

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09583

研究課題名(和文) miRNAの発現調節による歯周組織構成細胞の分化誘導

研究課題名(英文) Induction of differentiation of periodontal tissue constituent cells by regulating expression of miRNA

研究代表者

高井 英樹 (TAKAI, Hideki)

日本大学・松戸歯学部・准教授

研究者番号：30453898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞を異なる性質の細胞に分化させるためには、特異的な転写因子(TFs)の発現誘導が必要である。MicroRNA(miRNA)は、mRNAの3'-UTRに結合し、翻訳抑制を引き起こす。我々は、歯周組織で発現量が多いTFsをmiRNAで抑制することで、歯根膜細胞(HPDL)がどのような細胞に分化誘導されるかを解析した。miR141およびmiR200aがTwist2とKlf12 3'-UTRに結合し、Sox5およびSox6 mRNAおよびタンパク質量を増加させた。以上の結果から、miR141およびmiR200aは、HPDL細胞を軟骨細胞に分化誘導す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

本実験では歯周病治療の実用化を目指して、ヒト歯周組織構成細胞に特異的な転写因子の発現をmiRNAで調節するところが独創的であると思われる。予想される結果としてヒト歯周組織構成細胞を異なる性質の細胞に分化誘導されると考えられる。以上のことから、本研究の意義は、歯周組織構成細胞に発現する特異的な転写因子をmiRNAで調節することにより、将来の歯周治療に応用することである。

研究成果の概要(英文)：In order to differentiate stem cells into cells with different properties, it is necessary to induce the expression of specific transcription factors (TFs). MicroRNA (miRNA) binds to the 3'-UTR of mRNA and causes translational repression. We analyzed what kind of cells the periodontal ligament cells (HPDL) are induced to differentiate by suppressing TFs, which are highly expressed in periodontal tissues, with miRNA. miR141 and miR200a bound to Twist2 and Klf12 3'-UTR, increasing Sox5 and Sox6 mRNA and protein levels. These results suggest that miR141 and miR200a may induce the differentiation of HPDL cells into chondrocytes.

研究分野：細胞の分化誘導

キーワード：miRNA

1. 研究開始当初の背景

歯周組織再生療法の確立は各々の歯周組織（歯槽骨、歯根膜、歯肉およびセメント質）に存在する細胞（歯周組織構成細胞）の生物学的特性を理解する事が重要である。未分化間葉系幹細胞は、骨形成因子 (BMPs, WNTs, FGFS) に応答し、骨関連転写因子 (Runx2, Osx, C/EBPS, Hox) を活性化する事で骨芽細胞への分化誘導が開始することが知られている。また、近年、遺伝子発現の調節には転写因子以外に miRNA による翻訳調節が重要であり、miRNA は様々な細胞において、骨関連転写因子を調節し、骨芽細胞への分化を誘導すると報告されている。

2. 研究の目的

本実験では、研究期間内に患者から採取した歯根膜細胞 (HPDL) を用い、歯周組織構成細胞に発現する特異的な転写因子 (Twist2 および KLF12) の 3'-UTR に結合する miRNA を検索し、miRNA による歯周組織構成細胞の分化誘導を検討することを研究目的とした。

3. 研究の方法

HPDL は 10%ウシ胎児血清および抗生物質 (100unit/ml ペニシリンおよび 100μg/ml ストレプトマイシン) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培養液を用いて、37°C、5%CO2 インキュベーター内で培養した。歯周組織構成細胞に優位に発現している転写因子 (Twist2 および KLF12) の 3'-UTR に結合する miRNA を公開データベースの TargetScan にて検索した。次に、miRNA が結合する 3'-UTR を PGL3 promoter プラスミドに挿入し、シークエンス解析を行い、正しい配列が挿入されたか確認し、Luciferase assay にて miRNA が予想される配列に結合するか検索した。さらに、歯周組織構成細胞に優位に発現している転写因子 (Twist2 および KLF12) をノックダウンするために miRNA を導入する 1 日前に細胞を 100 mm に播種した。細胞が 40~60% コンフルエントの状態では 3μg miRNA を Lipofectamine 2000 を用いて細胞内に導入した。その後 10%FBS を含む DMEM で 68 時間細胞培養後、細胞を回収し、全 RNA およびタンパク質を抽出した。Real-time PCR にて各種転写因子の RNA の発現量、Western Blot 法にてタンパク質量を検索した。また、miRNA を導入し培養した HPDL をさまざまな細胞染色法 (アリザリンレッド染色、アリシアンブルー染色、オイルレッド O 染色) で染色し、HPDL がどのような細胞に分化誘導されるか検索した。

