

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11348

研究課題名(和文) microRNAによる軟骨細胞分化制御の分子メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism of chondrocyte differentiation control by microRNA

研究代表者

二階堂 まりこ(梅田まりこ)(Nikaido, Mariko)

九州大学・大学病院・学術研究員

研究者番号：40707618

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)：Micro RNAは、短鎖noncoding RNAの一つであり、messenger RNAの分解などを介し、様々な細胞の機能や器官の発育を制御する。本研究では、胎生期マウス下顎隆起におけるメッセル軟骨などの一次軟骨、および顎角隆起や下顎頭軟骨などの二次軟骨の発育に対するmiR-200aの果たす役割を検討した。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs are non-coding small RNA molecules that regulate various cellular functions. In this study, we analyzed the function of microRNA-200a during the development of primary and secondary cartilages in the mandible during the embryonic stage.

研究分野：発生学

キーワード：miRNA 下顎頭

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトの顎顔面の形態的バリエーションは、その発生から成長発育の期間を通して形づくられる。矯正歯科治療においては、このバリエーションのうち、重度の骨格的異常を顎変形症として形態学的に診断し、外科的矯正治療の対象とする。しかしながら、この形態診断は成長を終了した個体に対する表現型の診断であり、その原因や発生メカニズムに対しては関心が払われていないのが現状である。したがって、成長期に顎変形症が疑われる症例においては、不確実な診断により非可逆的な侵襲を加えられ、患者の QOL の著しい低下を惹起してしまうことがある。

これらの問題を解決し、成長期の早い時期に診断を可能とするために、顎変形症の表現型を決定づける遺伝的因子の解析が行われてきたが、複数の遺伝子が多因子性に関係し、かつ環境因子と交絡するため、決定的な因子については判明していないのが現状である。そのような中、従来遺伝子の概念を覆す発表がここ 10 年で数々なされてきた。それは、RNA の転写に関するもので、実はゲノムの 70% に相当する広大な領域がいったんは RNA として転写され、従来は 100 個程度しか知られていなかった ncRNA (non coding RNA) が実は 2 万 3000 個以上も存在することが明らかになった[1]。

一方で、長さが 20 ~ 30 塩基の microRNA (miRNA) が「RNA サイレンシング」という現象を通してターゲット遺伝子の発現を抑制していることが明らかにされた。よって、「遺伝子をコードしない領域: non coding DNA」は役に立っていない訳ではなく、miRNA をふくむ ncRNA が転写されることで複雑に生命現象を制御するという考えが受け入れられるようになった。

我々は、顎顔面に表現型が発現すると予測される種々の因子について、表現型とその発現のメカニズムを解析することを目的として、下顎の形態形成のメカニズムを解析してきた。また、近年、タンパク質の合成・mRNA の分解を転写後に制御する microRNA (miRNA) が注目されており、我々は胎齢 14 日のマウス下顎頭の器官培養を用いて、miRNA (miR)-200a が下顎頭軟骨の形態形成に関与することを示した。

[1] The FANTOM Consortium, RIKEN Genome Exploration Research Gro...

### 2. 研究の目的

下顎頭軟骨原基の形成以前の、未分化な間葉細胞が上皮に包まれた状態にある下顎隆起における miR-200a の役割については不明なままである。本研究の目的は、下顎頭軟骨の発生の初期段階である下顎隆起形成期における miR-200a の役割を解明し、miRNA-200a の転写後調節のターゲットを

同定することである。これにより、下顎骨の発生から形態形成に至る分子メカニズムを解明し、下顎頭軟骨の成長制御などを目的とした顎整形治療と顎変形症の発生要因の基盤的知識の蓄積に貢献する。

### 3. 研究の方法

本研究では、下顎のパターン形成や下顎隆起内の軟骨分化における、miR-200a の機能を特定し、ターゲット mRNA を同定することである。miR-200a の機能を解析するため、下顎頭軟骨の発生源である、第一鰓弓由来の下顎隆起全体を研究対象として用い、miR-200a をエレクトロポレーション法にて導入する。導入したことで生じる形態変化の解析を組織学的検索で行う。

また、miR-200a を導入した下顎隆起を 4 群に分け、抗 AGO2 抗体を用いて RIP-Assay を行う。得られた small/Large RNA について免疫沈降法などの生化学的手法によりペアリソ解析を行い、miR-200a のターゲット mRNA を同定する。特定された mRNA の下顎隆起内における発現の局在を in situ hybridization 法にて確認し、また、miR-200a と結合することをより確認する。

