

令和元年6月13日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11779

研究課題名(和文) 頭蓋骨縫合部早期癒合症に対する新規microRNA治療開発にむけた基礎的研究

研究課題名(英文) Investigation of the role of miRNA in syndromic craniosynostosis

研究代表者

小林 起穂 (KOBAYASHI, Yukiho)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：20596233

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)：miRNAアレイにて、1265種類のmiRNAについて発現を検索したところ、アペールマウス(Ap)および野生型マウス(Ct)の冠状縫合部において511種類のmiRNA発現が確認された。Ctと比較してApにおいて19種類のmiRNA発現が有意に亢進し、5種類のmiRNA発現が抑制されていた。リアルタイムPCRにより、Ctと比較して、Ap(n=3)においてmmu-miR-182-5p、mmu-miR-206-3pの有意に高い発現が確認され、mmu-miR-133a-3pの発現が高い傾向にあった。これらmiRNAは頭蓋縫合早期癒合症の発症に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭蓋冠縫合部の発生過程におけるmiRNAの発現およびその機能は全く不明であったが、本研究により500種類以上のmiRNAが発生中の頭蓋冠縫合部に発現することが明らかとなり、何らかの役割を果たす可能性が示唆された。これにより、顎顔面領域に形態異常を呈する先天性骨代謝疾患に対し、新たな創薬ターゲットを探索し、新規治療法の開発基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We detected 511 kinds of miRNA in the calvarial coronal suture of Apert syndrome model mouse at E15.5 by the miRNA array. Significantly higher expression of 19 kinds of miRNA in the calvarial tissue of Apert model mouse as compared with that of wild type. On the other hand, 5 kinds of miRNA was significantly decreased in the calvarial tissue of Apert model mouse as compared with that of wild type. By qPCR analysis, mmu-miR-182-5p, mmu-miR-206-3p were significantly higher in the calvarial tissue of Apert model mouse as compared with that of wild type. These results suggested that mmu-miR-182-5p, mmu-miR-206-3p would have some role in the establishment of craniosynostosis in the Apert syndrome model mouse.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：頭蓋骨縫合癒合症

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膜性骨化によって形成される頭蓋骨同士を結合する線維性組織である縫合部は、成長の場として重要な役割を果たす。成長期において頭蓋骨骨断端に骨添加と同時に、脳の成長に応じて骨表面における骨吸収・骨形成があいまって、頭蓋内容積を増大させるように頭蓋骨は外側へと位置を変化させる。胎生期を含め成長期以前の早期に、縫合部の早期癒合を発症する頭蓋冠縫合部早期癒合症(以下 cs)においては、これら機能は著しく阻害され、頭蓋顎顔面領域の変形をきたし、骨格性下顎前突、開咬、重度の叢生等の発症が惹起される。このように、cs の病態は矯正歯科臨床と深く関わり、cs 患者に対する歯科矯正治療には健康保険が適用されているが、形態・機能・審美の改善には外科的矯正治療が必要となる場合も多く、非侵襲的かつ病態成立機構に根ざした治療法の確立が世界的に強く期待されている。研究代表者らはこれまでに、cs を主徴とする Apert 症候群患者由来の骨芽細胞様細胞を用いて、本疾患の病態成立機構に骨芽細胞の分化亢進が関与する事を *in vitro* 実験系で示し 1)、Apert 型変異を含む可溶性 FGFR2 が新規治療法の開発に寄与する可能性を *in vitro* / *in vivo* 両面の研究で報告してきた 2-4)。さらに、cs を呈する Grieg cephalopolysyndactyly 症候群のモデルマウス (Gli3Xt-J/Xt-J) を用いて、cs の発症機序にヘッジホッグシグナリングが深く関与すること、また FGF2 浸潤ピーズによる治療効果を初めて報告し 5)、Gli3Xt-J/Xt-J と骨関連転写因子 Run2 ノックアウトマウス (Runx2<sup>-/-</sup>) とを交配させて得られた個体 (Gli3Xt-J/Xt-J;Runx2<sup>-/-</sup>) では cs の発症が抑制されること、その抑制機序に転写因子 Dlx5 および Runx2-typeII isoform の発現低下が関与する事を報告している 6)。近年、miRNA という新しい遺伝子発現調節機構が内軟骨性骨化において重要な役割を果たすことが個体レベルで証明されているが、頭蓋骨やその縫合部の発生、成長発育とその異常に対する miRNA の機能は全く不明である。研究代表者らのこれまでの研究成果をふまえ、miRNA の分子機構と膜性骨化および頭蓋骨縫合部発生・成長、疾患との関わりを明らかにすることは、cs をはじめとする顎顔面領域に形態異常を呈する先天性骨代謝疾患に対し、新たな創薬ターゲットを探索し、新規治療法の開発基盤となることが期待される。

