

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11942

研究課題名(和文) 一次・二次軟骨におけるガレクチン3の機械的刺激負荷応答の相違について

研究課題名(英文) Differential response to mechanical stimulus loading of Galectin-3 in primary and secondary cartilage

研究代表者

寺尾 文恵 (Terao, Fumie)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：10510018

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)：下顎頭軟骨は二次軟骨として分類され、一次軟骨である関節軟骨と成長板軟骨の機能を同時に有している。本研究では、ガレクチン3を介した新規の二次軟骨特異的な軟骨分化制御メカニズムを解明するため、マウス胎生期下顎頭軟骨原基由来細胞と四肢胚由来細胞を用いて解析を行った。下顎頭原基由来細胞において、外因性のガレクチン3は軟骨分化を抑制し、内因性のガレクチン3は細胞の増殖を促進することが示唆された。さらに、ガレクチン3の機械的刺激応答経路は、下顎頭原基由来細胞と四肢胚由来細胞では異な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

ガレクチン3は、発生期の下顎頭軟骨細胞の増殖・分化に深く関わり、機械的刺激に対して長管骨にある一次軟骨とは異なる応答性を示すことが分かった。この結果は、ガレクチン3の軟骨分化過程への生物学的役割の解明だけでなく、歯科矯正臨床において、下顎頭軟骨の成長制御や機械的刺激負荷による骨関節症の発症など、成長期から成人期に至るまで顎関節や下顎頭軟骨に関わる問題の解決に対して基盤的知識の蓄積に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The mandibular condylar cartilage (MCC), and has the functions of primary cartilage, articular cartilage and growth plate cartilage, at the same time. In this study, to elucidate a novel mechanism of galectin-3-mediated regulation of secondary cartilage-specific chondrogenic differentiation, we analyzed cells from mouse embryonic MCC primordium and limb buds. In MCC-derived cells, exogenous galectin-3 suppressed chondrogenic differentiation, while endogenous galectin-3 promoted cell proliferation. The pathway of galectin 3 response to mechanical stimuli may be different between MCC-derived cells and limb bud cells.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：軟骨分化 機械的刺激応答 ガレクチン3

1. 研究開始当初の背景

顎関節を構成する下顎頭軟骨は、成長期においては成長板軟骨として、また、成長が終了してからは関節軟骨として機能する二次軟骨として分類され、長管骨の骨幹端に存在する一次軟骨である関節軟骨と成長板軟骨の機能を同時に有している。これらの軟骨は常に機械的刺激にさらされ、外的刺激としてのメカニカルストレスに対して、細胞分化、細胞外基質代謝、および細胞増殖を変化させて対応をしている。

われわれは、これまでラット胎仔四肢胚由来間葉細胞の高密度培養に機械的伸展刺激を負荷する実験により、機械的伸展刺激により一次軟骨分化が抑制されることを明らかにし、細胞内と細胞外基質間を介在するインテグリンを介した ERK-1/2 の活性化と核移行が直接的に関与していることを示した

ガレクチン 3 は、 β -ガラクトシドを有する糖類に特異的に結合するレクチンの一つで、発生、分化、形態形成、細胞死などの多くの生命現象に関与すると考えられている。ガレクチン 3 は、マウス胎生期、脊索、骨、皮膚および軟骨において発現が報告されており、一次軟骨では増殖・肥大している軟骨細胞に強く発現していることが知られている。一方、二次軟骨である下顎頭軟骨における発現や軟骨分化との関連性、および機械的刺激応答との関係は不明であり、このメカニズムを明らかにすることは重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究では、マウス胎生期下顎頭由来細胞におけるガレクチン 3 の、細胞増殖および軟骨分化に対する役割を明らかにし、さらに、マウス胎生期四肢胚由来細胞と下顎頭由来細胞を用いて、機械的刺激負荷条件下におけるガレクチン 3 の発現の変化とその機械的刺激応答のメカニズムを解明することにより、一次・二次軟骨におけるガレクチン 3 の機械的刺激負荷応答の相違について解析することにより、二次軟骨特異的な軟骨分化制御機構の存在を探求することを目指す。

3. 研究の方法

1) ガレクチン 3 の組織学的検討

下顎頭軟骨を含めた発生期の顎関節において、ガレクチン 3 タンパクの発現局在を調べるために、胎齢 14 日、17 日のマウス胎仔のパラフィン切片を作製し、免疫組織化学染色を行った。

