

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11941

研究課題名(和文)Mechanosensitive microRNAによる下顎頭軟骨細胞の分化制御

研究課題名(英文)Regulation of mandibular condylar chondrocyte differentiation by mechanosensitive microRNA

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： 先行研究におけるマイクロアレイ法による検討から得られた下顎頭軟骨の mechanosensitive miRNAs の候補である5つのmiRNAsを、マウス下顎頭軟骨原基の間葉系細胞に遺伝子導入した。導入による増殖の変化を検討したところ、1つのmiRNAが、増殖を有意に抑制した。さらに、胎生期から出生後の成長期に至る5つのmiRNAsの発現の経時的変化を検討したところ、胎生期に発現が上昇し出生後に減少するもの、出生後、成長期から成長期以降に発現が上昇するもの、成長期以降に発現が上昇するもの、の3つに分類できた。5つのmiRNAsが、下顎頭軟骨の発育を時期特異的に制御してい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

下顎頭軟骨は、下顎骨の成長を制御する重要な解剖学的構造の一つである。これの成長の制御が幼少期の矯正歯科治療において試みられているが、効果のばらつきは依然大きく、人為的な制御と呼べる段階ではない。これは、下顎頭軟骨の矯正力(メカニカルストレス)に対する応答の詳細が解明できていないことも大きな原因の一つである。本研究より、マウス下顎頭軟骨のメカニカルストレス応答に関する重要な知見が得られた。本研究より得られた結果は、矯正力による下顎頭軟骨の成長発育の人為的制御に繋がり得る成果の一つであるといえる。

研究成果の概要(英文)： According to the microarray analysis in our previous research, we have selected five candidate microRNAs (miRNAs) which might function as mechanosensitive miRNAs in murine condylar cartilage. We transfected the five miRNAs to mesenchymal stromal cells isolated from anlagen of murine mandibular condylar cartilages, and performed cell proliferation analysis. This analysis revealed that one of the five miRNAs significantly repressed the cell proliferation. Furthermore, we examined the time-course change of expressions of the five miRNAs from prenatal stage to postnatal growth stage. According to the analysis, we divided the five miRNAs into the following three groups; miRNAs that were strongly expressed in prenatal stage, miRNAs that kept higher expression throughout growth stage, and miRNAs that remarkably increased expression after reaching full growth. These result indicated that the five miRNAs might control the growth of mandibular condylar cartilage in stage specific manners.

研究分野：矯正歯科

キーワード：下顎頭軟骨 メカニカルストレス microRNA 間葉系細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

下顎頭軟骨は、下顎骨の成長発育を制御する重要な部位であると考えられている。成長期の患者における矯正歯科治療では、下顎頭軟骨に対し、矯正力の負荷を行い、下顎骨の成長発育を制御し、不正咬合の改善が試みられている。こうした成長期の患者における矯正歯科治療は、ある程度の治療成果を挙げているものの、未だに下顎骨の成長発育を人為的に制御できているとは言い難い。この原因の一つとして、下顎頭軟骨の成長発育を司る分子メカニズムに関する知見が乏しいことが挙げられる。特に、矯正力を含めたメカニカルストレスの元での下顎頭軟骨の成長発育制御に関しては、研究成果の報告が非常に少ない。

私たちは、先行研究において、マウス下顎頭軟骨における軟骨細胞の増殖や分化を microRNA-200a が制御していることを発見した (Umeda et al. 2015)。よって、私たちは、下顎頭軟骨の成長発育において microRNA (miRNA) が重要な働きを担っていると考え、メカニカルストレス下での下顎頭軟骨の成長発育の変化に対する miRNA の働きについての検討を行っている。

### 2. 研究の目的

マウス下顎頭軟骨におけるメカニカルストレス応答性を有する miRNA (mechanosensitive miRNA) を同定し、下顎頭軟骨の成長発育や下顎頭軟骨細胞の分化・増殖における役割を検討することとした。

### 3. 研究の方法

先行研究において、マウス胎仔の下顎頭軟骨原基より未分化間葉系細胞を単離し、これらの細胞にメカニカルストレス負荷を行い、発現が顕著に変化し、また軟骨関連遺伝子である col2a 遺伝子や sox9 遺伝子を制御すると考えられた 5 つの miRNA (miR29a-3p, 152-3p, 431-5p, 134-5p, 145-5p) を、mechanosensitive miRNA の候補として同定した。これをもとに、下記の検討を行った。遺伝子導入では、control siRNA 導入群と導入をしない群 (下図「control」) を対照群として設けた。

マウス胎仔下顎頭軟骨原基由来の未分化間葉系細胞およびマウス前軟骨細胞株 ATDC5 の細胞増殖に対する働きの検討

下顎頭軟骨原基より単離した未分化間葉系細胞および ATDC5 に対し、5 つの miRNA をリポフェクション法により遺伝子導入し、増殖アッセイにより増殖の変化を経時的に検討した。マウス前軟骨細胞株 ATDC5 の軟骨器質産生に対する働きの検討

