

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09585

研究課題名(和文)新規バイオインフォマティクス解析を用いた細胞の光生物学的活性反応メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism of photobiological cell proliferation activity using a new bioinformatics analysis tool

研究代表者

石黒 一美 (ISHIGURO, Hitomi)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：20508486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：低出力レーザー照射(LLI)によるヒト線維芽細胞(HGF)とヒト歯肉上皮細胞(HGK)の遺伝子発現への影響を検討した。LLI照射後のHGFのマイクロアレイデータから機能解析で、defense response (DR)のCXCL8, NFKB1, NFKB1A, STAT1は他のDRとの反応をつなぐ遺伝子であった。また、qRT-PCRの結果、同様の発現変動傾向がみられた。次に、LLI照射後のHGKの遺伝子の発現をqRT-PCRで検討した結果、EGFRとTGF- β で有意な発現増加がみられた。本研究結果から、HGFとHGKの両方でLLI照射が創傷治癒に関わる遺伝子の発現と機能に關与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周組織の創傷治癒促進するため、レーザー光の光生物学的活性反応による低反応レベルレーザー治療(LLLT)が行われているが、レーザー光のような光刺激により細胞が賦活化、細胞増殖が亢進し、創傷治癒が促進する分子機構は未だに解明されていない。本研究では、歯周組織由来不死化ヒト細胞に対しLLLTを想定したレーザー照射を行い、cDNAマイクロアレイとバイオインフォマティクスによる遺伝子発現解析と機能解析を行うことで、低出力レーザー照射が細胞に与える未知のメカニズムの解明と臨床で実践する上でのエビデンスを構築する一助となった。

研究成果の概要(英文)：The effects of low-power laser irradiation on gene expression of immortalized human fibroblasts (HGF) and immortalized human gingival epithelial cells (HGK) were investigated.

(1) HGF: Functional analysis of microarray data revealed that the defense response (DR) genes CXCL8, NFKB1, NFKB1A, and STAT1 were genes that link responses to other DR-associated genes. When the above genes were verified by qRT-PCR, a similar trend of expression variation was observed.

(2) HGK: Wound healing-related gene expression over time was compared by qRT-PCR. significant expression increases were observed for EGFR and TGF- β , suggesting their involvement in promoting wound healing in HGK as well.

研究分野：歯周病学

キーワード：低出力レーザー(LLI) Nd:YAGレーザー 不死化ヒト線維芽細胞 不死化ヒト歯肉上皮細胞 マイクロアレイ qRT-PCR 遺伝子発現 機能解析

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 , Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

数種類の歯科用レーザーが市販され、その波長に応じて様々な歯科治療に利用されるようになっていた。主に、歯周治療では軟組織の切開、歯石の蒸散、歯肉メラニン色素沈着の除去のような高反応レベルレーザー治療 (HLLT) に加え、歯周外科治療後の創傷治癒促進のような低反応レベルレーザー治療 (LLLT) も臨床的には既に行われていた。しかしながら、LLLT で利用されるような出力のレーザー光による光刺激により、細胞が賦活化され、細胞増殖が亢進し、創傷治癒が促進するメカニズムについては未知であった。

2. 研究の目的

ヒト歯周組織由来の培養細胞として、ヒト線維芽細胞とヒト歯肉上皮細胞に低出力レーザー照射を行い、cDNA マイクロアレイとバイオインフォマティクスによる遺伝子発現解析と機能解析を行うことで、LLLT が細胞に与える未知のメカニズムの解明と臨床で実践する上でのエビデンスを構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF)

HGF に LLL 照射と同様の細胞増殖が得られる条件として、Nd:YAG レーザーを 100 mJ/5 pps (0.5W) の条件で 30 秒間照射し、cDNA マイクロアレイとデータ解析ツールを用い、照射 1, 3, 6, 12 時間後の経時的遺伝子発現変動と機能を解析した。さらに、Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (STRING) の結果から、他の変動遺伝子と関連を持つものについて、不死化、樹立、セルラインの歯肉線維芽細胞を用い、マイクロアレイデータと比較するため定量的逆転写 PCR (qRT-PCR) で検証を行った。

(2) ヒト歯肉上皮細胞 (HGK)

HGK に LLL 照射と同様の細胞増殖が得られる条件として、Nd:YAG レーザーを 100 mJ/30 pps (0.5W) の条件で 10 秒間照射し、qRT-PCR で創傷治癒関連遺伝子 (EGF, EGFR, TGF- β , HB-EGF) の経時的発現を検証した。

4. 研究成果

(1) ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF)

LLL 照射で、発現変動遺伝子が多数認められるのは、6, 12 時間後であり (図 1)、Database for Annotation Visualization and Integrated Discovery (DAVID) での機能解析結果では、照射後 1, 3, 6, 12 時間後の up-regulated genes は 13, 5, 212, 84 となり、down-regulated genes は 35, 68, 288, 425 の Biological Process (BP) に含まれ、多くは創傷治癒に関連する BP であった。