2) ガレクチン 3 タンパク添加実験

胎齢 10 日のマウス四肢胚および胎齢 14 日のマウス下顎頭原基を摘出し、トリプシンコラゲナーゼ処理にて細胞を得た。得られた細胞を単層培養および高密度培養し、ガレクチン 3 リコンビナントタンパクを添加した。添加後、細胞増殖および軟骨分化ノジュール形成への影響を検討した。

3) ガレクチン 3 ノックダウン実験

胎生期下顎頭原基由来細胞に siRNA を導入することにより、ガレクチン 3 のノックダウンを行い、細胞増殖への影響を検討した。

4) 機械的刺激負荷によるガレクチン 3

胎齢 10 日のマウス四肢胚および胎齢 14 日のマウス下顎頭原基を摘出し、トリプシンコラゲナーゼ処理にて得られた細胞を用いて、シリコン膜を底面に持つポリジメチルシロキサン (PDMS) 製のストレッチチャンパーに播種し、10%FBS 含有 DMEM 培地にて培養を行った。機械的伸展刺激の負荷を行った後、Total RNA およびタンパク質を回収し、RT-PCR 法およびウェスタンブロットティング法を用いて発現量の変化を解析した。

4. 研究成果

1) 二次軟骨におけるガレクチン3タンパクの発現局在

マウス胎生期のガレクチン3タンパクは、マウス胎齢14日の下顎頭原基に局在し(図1矢印)、胎齢17日では、増殖細胞層、成熟細胞層、肥大軟骨細胞層および関節円板の細胞層に局在し、下顎頭形成初期から継続して発現していることを確認した。二次軟骨における発現局在は、これまでに報告されている一次軟骨における発現分布に類似していることが分かった。

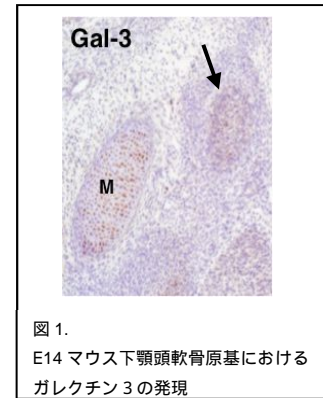


図 1.
E14 マウス下顎頭軟骨原基における
ガレクチン3の発現

2) ガレクチン3リコンビナントタンパク添加実験

下顎頭原基由来細胞の高密度培養において、ガレクチン3ヒトリコンビナントタンパクの添加により、軟骨ノジュール形成が抑制された。

四肢胚由来細胞および下顎頭原基由来細胞の単層培養にガレクチン3ヒトリコンビナントタンパクを添加し、24、48時間後に細胞増殖について検討を行ったところ、ガレクチン3の添加による細胞増殖の有意な変化は認められなかった。

以上のことから、外因性のガレクチン3は、下顎頭原基由来細胞の増殖には関与せず、軟骨分化を抑制することが示唆された。

3) ガレクチン3 siRNAによるノックダウン実験

下顎頭原基由来細胞の単層培養へのsiRNA導入2日目において有意に細胞増殖が抑制された。このことから、内因性のガレクチン3は、下顎頭原基由来細胞の増殖を促進する役割を果たすことが示唆された。

4) 機械的伸展刺激負荷実験

下顎頭原基由来細胞への機械的伸展刺激負荷実験

ガレクチン3タンパクの発現は、負荷5分後では伸展力負荷による優位な差は認められず、15分後にやや上昇傾向がみられ、30分でピークを迎え、60分後には発現が対照群と変わらないレベルにまで低下した。負荷30分後には、FAKのリン酸化が上昇し、60分後にはERK1/2とAktのリン酸化が上昇する傾向にあることも確認した。これらのことから、機械的伸展刺激の負荷条件下における下顎頭原基由来細胞の軟骨分化制御メカニズムにおいて、ガレクチン3が何らかの役割を果たしている可能性のあることが示唆された。

四肢胚由来細胞への機械的伸展刺激負荷実験

機械的刺激負荷により、ガレクチン3の発現の変化はみとめられなかった。一方で、機械的刺激の負荷によるERKのリン酸化は、下顎頭由来細胞を用いた実験と同様に上昇していた。