### 2. 研究の目的

真核生物に広く保存されている microRNA (miRNA) はゲノム上に多数存在し、タンパク質をコードしない小分子 RNA である。miRNA が個体発生、形態形成、細胞死、細胞増殖等様々な生命現象を制御していることが明らかとなることで、新たな遺伝子発現調節ネットワークの存在が注目され、miRNA の機能異常と疾患との関わりも報告されている。先天性骨系統疾患の一つである頭蓋冠縫合部早期癒合症は、近年その原因遺伝子が報告されているが、明らかとされている遺伝子は極一部に過ぎない。頭蓋冠縫合部の発生には様々な遺伝子発現が時間的・空間的に制御されているが、その発現調節機構の詳細は不明である。本研究は、頭蓋冠縫合部の発生、およびその関連疾患の発症機序に関与する miRNA を同定し、その機能解析を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

Apert 症候群モデルマウス (Ap) および同腹野生型 (Ct) マウス (E15.5~E17.5) 頭蓋冠より冠状縫合部を摘出し、当該部位における miRNA および mRNA を抽出し、miRNA アレイ、DNA アレイにて疾患特異的 mRNA、miRNA の抽出を行う。これをもとに、クラスター解析、パスウェイ解析、特定機能遺伝子群の抽出を行う。疾患特異的 miRNA については縫合部における発現をリアルタイム PCR 法にて確認する。

### 4. 研究成果

1265 種類の miRNA について発現を検索したところ、Ap および Ct の冠状縫合部において 511 種類の miRNA 発現が確認された。Ct と比較して Ap において 19 種類の miRNA 発現が有意に亢進し、5 種類の miRNA 発現が抑制されていた。リアルタイム PCR により、Ct と比較して、Ap (n=3) において mmu-miR-182-5p、mmu-miR-206-3p の有為に高い発現が確認され、mmu-miR-133a-3p の発現が高い傾向にあった。頭蓋冠縫合部の発生過程における miRNA の発現およびその機能は全く不明であったが、本研究により 500 種類以上の miRNA が発生中の頭蓋冠縫合部に発現することが明らかとなり、何らかの役割を果たす可能性が示唆された。今後の展望として、得られた結果より、*in vivo* において Ap と Ct の間に有為な差が認められた miRNA を骨組織特異的に強制発現するトランスジェニックマウス (以下 miRNA-Tg マウス) を以下のように作製する。Type I collagen プロモーターを有する発現ベクターに目的マウス miRNA 前駆体 (pre-miRNA) cDNA (Genscript 社に合成依頼予定) を適切な制限酵素 site にクローニングし、Type I col-premiRNA ベクターを構築する。当該ベクターをマウス頭蓋冠由来骨芽細胞株 MC3T3E1 細胞に Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて transfection し、本ベクターによる目的 miRNA 発現について、特異的プライマーを用いたリアルタイム PCR により確認する。確認後、Type I col promoter-premiRNA-poly A を直鎖化・精製し、前核期受精卵 (C57BL/6J) に injection、仮親への胚移植を経て、F0 マウスを得る。F0 マウスの尾部組織からゲノム DNA を抽出し、genotyping PCR を行う。目的 miRNA の発現量が高い系を 2~3 系統抽出し、野生型マウスとの交配により F1 マウスを得る。得られた miRNA-Tg マウス胎児 (E15.5~E18.5) における頭蓋骨のマイクロ CT を撮影し、骨塩量の計測、および形態学的検討を加える。また、顎顔面当該領域の透明骨格

