

令和元年5月31日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11551

研究課題名(和文) 新規同定した長鎖非翻訳RNAによる歯髄細胞増殖・分化誘導機序の解明

研究課題名(英文) Novel long non-coding RNA regulates the proliferation and differentiation of human dental pulp cells

研究代表者

鈴木 茂樹 (Suzuki, Shigeki)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：30549762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄細胞は高い細胞増殖能を有し、DMP-1遺伝子は硬組織形成時に歯髄細胞・象牙質芽細胞が発現する遺伝子である。これら細胞同様にDMP-1遺伝子座からの転写が活発に行われている口腔上皮細胞では、DMP-1 mRNAはスプライシングを受けることなくクロマチンに強局在をしていた。DMP-1発現抑制は細胞増殖を抑制し、さらにはChIP-array解析により、細胞増殖抑制因子CDKN1BがDMP-1の発現抑制によりepigeneticsに発現上昇する遺伝子として同定された。歯髄細胞からもDMP-1が検出されることから、unspDMP-1はepigeneticsに歯髄細胞機能を制御していると推定される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯髄細胞は高い増殖能・硬組織形成分化能を持つのみでなく、歯髄組織は良質な幹細胞の供給源である。本研究では歯髄・象牙質に高発現するDentin matrix protein-1 (DMP-1) 遺伝子座から転写されるRNAがクロマチン動態制御を担うchromatin associated RNAであることを明らかにした報告である。この新規転写産物発現制御により歯髄組織から得られる細胞集団の増殖・分化等の細胞機能を制御すること、さらにはこの新規転写産物発現レベルを指標とした新たな細胞集団を分離することにより、将来的には再生ソースとしての歯髄組織のさらなる有用性開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human dental pulp cells possess potent proliferative ability. DMP-1 expression is induced during the odonto/osotogenic differentiation of human dental pulp cells. In oral epithelial cells, abundant RNA molecules are transcribed from DMP-1 gene locus and the transcribed RNA molecules remain unspliced and are predominantly localized in chromatin (unspliced DMP-1: unspDMP-1). Suppression of endogenous these RNA molecules resulted in the inhibition of cell growth. Further analysis utilizing Ch-IP analysis revealed that CDKN1B gene was epigenetically modified by unspDMP-1. As human dental pulp cells also expresses unspDMP-1, unspDMP-1 may possess pivotal roles for proliferation, migration, and differentiation in human dental pulp cells.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：歯髄細胞 epigenetics lncRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Dentin Matrix Protein-1 (DMP-1) は Dentin sialophosphoprotein (DSPP) と共に象牙芽細胞より分泌され象牙質に沈着する非コラーゲン性タンパク質であり、*Dmp-1* 遺伝子欠損マウスは象牙質形成不全症様の表現型を呈することから、DMP-1 は象牙質石灰化に必須の役割を果たすことが知られている。さらに DMP-1 の C 末端領域 (C-DMP-1) は DSPP の C 末端領域 (Phosphophoryn : PP) と同様に integrin 結合配列 Arg-Gly-Asp (RGD) を持つが、C-DMP-1 の RGD のみが integrin $\alpha\beta 3$ 、 $\alpha\beta 5$ を介して高い細胞接着・遊走などを促進させる機能を持つ (Suzuki, *et al.*, PLOs ONE, 2014)。DMP-1 はその遺伝子名が表す通り DSPP と同様に歯髄・象牙質で同定され、正常組織では象牙質および骨に高発現している (Suzuki, *et al.*, Arch Oral Biol, 2012)。

ヒト歯髄細胞および未分化細胞マーカーで歯髄より単離された歯髄幹細胞は、高い増殖能と分化能を持つことから、再生医療の有用なソースとなることが近年相次いで報告されている (Morad *et al.*, Arch Oral Biol, 2013, Kwon *et al.*, Sci Rep, 2015)。しかしながら、如何にして歯髄組織・細胞がこのような特性を維持できるのかは未だ明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究計画では、歯髄細胞・象牙芽細胞同様に DMP-1 遺伝子座からの転写が活発に行われている口腔上皮細胞を主に用いて DMP-1 遺伝子座の転写活性化による細胞増殖制御機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞分画ならびにパイオインフォマティクス解析

細胞分画法によりクロマチン局在 RNA (非翻訳 RNA) および核・細胞質 RNA (翻訳 RNA) を精製し、DNase 処理後に qPCR および RNA-seq 解析を行った。RNA-seq およびパイオインフォマティクス解析は MacroGen Japan および Amelieff により行われた。

(2) 細胞増殖能の検討

96 well plate に細胞を播種し、siRNA 導入後の細胞数を crystal violet による染色にて定量した。さらに細胞周期については cell cycle phase determination kit を用いた細胞処理後にフローサイトメトリーにて解析を行った。

