

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670876

研究課題名(和文) 下顎頭軟骨における間葉系幹細胞分化のマイクロRNAによる分子制御基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular basis regulating differentiation of mesenchymal stem cells in mandibular condylar cartilage by microRNAs

研究代表者

高橋 一郎 (TAKAHAHI, Ichiro)

九州大学・歯学研究科(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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウス下顎頭軟骨発生期のosteo-chondroprogenitor cell細胞分化に関わるマイクロRNAとして、肩関節とのマイクロアレイ解析の比較により、miRNA(miR)-200aとその標的遺伝子候補としてDistal-less homeobox (Dlx) 5を抽出した。軟骨前駆細胞株ATDC5へのmiR-200a導入によりDlx5タンパク発現が減少した。また、レポーターアッセイによりDlx5がmiR-200aの直接のターゲットであることを示した。以上より、下顎頭軟骨発生期のOPCPにおいて、miR-200aはDlx5を標的遺伝子として軟骨分化の制御を行っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Microarray analysis using osteo-chondroprogenitor cells, putative mesenchymal stem cells in mandibular condylar cartilage and those in the primary cartilages in shoulder joint during embryonic stages has revealed that microRNA-200a (miR-200a) is one of the candidate microRNA which regulates the differentiation of secondary cartilage. We found that Dlx5 is a candidate target gene for miR-200a by microarray analysis. Reporter assay revealed that miR-200a inhibited the promoter activities of Dlx-5. Further, miR-200a reduced the production of Dlx5 protein in ATDC5 cells. Thus, it has been suggested that miR-200a regulates the differentiation of mandibular condylar cartilage cells through inhibition of Dlx5 production.

研究分野：医歯薬学

キーワード：発生・分化 microRNA 下顎頭軟骨

### 1. 研究開始当初の背景

歯科矯正学においては、下顎骨の成長の場として重要な役割を果たす下顎頭軟骨の機能や細胞分化の分子メカニズムについて数多くの研究が行われてきた。下顎頭軟骨は二次軟骨として発生し、一次軟骨である長管骨の成長板軟骨と関節軟骨の両方の機能を同時に果たすユニークな組織として知られている。下顎頭軟骨の細胞分化は、一次軟骨には存在しない二次軟骨特有の osteo-chondroprogenitor cell (OCPC) の増殖と分化によって起こることが知られている。この OCPC は、間葉幹細胞としての性質を保持していると考えられるが、その形質の保持にどのような分子メカニズムが関連しているかは分かっていない。

一方、近年、miRNA を含む非翻訳領域の短鎖 RNA が遺伝子発現からタンパクへの翻訳までの過程において、mRNA の分解や発現制御に重要な役割を果たしていることが知られるようになり、個体発生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。しかしながら、国際的に見ても下顎頭軟骨細胞の分化過程における miRNA の発現パターンや、その機能に関する報告は皆無といっても過言ではない。

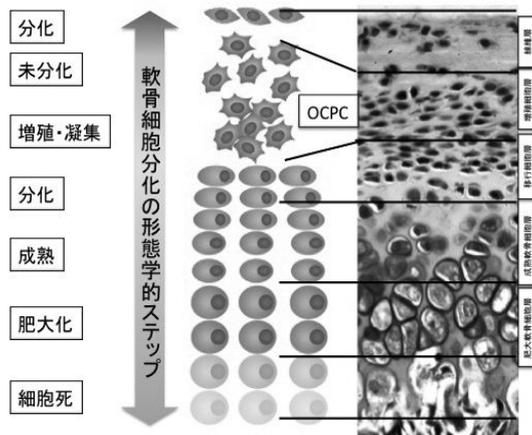


図1. 下顎頭軟骨の分化過程における OCPC

### 2. 研究の目的

下顎頭軟骨と OCPC を持たない一次軟骨における miRNA の発現とを系統的に比較し、OCPC の分化を制御する分子メカニズムに関わる miRNA の役割を解明することを目的として研究を行った。OCPC の未分化な形質の維持やその後の軟骨細胞の分化に miRNA が関与していることを示す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 肩関節軟骨と下顎頭軟骨との比較

