

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32710

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K21026

研究課題名（和文）Myo-inositolに代わる下顎骨特異的成長促進効果を示す構造異性体の同定

研究課題名（英文）Exploration of the structural isomer of myo-inositol which exhibit specific augmentation of mandibular endochondral growth

研究代表者

遠山 俊之介（tohyama, syunnosuke）

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号：10908940

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、Myo-inositolが軟骨分化に与える影響を明らかにするため、マウス由来の軟骨分化能を持つATDC5細胞を用いた培養実験を行った。細胞は 対照群（control）、陽性対照群（BMP4群）、実験群（Myo-inositol群）の3群に分け、軟骨分化の指標として軟骨分化の最終マーカーであるCol の発現を比較した。その結果、Myo-inositolを添加した実験群において、ATDC5細胞の軟骨分化が有意に増強されることが確認された。このことから、Myo-inositolは下顎の成長を促進するだけでなく、軟骨の恒常性維持にも有益であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、Myo-inositolが軟骨細胞の分化を促進する能力を持つことを明らかにし、特にATDC5細胞におけるSox9の増強を通じてその効果を示した。これにより、Myo-inositolが下顎の成長を促進し、軟骨の恒常性を維持するための作用があることが示唆された。Pik3CDを介した細胞内シグナル伝達の理解を深め、軟骨形成メカニズムの新たな知見になる。将来的な臨床応用にMyo-inositolのサプリメントとしての可能性が示され、下顎後退症に対し新しい治療を提供することが期待される。今後の研究で、さらに詳細な作用機序が明らかになれば、より効果的な治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, to elucidate the effects of myo-inositol on cartilage differentiation, we conducted culture experiments using ATDC5 cells, which have cartilage differentiation potential and are derived from mice. The cells were divided into three groups: (1) control group, (2) positive control group (BMP4 group), and (3) experimental group (myo-inositol group). The expression of ColX, a terminal marker of cartilage differentiation, was compared among these groups. As a result, it was confirmed that cartilage differentiation of ATDC5 cells was significantly enhanced in the experimental group with the addition of myo-inositol. This suggests that myo-inositol not only promotes mandibular growth but is also beneficial for maintaining cartilage homeostasis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Myo-inositol 下顎骨特異的成長

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初の背景

骨格性下顎後退症は、下顎骨の成長が不十分であることが原因で引き起こされる場合がある。この症状は、さまざまな問題を引き起こすことが知られている。例えば、気道狭窄による呼吸困難、顎関節への過度の負担による顎関節疾患のリスク上昇、咀嚼機能の低下、転倒による上顎前歯の外傷、顎顔面領域の変形や変位に伴う形態的かつ審美的な問題などである (J Dent Res 2020;99:26-35)。これらの問題は、患者の QOL を大きく低下させるだけでなく、社会生活にも支障をきたす可能性がある。したがって、骨格性下顎後退症に対する効果的な治療法の確立は、歯科医学における重要な課題の一つであると言える。

現在、成長期における下顎骨の成長促進を目的として、機能的顎矯正装置が広く用いられている。この装置は、下顎骨の前方移動を促すことで、下顎骨の成長を促進するものである。しかしながら、機能的顎装置による下顎骨成長促進効果は、短期的には認められるものの、長期的な安定性に課題があることも報告されている (日本矯正歯科学会矯正歯科診療のガイドライン上顎前突編)。この問題は、装置の装着を中断した後に、下顎骨が後戻りするためであると考えられている。したがって、臨床的に予知性が高く、長期的な効果が安定している成長期における下顎骨の成長促進法の開発が望まれている。

下顎骨を選択的に成長促進させる方法として、動物実験レベルではサイトカイン投与が下顎骨成長を促進するという報告がある (AJODO 2017;152:820-29)。サイトカインは、細胞間のシグナル伝達に関与するタンパク質であり、骨代謝においても重要な役割を果たしていることが知られている。しかし、サイトカイン投与による下顎骨成長促進法には、いくつかの課題がある。例えば、頻回投与の必要性や、全身投与した場合の腫瘍細胞増殖促進などの副作用の懸念、局所投与する場合の顎関節腔への刺入の必要性などである。これらの問題は、臨床応用を考えた場合には大きなハードルとなっている。

