

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861792

研究課題名(和文) 機械的刺激による下顎頭軟骨細胞分化を制御するmicroRNAの解明

研究課題名(英文) Research for microRNAs that regulate chondrogenesis in condylar cartilage under mechanical stress

研究代表者

星 健治 (Hoshi, Kenji)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90569964

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)： 間葉系幹細胞に対するメカニカルストレス負荷に伴う軟骨細胞への分化についてmicro RNA (miRNA)に着目し検討した。

胎生期マウス下顎頭より間葉系幹細胞を単離し、伸展力負荷を行った。負荷時間は3時間、1日間、2日間とした。伸展力負荷に伴い発現が変動し、軟骨関連遺伝子をターゲットとするmiRNAをマイクロアレイ法により検討した。その結果、Col2aやSox9をターゲットとする、miR-134-5p、152-3p、29a-3p、431-5p、145a-5p、342-3p、125a-3pなどの発現が上昇することがわかった。

研究成果の概要(英文)： We examined the chondrogenesis of mesenchymal stem cells under mechanical stress, focusing on micro RNAs (miRNA). Mesenchymal stem cells derived from fetal mouse condylar cartilages were seeded on a culture device that can apply tensile stress. We loaded tensile stress for 3 hours, 1 day and 2 days. After the application of tensile stress, microarray analysis was performed to detect miRNAs whose expression levels were characteristically changed. We also examined whether the detected miRNAs target chondrogenic marker genes. According to this analysis, the expression levels of miR-134-5p, 152-3p, 29a-3p, 431-5p, 145a-5p, 342-3p and 125a-3p were increased in loaded groups compared with control groups. These miRNAs were found to target Col2a or Sox9.

研究分野： 歯科矯正学

キーワード： 軟骨細胞 メカニカルストレス microRNA

1. 研究開始当初の背景

下顎頭軟骨は下顎骨の成長の重要な拠点である。成長期の矯正歯科治療では、矯正力による下顎頭軟骨の成長の制御が試みられてきた。しかし、軟骨組織の機械的刺激に対する応答機構や、成長発育の分子メカニズムの多くが不明であるため、人為的な制御は困難であった。申請者等はこれまで、ラットの下顎頭軟骨が機械的伸展刺激により分化抑制を受けることを報告した。

下顎頭軟骨には、線維層、増殖細胞層、移行細胞層、成熟軟骨細胞層、肥大軟骨細胞層といくつかの層構造を有する。そのうち増殖細胞層は、間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell: MSC) に富み、ここでの増殖と分化により下顎頭軟骨の細胞分化が進むと考えられている。また、それぞれの細胞層では特徴的な細胞外基質が分泌されており、各分化段階の細胞が種々の成長因子を発現し、相互に細胞分化に影響を与え合っている。こうしたタンパク質の合成・分泌の制御に影響を与える因子として本研究では microRNA (miRNA) を考えた。

近年、多くの種類の細胞において、その分化や増殖に miRNA が関与することが示されている。しかし、軟骨細胞の分化に対する miRNA の関わりについての報告は少なく、特に、機械的刺激下での軟骨細胞分化について miRNA に着目し検討した報告はない。こうした検討は、これまで不明な点が多かった機械的刺激の負荷に伴う軟骨組織の分化メカニズムの解明に寄与し、これまで困難であった成長期の矯正歯科治療における下顎頭軟骨成長の制御へと繋がると考えられる。

2. 研究の目的

下顎頭軟骨における機械的刺激の負荷に伴う間葉系幹細胞の軟骨細胞分化制御のメカニズムについて miRNA に着目し検討することとした。

3. 研究の方法

胎生期マウス下顎頭由来間葉系幹細胞に対する伸展力負荷培養系の確立

胎齢 14 日の ICR マウス胎仔下顎頭より MSC を単離、回収した。得られた細胞を用いて 10% FBS 含有 DMEM 中でスポットマイクロマスカルチャーを行った。この培養細胞に対し、伸展力負荷を行った。細胞はシリコンゴム製の底面を培養ウェルに持つ培養プレートに播種した。伸展力負荷方法は、培養ウェル底面に凸面を形成し、細胞に伸展力を負荷するものとした (図 1)。

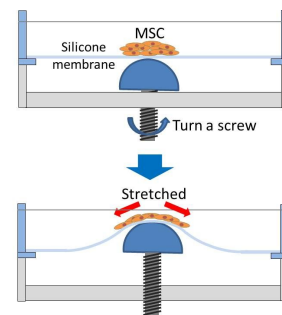


図1. メカニカルストレス負荷培養装置 (伸展力負荷)

この培養系における細胞密度、伸展力の大きさ、伸展力負荷開始の適切なタイミング、負荷時間を検討した。培養ウェルに生じる伸展力の大きさ (伸展歪みの大きさ) を有限要素解析により検討した (図 2)。また MSC の軟骨細胞分化の変化の検討をアルシアンブルー染色により行った。