(3) chromatin immunoprecipitation (ChIP) array 解析

siRNA を導入した口腔上皮細胞を 1%ホルムアルデヒド溶液で固定し、H3lys27 (Cell Signaling Technologies), H3lys4 (Cell Signaling Technologies), SUZ12, mCherry および control IgG を用いてそれぞれ免疫沈降を行った。得られた沈降 DNA サンプルを EpiThect ChIP qPCR array を用いて解析した。

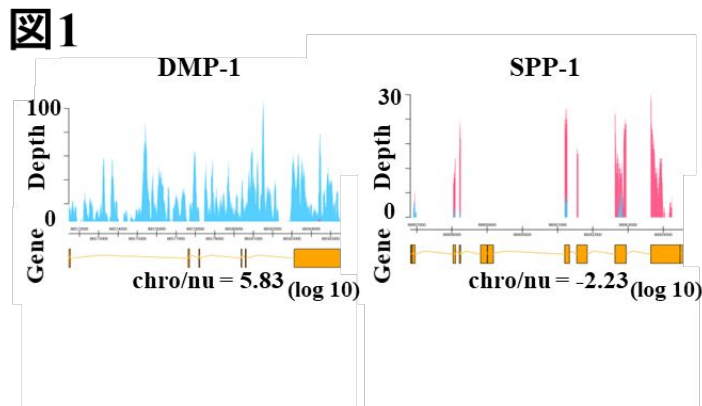
(4) RNA immunoprecipitation (RIP) 解析

口腔上皮細胞に PP7-mCherry 発現ベクターを導入し抗生剤選択培養により安定発現株を樹立した。樹立した安定発現細胞株に unspDMP1-24xPP7 またはコントロールベクターを一過性に導入し、導入 24 時間後に 1%ホルムアルデヒド溶液で細胞を固定後 RNA ChIP-IT kit を用いて unspDMP-1 の CDKN1B promoter 領域への直接的会合を検討した。

4. 研究成果

歯髄・象牙芽細胞の硬組織形成分化過程において DMP-1 遺伝子座からの RNA の転写は促進されるものの、非分化誘導時の発現レベルは高くない。我々は口腔扁平上皮由来細胞ならびに組織において DMP-1 遺伝子座が活性化されていることを見出した。そのような背景から、本研究計画では、まず口腔上皮由来細胞を用いて解析を行った。細胞分画法により total RNA をクロマチン画分(非翻訳 RNA)および核分画(翻訳 mRNA)に分離し、発現量を網羅的に RNA-seq

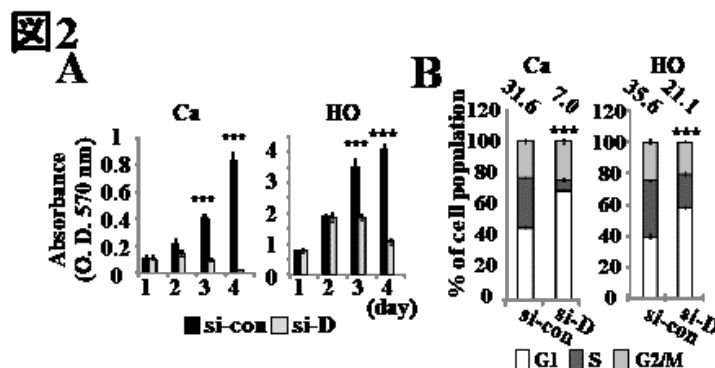
にて比較検討した。図 1 に示すように DMP-1 遺伝子座から転写される RNA はエクソン領域のみならずイントロン領域からも転写されており、RNA の局在はクロマチン有意であった (chro/nu = クロマチン/核 = 5.83)。一方、



オステオポンチンのコード遺伝子である SPP-1 遺伝子座からの RNA 転写はエクソン特異的かつ chro/nu = -2.23 であることから、SPP-1 は転写後にスプライシングを受けて核質に出たのちに細胞質に輸送され翻訳される一般的な mRNA の発現様式であった。これら結果から、DMP-1 遺伝子座から転写された RNA はスプライシングを受けずに核に留まって機能する chromatin associated RNA の一種であることが示唆された。

続いて、この chromatin associated RNA (unspliced DMP-1: unspDMP1) に対する特異的 siRNA を用いて発現抑制を行うと、2 種の細胞 (Ca: Ca9-22 および Ho: Ho1-u-1) において、コントロール群 (si-con) と比較して、

特異的 siRNA 導入群 (si-D) で細胞増殖抑制を認めた (図 2A)。また、細胞周期を検討したところ S 期の細胞比が特異的 siRNA 導入群で有意に減少していたことから (図 2B)、この



