養した培養上清から Extracellular Microvesicles ペレットを回収し、マイクロアレイ法で microRNA の発現を解析した。

② マウス初代骨髄細胞を M-CSF と RANKL 存在下で培養して得られた破骨細胞の培養上清から、Extracellular Microvesicles ペレットを回収し、qRT-PCR 法で microRNA の発現を解析した。

(3) (1) で得られたマウス細胞の結果をヒト細胞で確かめることにした。ヒト CD14+ cells を M-CSF と RANKL 存在下で培養することで、破骨細胞を分化させた。破骨細胞へ分化する前のマクロファージの時点と、成熟した破骨細胞へ分化した時点で Total RNA を回収し、マイクロアレイ解析と qRT-PCR 法で microRNA の発現を解析した。

4. 研究成果

(1) 表 1 に RANKL 単独と TNF- α と RANKL の組合せの 2 通りで破骨細胞を誘導した時に、2 倍以上変動した microRNA をまとめた。miR-223 と miR-378 は、破骨細胞分化に重要である可能性があり、miR-21, miR-29b, miR-146a, miR-155, および miR-210 は TNF- α と RANKL の組合せでの破骨細胞分化に関与している可能性が示唆された。

	TNF- α /RANKL	RANKL	TNF- α /RANKL RANKL
Downregulation	-	miR-23b, miR-146a, miR-146b, miR-338-3p	miR-223, miR-342-3p
Upregulation	miR-29a, miR-29b, miR-29c, miR-30b, miR-30c, miR-34a, miR-101a, miR-101b, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-148b, miR-199a-3p, miR-365, miR-1892, miR-1904	miR-18a, miR-99a, miR-100, miR-378*, miR-714	let-7e, miR-19a, miR-33, miR-96, miR-125a-3p, miR139-3p, miR-183, miR-188-5p, miR-193, miR-210, miR-378, miR-483, miR-494, miR-671-5p, miR-674*, miR-680, miR-689, miR-721, miR-1224, miR-1895, miR-1897-5p

表 1 Kagiya *et al.* J Periodontal Res 2013 より引用

(2) ① ヒトマクロファージ様細胞が分泌する Extracellular Microvesicles 中の microRNA 発現では、解析した 1,222 種類の microRNA のうち、53 種類が検出された。miR-1246 が最も多く発現し、miR-574-5p と miR-4281 がこれに続いて豊富に発現していた。表 2 にヒトマクロファージ様細胞が分泌する Extracellular Microvesicles 中で検出された microRNA を示す。

miRNA	Signal intensity	miRNA	Signal intensity
hsa-miR-1246	3527.1	hsa-miR-16	58.0
hsa-miR-574-5p	1102.9	hsa-let-7b*	47.3
hsa-miR-4281	622.5	hsa-miR-940	47.0
hsa-miR-574-3p	519.1	hsa-let-7f-1*	45.7
hsa-miR-1290	474.4	hsa-miR-33b*	43.7
hsa-miR-720	354.6	hsa-miR-4312	39.8
hsa-miR-3148	345.6	hsa-miR-1639	38.5
hsa-miR-32*	257.9	hsa-miR-4313	37.9
hsa-miR-197	226.3	hsa-miR-425*	34.8
hsa-miR-1281	195.9	hsa-miR-191*	33.8
hsa-miR-4290	193.7	hsa-miR-149	29.8
hsa-miR-483-3p	168.4	hsa-miR-1234	27.3
hsa-miR-1268	156.8	hsa-miR-223	25.8
hsa-miR-1825	148.6	hsa-miR-1280	22.2
hsa-miR-595	131.0	hsa-miR-1225-3p	21.0
hsa-miR-3148	124.8	hsa-miR-23c	19.7
hsa-miR-877*	118.0	hsa-miR-4323	19.7
hsa-miR-21	106.8	hsa-miR-2116*	15.4
hsa-miR-1260	105.2	hsa-miR-4310	13.4
hsa-miR-762	91.5	hsa-miR-1228	13.2
hsa-miR-23a	79.0	hsa-miR-1238	12.5
hsa-miR-630	77.3	hsa-miR-3676	9.3
hsa-miR-2278	72.5	hsa-miR-933	4.6
hsa-miR-766	72.2		
hsa-miR-4286	68.2		
hsa-miR-328	68.1		
hsa-miR-20a	60.7		
hsa-miR-92a	60.4		
hsa-miR-4284	59.7		
hsa-miR-1257	59.0		