4. 研究成果

Twist2 および KLF12 の 3'-UTR に結合する miRNA を公開データベースの TargetScan にて検索した結果、miR141 および 200a が結合する可能性があることが確認された (図 1)。miRNA が結合する 3'-UTR 配列を挿入した PGL3 promoter プラスミドまたは miRNA が結合する 3'-UTR に mutation を挿入した配列を挿入した PGL3 promoter プラスミド、miR141 過剰発現プラスミドおよび miR200a 過剰発現プラスミドを用いた Luciferase assay の結果、miR141 および 200a が予想される配列に結合することが証明された (図 2、3)。

Human Twist2	Context Score Percentile 74
Position 105-111 of Twist2 3' UTR	5'...AAGAGGAAGAGGGGGCAGUGUUU...
has-miR-141-3p	3' GGUAGAAAUGGUCUGUCACAAU
mutation Twist2 3' UTR	5'...AAGAGGAAGAGGGGGCCCGGGGU...
Position 105-111 of Twist2 3' UTR	5'...AAGAGGAAGAGGGGGCAGUGUUU...
has-miR-200a-3p	3' UGUAGCAAUGGUCUGUCACAAU
mutation Twist2 3' UTR	5'...AAGAGGAAGAGGGGGCCCGGGGU...
Human KLF12	Context Score Percentile 93
Position 79-86 of KLF12 3' UTR	5'...GCUGAAUCCCUUCACAGUGUUA...
has-miR-141-3p	3' GGUAGAAAUGGUCUGUCACAAU
mutation KLF12 3' UTR	5'...GCUGAAUCCCUUCACCCGGGGA...
Position 79-86 of KLF12 3' UTR	5'...GCUGAAUCCCUUCACAGUGUUA...
has-miR-200a-3p	3' UGUAGCAAUGGUCUGUCACAAU
mutation KLF12 3' UTR	5'...GCUGAAUCCCUUCACCCGGGGA...

図 1 転写因子 3'-UTR に結合する miRNA

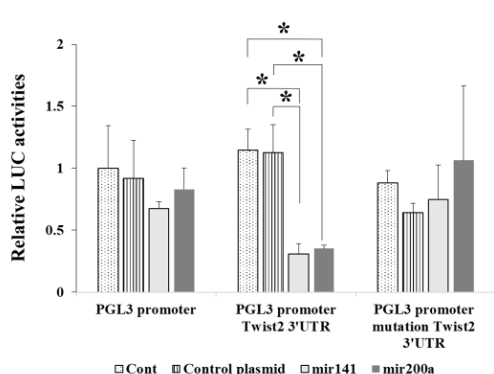


図 2 Twist2 3'-UTR 配列に対する miR の結合

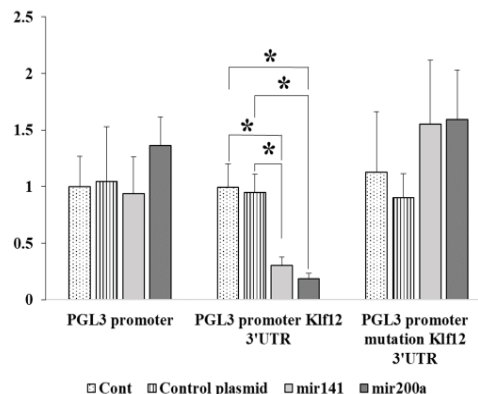


図 3 KLF12 3'-UTR 配列に対する miR の結合

次に、間葉系細胞に発現する転写因子 RNA およびタンパク質を Real-time PCR および Western Blot にて検索を行った結果、Twist2 および Klf12 mRNA およびタンパク質を減少させ、軟骨芽細胞で優位に発現している Sox5 および Sox6 mRNA およびタンパク質を増加させた (図 4、5)。

