

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11376

研究課題名(和文) 歯根膜細胞の各メカニカルストレス反応におけるmicro RNAが果たす役割の解析

研究課題名(英文) Elucidation of the microRNA-mediated control of the alveolar bone metabolism by PDL cells under each mechanical stresses

研究代表者

野田 晃司 (Noda, Koji)

鶴見大学・歯学部・臨床教授

研究者番号：10148059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：矯正学的歯の移動でなぜ圧迫・伸展刺激で骨吸収・骨形成と異なる骨代謝反応が惹起されるかについて明らかとすべく、圧迫・伸展刺激を負荷された歯根膜線維芽細胞セルラインが発現するマイクロRNA(miRNA)について解析を行った。圧迫・伸展刺激では異なるmiRNA発現が誘導された。骨代謝制御に重要な因子であるOPGに着目し、歯根膜線維芽細胞における圧迫・伸展刺激での発現変動と、miRNA発現の関連について解析を行った。その中で、OPGを標的とするmiR-3198がOPG発現変動と逆の変動をし、圧迫・伸展刺激負荷による歯根膜線維芽細胞のOPG発現変動に重要な役割を果たしていることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：We aimed to elucidate the regulatory mechanism of the induction of the different bone metabolisms, bone resorption and bone formation, at the compression and tension side during orthodontic tooth movement. We focused on the microRNA(miRNA), and analysed the expression of miRNA in PDL cells under compression and tension.

We discovered that different miRNAs were upregulated in PDL cells under compression and tension. Then we examined the relationship between the change of OPG expression by different mechanical stresses and the difference of miRNA induction. miRNAs which can target OPG were firstly selected, and we found that miR-3198 was the miRNA which exhibited different change of the expression between compression and tension. miR-3198 and OPG inversely changed by compression and tension. Finally, we confirmed that miR-3198 play a role in the change of OPG expression under compression and tension.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：マイクロRNA メカニカルストレス 歯根膜 矯正学的歯の移動 歯槽骨 歯周組織 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

咬合咀嚼に重要な役割を果たしている歯は歯根膜を介して歯槽骨に支えられており、日常的に咀嚼力が負荷されていても歯槽骨の骨吸収・骨形成バランスが維持されている。歯科矯正治療では歯に持続的機械刺激を負荷して、歯根周囲圧迫側で骨吸収、伸展側で骨形成という部位選択的に骨代謝の変化を生じさせ歯の移動が行われる。臨床的に歯根膜のない状態である骨性癒着歯では歯の移動が起こらないことから、歯根膜細胞は機械刺激感受とその反応制御を受け持つと言われている。

申請者らはその感受機構を解明すべく研究を行ってきた。得られた知見として、*in vitro*において歯根膜細胞が圧迫刺激を受けることで破骨細胞分化因子RANKLの発現を上昇させ破骨細胞分化を促進させること(J Bone Miner Res 2002)、そして伸展刺激負荷ではRANKLの阻害因子であるOPGを産生増加させ破骨細胞分化を抑制すること(J Dent Res 2006)を報告した。これらは歯科矯正臨床で観察される歯根周囲圧迫側での骨吸収促進と伸展側での骨形成促進が惹起され歯の移動が生ずることを分子生物学的に説明しているが、なぜ機械刺激の種類の相違によってこのような細胞反応の相違が生ずるかについては不明であった。機械刺激の感受機構に関して、伸展刺激感受機構・細胞内シグナル伝達についてはいくつか報告が見られるが(Kook *et al.* J Cell Biochem. 2009, Ziegler *et al.* BMC Cell Biol. 2010)、圧縮刺激の機械刺激感受機構・細胞内シグナル伝達ならびになぜ機械刺激の負荷様式によって細胞動態が異なるのか、そしてそれぞれの機械刺激感受機構・細胞内シグナル伝達の相違については報告がない。

近年、micro RNA (miRNA)などの non coding RNA による mRNA 切断・タンパク質への翻訳制御機構が解明され、これまでの DNA RNA タンパク質というセントラルドグマでは説明できなかった生命現象が解明されつつある。さらに、機械刺激による miRNA 発現変化について、植物(ポプラ)において機械刺激負荷に応じて miRNA の発現変化が生じ、このことが機械刺激への適応機構の1つではないかと報告している(The Plant cell, 2005)。さらに哺乳動物細胞においても、血管内皮細胞の機械刺激への反応において、miRNA が重要な役割を果たしていることが報告されている(PNAS. 2011;108:10355-60, Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011;300:H1762-9, BBRC.2010;393:643-8)。加えて miRNA-140 が軟骨分化と軟骨の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが報告された(Genes Dev. 2010 24:1173-85)。

