様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ６ 月 １２ 日現在

機関番号：１５４０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2022～2024
課題番号：２２Ｋ１０２７３

研究課題名（和文）Sema3Aによる下顎頭軟骨分化促進機構の解明と下顎後退症新規治療への応用

研究課題名（英文）Clarification of the mechanism by which Sema3A promotes mandibular condylar cartilage differentiation and its application to a novel treatment for mandibular retrognathism.

研究代表者
麻川　由起（丹根由起）（Asakawa (Tanne), Yuki）

広島大学・医系科学研究科（歯）・助教

研究者番号：５０５２６２４１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、 Semaphorin3A (Sema3A)に着目し、Sema3A による下顎頭軟骨分化促進メカニズムを検証することを目的とした。
　まず、Sema3A による Sox9 発現に対するSema3A レセプター(Nrp-1) の関与について検証したところ、Sema3AによるSox9遺伝子発現促進機構はNrp-1を介している可能性が示唆された。 また、下顎頭軟骨組織ではSema3A、NRP-1およびPLXNA1の発現が増殖軟骨細胞層から前肥大軟骨細胞層にかけて認められ、下顎頭軟骨組織のSema3Aタンパク濃度は週齢が増加するにつれて有意に減少することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究は、 Semaphorin3A (Sema3A)に着目し、Sema3A による下顎頭軟骨分化促進メカニズムを検証することを目的とした。本研究により、Sema3AはSema3A受容体(Nrp-1)とAktのリン酸化を介して、Sox9およびⅡ型コラーゲン発現を促進していることが明らかとなった。したがって、Sema3Aの発現調整およびNrp-1の活性化は下顎後退症などの成長障害の治療につながるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study focused on Semaphorin 3A (Sema3A) and aimed to investigate the mechanism by which Sema3A promotes differentiation of mandibular condylar cartilage. First, the involvement of the Sema3A receptor (Nrp-1) in Sema3A-induced Sox9 expression was examined, suggesting that the mechanism for Sema3A-mediated Sox9 gene expression may be mediated by Nrp-1. Additionally, in mandibular condylar cartilage tissue, the expression of Sema3A, NRP-1, and PLXNA1 was observed from the proliferative chondrocyte layer to the prehypertrophic chondrocyte layer, and it was revealed that the concentration of Sema3A protein in mandibular condylar cartilage significantly decreased with increasing age.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：Semaphorin3A　顎関節

※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、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

下顎後退症は、先天的あるいは後天的な下顎骨の成長不全の結果生じる顎顔面形態の一様相であるが、この形態変化を決定する要因は不明な点が多い。成長期の下顎後退症の治療としては、マウスピース型矯正装置を用いた下顎骨の前方成長促進が行われる場合があるが、反応には個人差が大きく、また成長量や方向を予測するのは困難である。

Semaphorin は神経軸索の方向性を決定する神経ガイダンス因子として 1990 年代前半に同定された分子群である。Semaphorin はこれまでに 20 種類を超えるメンバーが同定されており、その中でも Sema3A は、骨芽細胞の分化促進と破骨細胞の分化抑制を同時に調節し、骨量を増加させる骨保護作用を有することから、骨粗鬆症を始めとする様々な疾患の鍵分子として考えられている。近年、下顎の前下方への成長過大を特徴とする骨格性下顎前突症のゲノムワイド関連解析により、Sema3A の受容体の一つとされる Plexin-A2 をコードする遺伝子 *PLXA2* が新規感受性遺伝子として報告された。さらに、Sema3A は Plexin-A2 を介して PTHrP を抑制し、軟骨成長を促進することが報告されている。このことより、Sema3A は下顎頭軟骨成長に関与する重要因子の可能性が考えられる。申請者らは、Sema3A が培養軟骨細胞において内軟骨性骨化の初期分化段階で高発現し、Sema3A 発現抑制がⅡ型コラーゲン発現を有意に抑制していたことから、Sema3A は軟骨の初期分化を促進することを明らかにした (図 1)。さらに、申請者らのこれまでの研究により Sema3A の発現抑制は高分子ヒアルロン酸合成酵素（HAS-2）の発現を約 98% 抑制した (図 1) ことから、Sema3A は高分子ヒアルロン酸合成に強く関与していると考えられる。Sema3A のシグナル伝達経路としては、古典的 Wnt 経路の活性化により、骨芽細胞分化を促進することが報告されている (Wu X *et al.* Cell, 2008) 。軟骨細胞の増殖、分化には Wnt シグナリングが重要な役割を果たしているが、そのうち Wnt5a は Ⅱ 型コラーゲンの発現調節に関与している (Ryu JH *et al.* J Biol Chem, 2006)。したがって、Sema3A の Ⅱ 型コラーゲン調節機構として、Wnt5a の関与が疑われる。一方、血管内皮細胞において、Has-2 の発現は P13K/Akt シグナリング経路にて調節されていることが報告されている (Zhu L *et al* J Cell Biochem 2019)ことより、P13K/Akt を介したシグナリング経路が考えられる（図 2)。