表 2 Kagiya *et al.* Microarrays: Principles, Applications and Technologies. Nova Science Publishers 2014 より引用

② これまでの研究成果から、破骨細胞分化に重要な microRNA として let-7e, miR-21, miR-33, miR-155, miR-210, miR-223, miR-378, miR-1224 等が考えられた。この 8 種類の microRNA について、破骨細胞が分泌する Extracellular Microvesicles に存在するか調べたところ、miR-378, miR-210,

miR-21 は、多量に存在する一方、miR-33 と miR-1224 は存在しなかった。以上より、破骨細胞は microRNA を含む Extracellular Microvesicles を分泌するが、細胞内で発現している全ての microRNA が、Extracellular Microvesicles 内に存在するとは限らないことが示された。

(3) miR-21 は、マウス破骨細胞分化過程で発現が上昇し、分化に重要な役割を担っているとされる。しかし、我々の実験では、マウス破骨細胞分化過程とヒト破骨細胞分化過程の両方で、miR-21 の有意な発現上昇はなかった。miR-155 と miR-223 はマウス破骨細胞分化過程でその発現が減少し、これらの過剰発現によって、マウス破骨細胞分化は抑制される。しかし、これらの microRNAs は、ヒト破骨細胞分化過程では、マウスの場合と違って、むしろ発現上昇する傾向が認められた。

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 Kagiya T, Taira M. Expression of MicroRNAs in the Extracellular Microvesicles of Murine Osteoclasts.

J Oral Tissue Engin 2013;10(3): 142-150.

(査読有)

URL:<https://iwatemed.repo.nii.ac.jp/>

② Kagiya T, Nakamura S. Expression profiling of microRNAs in RAW264.7 cells treated with a combination of tumor necrosis factor alpha and RANKL during osteoclast differentiation. *J Periodontal Res* 2013;48(3): 373-385. (査読有)

DOI:10.1111/jre.12017

[学会発表] (計 6 件)

① 鍵谷 忠慶:microRNA を介した破骨細胞分化制御について 岩手医科大学 歯学研究セミナー 2014 年 3 月 4 日 (盛岡市)

② 鍵谷 忠慶、中山 貴博、安藤 禎紀、藤村 朗：破骨細胞分化において重要と考えられる microRNA について 第 118 回日本解剖学会全国学術集会 2013 年 3 月 28 日（高松市）

③ 鍵谷 忠慶、中山 貴博：TNF- α /RANKL 誘導性破骨細胞における microRNA の発現について 第 117 回日本解剖学会全国学術集会 2012 年 3 月 26 日（甲府市）

④ 安藤 禎紀、古川 真司、桑島 幸紀、鍵谷 忠慶、藤村 朗、三浦 廣行：赤色蛍光強発現 TG マウスの蛍光分布 第 117 回日本解剖学会全国学術集会 2012 年 3 月 26 日（甲府市）

⑤ 鍵谷 忠慶：骨代謝における microRNA の役割について 東夷塾 2012 年 3 月 6 日（盛岡市）

⑥ 鍵谷 忠慶、平 雅之、安藤 禎紀、藤村 朗：マクロファージが銅イオンに暴露された時の microRNA の発現について 第 53 回歯科基礎医学会学術大会 2011 年 10 月 2 日（岐阜市）

〔図書〕（計 1 件）

① Kagiya T, Taira M. A New Application for Microarrays: Analysis of Global MicroRNA Expression Profiles in the Extracellular Microvesicles of Human Macrophage-like Cells. In: Rogers JV, editor. Microarrays: Principles, Applications and Technologies. New York: Nova Science Publishers 2014; 69-80. (査読有)
ISBN:978-1-62948-669-7 (Hardcover Book)
ISBN:978-1-62948-713-78 (eBook)

〔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

岩手医科大学ホームページ
<http://www.iwate-med.ac.jp/>
岩手医科大学リポジトリ
<https://iwatemed.repo.nii.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鍵谷 忠慶 (KAGIYA, Tadayoshi)
岩手医科大学・歯学部・助教
研究者番号：30405774

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

中山 貴博 (NAKAYAMA, Takahiro)
岩手医科大学・歯学部・研究員
研究者番号：70599208

安藤 禎紀 (ANDO, Yoshinori)
岩手医科大学・歯学部・助教
研究者番号：40583662

藤村 朗 (FUJIMURA, Akira)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号：80173459

三浦 廣行 (MIURA, Hiroyuki)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号：00048563