申請者らは予備実験としてヒト歯根膜細胞培養実験系において圧縮刺激(2g/cm²)と伸展刺激(15%伸展)負荷サンプルについて

miRNA(ヒト 723 種)発現プロファイリングを行い次のような結果を得ている。1)圧縮刺激で特異的に変動: 41miRNA、2)伸展刺激で特異的に変動: 11 miRNA、3)圧縮刺激・伸展刺激で共変動: 15miRNA、4)これら miRNA 群には標的候補遺伝子として OPG (miR-135,miR-3198)や M-CSF (miR-1207, miR-939)などを含むものが存在した。これらの結果から、歯根膜細胞が圧縮・伸展刺激によって異なる miRNA を発現し、それによって骨代謝制御因子の発現・産生を変化させている可能性が強く示唆される。以上のことから、歯根膜細胞が機械刺激負荷へ反応する過程において miRNA が重要な役割を果たしていることが予想され、本研究課題を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、歯根膜細胞・骨芽細胞・骨細胞が圧縮力・伸展力などの機械刺激を受けることで micro RNA の発現を変化させ、その変化が骨吸収ならびに骨形成の制御に重要な役割を果たしているとの研究仮説を設定し、その検証を行うべく歯の移動を行ったラット非脱灰凍結連続切片から Laser capture microdissection(LCM)法にて miRNA 発現解析ならびに細胞培養実験にて各細胞へ機械刺激を与えた場合の miRNA の発現変化とそれに伴う細胞動態反応を解析することを研究目的とする。

具体的な specific aim として、下記を設定する。

- (1) 歯の移動時の圧迫側・牽引側における miRNA 発現プロファイリングを行う。
- (2) 組織の miRNA 発現変化プロファイルと細胞培養実験系の結果を比較する。
- (3) 各機械刺激により発現変化が見られた miRNA の機能を、特に機械刺激シグナル伝達における役割について明らかとする。
- (4) 組織における miRNA 発現変化とその役割を明らかとする。

機械刺激による骨代謝バランスの変化を制御する機構にも DNA RNA タンパク質というセントラルドグマでは説明できない機構があり、本研究課題は miRNA の機械刺激受容における役割の解明を探索項目とする点を特徴とする。また機械的刺激負荷に伴う骨代謝制御と miRNA の関連を述べた論文はなく、これを扱う点も本研究の独創的な点として挙げられる。

さらに本研究では機械刺激の種類の相違と、それによる細胞反応の相違を惹起する分子生物学的機構の解明も研究目的として設定しており、その点も本研究の特色の一つである。

本研究遂行により、圧縮刺激により発現が変化する miRNA 群(A 群) 伸展刺激により発現が変化する miRNA 群(B 群)が明らかとなる計画である。それによって、A 群・B 群に共通の miRNA を機械刺激による共通変

動 miRNA (C 群) として定義することができ、(AC) は圧縮刺激により特異的に変動する miRNA、(B-C) は伸展刺激により特異的に変動する miRNA と考えることができる。歯科矯正治療における部位選択的骨代謝制御を考えた場合、圧縮刺激部位での骨吸収、伸展刺激部位での骨形成促進が観察されることから、上述の (A-C) 群は破骨細胞活性化と関連し、(B-C) 群は骨形成促進と関連することが示唆される。

よってこれら miRNA が骨粗鬆症・慢性関節リウマチ・歯周病などの骨疾患のリスク診断などに将来的に応用できることも考えられる。さらには骨代謝制御の分子標的薬の創薬ターゲットとなる可能性も考えられ、国民の健康増進に大きな貢献を果たせるものと考えている。

さらにこれら miRNA 群について knockdown, transfection 実験を行うことで、実際に各機械刺激受容において重要な役割を果たしている miRNA を特定することができ、機械刺激による骨代謝制御機構における miRNA の果たす役割を解明することができるかと予測している。このことは力学的負荷によって生ずる miRNA 発現変化と、それによる健康的な骨組織維持機構を解明することができることを意味すると思われる。