研究代表者らは、成長期マウスへの Myo-inositol 栄養補給が下顎頭軟骨の特異的成長促進を可能にすることを明らかにした (Bone 2019;121:181-90)。Myo-inositol は、イノシトール的一种であり、細胞膜の構成成分として知られている。研究代表者らは、Myo-inositol 代謝に関与する酵素 Pik3cd が下顎頭軟骨に特異的に高発現していることを見出し、この酵素の活性化が Myo-inositol による下顎頭軟骨の成長促進効果に関与していることを示唆した。これらの結果から、Myo-inositol 栄養補給が成長期骨格性下顎後退症への新規治療法となりうることを期待されている。

Inositol には8つの構造異性体が存在することが知られている。その中でも、Chiro-inositol は多嚢胞性卵巣症候群への治療効果が報告されており (N Engl J Med. 1999;340:1314-20)、myo-inositol 以外の inositol 構造異性体が特異的な下顎骨成長促進効果を示す可能性も推察されるが、詳細についてはほとんど明らかになっていない。Inositol 構造異性体は、それぞれ固有の生理活性を有していることが知られており、下顎骨成長促進効果についても、各異性体で異なる可能性がある。したがって、各構造異性体の効果や作用メカニズムについて、さらなる研究が必要とされている。特に、臨床応用を見据えた場合、安全性や副作用についての検討も重要な課題となる。

2. 研究の目的

近年、骨格性下顎後退症に対する新たな治療法の開発が求められていた。本研究課題では、Myo-inositol による下顎骨成長促進効果に着目し、より効果的かつ安全な治療法の確立を目指した。具体的には、以下の2点を主要な目的とした。

(1) Inositol 構造異性体間における下顎骨成長促進効果の比較検討

Inositol は8つの構造異性体を有しており、それぞれが固有の生理活性を示すことが知られていた。本研究では、各構造異性体がもたらす下顎骨成長促進効果を比較し、最も高い効果を示す異性体を同定することを目的とした。この知見は、より効果的な治療法の開発に寄

与すると期待される。

(2) Inositol 構造異性体の下顎骨特異的成長促進効果の検証

Myo-inositol は下顎頭軟骨に特異的な成長促進効果を示すことが明らかになっていたが、他の構造異性体についてはその特異性が不明であった。本研究では、各構造異性体が下顎骨に特異的な成長促進効果を示すかどうかを検証することを目的とした。下顎骨特異的な効果が確認された場合、全身的な副作用のリスクを低減した治療法の開発につながると期待される。

これらの目的を達成するため、本研究では、*in vivo* および *in vitro* の両面からアプローチを行った。*In vivo* では、成長期マウスを用いて各構造異性体の経口投与による下顎骨成長促進効果を評価した。*In vitro* では、下顎頭軟骨由来細胞を用いて、各構造異性体が細胞増殖や分化に与える影響を解析した。さらに、構造異性体の作用メカニズムについても、分子生物学的手法を用いて探索した。

本研究の成果は、骨格性下顎後退症に対する新たな治療法の開発に大きく貢献すると期待される。また、Inositol 構造異性体の生理活性に関する基礎的知見の蓄積にも寄与すると考えられた。将来的には、本研究で得られた知見を基盤として、臨床応用に向けた translational research へと発展させることを目指して研究を遂行した。

3. 研究の方法

本研究では、Myo-inositol が軟骨分化に与える影響とそのタイミングを明らかにするとともに、*in vivo* における下顎骨成長促進効果を検証するために、以下の実験を行った。