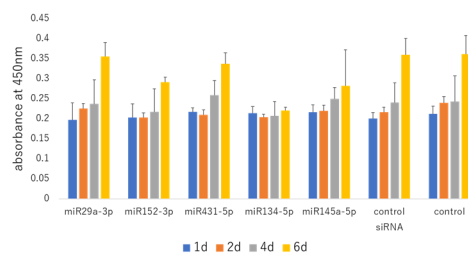
ATDC5 に対し、5 つの miRNA をリポフェクション法により遺伝子導入し、マイクロマスカルチャーを行った。その後、軟骨器質産生の変化をアルシアンブルー染色により経時的に検討した。染色された基質を溶解後、溶解液の吸光度を測定し、基質産生を定量的に評価した。マウス下顎頭軟骨における発現パターンの検討

胎齢 14 日、16 日、18 日の ICR マウス胎仔より下顎頭軟骨原基を、生後 4 週、6 週、8 週、10 週、20 週のマウスより下顎頭を摘出し、これらにおける 5 つの miRNA の発現量をリアルタイム PCR 法により検討した。

### 4. 研究成果

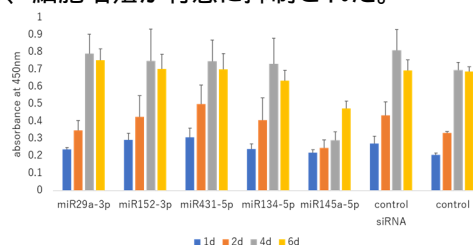
マウス胎仔下顎頭軟骨原基由来の未分化間葉系細胞の増殖に対する抑制的効果

5 つの miRNA を未分化間葉系細胞に対し導入後、1、2、4、6 日後に細胞増殖を評価した。miR134-5p を導入した群において、細胞増殖が有意に抑制された。



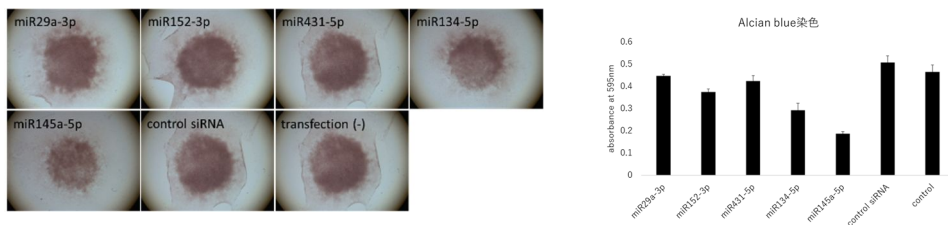
マウス前軟骨細胞株 ATDC5 の増殖に対する抑制的効果

5 つの miRNA を ATDC5 に対し導入後、1、2、4、6 日後に細胞増殖を評価した。miR145a-5p を導入した群において、細胞増殖が有意に抑制された。



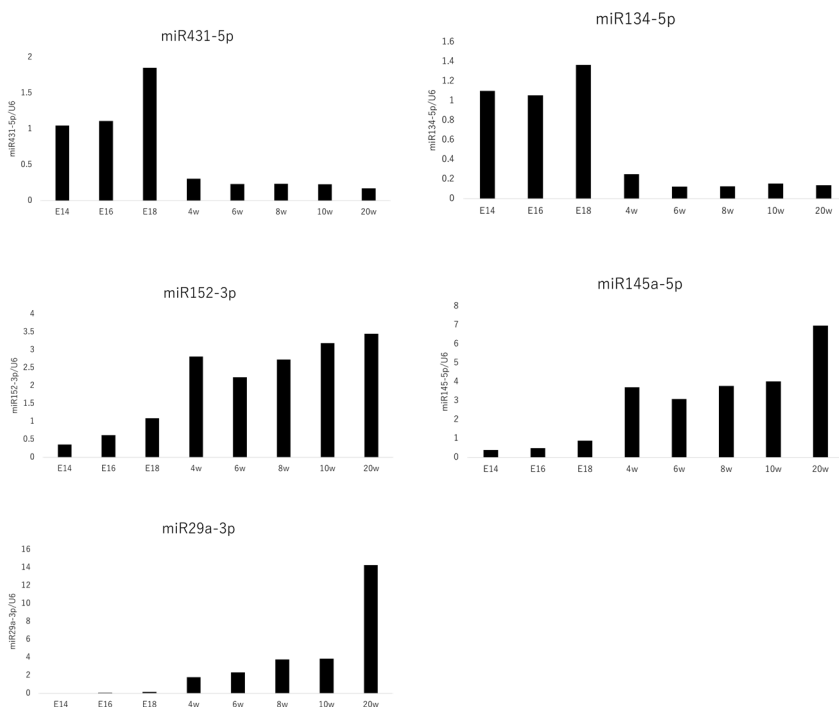
## マウス前軟骨細胞株 ATDC5 の軟骨器質産生に対する抑制的効果

5 つの miRNA を ATDC5 に導入し、8 日間マイクロマスカルチャーを行い、アルシアンブルー染色を行った。miR152a-3p、134-5p、145a-5p を導入した群において、軟骨器質産生が有意に抑制された。