マイクロアレイによる解析

E14, 16 および 18 のマウス肩関節軟骨の成長・加齢に伴う miRNA および messenger RNA

(mRNA) 経時的発現の変化について、以前行った同じ時期の下顎頭軟骨における発現と比較し、下顎頭軟骨特異的に発現が認められる miRNA を抽出した。

#### (2) ターゲット遺伝子の探索と解析

マウス下顎頭軟骨形成において miR-200a が OCPC 分化における軟骨分化を制御する可能性が考えられたため、miR-200a の標的遺伝子を軟骨分化制御因子の中から、データベースおよび文献を用いて検索、抽出した。同時に下顎頭軟骨原基における遺伝子発現パターンをデータベースにより解析し、Dlx5 (distal-less homeobox 5) に注目することとした。まず、通常の下顎頭形成における Dlx5 遺伝子および Dlx5 タンパクの発現を確認するため、E14 および E16 において *in situ* hybridization 法および免疫組織化学染色法を実施した。

マウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 の単層培養を行い、miR-200a の導入実験を行った。導入翌日にタンパクを回収し、ウエスタンブロッティングによる解析を行った。また、導入翌日に回収した RNA を用いて、逆転写、RT-PCR 解析を行った。

Dlx5 が miR-200a の直接のターゲットであるかを調べるために、レポーターアッセイを行った。Dlx5 遺伝子の 3'-UTR 配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子の下流にクローニングしたベクターを ATDC5 に導入し、さらに miR-200a を導入した。

### 4. 研究成果

#### (1) 肩関節軟骨と下顎頭軟骨との比較

E14, 16 および 18 のマウス肩関節軟骨の成長・加齢に伴う miRNA および messenger RNA (mRNA) 経時的発現の変化について、以前行った同じ時期の下顎頭軟骨における発現と比較し、下顎頭軟骨特異的に発現が認められる miRNA を抽出したところ、miR-200 ファミリーが抽出された。miR-200a は、以前の研究により、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ことから、OCPC における miR-200a の軟骨分化制御機構についてさらに検討することとした。

#### (2) miR-200a のターゲット遺伝子の探索と解析

免疫組織化学染色法および *In situ* hybridization 法を用いた検討により、Dlx5 は E14 では下顎頭原基で弱く発現が認められ、E16 では下顎頭軟骨の増殖細胞層および前肥大細胞層に強く発現が認められ、miR-200a が E14 から E16 にかけて発現が減少することとは対照的であった。

マウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 の単層培

養を行い、miR-200a の導入実験を行った。導入翌日にタンパクを回収し、ウエスタンブロットニングによる解析を行った結果、有意に miR-200a 導入群において Dlx5 タンパク量の減少が見られた。導入翌日に回収した RNA を用いて、逆転写および RT-PCR 解析を行ったところ、Dlx5 遺伝子発現に減少傾向が認められたが有意差はなかった。

Dlx5 遺伝子の 3'-UTR 配列を組み込んだベクターをもちいてレポーターアッセイを行ったところ、ルシフェラーゼ発現が有意に減少した。Dlx5 遺伝子の 3'-UTR 配列に一部変異を導入したベクターを用いた際には、ルシフェラーゼ発現の減少は認められなかった。

以上のことから、マウス下顎頭軟骨発生期の OPCP において、miR-200a は Dlx5 を標的遺伝子として軟骨分化の制御を行ってい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 9 件)

Umeda M, Terao F, Miyazaki K, Yoshizaki K, Takahashi I.: MicroRNA-200a Regulates the Development of Mandibular Condylar Cartilage. J Dent Res. 94: 795-802, 2015 June

Albogha MH, Takahashi I. Generic finite element models of orthodontic mini-implants: Are they reliable? J Biomech. 48(14): 3751-6, 2015 Nov

Albogha MH, Kitahara T, Todo M, Hyakutake H, Takahashi I. Maximum principal strain as a criterion for prediction of orthodontic mini-implants failure in subject-specific finite element models. The Angle Orthodontist. 86(1):24-31. 2016 Jan.

Albogha MH, Kitahara T, Todo M, Hyakutake H, Takahashi I. Predisposing Factors for Orthodontic Mini-Implant Failure Defined by Bone Strains in Patient-Specific Finite Element Models. Ann Biomed Eng. 2016 Mar

Miyazaki K, Yoshizaki K, Arai C, Yamada A, Saito K, Ishikawa M, Xue H, Funada K, Haruyama N, Yamada Y, Fukumoto S, Takahashi I. Plakophilin-1, a Novel Wnt Signaling Regulator, Is Critical for Tooth Development and Ameloblast

Differentiation. PLoS One. 24;11(3):e0152206. 2016 Mar.