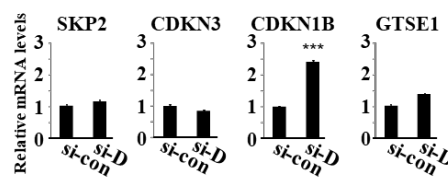
chromatin associated RNA は細胞増殖に関与する遺伝子の発現調節領域における局所クロマチンリモデリング

制御を介して細胞の増殖を促進させていることが示唆された。そこで、chromatin

図 3

Promoter	Lys27/Lys4	SUZ12
SKP2	0.6464	0.0000
CDKN3	0.5364	0.2840
CDKN1B	0.5396	0.5079
GTSE1	0.6661	0.5800

Ratio = $\frac{\text{percent input of si-D treated}}{\text{percent input of si-con treated}}$

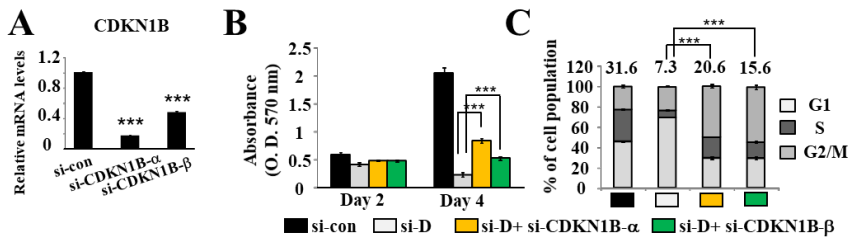


associated RNA の発現抑制により epigenetics にクロマチン構造変化をきたす細胞周期関連遺伝子座を Ch-IP array で網羅的に探索したところ、特異的 siRNA 導入群において CDKN1B の転写発現領域の epigenetic な活性化とそれに付随する CDKN1B 遺伝子の発現上昇を認めた (図 3)。さらに、chromatin associated RNA に対する特異的 siRNA 導入細胞において、CDKN1B 発現を CDKN1B に対する特異的 siRNA で抑制したところ、細胞増殖ならびに S 期細胞比率の回復が認められたことから (図 4: 次項)、この新規 chromatin associated RNA は、epigenetics に CDKN1B の発現を抑制することで、結果として細胞増殖を促進していることが示唆された。

続いて、バクテリオファージ由来 PP7 およびその特異結合配列 24xPP7 stem loop を用いた RNA 標識法により、chromatin associated RNA が CDKN1B 転写調節領域に結合するか否かを検討し

たところ、解析した 3 か所 (-1389 to -1307, -835 to -746, -415 to -328 それぞれ転写開始点からの位置) にお

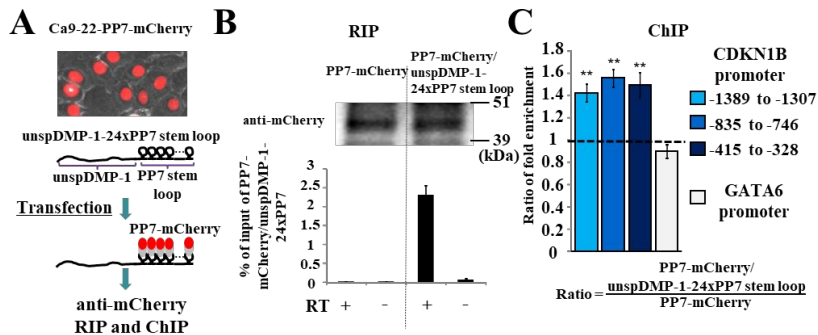
図4



いて、コントロールとして用いた GATA6 転写調節領域と比較して有意な結合を認めた (図5)。これら結果から本研究計画から DMP-1 遺伝子座には転写後にスプライシングを受けずにクロマチンに留まる RNA が存在することが明らかとなった。本研究では細胞増殖のみに焦点を絞って解析を行ったが、

口腔上皮細胞と比較して発現レベルは高くないものの、培養歯髄細胞においても同様の RNA が転写されていることから、歯髄細胞の増殖・遊走・分化などの細胞機能への関与が推定され、現在解析を進めている。