3. 研究の方法

【研究の概要】

本研究では、specificaim として下記3点を設定し研究を進めた。

(1) 培養ヒト歯根膜線維芽細胞セルラインへの圧迫・牽引刺激における miRNA 発現プロファイリング。

(2) 各機械刺激により発現変化が見られた miRNA の機能解析。

(3) 探索候補 miRNA のうち、骨代謝関連サイトカインなどを標的候補とする miRNA について機能解析。

【具体的な研究方法】

(1) 培養ヒト歯根膜線維芽細胞セルラインへの圧迫・牽引刺激における miRNA 発現プロファイリング。

ヒト不死化歯根膜線維芽細胞セルライン (HPL cells) へ、圧迫刺激 (2g/cm²) 伸展刺激 (15%-elongation, 1s stretch, 1s relax) を負荷 24h 後に miRNA を含んだ total RNA を NucleoSpin miRNA を用いて抽出した。つぎにアジレント社 Rat miRNA マイクロアレイ Rel.16.0 にて miRNA 発現プロファイリングを行う。コントロールと比較して各プローブスポットの Quality flag がどちらか一方が Good で、かつ発現変化量が 2 倍以上のものを変動有りとして判断した。

2 倍以上の変動が観察された miRNA についてその発現変動をリアルタイム PCR にて再確認を行った。具体的には、成熟型 micro RNA へ poly A tail を付加後、3'-degenerate anchor と 5'-universal tag 付 poly T プラ

イマーを用いて cDNA を合成し、その cDNA をテンプレートとして各 micro RNA 特異的プライマーを用いてリアルタイム PCR を行いインカレーター法 (EvaGreen) にて amplicon の増幅を検出した。

(2) 各機械刺激により発現変化が見られた miRNA の機能解析。

miRNA アレイにて変動がみられる miRNA のうち、miRNA 標的遺伝子データベース (miRBase) で標的遺伝子候補として骨代謝関連遺伝子があるものを選択し、miRNA アレイを用いた網羅的発現解析で得られた結果をリアルタイム PCR 法にて再確認を行った。

(3) 探索候補 miRNA のうち、骨代謝関連サイトカインなどを標的候補とする miRNA について機能解析。

候補として選択した miRNA についてその機能を文献的に検索した。あらかじめ骨代謝関連サイトカインの発現変化などに関連した miRNA が探索候補に含まれていたため、それらについて優先的に機能解析を行った。

さらに機械的刺激感受機構と酸化ストレスとの関連を示唆するデータが得られたため、破骨細胞分化と酸化ストレスとの関連について研究を遂行した。

4. 研究成果

(1) ヒト歯根膜線維芽細胞セルラインへのメカニカルストレス負荷で変動した miRNA について

圧迫刺激・伸展刺激どちらでも発現が上昇した miRNA として、miR-1268, -3648, -642b, -135a が観察された。圧迫刺激で上昇する miRNA として、miR-572, -663, -575, -3679-5p, UL70-3p, -3198 が観察された。伸展刺激で上昇した miRNA は、miR-376a であった。

これらのことから、miRNA の中にはメカニカルストレスの種類にかかわらず発現が上昇するものもあるが、いくつかの miRNA はそれぞれのメカニカルストレス特異的に発現が変動することが明らかとなった。

(2) OPG を標的とする miRNA はメカニカルストレスで変動した。

次に申請者らは、矯正学的歯の移動時の歯槽骨骨代謝に深く関わっている OPG 発現に關与する miRNA が、歯根膜線維芽細胞セルラインへのメカニカルストレス負荷でどのように発現変動するかについて調査を行った。

miRNA の標的遺伝子データベース (microRNA.org と、miRDB.org) を用いて、OPG を標的とする miRNA トップ 50 を探索したところ、どちらのデータベースにも載っている miRNA が 22 個あった。

この 22miRNA のうち、miRNA アレイ解析で変動が見られた miRNA と重複しているものは、miR-3198 のみであった。

これらのことから、miR-3198 がメカニカル

ストレス負荷による OPG 発現変動に関わることを示唆された。

(3) OPG と miR-3198 発現は圧迫・伸展刺激で逆の変動を示した。

歯根膜線維芽細胞セルラインへの圧迫・伸展刺激で OPG と miR-3198 発現がどのような変動パターンを示すのか、realtime-RT-PCR で計測した。OPG 発現は圧迫刺激により減少し、伸展刺激で増加していた。しかしながら miR-3198 発現は圧迫刺激で増加し、伸展刺激で減少していた。

(4) miR-3198 の gain of function、loss of function 実験

次に、OPG 発現変動と miR-3198 発現変動との関連をさらに探索すべく、miR-3198 mimic 過剰発現系を用いた gain of function 実験、および miR-3198 inhibitor 過剰発現系を用いた loss of function 実験を行った。各過剰発現により miR-3198 の十分な発現変動を確認した後、OPG 発現について mRNA およびタンパク質レベルで確認を行った。

miR-3198 mimic 過剰発現で miR-3198 発現が増加すると、OPG は減少した。逆に、miR-3198 inhibitor 過剰発現で miR-3198 発現が減少すると、OPG は増加した。

