

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25713064

研究課題名(和文) 軟骨内骨化を制御する血管新生因子標的microRNAの同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of target microRNAs of angiogenesis factor regulating endochondral ossification

研究代表者

藤田 優子 (FUJITA, Yuko)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90514670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、軟食もしくは硬食を摂取させたラット咬筋のマイクロRNA (miRNA)-mRNAの発現特性を知るため、miRNAとmRNAのマイクロアレイ解析と統合解析を行った。さらに、Gene Ontology (GO) 解析を用いて血管形成と軟骨内骨化とに関連したmiRNAとmRNAを特定することにした。

GO解析により、数種の血管形成要因と骨化関連遺伝子を含む12の遺伝子と8つのmiRNAとの相互関係が予測された。特に、rno-miR-19b-3pとrno-miR-181c-5pの潜在的標的として、それぞれ5つの血管形成と軟骨内骨化とに関連したmRNAが特定された。

研究成果の概要(英文)：We performed microarray and integrated analyses of microRNA-mRNA expression profiles for masseter muscle in rats fed the soft or hard diets. In addition, we identified the miRNAs and mRNAs associated with the angiogenesis and endochondral ossification using Gene Ontology (GO) analysis.

GO analysis predicted interactions between 12 genes and 8 miRNAs, including some angiogenesis factors and ossification genes. In particular, 5 mRNAs associated with angiogenesis and endochondral ossification were identified as potential targets of rno-miR-19b-3p and rno-miR-181c-5p, respectively.

研究分野：小児歯科

キーワード：マイクロRNA 血管新生 骨化 マイクロアレイ 咬筋 統合解析

1. 研究開始当初の背景

microRNA(miRNA) は22-25塩基のノンコーディング RNA で、組織特異的に標的遺伝子の mRNA に結合してその翻訳を阻害または直接分解する機能をもつ。

我々は、過去に成長期ラットの軟食摂取による下顎骨の成長遅延が、すべて咬筋の付着部位に発症することを明らかにした。近年、筋と骨が体液性、または局所性に相互作用する機構に関する研究が盛んに行われており、これまでに幾つかの遺伝子が発見されている。そこで我々は、咬筋の遺伝子発現量の異常による筋線維量の低下が、骨形成低下の原因であると推察した。しかし、筋肉の発達や萎縮のメカニズムについては未だ解明されていない部分が多い。さらに、硬組織の石灰化と血管新生は切り離せない関係にあるが、骨組織に近接する筋肉において骨形成と血管形成の両方に携わる遺伝子やそれらを制御する miRNA についてはあまり知られていない。

2. 研究の目的

我々は、血管新生および軟骨内骨化に関する遺伝子を制御する miRNA が咬筋内に存在すると仮定し、硬食または軟食を摂取させたラットの骨組織および咬筋組織の形態計測を行うとともに、咬筋組織の miRNA と mRNA のマイクロアレイ解析を行い、血管新生と軟骨内骨化遺伝子を制御する新たな miRNA を発見することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究は、九州歯科大学研究倫理委員会の承認を得て行った(13-20)。生後3週齢の雄ラット10匹を固形食(HD; n = 5)群と粉末食(SD; n = 5)群に分けて8週間飼育した。

(2) 左側の咬筋浅層中央部を摘出し、通法に従って HE 染色標本を各サンプルから3枚ずつ作製した。すべての標本から無作為に100個の筋線維を抽出し、ImageJ software (National Institutes of Health)を用いて筋線維の直径と横断面積を測定した。

(3) 下顎骨を摘出後、軟エックス線撮影を行い、ImageJ software を用いて下顎骨のセファロ分析を行った。

(4) microCT を用いて、下顎骨の骨梁構造の解析を行った。

(5) 2群間の比較は、student の *t* 検定を用いて行った。

(6) 同側の咬筋浅層中央部から速やかに miRNA を含む全 RNA を抽出し、Rat miRNA Microarray 8x15K Rel21.0 と SurePrint G3 Rat GE Microarray 8x660K ver2 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)を使用して miRNA と mRNA のマイクロアレイ解析を行った。

(7) Student の *t* 検定で *p* 値が 0.05 未満か

つ Fold change が 1.5 倍以上または - 1.5 倍以下の miRNA と mRNA を抽出した。

(8) 変動 miRNA の標的遺伝子を2種類のオンライン・データベース (TargetScan; <http://www.targetscan.org/miRDB>;