図5



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

1. Suzuki S, Fukuda T, Nagayasu S, Nakanishi J, Yoshida K, Hirata-Tsuchiya S, Nakao Y, Sano T, Yamashita A, Yamada S, Ohta L, Shiba H, Nishimura F: Dental pulp cell-derived powerful inducer of TNF-α comprises PKR containing stress granule rich microvesicles. *Sci Rep.* 9(1):3825, 2019.
2. 鈴木茂樹* ほか: 非翻訳長鎖 RNA によるエピジェネティックな遺伝子発現調節機構と歯周炎感受性との関連性. *日本歯周病学会会誌.* 61: 1-8, 2019.
3. Suzuki S*, Hoshino H, Yoshida K, Nakanishi J, Tsuchiya-Hirata S, Kobuke S, Haruyama N, Nishimura F, Shiba H: Genome-wide identification of chromatin-enriched RNA reveals that unspliced dentin matrix protein-1 mRNA regulates cell proliferation in squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 495(3): 2303-2309, 2018.
4. Suzuki S*, Nakanishi J, Yoshida K, and Shiba H: Dentin sialophosphoprotein is a potentially latent bioactive protein in dentin *J Oral Biosci.* 58(4):134-42, 2016.
5. Sano T, Nagayasu S, Suzuki S, Iwashita M, Yamashita A, Shinjo T, Sanui T, Kushiya A, Kanematsu T, Asano T, Nishimura F*: Epicatechin downregulates adipose tissue CCL19 expression and thereby ameliorates diet-induced obesity and insulin resistance. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 4753(16): 30200-30209, 2016.
6. Jaha H, Husein D, Ohyama Y, Xu D, Suzuki S, Huang GT and Mochida Y*: N-terminal Dentin Sialoprotein fragment induces type I collagen production and upregulates dentinogenesis marker expression in osteoblasts. *Biochem Biophys Rep.* 6: 190-196, 2016.

[学会発表](計11件)

1. 中西 惇, 鈴木茂樹, 小武家誠司, 吉田和真, 永安慎太郎, 柴 秀樹: Phosphoryn の持つ抗炎症作用の検討. 第144回日本歯科保存学会春季学術大会, 栃木, 2016.
2. 永安慎太郎, 鈴木茂樹, 柴 秀樹: 歯髄細胞特異的因子によるマクロファージからの TNF-α 産生誘導機構の解明. 第37回日本歯内療法学会学術大会, 名古屋, 2016.
3. 永安慎太郎, 鈴木茂樹, 中西 惇, 吉田和真, 土屋志津, 本山直世, 小武家誠司, 柴 秀樹:

- マクロファージからの TNF- α 産生を誘導する歯髄細胞特異的因子の探索. 第 145 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 長野, 2016.
4. 吉田和真, 鈴木茂樹, 中西 惇, 永安慎太郎, 小武家誠司, 柴 秀樹: Heparin-LL37 複合体による抗菌作用の検討. 第 145 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 長野, 2016.
 5. 平田-土屋志津, 岡本一起, 鈴木茂樹, 本山直世, 永安慎太郎, 小武家誠司, 柴 秀樹, 北村知昭: BMP-Smad シグナルに MTI-II Peptide Anti-Inflammatory Drug (MPAID) が与える影響. 第 146 回日本歯科保存学会春季学術大会, 青森, 2017.
 6. 鈴木茂樹, 吉田和真, 中西 惇, 平田-土屋志津, 小武家誠司, 永安慎太郎, 本山直世, 柴 秀樹: クロマチン局在 DMP-1 遺伝子による細胞増殖制御機構の解明. 第 147 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 盛岡, 2017.
 7. 永安慎太郎, 鈴木茂樹, 中西 惇, 吉田和真, 小武家誠司, 本山直世, 土屋志津, 西村英紀, 柴 秀樹: 培養ヒト歯髄細胞上清からの炎症促進 Microvesicles の単離. 第 147 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 盛岡, 2017.
 8. 吉田和真, 鈴木茂樹, 中西 惇, 小武家誠司, 本山直世, 永安慎太郎, 平田-土屋志津, 柴 秀樹: 抗菌ペプチド LL37 の宿主細胞傷害性低減を目指した複合体の開発. 第 147 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 盛岡, 2017.
 9. 中西 惇, 鈴木茂樹, 吉田和真, 本山直世, 小武家誠司, 永安慎太郎, 平田-土屋志津, 柴 秀樹: Phosphoryn の持つ抗炎症機能領域の探索. 第 147 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 盛岡, 2017.
 10. 王 祝愉, 根本 英二, 丸山 顕太郎, 鈴木 茂樹, 多田 浩之, 向阪 幸彦, 須藤 瑞樹, 山田 聡: ヒト歯根膜細胞は周期的伸展刺激により抗炎症性エクソソームを分泌する 第 61 回秋季日本歯周病学会学術大会, 大阪, 2018.
 11. 平田-土屋志津, 鈴木茂樹, 西藤法子, 本山直世, 柴 秀樹: Aspirin が BMP 誘導性骨芽細胞分化に与える影響 第 149 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 京都, 2018.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 柴 秀樹

ローマ字氏名: Shiba Hideki

所属研究機関名: 広島大学・大学院医歯薬保健学研究院(歯)研究科

部局名: 歯髄生物学研究室

職名: 教授

研究者番号(8桁): 60260668

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。