6, 12 時間後に共通する BP である defense response に着目した STRING での機能解析結果では、CXCL8, NFKB1, NFKBIA および STAT1 が、defense response に関与する遺伝子の反応をつなぐ役割を果たしていた (図 2, 3)。全ての細胞間において NFKB1 と NFKBIA の qRT-PCR による検証では、マイクロアレイデータと同様の発現変動が有意に認められた。また、CXCL8 と STAT1 においても同様の傾向が認められた。

本研究では、歯肉線維芽細胞への LLL 照射後の遺伝子の発現変動解析および機能解析から、6, 12 時間後で、創傷治癒に関連する BP に多くの発現変動遺伝子が含まれ、特に defense response に大きな影響を及ぼすことが明らかになった。

(2) ヒト歯肉上皮細胞 (HGK)

LLL 照射後 1 時間では、GFR および TGF- β の有意な発現減少が認められた。また、LLL 照射後 6 時間では、EGFR, TGF- β の有意な発現増加を認めた。

LLL 照射による、歯肉上皮細胞の創傷治癒促進に関する報告は少ない。本研究の qRT-PCR の結果から歯肉線維芽細胞と同様、LLL 照射は歯肉上皮細胞も創傷治癒促進への関与が示唆された。今後、cDNA マイクロアレイを用いたさらなる解析を行う予定である。

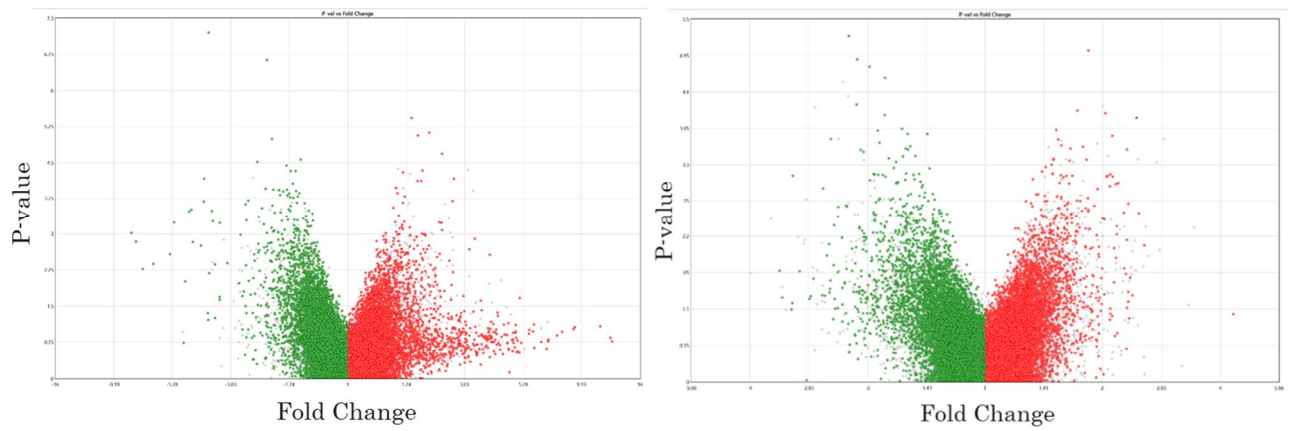


図1 左図：照射6時間後のVolcano Plot，右図：照射6時間後のVolcano Plot

赤色は照射群で増加した遺伝子，緑色は照射群で減少した遺伝子を表す。

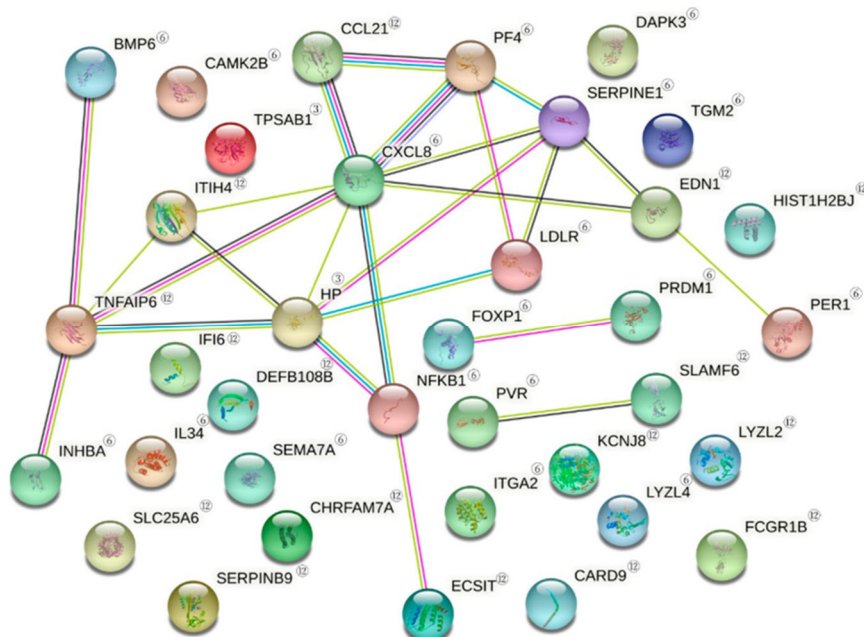


図2 Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (STRING)
LLL照射による defense response における Up-regulated DEGs の PPI ネットワークを表す。