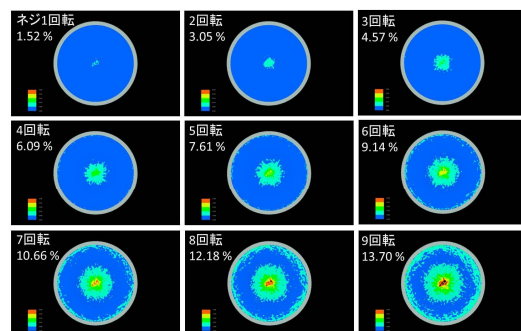


図2. 伸展力負荷時に培養ウェルに生じる伸展歪みの大きさと分布の有限要素解析

マイクロアレイ解析

により検討された培養条件のもと伸展力負荷を行った。伸展力負荷後、miRNA を含め total RNA を回収し、マイクロアレイ解析

を行った。伸展力負荷に伴い発現が変動する miRNA を抽出した。対照群との比較で、シグナル値が 2 倍以上変化するものを抽出した。ただし、また、それら miRNA のうち、軟骨関連遺伝子 Col2a、Sox9 をターゲットとする miRNA を、データベースを用いて検索した。

4. 研究成果

伸展力負荷培養系

細胞密度は、 4×10^6 個/ml とした。伸展力の大きさは、マイクロマスカルチャーを行った MSC において、ノジュール形成の低下を認めた 10.7% とした (図 3)。

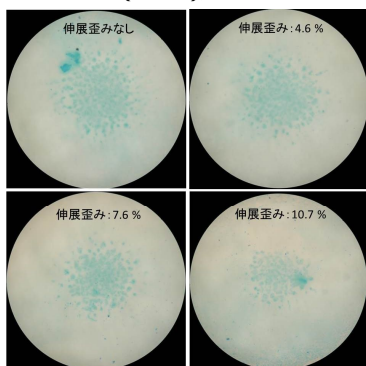


図3. 伸展力負荷に伴うMSCの軟骨細胞分化の変化(アルシアンブルー染色)

伸展力負荷時間は 3 時間、1 日間、2 日間とした。

伸展力負荷に伴い下顎頭由来 MSC 中で発現が変動する miRNA の探索

3 時間負荷を行った群では、4 個の miRNA の発現が対照群と比べ 2 倍以上に上昇し、5 個 miRNA の発現が 2 倍以上に減少した。これらの miRNA のうち、Col2a の発現を制御する miRNA はデータベースより検出されなかった。

1 日間負荷を行った群では、19 個の miRNA の発現が上昇し、4 個の miRNA の発現が減少した。これらの miRNA のうち、Col2a をターゲットとする miR-134-5p の発現が上昇した。

2 日間負荷を行った群では、29 個の miRNA の発現が上昇し、6 個の miRNA の発現が減少した。これら miRNA のうち、Col2a をターゲットとする miR-134-5p, 152-3p の発現が上昇した。

3 時間伸展力負荷を行った群と、1 日間伸展力負荷を行った群の比較では、41 個の miRNA の発現が上昇し、9 個の miRNA の発現が減少した。これらの miRNA のうち、Col2a をターゲット遺伝子とする miR-152-3p, 29a-3p, 431-5p, 342-3p は、その発現を上昇させた。これらのうち miR-29a-3p は、軟骨分化関連遺伝子である Dlx5 もターゲットとすることがデータベースよりわかった。一方、Sox9 をターゲットとする miR-145a-5p, 125a-3p の発現も上昇した。

1 日間伸展力負荷を行った群と、2 日間伸展力負荷を行った群の比較では、4 個の miRNA の発現が上昇し、7 個の miRNA の発現が減少した。これらの miRNA のうち、Col2a をターゲットとする miR-152-3p の発現が上昇した。

今回、培養系の検討に多くの時間を要し、当初計画していた miRNA 導入下での実験系を進めることができなかった。今後、マイクロアレイ解析より抽出された miRNA の発現の変化をリアルタイム PCR 法により検討し、実際の発現の変動の状況を確認する。さらに、遺伝子導入の実験系により間葉系幹細胞の軟骨細胞への分化や増殖に与える影響を検討する予定である。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

・竹下信郎、佐々木紀代、星健治、川木晴美、長谷川正和、山本照子 CCN2/CTGF は *in vivo* の機械的刺激に対する初期反応において縫合細胞の血管内皮細胞分化と骨細胞のアポトーシスを誘導する 第 7 回日本 CCN ファミリー研究会、ポスター、2015 年 8 月 29 日、岡山

・星健治、三木洋一郎、五百井秀樹、北原亨、
高橋一郎 九州大学歯学部歯科矯正学実
習におけるチーム基盤型学習法（TBL） 第
11 回九州矯正歯科学会学術大会、ポスター、
2016 年 2 月 6-7 日、福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔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

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星 健治 (HOSHI KENJI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90569964

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：