本研究は、Sema3A のⅡ型コラーゲン、Sox-9 および Has-2 誘導能に着目し、下顎頭軟骨分化促進の作用機序を解明するとともに、Sema3A による下顎骨成長制御メカニズムを利用した下顎後退症の新規治療法への応用を最終的な目的とする。

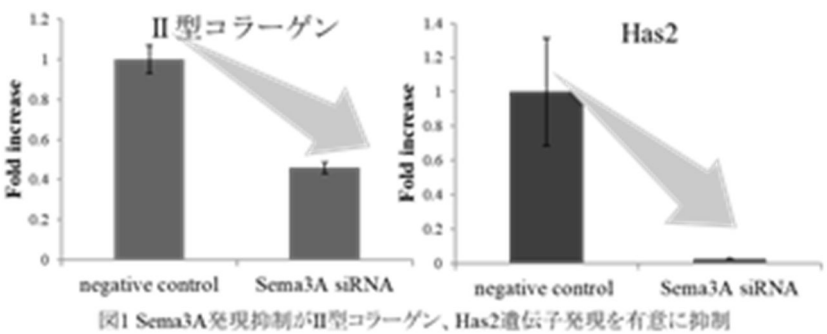

図1 Sema3A発現抑制がⅡ型コラーゲン、Has2遺伝子発現を有意に抑制

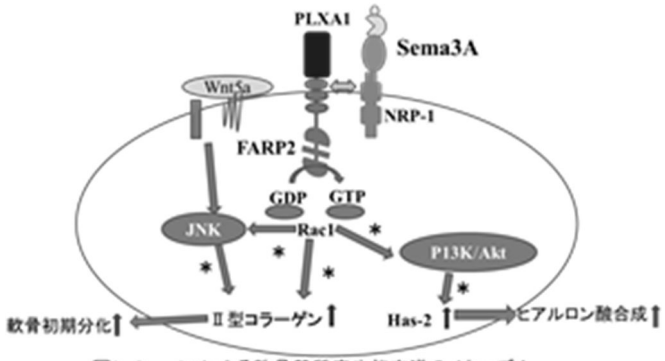

図2 Sema3Aによる軟骨基質産生能亢進のメカニズム
（＊は今回検討する部分）

２．研究の目的

本研究は、Sema3A のⅡ型コラーゲン, Sox-9 および Has-2 誘導能に着目し、下顎頭軟骨分化促進の作用機序を解明するとともに、Sema3A による下顎骨成長制御メカニズムを利用した下顎後退症の新規治療法への応用を最終的な目的とする。

３．研究の方法

本研究は、Sema3A の下顎頭軟骨分化の調節機構を明らかにするために以下の 2 点を検証する。実験１では、培養軟骨細胞を用い、Ⅱ型コラーゲン、Sox-9 および Has-2 発現に対する Sema3A の作用機序を解明するために、Sema3A による軟骨基質タンパクおよび Has-2 発現への Sema3A レセプター (Nrp-1) の関与について検討する。さらに、Nrp-1 中和抗体存在下で Sema3A 添加した際の P13K/Akt 活性変化をウェスタンブロット法にて分析する。　実験 2 では、in vivo 実験系にてラット顎関節への Sema3A および Sema3A siRNA 局在投与が下顎頭軟骨および細胞外基質へ与える影響について組織学的検討を行う。さらに、年齢が Sema3A および Sema3A レセプターの下顎頭軟骨および滑膜における局在と発現量におよぼす影響について検討する。

４．研究成果

まず、実験１では Sema3A による Sox-9 およびⅡ型コラーゲン発現に対する Sema3A レセプター(Nrp-1) の関与について検証した。培養軟骨細胞に対して、5ug/ml Nrp-1 中和抗体存在下で Sema3A を添加し、RT-PCR 法およびウェスタンブロット法にて検討したところ、1ng/ml Sema3A による Sox-9、 Ⅱ型コラーゲン発現上昇を抑制する結果となった。この結果より、Sema3A による Sox-9 およびⅡ型コラーゲン発現促進機構は Nrp-1 を介している可能性が示唆された。次に Nrp-1 中和抗体を用いて Nrp-1 ブロッキング後に、Sema3A を添加した際の Akt のリン酸化についてウェスタンブロット法にて検討したところ、Sema3A による Akt リン酸化の促進が Nrp-1 中和抗体により抑制される結果となった。

次に、年齢が Sema3A および Sema3A レセプターの下顎頭軟骨および滑膜における局在と発現量におよぼす影響について検討した。本研究では、4, 8, 12 週齢 Wistar 系雄性ラットを用いた。それぞれの週齢は若年期、思春期、成人期を想定している。4、8、12 週齢ラット下顎頭軟骨組織では Sema3A、NRP-1 および PLXNA1 の発現が増殖軟骨細胞層

