

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463168

研究課題名(和文) 頭蓋冠縫合部早期癒合症におけるmicroRNAの発現および機能解析

研究課題名(英文) Analysis of expression pattern and function of micro-RNA in craniosynostosis

研究代表者

小林 起穂 (KOBAYASHI, YUKIHO)

東京医科歯科大学・医歯(薬)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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アペール症候群(As)の発生機序に関するmicroRNAを同定することを目的とした。ASモデルマウス(Ap)及び同腹コントロールマウス(Ct)頭蓋冠より冠状縫合部を摘出し、miRNAを抽出後、miRNAアレイにてmiRNAの解析を行った。また縫合部における発現量をリアルタイムPCR法にて検索した。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。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the expression pattern of miRNA in the calvarial sutures of Apert syndrome model mice (Ap mice) and the control mice (Ct mice). Ap mice showed higher expression of 19 kinds of miRNA and lower 5 kinds of miRNA significantly. Additionally, mmu-miR-182-5p and mmu-miR-206-3p significantly highly expressed in Ap mice by real-time PCR.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：頭蓋冠縫合部早期癒合症 miRNA

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 (*Gli3^{Xt-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⁾、*Gli3^{Xt-J/Xt-J}* と骨関連転写因子 Run2 ノックアウトマウス (*Runx2^{-/-}*) とを交配させて得られた個体 (*Gli3^{Xt-J/Xt-J}; Runx2^{-/-}*) 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-typell 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。

【参考文献】研究代表者 (は太字・二重下線で記載、* ; Corresponding author

- 1) **Tanimoto, Y.**, et.al., *J Biol Chem.* (2004)
- 2) Yokota, M., **Kobayashi, Y***, et.al., *PLoS One.* (2014)
- 3) Morita, J., Nakamura, M., **Kobayashi,**

Y., et.al., *Dev Dyn.* (2014)

- 4) Suzuki, H., Suda, N., Shiga, M., **Kobayashi, Y.**, et.al., *J Cell Physiol.* (2012)
- 5) Rice, D.P., Connor, E.C., Veltmaat, J.M., Lana-Elola, E., Veistinen, L., **Tanimoto, Y.**, et.al., *Hum Mol Genet.* (2010)
- 6) **Tanimoto, Y.**, et.al., *J Biol Chem.* (2012)

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

（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 5 件）

- (1) Therapeutic effect of nanogel-based delivery of soluble FGFR2 with S252W mutation on craniosynostosis. Yokota M, Kobayashi Y, Morita J, Suzuki H, Hashimoto Y, Sasaki Y, Akiyoshi K, Moriyama K. 査読あり
PLoS One. 2014 Jul 8;9(7):e101693. doi: 10.1371/journal.pone.0101693.
- (2) RELAXIN enhances differentiation and matrix mineralization through Relaxin/insulin-like family peptide receptor 2 (Rxfp2) in MC3T3-E1 cells in vitro. Duarte C, Kobayashi Y, Kawamoto T, Moriyama K. 査読あり
Bone. 2014 Aug;65:92-101. doi: 10.1016/j.bone.2014.05.005.
- (3) Long-term orthodontic and surgical treatment and stability of a patient with Beckwith-Wiedemann syndrome.

Hikita R, Kobayashi Y, Tsuji M, Kawamoto T, Moriyama K.

Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2014 May;145(5):672-84. doi:

10.1016/j.ajodo.2013.08.019. 査読あり

- (4) Relaxin receptors 1 and 2 and nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor) mRNAs are expressed in oral components of developing mice.

Duarte C, Kobayashi Y, Kawamoto T, Moriyama K.

Arch Oral Biol. 2014 Feb;59(2):111-8. doi:

10.1016/j.archoralbio.2013.10.010. 査読あり

- (5) Soluble form of FGFR2 with S252W partially prevents craniosynostosis of the apert mouse model.

Morita J, Nakamura M, Kobayashi Y, Deng CX, Funato N, Moriyama K.

Dev Dyn. 2014 Apr;243(4):560-7. doi: 10.1002/dvdy.24099. 査読あり

〔学会発表〕（計 10 件）

- (1) ドゥアルテ カロリーナ, 小林起穂, 森田淳平, 川元龍夫, 森山啓司. マウス頭蓋矢状縫合部拡大時の骨リモデリングに対する子宮弛緩因子リラキシンの影響. 第73回日本矯正歯科学会大会 2014.10.20 幕張メッセ(千葉県, 千葉市)
- (2) Hikita R, Kobayashi Y, Tsuji M, Kawamoto T and Moriyama K. Long-term orthodontic and surgical treatment and stability of a patient with Beckwith Wiedemann syndrome. 90th Congress of the European Orthodontic Society. 2014.06.18 Warsaw (Poland)
- (3) Duarte C, Kobayashi Y, Kawamoto T, Moriyama K. Relaxin Affects Osteoblast Proliferation and Differentiation In Vitro. The 91st General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, Seattle (USA), March 20-23, 2013.
- (4) Yoshizaki M, Kobayashi Y, Moriyama K. Soluble FGFR2 with Apert mutation inhibits osteoblastic proliferation and differentiation. The 91st General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, Seattle (USA), March 20-23rd, 2013.
- (5) Duarte C, Kobayashi Y, Kawamoto T, Moriyama K. Relaxin Affects Differentiation and Mineralization of MC3T3-E1 Cells Through Rxfp2. 2nd Joint Annual Meeting of the International Bone and Mineral Society

and the Japanese Society for Bone and Mineral Research, Kobe International Conference Center (Hyogo, Kobe, Japan), May 28th - June 1st, 2013.

- (6) Yoshizaki M, Kobayashi Y, Moriyama K. Soluble fibroblast growth factor receptor 2 with Apert mutation inhibits differentiation and mineralization of osteoblast. 2nd Joint Meeting of the International Bone Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research, Kobe International Conference Center (Hyogo, Kobe, Japan), May 28th June 1st, 2013.
- (7) 森田淳平、船戸紀子、小林起穂、中村正孝、森山啓司. アペール型変異(S252W)を伴う可溶型 FGFR2 はアペール症候群モデルマウスの頭蓋冠早期癒合症の発症を抑制する. 第 72 回日本矯正歯科学会大会、キッセイ文化ホール(長野県、松本市) 平成 25 年 10 月 7-9 日.
- (8) 澤田紘美、小川卓也、片岡恵一、阿彦希、小林起穂、馬場祥行、森山啓司. 口唇口蓋裂患者における創外型延長装置による上顎骨延長時の牽引力に関する検討. 第 37 回日本口蓋裂学会総会・学術集会、佐賀市文化会館(佐賀県、佐賀市) 平成 25 年 5 月 30-31 日.
- (9) ドゥアルテ カロリーナ、小林起穂、川元龍夫、森山啓司. 子宮弛緩因子リラキシンが骨芽細胞の形質に及ぼす影響についての検討. 第 72 回日本矯正歯科学会大会、キッセイ分化ホール(長野県、松本市) 平成 25 年 10 月 7-9 日.
- (10) 吉崎正子、小林起穂、佐々木善浩、秋吉一成、森山啓司. 頭蓋冠縫合部早期癒合症に対する FGF/FGFR シグナルを標的とした新規治療法開発への試み. 第 72 回日本矯正歯科学会大会、キッセイ分化ホール(長野県、松本市) 平成 25 年 10 月 7-9 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 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

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

(2) 研究分担者

森山 啓司 (MORIYAMA, Keiji)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：20262206

(3) 連携研究者

()

研究者番号：