以上のことから、ガレクチン3の機械的刺激応答は、下顎頭原基由来細胞(二次軟骨)と四肢胚由来細胞(一次軟骨)では異なる可能性が示唆され、さらにガレクチン3のERKシグナルとは異なるほかの経路を介した機械的刺激応答メカニズムの存在が示唆された

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Han Xue, Yoshizaki Keigo, Miyazaki Kanako, Arai Chieko, Funada Keita, Yuta Tomomi, Tian Tian, Chiba Yuta, Saito Kan, Iwamoto Tsutomu, Yamada Aya, Takahashi Ichiro, Fukumoto Satoshi	4. 巻 293
2. 論文標題 The transcription factor NKX2-3 mediates p21 expression and ectodysplasin-A signaling in the enamel knot for cusp formation in tooth development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 14572 ~ 14584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.003373	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Albogha Mhd Hassan, Takahashi Ichiro	4. 巻 89
2. 論文標題 Effect of loaded orthodontic miniscrew implant on compressive stresses in adjacent periodontal ligament	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Angle Orthodontist	6. 最初と最後の頁 235 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2319/122017-873.1	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Yassin Ahmed Salah, Hoshi Kenji, Terao Fumie, Umeda Mariko, Takahashi Ichiro	4. 巻 76
2. 論文標題 The role of miRNA-200a in the early stage of the mandibular development	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Orthodontic Waves	6. 最初と最後の頁 197 ~ 206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.odw.2017.06.001	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Furukawa Y., Haruyama N., Nikaido M., Nakanishi M., Ryu N., Oh-Hora M., Kuremoto K., Yoshizaki K., Takano Y., Takahashi I.	4. 巻 96
2. 論文標題 Stim1 Regulates Enamel Mineralization and Ameloblast Modulation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 1422 ~ 1429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034517719872	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Imamura Kanako, Terajima Masahiko, Nakashima Akihiko, Takahashi Ichiro	4. 巻 78
2. 論文標題 A three-dimensional analysis of masticatory muscles in laterognathism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Orthodontic Waves	6. 最初と最後の頁 143 ~ 150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.odw.2019.09.010	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Funada Keita, Yoshizaki Keigo, Mlyazaki Kanako, Han Xue, Yuta Tomomi, Tian Tian, Mizuta Kanji, Fu Yao, Iwamoto Tsutomu, Yamada Aya, Takahashi Ichiro, Fukumoto Satoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 microRNA-875-5p plays critical role for mesenchymal condensation in epithelial-mesenchymal interaction during tooth development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61693-w	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計22件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