(1) ATDC5 細胞を用いた培養実験

軟骨分化能を有するマウス ATDC5 細胞を用いて、control 群、positive control 群 (BMP4 群: BMP4 100 ng/mL, FUJIFILM Wako Chemicals, Tokyo, Japan)、実験群 (Myo-inositol 群: Myo-inositol 100 μ M, FUJIFILM Wako Chemicals, Tokyo, Japan) の 3 群に分けて培養実験を行った。ATDC5 細胞は、L-グルタミンおよびピルビン酸ナトリウムを含む DMEM/Ham's F-12 培地で培養し、HEPES を含まず、10% の胎牛血清と抗生物質 (ペニシリン 100 U/mL およびストレプトマイシン 100 μ g/mL) を添加した。ATDC5 細胞を用いた理由は、下顎頭軟骨と類似した Pik3CD を発現していることに加え、軟骨分化の各ステージにおける表現型の変化が明確であり、分化メカニズムの解析に適しているためである。細胞は 37 °C、5% CO₂ のインキュベーターで培養し、100 μ M Myo-inositol (Bone 2019;121:181-9) の有無で培養した。培養期間は 5 日間とし、軟骨分化の初期段階である 3 日目と、後期段階である 5 日目で比較を行った。各時点で細胞を回収し、後述する遺伝子発現解析およびタンパク質発現解析に用いた。また、細胞増殖能への影響を評価するために、各群の細胞数を経時的に測定した。

(2) 軟骨分化マーカーの発現解析

軟骨分化の指標として、軟骨分化の最終マーカーとして知られている Col の発現を比較した。リアルタイム RT-PCR 法を用いた遺伝子発現解析では、マウスの Col₁、Col₂、SOX9、RPS18 のプライマーシーケンスを用いて実施した。各遺伝子の発現量は、RPS18 を内部標準として用い、Ct 法により相対定量化した。また、各群の発現量を control 群の発現量で除し、fold change を算出した。

タンパクレベルの発現を比較するために、Myo-inositol を含む培地と BMP4 を含む培地で 7 日間培養を行った後、抗 Col10A1 抗体 (1:100, Cloud-clone corp. Wu han, China) を Can Get Signal 溶液に含ませてインキュベートし、PBS-T で洗浄した。続いて、Alexa Fluor 488 標識二次抗体 (1:1000, Abcam, Cambridge, MA) でインキュベートし、再度 PBS-T で洗浄した。核を DAPI (1 μ g/ml, Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO) で染色し、蛍光免疫染色を行った。各群の蛍光強度を測定し、control 群との比較を行った。さらに、Western blot 法を用いて、Col10A1 タンパク質の発現量を定量的に解析した。

(3) *In vivo* における Myo-inositol の効果の検証

In vitro の結果を踏まえ、in vivo における Myo-inositol の下顎骨成長促進効果を検証するために、4 週齢の雄性マウス(C57BL/6J)を用いた。マウスを control 群、Myo-inositol 群(100 mg/kg/day)の 2 群に分け、4 週間の経口投与を行った。投与期間終了後、マイクロ CT を用いて下顎骨の形態学的解析を行った。計測項目は、下顎骨全長、下顎枝高、下顎骨体長、下顎頭長とし、各群の平均値を算出した。また、下顎頭軟骨における軟骨分化マーカーの発現を免疫組織化学的に評価した。下顎頭軟骨を摘出し、パラフィン包埋後、連続切片を作製した。切片は、抗 Col10A1 抗体(1:100)、抗 Sox9 抗体(1:100)、抗 Col2a1 抗体(1:100)を用いて免疫染色を行い、陽性細胞数を計測した。さらに、in situ hybridization 法を用いて、各軟骨分化マーカーの mRNA 発現を可視化し、その局在を比較した。

これらの実験により、Myo-inositol が軟骨分化に与える影響とそのタイミング、および in vivo における下顎骨成長促進効果を多角的に解析した。

4. 研究成果

本研究では、Myo-inositol が軟骨細胞分化に与える影響を、遺伝子発現およびタンパク質発現の両面から多角的に解析した。以下に、得られた主要な結果について詳述する。

(1) リアルタイム RT-PCR 法を用いた遺伝子発現解析結果

リアルタイム RT-PCR 解析により、Myo-inositol が軟骨細胞分化マーカーの mRNA レベルでの発現を増強することが明らかになった(図 1)。特に、軟骨細胞分化の初期段階において重要な転写因子として知られる Sox9 は、Myo-inositol 添加により、BMP4 刺激と同程度に 3 日目で発現が増強された。Sox9 は、軟骨細胞の主要な細胞外マトリックス成分である Col II の発現を直接的に制御することが知られており、本研究の結果は、Myo-inositol が Sox9 の発現増強を介して Col II の発現を促進する可能性を示唆している。実際に、Col II の mRNA 発現も、Myo-inositol 添加によって 3 日目で増強されたが、その程度は BMP4 群よりも低かった。この結果は、Myo-inositol による Col II の発現増強作用が BMP4 ほど強くないことを示しているが、Sox9 の発現増強と同様の傾向を示したことから、両者の作用機序が関連している可能性が考えられる。