<http://mirdb.org/miRDB/>)で検索し、両方のデータベースとマイクロアレイ解析の結果とが一致する遺伝子を抽出した。

(9) 制御-標的関係にある miRNA-mRNA のシグナル値から Pearson の積率相関係数を求め、負の相関関係を示したペアを抽出した。

(10) 標的遺伝子の生物学的機能をオンライソフトウェア、The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID; <https://david-d.ncifcrf.gov/>) 中の Gene Ontology (GO)で機能解析を行い、血管新生または軟骨形成もしくは両方のタームに属する遺伝子を抽出した。Cytoscape 3.5 (<http://www.cytoscape.org/>)を使用して、これらの条件を満たす miRNA-mRNA ペアの制御ネットワークを構築した。

4. 研究成果

(1) 筋線維の形態計測

SD 群の筋線維の直径と横断面積は HD 群に比べて有意に低値を示した ($p < 0.01$; 図1)。

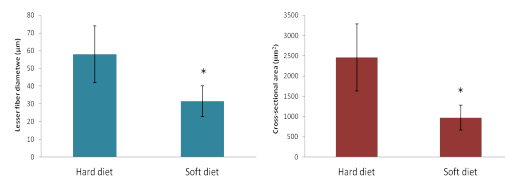


図1 咬筋線維の直径と横断面積

(2) セファロ分析

図2に示す Co-Gn、Co-I1、Go-Mn、Go1-Go2、M1-M2の長さが、SD 群のほうが HD 群に比べて有意に短かった ($p < 0.001$)。

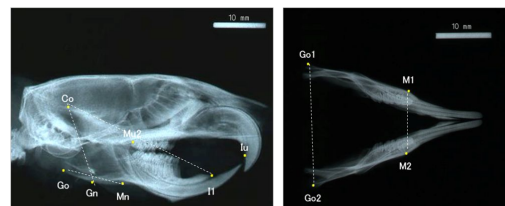


図2 セファログラムの計測点

(3) microCT 解析

SD 群と HD 群における海綿骨量の平均値 ± 標準偏差は、それぞれ 21.24 ± 2.68 (%) と 27.19 ± 3.99 (%), SD 群と HD 群における皮質骨幅の平均値 ± 標準偏差は、 318.77 ± 17.55 (µm) と 437.26 ± 21.08 (µm) で、どちらも SD 群のほうが HD 群に比べて有意に低値を示した ($p < 0.05$; 図3)。

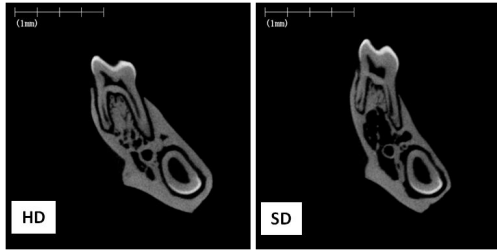


図3 下顎骨のmicroCT画像

(4) マイクロアレイ解析および統合解析
miRNA マイクロアレイ解析では、変動 miRNA として 39 のプローブが抽出され、mRNA のマイクロアレイ解析では、変動 mRNA として 3400 のプローブが抽出された (図 4)。

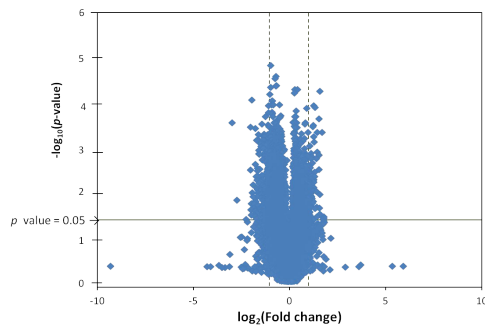


図4 mRNA の volcano plot

2 種のデータベースを用いた統合解析で得られた miRNA-mRNA のペアのうち、負の相関関係が認められたペアは 289 であった。GO 解析により、血管新生または軟骨形成もしくは両方に関連する遺伝子を抽出した結果、すべて下方制御された 12 種の標的 mRNA と 8 種の制御 miRNA が抽出され、全部で 20 の miRNA-mRNA のペアが得られた。

Connective tissue growth factor (Ctgf)、Sulfatase 1 (Sulf1)、Matrix metalloproteinase 14 (Mmp14)、Cysteine rich angiogenic inducer 61 (Cyr61)は、血管新生と軟骨形成の両方に関連していた。Melanogenesis associated transcription factor (Mitf)は、4 種の miRNA に制御されていた。これら 12 種の mRNA を制御する miRNA として 8 種が抽出されたが、特に rno-miR-19b-3p と rno-miR-181c-5p は、それぞれ 5 種の mRNA を制御し、どちらも血管新生と軟骨形成両方の作用を有する遺伝子を制御していることが明らかとなった。(表 1, 図 5)。