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

1. 発表者名 寺尾 文恵, 北原 亨, 星 健治, 森 悦秀, 高橋 一郎.
2. 発表標題 下顎第二大臼歯喪失を伴う骨格性下顎前突症に対して第三大臼歯の近心移動と外科的矯正治療を行った一例
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 春山直人、吉崎恵悟、野村俊介、野口健志
2. 発表標題 上下顎前歯先天性欠損及び両側口唇顎裂を伴ったPierre Robin sequenceの一症例
3. 学会等名 第42回日本口蓋裂学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荒川 雅弘, 北原 亨, 高橋 一郎
2. 発表標題 下顎前突患者における筋機能MRIおよび31P-MRSを用いた咀嚼筋疲労の分子イメージング
3. 学会等名 第28回日本顎変形症学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 3.山田 朋弘, 林田 淳之介, 森山 雅文, 春山 直人, 中野 旬之, 寺尾 文恵, 星 健治, 野口 健志, 中村 誠司, 高橋 一郎, 森 悦秀
2. 発表標題 口唇・口蓋裂患者5例に対するRED systemを用いた前方部骨延長術の安定性と言語に及ぼす影響
3. 学会等名 第28回日本顎変形症学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中西 正光, 春山 直人, 呉本 晃一, 高橋 一郎
2. 発表標題 唾液腺におけるストア作動性Ca ²⁺ 流入の異常は, 唾液分泌量を減少させる
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮崎 佳奈子, 吉崎 恵悟, 湯田 智美, 韓 雪, 新井 智映子, 鮎田 啓太, 田 甜, 福本 敏, 高橋 一郎.
2. 発表標題 PKP1 は歯原性上皮細胞において密着結合構成因子ZO-1 の局在を制御する
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鮎田 啓太, 吉崎 恵悟, 韓 雪, 宮崎 佳奈子, 新井 智映子, 湯田 智美, 田 甜, 福本 敏, 高橋 一郎
2. 発表標題 歯に特異的に発現するmicroRNA-875 の同定および歯の発生における役割
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 韓 雪, 吉崎 恵悟, 宮崎 佳奈子, 新井 智映子, 鮎田 啓太, 湯田 智美, 田 甜, 福本 敏, 高橋 一郎
2. 発表標題 歯の咬頭形成におけるホメオボックス転写因子Nkx2-3 の役割
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田 甜, 吉崎 恵悟, 韓 雪, 宮崎 佳奈子, 新井 智映子, 鮎田 啓太, 湯田 智美, 高橋 一郎
2. 発表標題 ホメオボックス転写因子Nkx2-3による歯の咬頭形成制御機構
3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鮎田 啓太, 吉崎 恵悟, 韓 雪, 宮崎 佳奈子, 新井 智映子, 湯田 智美, 田 甜, 高橋 一郎
2. 発表標題 歯特異的microRNA-875 は歯の発生において歯原性間葉細胞の凝集を誘導する
3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野口 健志, 北原 亨, 高橋 一郎, 森 悦秀, 山田 朋弘.
2. 発表標題 2段式スプリントを併用した分割Le Fort Ⅱ型骨切り術および両側下顎枝矢状分割術を行った骨格性開咬症例2例
3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 14. 春山 直人, 野村 俊介, 石井 加奈子, 要 匡, 野口 健志, 吉崎 恵悟, 高橋 一郎
2. 発表標題 過大な上下顎歯槽部高および永久歯萌出遅延を伴う頭蓋骨幹端骨異形成症の1例
3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2018年

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

1. 発表者名 川口 有香, 南舘 崇夫, 春山 直人, 高橋 一郎
2. 発表標題 下顎前突症患者における顎態および咬合と口腔関連Quality of Life との相関
3. 学会等名 第14回九州矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野村 俊介, 春山 直人, 野口 健志, 林田 裕子, 辻 恭子, 吉崎 恵悟, 高橋 一郎
2. 発表標題 口蓋裂を伴う下顎後退による骨格性 Ⅱ級症例に対して機能的顎矯正装置を適用した2 症例
3. 学会等名 第14回九州矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星 健治, 内田 花奈, チェ ジェホン, 高橋 一郎
2. 発表標題 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 第14回九州矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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 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 第76回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 笠 法子, 春山 直人, 古川 雄亮, 中西 正光, 星 健治, 寺尾 文恵, 高橋 一郎.
2. 発表標題 矯正学的な歯の移動は歯根膜圧迫側を低酸素にすることでオートファジーを誘導する
3. 学会等名 第76回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Suntornchatchaweach S, Hoshi K, Takahashi I.
2. 発表標題 Dentoskeletal differences among medial, anterior, and anteromedial disc displacement in facial asymmetric patients
3. 学会等名 第30回日本顎変形症学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Minamidate T, Haruyama N, Takahashi I.
2. 発表標題 Validation of the Japanese version of the child oral health impact profile-short form (COHIP-SF 19 JP) for school-age children.
3. 学会等名 The 9th International Orthodontic Congress /12th Asian Pacific Orthodontic Conference/ the 79th Annual Meeting of the Japanese Orthodontic Society.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Suntornchatchaweach S, Hoshi K, Okamura K, Yoshiura K, Takahashi I.
2. 発表標題 Asymmetrical characteristics of mandible among various types of articular disk displacement on ipsilateral and contralateral sides of facial asymmetry.
3. 学会等名 The 9th International Orthodontic Congress /12th Asian Pacific Orthodontic Conference/ the 79th Annual Meeting of the Japanese Orthodontic Society.
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 上山吉哉・森悦秀	4. 発行年 2017年
2. 出版社 九州大学出版	5. 総ページ数 77
3. 書名 外科的矯正治療カラーアトラス	

〔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
研究分担者	高橋 一郎 (Takahashi Ichiro) (70241643)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	春山 直人 (Haruyama Naoto) (70359529)	九州大学・歯学研究院・准教授 (17102)	

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
---------	---------