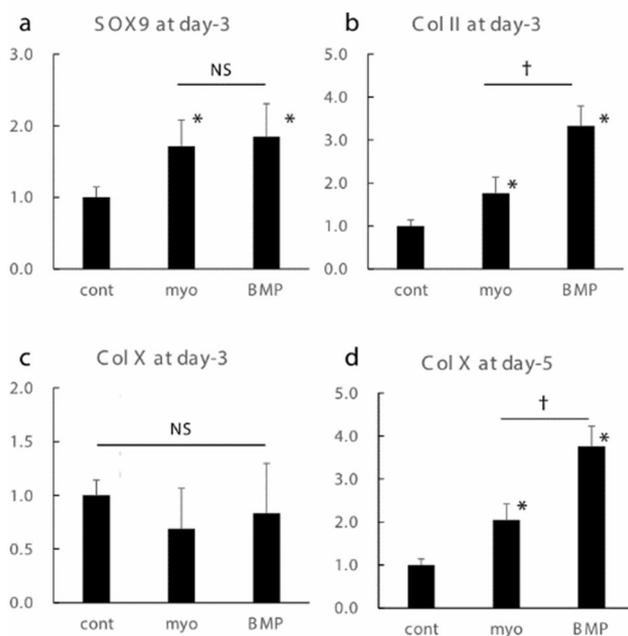


図 1. 軟骨細胞分化マーカーのリアルタイム RT-PCR

一方、軟骨細胞の終末分化マーカー

として知られる Col X の mRNA 発現は、3 日目ではいずれの群においても安定して低く保たれていたが、5 日目には Myo-inositol 群で有意に高くなった。Col X は、軟骨細胞の肥大化に伴って発現が増加することが知られており、本研究の結果は、Myo-inositol が軟骨細胞の終末分化を促進する作用を有することを示唆している。また、Col X の発現増強が 5 日目で認められたことから、Myo-inositol の作用は軟骨細胞分化の後期段階において特に顕著であることが示された。

以上の結果から、Myo-inositol は BMP4 と同様に、軟骨細胞分化の各ステージにおいて重要な役割を果たす因子の mRNA 発現を増強することが明らかとなった。特に、Sox9 や Col II の発現増強は軟骨細胞分化の初期段階において、Col X の発現増強は後期段階において重要な意義を持つと考えられる。これらの知見は、Myo-inositol が軟骨細胞分化の制御因子として機能する可能性を示唆するものであり、軟骨形成メカニズムの解明に寄与するものと期待される。

(2) タンパクレベルの発現結果

Myo-inositol による軟骨細胞分化促進作用が、タンパク質レベルでも確認されるかどうかを検討するために、Col X の免疫蛍光染色を行った (図 2)。その結果、BMP4 群では7日目において Col X の発現が顕著に増加したが (図 2 c)、Myo-inositol 群でも同様に Col X の発現増強が認められた (図 2 b)。定量的な評価を行うために、各群で 19~22 枚の写真を用いて、観察領域内の Col X 陽性領域の割合を算出したところ、control 群と比較して、Myo-inositol 群と BMP4 群はいずれも Col X 陽性領域の有意な増加を示した (図 2 d)。ただし、BMP4 群における Col X 陽性領域の割合は、Myo-inositol 群よりも統計的に有意に高かった。これらの結果から、Myo-inositol は BMP4 と同様に、軟骨細胞の終末分化マーカーである Col X のタンパク質発現を増強することが明らかとなった。