表 1 血管新生または軟骨形成に関する miRNA-mRNA

miRNA	Target Gene Symbol	GO analysis (Biological Process)
rno-miR-19b-3p	Rhob	血管新生
	Nrarp	血管新生
	Ctgf	血管新生、軟骨形成
	Inpp4b	骨代謝の制御
	Sulf1	血管内皮細胞増殖因子産生、軟骨形成
rno-miR-30a-5p	Rhob	血管新生
rno-miR-101a-3p	Mitf	骨代謝
rno-miR-101b-3p	Mitf	骨代謝
rno-miR-148b-3p	Meox2	血管新生
	Nrarp	血管新生
	Mitf	骨代謝
rno-miR-181c-5p	Sulf1	血管内皮細胞増殖因子産生、骨・軟骨の形成
	Mmp14	血管新生、骨・軟骨形成
	Prox1	血管内皮細胞の分化・増殖
	Rassf2	骨代謝
rno-miR-218a-5p	Cyr61	血管新生、軟骨形成
	Mitf	骨代謝
rno-miR-410-3p	Prox1	血管内皮細胞の分化・増殖
	Mmp14	血管新生、骨・軟骨形成
	Sox18	血管新生

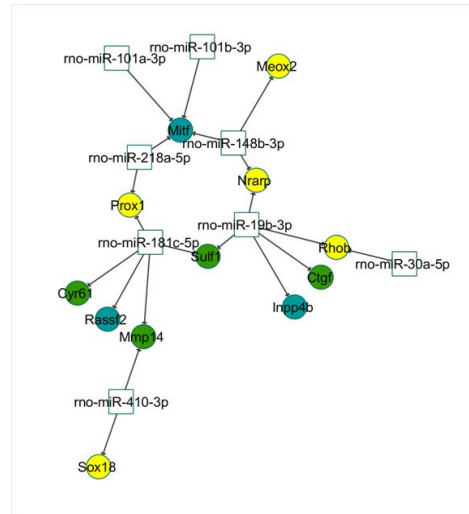


図5 Cytoscape による miRNA-mRNA ネットワーク

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 5 件)

Fujita Y, Goto S, Ichikawa M, Hamaguchi A, Maki K. Effect of dietary calcium deficiency and altered diet hardness on the jawbone growth: a micro-CT and bone histomorphometric study in rats. Arch Oral Biol, 査読有, 2016, 72:200-210.

DOI:10.1016/j.archoralbio.2016.08.036

Fujita Y, Maki K. High-fat diet-induced obesity triggers alveolar bone loss and spontaneous periodontal disease in growing mice.

BMC Obes, 査読有, 2016, 3:1

DOI: 10.1186/s40608-016-0082-8

Goto S, Fujita Y, Hotta M, Sugiyama A, Maki K. Influence of differences in the hardness and calcium content of diets on the growth of craniofacial bone in rats. Angle Orthod, 査読有, 2015, 85: 969-79

DOI: 10.2319/102214-765.1

Saeki K, Fujita Y, Shiono Y, Morimoto Y, Maki K. Pulp revascularization in immature permanent tooth with apical periodontitis using mineral trioxide aggregate. Case Rep Med, 査読有, 2014: 564908

DOI:10.1155/2014/564908

Fujita Y, Maki K. Single-visit revascularization treatment of an immature permanent tooth with apical periodontitis: a case report. Ped Dent J, 査読有, 2013, 23: 57-61

〔学会発表〕(計3件)

藤田優子、後藤翔太、市川舞佳、濱口絢子、牧 憲司 咀嚼力低下による萎縮を伴ったラット咬筋における microRNA 発現解析と標的遺伝子の探索 (平成 28 年 10 月 30 日 第 34 回日本小児歯科学会九州地方会大会 宮崎)

藤田優子 骨代謝に影響を及ぼす栄養と食習慣に関する研究 (平成 29 年 3 月 12 日, 平成 28 年度第 2 回北九州小児歯科臨床研究会 北九州)

藤田優子 骨代謝に影響を及ぼす栄養と食習慣に関する研究 (平成 29 年 5 月 26 日 第 55 回日本小児歯科学会大会小児歯科学会学術賞 Lion Award 受賞記念講演 北九州)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 優子 (FUJITA, Yuko)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号: 90514670