Ioi H, Kang S, Shimomura T, Kim SS, Park SB, Son WS, Takahashi I. Effects of vermilion height on lip esthetics in Japanese and Korean orthodontists and orthodontic patients. Angle Orthod 84(2):239-245, 2014.

Yanase Y, Ioi H, Nishioka M, Takahashi I. Effects of sliding velocity on friction. Angle Orthod 84(3):454-458, 2014.

Trisnawaty N, Ioi H, Kitahara T, Suzuki A, Takahashi I. (2013) : Effects of extraction of four premolars on vermilion height and lip area in patients with Bimaxillary protrusion, Eur J Orthod 35(4):521-528,2013.4

Ioi H., Kang S., Shimomura T., Kim S. S., Park S. B., Son W. S., Takahashi I. Effects of vertical positions of anterior teeth on smile esthetics in Japanese and Korean orthodontists and orthodontic patients. J Esthet Dent.25(4):274-282,2013.8

[学会発表](計 9 件)

新井智映子、吉崎恵悟、宮崎佳奈子、韓雪、鮎田啓太、高橋一郎 基底膜分子 Nephronectin は歯原性上皮幹細胞の分化および細胞増殖に關与する 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会、ポスター、2015 年 9 月 11-13 日、新潟 宮崎佳奈子、吉崎恵悟、新井智映子、韓雪、鮎田啓太、高橋一郎 新規 Wnt シグナル調節因子 PKP1 の歯の発生における役割 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会、ポスター、2015 年 9 月 11-13 日、新潟

新井智映子、吉崎恵悟、宮崎佳奈子、韓雪、鮎田啓太、高橋一郎 歯の発生における基底膜分子 Nephronectin の役割 第 74 回日本矯正歯科学会大会(優秀発表賞受賞)、ポスター、2015 年 11 月 18-20 日、福岡

宮崎佳奈子、吉崎恵悟、新井智映子、韓雪、鮎田啓太、高橋一郎 外胚葉異型性症原因遺伝子 Plakophilin 1 は歯の発生において Wnt シグナル調節因子として作用する 第 74 回日本矯正歯科学会大会、ポスター、2015 年 11 月 18-20 日、福岡

Albogha Mhd Hassan, Kitahara Toru,

Todo Mitsugu、Hiyakutake Hiroto、Takahashi Ichiro Three factors play significant role in the stability of orthodontic mini-implants 第74回日本矯正歯科学会大会(優秀発表賞受賞)、口演、2015年11月18-20日、福岡

Miyazaki K, Yoshizaki K, Arai C, Han Xue, Funada K, Takahashi I. Plakophilin-1, a novel Wnt signaling regulator, is critical for tooth development and ameloblast differentiation. (口演、ポスター), International Symposium 2015 Oral and Craniofacial Development and Disease, December 10<sup>th</sup>, 11<sup>th</sup>, 2015, Yumikura Hall Osaka University, Osaka, Japan

Arai C, Yoshizaki K, Miyazaki K, Xue Han, Funada K, Takahashi I. Nephronectin, a basement membrane protein, plays critical roles for differentiation and proliferation of dental epithelial stem cells during tooth development. (口演), Kyudai Oral Bioscience 2016, February 27<sup>th</sup>, 2016, Fukuoka, Japan

北原亨、飯久保正弘、湯浅賢治、高橋一郎 筋機能MRIおよび31P-MRSを用いた咀嚼筋疲労の分子イメージング 第73回日本矯正歯科学会 2014年10月20-22日

Ioi H, Kang DS, 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 111<sup>th</sup> Annual Session. Chicago, USA, 2014.

〔図書〕(計1件)

Ichiro Takahashi, Mechano-Reaction of Chondrocytes in the Mandibular Condyle During Orthopedic-Orthodontic Intervention. in Orthodontic Treatment of Class III Malocclusion, eds. Peter W Ngan, Toshio Deguchi, Eugene W. Roberts, Chapter 3. Bentham Science Publishers Ltd. Sharjah, U.A.E: 2014, pp37-60.

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