## 5 つの miRNA の下顎頭軟骨における発現の経時的变化

マウスの胎生期から出生後成長期にかけての 5 つの miRNA の発現の経時的变化を検討したところ、大きく 3 つのパターンに大別できた。miR431-5p、134-5p は胎生期において発現量が高いが、出生後に減少した。一方、miR152-3p、145a-5p は胎生期において発現量が低い、出生後成長期終了まで高い状態が維持された。最後に、miR29a-3p は、成長期終了後、発現量が著しく上昇した。以上より、5 つの miRNA は、時期特異的にマウス下顎頭軟骨の成長発育や分化を制御している可能性が示唆された。



## < 引用文献 >

M Umeda, F Terao, K Miyazaki, K Yoshizaki, I Takahashi. MicroRNA-200a Regulates the Development of Mandibular Condylar Cartilage. J Dent Res. 2015 Jun; 94(6): 795-802.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Yassin AS, Hoshi K, Terao F, Umeda M, Takahashi I                         | 4. 巻<br>76(4)         |
| 2. 論文標題<br>The role of miRNA-200a in the early stage of the mandibular development. | 5. 発行年<br>2017年       |
| 3. 雑誌名<br>Orthodontic Waves   | 6. 最初と最後の頁<br>197-206 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.odw.2017.06.001                               | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-             |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>二階堂 まりこ, 星 健治, 今城 育美, 山田 朋弘, 森 悦秀, 高橋 一郎 | 4. 巻<br>13(1)       |
| 2. 論文標題<br>基底細胞母斑症候群を伴うAngle Class I 叢生成人女性症例      | 5. 発行年<br>2017年     |
| 3. 雑誌名<br>九州矯正歯科学会雑誌                               | 6. 最初と最後の頁<br>16-22 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし                     | 査読の有無<br>無          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難             | 国際共著<br>-           |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>星 健治, 安永 遙菜, 北原 亨, 林田 淳之介, 中村 誠司, 高橋 一郎    | 4. 巻<br>15(1)       |
| 2. 論文標題<br>下顎骨の外科的前方移動においてオーバーコレクションを行った下顎後退症の顎変形症症例 | 5. 発行年<br>2019年     |
| 3. 雑誌名<br>九州矯正歯科学会雑誌                                 | 6. 最初と最後の頁<br>45-50 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし                       | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難               | 国際共著<br>-           |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>星 健治, ヤシン アハマド, 寺尾 文恵, 二階堂 まりこ, 高橋 一郎 |
| 2. 発表標題<br>microRNA-200aによるマウス下顎頭軟骨・顎角軟骨の形成抑制    |
| 3. 学会等名<br>第76回日本矯正歯科学会学術大会                      |
| 4. 発表年<br>2017年                                  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>笠 法子, 星 健治, 高橋 一郎                            |
| 2. 発表標題<br>短根歯を多数認めたskeletal class , Angle Class , 叢生症例 |
| 3. 学会等名<br>第13回九州矯正歯科学会学術大会                             |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>野田 佳苗, 星 健治, 吉崎 恵悟, 高橋 一郎               |
| 2. 発表標題<br>下顎頭軟骨の分化を制御するmechanosensitive miRNA の探索 |
| 3. 学会等名<br>第14回九州矯正歯科学会学術大会                        |
| 4. 発表年<br>2019年                                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>星 健治, 内田 花奈, チェ ジェホン, 高橋 一郎                          |
| 2. 発表標題<br>Objective Grading System を用いた九州大学病院矯正歯科における矯正治療結果の評価 |
| 3. 学会等名<br>第14回九州矯正歯科学会学術大会                                     |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>星 健治, 日高 慶樹, 福井 紗貴, 高橋 一郎            |
| 2. 発表標題<br>側面セファログラムを用いた九州大学病院矯正歯科における矯正治療結果の評価 |
| 3. 学会等名<br>第78回日本矯正歯科学会学術大会                     |
| 4. 発表年<br>2019年                                 |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>野田 佳苗, 星 健治, 吉崎 恵悟, 寺尾 文恵, 高橋 一郎      |
| 2. 発表標題<br>Mechanosensitive microRNAによる下顎頭軟骨分化制御 |
| 3. 学会等名<br>第78回日本矯正歯科学会学術大会                      |
| 4. 発表年<br>2019年                                  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Suntornchatchaweach S, Hoshi K, Takahashi I   |
| 2. 発表標題<br>Lateral maxillofacial characteristics in anterior and mediolateral disc displacement of temporomandibular joints among mandibular asymmetry |
| 3. 学会等名<br>第78回日本矯正歯科学会学術大会  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Suntornchatchaweach S, Hoshi K, Takahashi I  |
| 2. 発表標題<br>Lateral cephalometric characteristics in mandibular asymmetric patients with anterior and mediolateral disc displacement of temporomandibular joints |
| 3. 学会等名<br>第15回九州矯正歯科学会学術大会   |
| 4. 発表年<br>2020年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                | 備考 |
|-------|---|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 高橋 一郎<br><br>(Takahashi Ichiro)<br><br>(70241643) | 九州大学・歯学研究院・教授<br><br><br><br>(17102) |    |