Col X は、軟骨細胞の肥大化に伴って発現が増加し、軟骨基質の石灰化に重要な役割を果たすことが知られている。本研究において、Myo-inositol が Col X のタンパク質発現を増強したことは、軟骨細胞の終末分化および軟骨基質の石灰化を促進する作用を有することを示唆している。また、遺伝子発現解析の結果と合わせて考えると、Myo-inositol は Col X の mRNA 発現を増強することで、タンパク質レベルでの発現増強に寄与している可能性が考えられる。ただし、BMP4 群と比較して Myo-inositol 群における Col X 発現増強の程度が低かったことから、Myo-inositol の作用は BMP4 ほど強くないことが示された。この結果は、Myo-inositol と BMP4 の作用機序が完全に一致するわけではなく、それぞれ固有の制御メカニズムを有している可能性を示唆している。

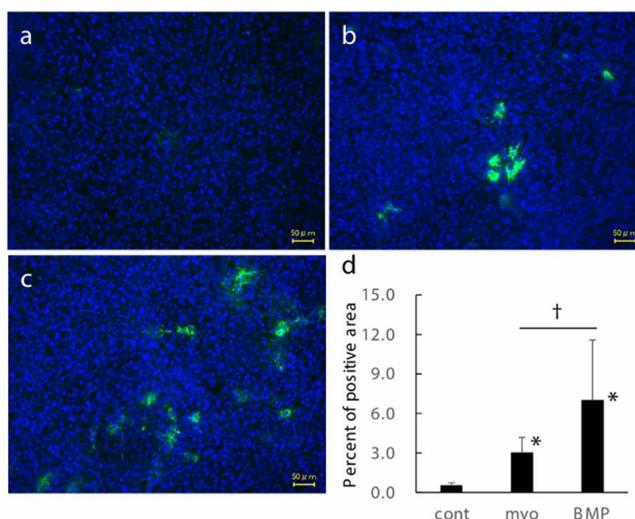


図 2. Col X の免疫蛍光分析像と写真陽性領域の割合
control 群(a)、Myo-inositol 群(b)、および BMP4 群(c)
妖精領域割合(d)

以上の遺伝子発現解析および免疫蛍光染色の結果から、Myo-inositol は軟骨細胞分化の各ステージにおいて重要な因子の発現を増強し、特に終末分化マーカーである Col X の発現を促進することが明らかとなった。このことは、Myo-inositol が軟骨細胞の分化を促進し、軟骨組織の形成を促す作用を有することを強く示唆している。本研究の成果は、Myo-inositol が骨格性下顎後退症をはじめとする軟骨形成不全を伴う疾患の新たな治療法開発に繋がる可能性を秘めており、今後のさらなる研究の発展が期待される。特に、Myo-inositol の作用機序の詳細な解明や、in vivo での効果の検証が重要な課題であると考えられる。また、Myo-inositol 以外のイノシトール誘導体の作用や、他の軟骨形成促進因子との相互作用についても検討する必要があるだろう。本研究の知見を基盤として、軟骨再生医療の発展に寄与する新たな知見が得られるものと期待される。

<引用文献>

Syunnosuke Tohyama, Hiroyuki Kanzaki, Misao Ishikawa, Yuta Katsumata, Chihiro Arai¹, Tomomi Ida, Satoshi Wada, Miho Shimoyama, Manase Shugo and Hiroshi Tomonari, Dental, Oral and Maxillofacial Research, Dent Oral Maxillofac Res, 2023 doi: 10.15761/DOMR.1000399、Volume 9

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tohyama Syunosuke, Kanzaki Hiroyuki, Ishikawa Misao, Ishikawa Misao, Katsumata Yuta, Arai Chihiro, Ida Tomomi, Wada Satoshi, Shimoyama Miho, Shugo Manase, Shugo Manase, Tomonari Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Myo-inositol augments chondrocytic differentiation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Dental, Oral and Maxillofacial Research	6. 最初と最後の頁 1と4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15761/DOMR.1000399	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅崎弘幸
2. 発表標題 成長期骨格性下顎後退症へのmyo-inositol 食事補充による内科的な下顎骨特異的成長促進
3. 学会等名 第81回東京矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下山美保、菅崎弘幸、井田知美、真名瀬崇吾、遠山俊之介、勝又裕太、友成博
2. 発表標題 下顎頭軟骨における抗酸化酵素発現低下はエピジェネティックに制御される
3. 学会等名 第82回日本矯正歯科学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------