標本の作製を行い、骨・軟骨の形態学的な解析を行う。胎児頭部の凍結切片を作製し、HE染色にて頭蓋顎顔面領域の組織発生の違いについて検討を加える。平成28年度に得られた発現調節遺伝子について WISH・ISH法により検索し、個体レベルでmiRNAが影響を与える因子についてより詳細に検討することを予定している。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計3件)

- 1) Kamimoto H, Kobayashi Y, Moriyama K. Relaxin 2 carried by magnetically directed liposomes accelerates rat midpalatal suture expansion and subsequent new bone formation. Bone Rep. 2019 Mar 14;10:100202. doi: 10.1016/j.bonr.2019.100202. 査読あり
- 2) Duarte C, Kobayashi Y, Morita J, Kawamoto T, Moriyama K. A preliminary investigation of the effect of relaxin on bone remodelling in suture expansion. Eur J Orthod. 2017 Jun 1;39(3):227-234. doi: 10.1093/ejo/cjw037. 査読あり
- 3) 小林起穂 東京医科歯科大学歯科講演会『顎顔面矯正学の現在と未来-顎顔面矯正学分野のめざすもの』-9: 顎顔面縫合部でのリモデリングをナノテクノロジーでコントロールする 矯正臨床ジャーナル 2017.06 33(6) 35-40 査読無し

### 〔学会発表〕(計8件)

- 1) 中村留理子、小林起穂、紙本裕幸、疋田理奈、東堀紀尚、高原楠旻、樺沢勇司、森山啓司外科的急速拡大およびtwo-jaw surgeryを施行した上顎狭窄歯列弓を伴う骨格性級開咬症例第77回日本矯正歯科学会学術大会 2018.10.30-11.01 神奈川県横浜
- 2) 仁木佑紀、東堀紀尚、上園将慶、五十嵐七瀬、稲垣有美、井上雅葵、会坂善也、バダラフノミン、小林起穂、辻美千子、森山啓司 顎関節形成不全の重症度により分類したoculo-auriculo-vertebral spectrum患者の顎顔面形態に関する検討 第77回日本矯正歯科学会学術大会 2018.10.30-11.01 神奈川県横浜市
- 3) 紙本裕幸、小林起穂、森山啓司 磁性制御型リボソームにより標的指向化されたリラキシンはラット正中口蓋縫合各台と骨形成を促進する 第77回日本矯正歯科学会学術大会 2018.10.30-11.01 神奈川県横浜市
- 4) Kamimoto H, Kobayashi Y, Moriyama K Relaxin Accelerates Rat Mid-palatal Suture Expansion and Subsequent Bone Formation 96th General Session & Exhibition of International Association for Dental Research. 2018.07.25-28 London, England
- 5) 疋田理奈、辻美千子、小林起穂、小倉健司、森山啓司. 臨床症状から Seathre-Chozen 症候群と診断された2症例の顎顔面領域の臨床的特徴について. 第75回日本矯正歯科学会大会 2016.11.07 徳島
- 6) 小林起穂、森山啓司. 頭蓋縫合早期癒合症発症および頭蓋骨縫合部発生に関与する micro RNA の同定. 第75回日本矯正歯科学会大会 2016.11.07 徳島
- 7) 小林起穂、辻美千子、疋田理奈、小倉健司、森山啓司. 頭蓋縫合早期癒合症(Craniosynostosis)患者の顎顔面形態の解析 アペール症候群とクルーゾン症候群の比較. 第75回日本矯正歯科学会大会 2016.11.07 徳島
- 8) 小林起穂、辻美千子、疋田理奈、小倉健司、森山啓司. 頭蓋縫合早期癒合症(Craniosynostosis)患者の顎顔面形態の解析 アペール症候群とクルーゾン症候群の比較. 第56回日本先天異常学会学術集会 2016.07.30 兵庫

### 〔図書〕(計1件)

- 1) Kobayashi Y, Duarte C, Moriyama K. Biomarkers in Bone Disease. Part of the series Biomarkers in Disease: Methods, Discoveries and Applications. 2016.07 (ISBN : 978-94-007-7745-3) pp 1-25

### 〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。