これらのことから、miR-3198 が歯根膜線維芽細胞の OPG 発現を負に制御していることが示唆された。

(5) miR-3198 はメカニカルストレス負荷による OPG 発現変動を制御している。

最後に、メカニカルストレス負荷による miR-3198 変動がメカニカルストレス負荷による OPG 発現変動に関わるかどうかを探索した。

圧迫刺激時に miR-3198 発現を人為的に減少させたところ、圧迫刺激による OPG 発現減少は阻止された。

逆に、伸展刺激時に miR-3198 発現を人為的に増加させたところ、伸展刺激による OPG 発現増加は阻止された。

これらのことから、miR-3198 はメカニカルストレス負荷による OPG 発現変動を制御し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6件)

Yamaguchi Y, Kanzaki H, Katsumata Y, Itohiya K, Fukaya S, Miyamoto Y, Narimiya T, Wada S, Nakamura Y. 2018. **Dimethyl fumarate inhibits osteoclasts via attenuation of reactive oxygen species signalling by augmented antioxidant.** J Cell Mol Med. 22(2):1138-1147. 査読有 DOI: 10.1111/jcmm.13367

Fukaya S, Kanzaki H, Miyamoto Y, Yamaguchi Y, Nakamura Y. 2017. **Possible alternative treatment for mandibular asymmetry by local unilateral igf-1 injection into the mandibular condylar cavity: Experimental study in mice.** American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics. 152(6):820-829. 査読有 DOI: 10.1016/j.ajodo.2017.05.023

Kanzaki H, Shinohara F, Itohiya K, Yamaguchi Y, Katsumata Y, Matsuzawa M, Fukaya S, Miyamoto Y, Wada S, Nakamura Y. 2017. **Rank1 induces bcl2 nuclear import and attenuates nrf2-mediated antioxidant enzymes, thereby augmenting intracellular reactive oxygen species signaling and osteoclastogenesis in mice.** The FASEB Journal. 31(2):781-792. 査読有 DOI: 10.1096/fj.201600826R

Miyamoto Y, Kanzaki H, Wada S, Tsuruoka S, Itohiya K, Kumagai K, Hamada Y, Nakamura Y. 2017. **Asporin stably expressed in the surface layer of mandibular condylar cartilage and augmented in the deeper layer with age.** Bone reports. 7:41-50. 査読有 DOI: 10.1016/j.bonr.2017.07.002

Narimiya T, Wada S, Kanzaki H, Ishikawa M, Tsuge A, Yamaguchi Y, Nakamura Y. 2017. **Orthodontic tensile strain induces angiogenesis via type iv collagen degradation by matrix metalloproteinase-12.** Journal of periodontal research. 52(5):842-852. 査読有 DOI: 10.1111/jre.12453

Wada S, Kanzaki H, Narimiya T, Nakamura Y. 2017. **Novel device for application of continuous mechanical tensile strain to mammalian cells.** Biology Open. 6(4):518-524. 査読有 DOI: 10.1242/bio.023671

Itohiya K, Kanzaki H, Ishikawa M, Wada S, Miyamoto Y, Narimiya T, Nakamura Y. 2016. **Occlusal hypofunction mediates alveolar bone apposition via relative augmentation of TGF- β signaling by decreased Asporin production in rats.** Dental, Oral and Craniofacial Research. 3:1-8. 査読有 DOI: 10.15761/DOCR.1000192

Kanzaki H, Shinohara F, Itohiya K, Yamaguchi Y, Fukaya S, Miyamoto Y, Wada S, Nakamura Y. 2016. **Molecular regulatory mechanisms of osteoclastogenesis through cytoprotective enzymes.** Redox Biol. 8:186-191. 査読有 DOI: 10.1016/j.redox.2016.01.006

〔学会発表〕(計1件)

菅崎弘幸、中村芳樹矯正学的歯の移動と
HMGB1 アップデートシンポジウム5「核内タ
ンパク質 HMGB1」2017年歯科基礎医学会学術
大会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野田 晃司 (NODA, Koji)
鶴見大学・歯学部・臨床教授
研究者番号：10148059

(2) 研究分担者

宮本 豊 (MIYAMOTO, Yutaka)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号：00633588

和田 悟史 (WADA, Satoshi)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号：20581119

菅崎 弘幸 (KANZAKI, Hiroyuki)
鶴見大学・歯学部・准教授
研究者番号：30333826

石川 美佐緒 (ISHIKAWA, Misao)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号：90582445

中村 芳樹 (NAKAMURA, Yoshiki)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：10097321