1) 下顎隆起器官培養系への遺伝子導入系の確立 胎齢 10 日齢マウス胎仔の下顎隆起を摘出し、ミリポアメンブレン上に静置する。改良型 Trowell 法により、5% CO<sub>2</sub> 37 °C において 100U ペニシリン・ストレプトマイシンと 100 mg/mL アスコルビン酸を添加した無血清 BGJb 培地にて器官培養を行う。miR-200a の機能を解析するために、150nM miR-200a miScript miRNA mimic で miR-200a を導入し過剰発現、150nM Anti-mmu-miR-200a miScript miRNA Inhibitor を導入して miR-200a の機能抑制をおこなう。コントロールとして蛍光標識陰性コントロール (AllStars negative control siRNA Labeling with Alexa Fluor 488) を使用して、確実に使用薬剤が導入されているかどうか確認する。それぞれの薬剤は実体顕微鏡下にてマイクロインジェクションし、生理食塩水内でエレクトロポレーションを行う。下顎隆起の右側に導入し、左側をコントロール側とする。

2) miR-200a 導入による組織構造の変化の確認

1) アルシアンブルー染色 メッケル軟骨および下顎頭軟骨の形態を観察するために、器官培養のホールマウントアルシアンブルー染色を行う。0.04% アルシアンブルー 8GX 酢酸エタノールで染色後、1% 水酸化カリウム・グリセリン混合液に浸漬し、透明化を行う。2) 免疫染色 培養器官をパラフィン包埋後の水平断連続切片を作製する。一次抗体は 0.05% ウシ血

清入り PBS にて希釈した rabbit anti-type I, II, X collagen 抗体、mouse anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) 抗体を使用する。二次抗体は 0.01M PBS にて希釈した IgG Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rabbit を用いて行う。

3) 軟骨特異的遺伝子発現の検討 培養 9 日目の下顎隆起を図 4 に示すように 4 群に分け、Total RNA を抽出し、軟骨特異的遺伝子 (Col2a1 および Sox9) について定量的 RT-PCR により検討する。

#### 4. 研究成果

下顎隆起における miR-200a の発現量は胎齢 9 日から 14 日にかけて徐々に増加した。また、胎齢 13 日の下顎隆起では、メッケル軟骨、下顎骨、歯胚に高発現を認め、胎齢 14 日ではこれらの部位に加え、下顎頭軟骨原基となる間葉系幹細胞の凝集部に高発現を認めた。さらに miR-200a mimic の導入を下顎隆起の前外側に行った群では、対照群に比べ顎角-下顎頭軟骨複合体の形成が減少した。以上より、miR-200a は下顎隆起の一次軟骨、二次軟骨双方で発現するが、二次軟骨の形成に抑制的に働く可能性が示唆された。

#### 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 2 件)

1. Furukawa Y., Haruyama N., Nikaido M., Nakanishi M., Ryu N., Oh-Hora M., Kuremoto K., Yoshizaki K., Takano Y., Takahashi I. Stim1 Regulates Enamel Mineralization and Ameloblast Modulation  
Journal of Dental Research  
Vol 96 2017 1422-1429  
査読あり

2. Ahmed Salah Yassin Kenji Hostie Fumie Tero Mariko Umeda Ichiro Takahashi  
The role of miRNA-200a in the early stage of the mandibular development  
Orthodontic Waves  
Vol 76 2017 197-206  
査読あり

[学会発表](計 3 件)

1. 星 健治, ヤシン アハマド, 寺尾 文恵, 二階堂 まりこ, 高橋 一郎  
microRNA-200a によるマウス下顎頭軟骨・顎角軟骨の形成抑制  
第 76 回日本矯正歯科学会学術大会 札幌  
2017 年 10 月 18 20 日

2. アハマド サラ ヤシン, 星 健治, 寺尾 文恵, 二階堂 まりこ, 高橋 一郎  
MicroRNA-200a による胎生期マウス下顎隆起の軟骨発育の制御  
第 12 回九州矯正歯科学会学術大会  
2017 年

3. 古川 雄亮, 春山 直人, 二階堂 まりこ, 中西 正光, 笠 法子, 大洞 將嗣, 呉本 晃一, 吉崎 恵悟, 高橋 一郎  
Stim1 はマウスのエナメル質の石灰化およびエナメル芽細胞成熟期にみられる周期性を制御する  
第 12 回九州矯正歯科学会学術大会  
2017 年

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 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 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

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
二階堂 まりこ ( Nikaido Mariko )  
九州大学・大学病院 学術研究員  
研究者番号: 40707618

(2) 研究分担者  
高橋 一郎 ( Takahashi Ichiro )  
九州大学・歯学研究院 教授  
研究者番号: 70241643

(2) 研究分担者  
春山 直人 ( Haruyama Naoto )  
九州大学・歯学研究院 准教授  
研究者番号: 70359529

(3)連携研究者

寺尾 文枝 ( Terao Fumie )

九州大学・歯学研究院 助教

研究者番号： 10510018