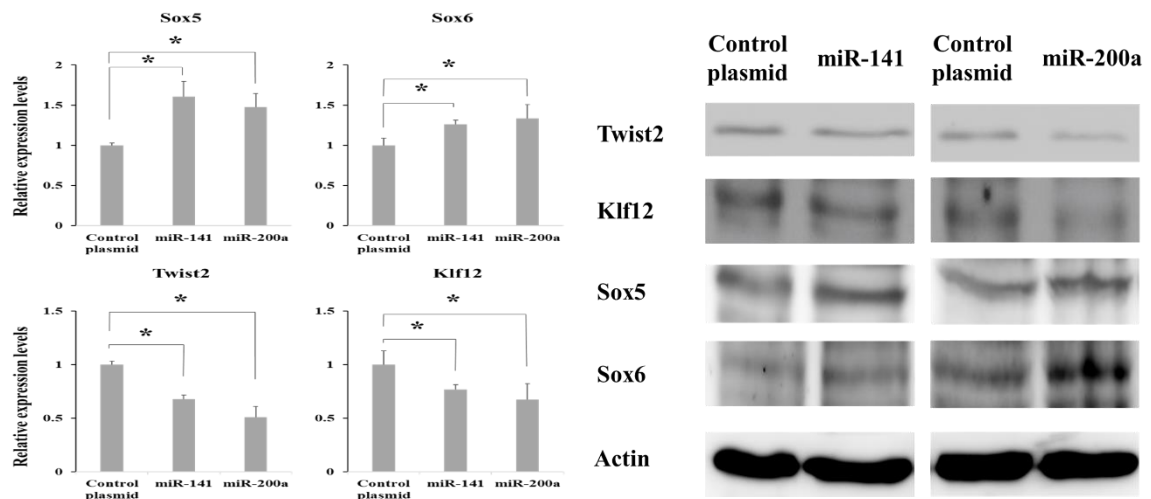
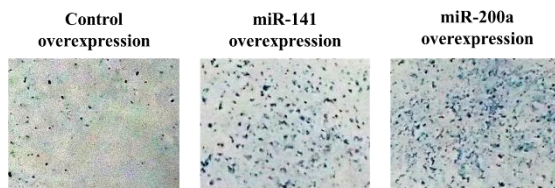


図 4 転写因子 mRNA に対する miR の効果

図 5 転写因子タンパク質に対する miR の効果

また、HPDL をディッシュに播種し、miR141 または 200a を細胞内に 4 時間導入後、10%FBS を含む DMEM で 21 日間細胞培養した HPDL をアリシアンブルー染色にて染色した。miR141 または 200a を導入した細胞は miR を導入していない細胞と比較して強く染色された (図 6)。

Alcian blue stain



21 days after transfection in HPDL cells

図 6 アリシアンブルーによる細胞染色

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takai H, Van Wijnen AJ, Ogata Y.	4. 巻 61
2. 論文標題 Induction of chondrogenic or mesenchymal stem cells from human periodontal ligament cells through inhibition of Twist2 or Klf12.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 313-320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.18-0224	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高井英樹、小方頼昌
2. 発表標題 Twist2またはKlf12阻害によるヒト歯根膜細胞からの軟骨形成または間葉系幹細胞への誘導
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takai H, Ogata Y
2. 発表標題 Induction of chondrogenic or mesenchymal stem cells from human periodontal ligament cells through inhibition of Twist2 or Klf12
3. 学会等名 13th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高井英樹、小方頼昌
2. 発表標題 miRNAによる歯根膜細胞の軟骨細胞への分化誘導
3. 学会等名 第61回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018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	小方 頼昌 (OGATA Yorimasa) (90204065)	日本大学・松戸歯学部・教授 (32665)	

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