から前肥大軟骨細胞層にかけて明瞭に認められた。なお、週齢間での発現分布の違いは認められなかった。血清中の Sema3A タンパク濃度は週齢が増加するにしたがって減少傾向を示したが、各週齢間の有意差は認められなかった。一方、下顎頭軟骨組織の Sema3A タンパク濃度は週齢が増加するにつれて有意に減少した。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計3件（うち査読付論文　3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 Tsuboi Eri、Asakawa Yuki、Hirose Naoto、Yanoshita Makoto、Sumi Chikako、Takano Mami、Onishi Azusa、Nishiyama Sayuri、Kubo Naoki、Kita Daiki、Tanimoto Kotaro	４．巻 60
２．論文標題 The role of semaphorin 3A on chondrogenic differentiation	５．発行年 2024年
３．雑誌名 In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal	６．最初と最後の頁 609～615
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11626-024-00909-z	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 －

１．著者名 麻川由起	４．巻 35
２．論文標題 下顎骨前方移動術を施行した下顎後退型上顎前突症の長期経過における術後変化と顎関節 症の関わり	５．発行年 2023年
３．雑誌名 中四国矯会誌	６．最初と最後の頁 7-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Kubo Naoki、Awada Tetsuya、Hirose Naoto、Yanoshita Makoto、Takano Mami、Nishiyama Sayuri、Tsuboi Eri、Kita Daiki、Ito Shota、Nakatani Ayaka、Onishi Azusa、Asakawa Yuki、Tanimoto Kotaro	４．巻 492
２．論文標題 Longitudinal effects of estrogen on mandibular growth and changes in cartilage during the growth period in rats	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Developmental Biology	６．最初と最後の頁 126～132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2022.10.007	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7件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 仲里みのり，麻川由起，廣瀬尚人，矢野下真，壷井英里，西山沙由理，久保尚毅，北大樹，中嶋亮介，武居咲希，谷本幸太郎
２．発表標題 Semaphorin3A の軟骨分化における役割とその作用機序について
３．学会等名 第37回一般社団法人日本顎関節学会総会・学術大会
４．発表年 2024年

１．発表者名
：谷本幸太郎，國松亮，麻川由起，吉見友希，廣瀬尚 人

２．発表標題
特発性下顎頭吸収と顎変形症との関連

３．学会等名
第 33 回日本顎変形症学会総会・学術大会

４．発表年
2023年

１．発表者名
：壷井英里， 廣瀬尚人，麻川由起，矢野下真，西山沙由理，久保尚毅，北大樹，武居咲希，仲里みのり，中嶋亮 介，谷本幸太郎

２．発表標題
広島大学病院矯正歯科における小児の顎関節症の発現に関する臨床統計調査

３．学会等名
第 66 回中・四国矯正歯科学会大会

４．発表年
2023年

１．発表者名
矢野下真，廣瀬尚人，西山沙由理，壷井英里，久保尚毅，北大樹，武居咲希，中嶋亮介，仲里みのり，麻川由起，谷本幸太郎

２．発表標題
顎関節症を有する重度骨格性上顎前突患者に対して顎関節症基本治療後に手術を併用した 矯正歯科治療を行った一例

３．学会等名
第 36 回一般社団法人日 本顎関節学会総会・学術大会

４．発表年
2023年

１．発表者名
壷井英里，廣 瀬尚人，麻川由起，矢野下 真，大西 梓，高野真実，西山沙由理，久保尚毅，北 大樹，谷本幸 太郎

２．発表標題
週齢の違いがラット顎関節および血清中の Semaphorin３A 発現に与える影響

３．学会等名
第 35 回一般社団法人日本顎関節学会総会・学術大会

４．発表年
2022年

１．発表者名
久保尚毅，廣瀬尚人，粟田 哲也，矢野下 真，西山沙由理，壷井英里，北 大樹，大西 梓，麻川由紀，谷本幸太郎

２．発表標題
下顎頭の成長に伴うエストロゲンの下顎骨および軟骨への影響

３．学会等名
第 35 回一般社団法人日本顎関節学会総会・学術大会

４．発表年
2022年

１．発表者名
北 大樹，矢野 下 真，廣瀬尚人，西山沙由理，壷井英里，久保尚毅，大西 梓，麻川由起，谷本幸太郎

２．発表標題
関節円板前方転位モデルラットにおける下顎頭の形態学的、組織学的変化

３．学会等名
第 35 回一般社団法人日本顎関節学会総会・学術大会

４．発表年
2022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
研究分担者	谷本　幸太郎 (Tanimoto Kotaro) (20322240)	広島大学・医系科学研究科（歯）・教授 (15401)	
研究分担者	矢野下　真 (Yanoshita Makoto) (20823199)	広島大学・医系科学研究科（歯）・助教 (15401)	
研究分担者	國松　亮 (Kunimatsu Ryo) (40580915)	広島大学・医系科学研究科（歯）・准教授 (15401)	

６．研究組織（つづき）

	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	廣瀬　尚人 (Hirose Naoto) (50611935)	広島大学・病院（歯）・講師 (15401)	

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