照射時間後， : 3時間， : 6時間， : 12時間，を示す。

- 赤線 : indicates the presence of fusion evidence
- 緑線 : neighborhood evidence
- 青線 : cooccurrence evidence
- 紫線 : experimental evidence
- 黄色線 : text mining evidence
- 水色線 : database evidence
- 黒線 : coexpression evidence

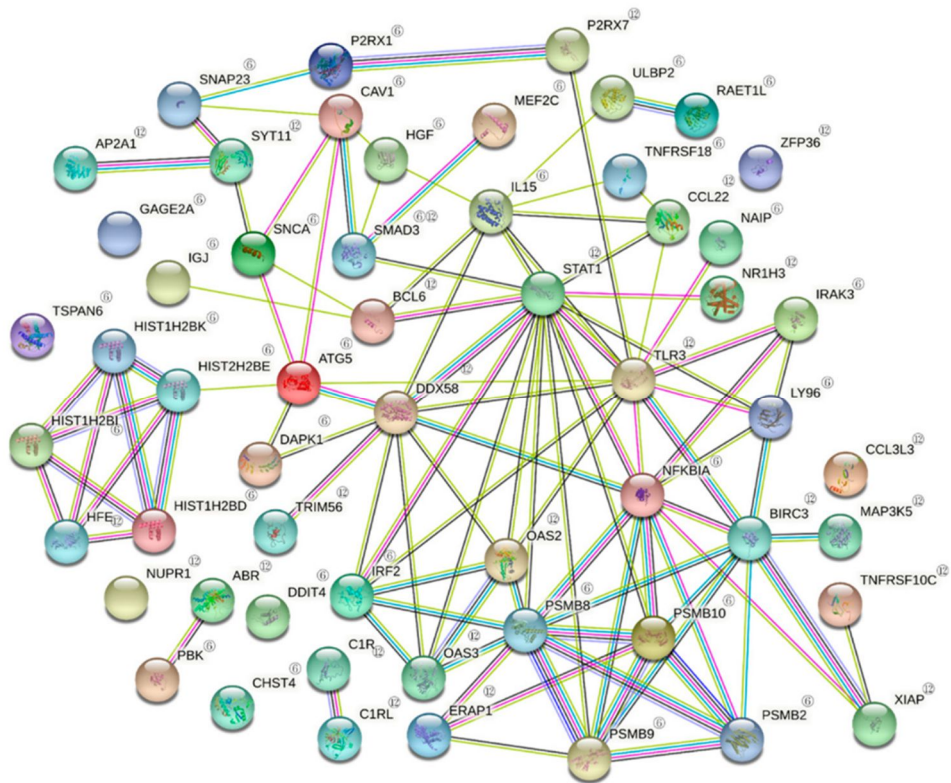


図3 Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (STRING)

LLL 照射による defense response における Down-regulated DEGs の PPI ネットワークを表す。

照射時間後， : 3 時間， : 6 時間， : 12 時間，を示す。

- 赤 線 : indicates the presence of fusion evidence
- 緑 線 : neighborhood evidence
- 青 線 : cooccurrence evidence
- 紫 線 : experimental evidence
- 黄色線 : text mining evidence
- 水色線 : database evidence
- 黒 線 : coexpression evidence

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wada Yuki、Suzuki Asami、Ishiguro Hitomi、Murakashi Etsuko、Numabe Yukihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Chronological Gene Expression of Human Gingival Fibroblasts with Low Reactive Level Laser (LLL) Irradiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm10091952	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 和田祐季、石黒一美、鈴木麻美、村樫悦子、中西生美、沼部幸博
2. 発表標題 低反応レベルレーザー照射によるヒト歯肉線維芽細胞の遺伝子発現変化
3. 学会等名 日本歯科保存学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田祐季、石黒一美、鈴木麻美、村樫悦子、沼部幸博
2. 発表標題 低反応レベルレーザー (LLL) 照射によるヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) の経時的遺伝子発現変化
3. 学会等名 日本歯周病学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齊藤仁志、石黒一美、鈴木麻美、村樫悦子、沼部幸博
2. 発表標題 ヒト歯肉上皮細胞への低反応レベルNd:YAGレーザー照射による遺伝子学的解析 創傷治癒促進に与える影響について
3. 学会等名 日本レーザー歯学会
4. 発表年 2021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	村檉 悦子 (MURAKASHI Etsuko) (40409222)	日本歯科大学・生命歯学部・講師 (32667)	

	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 協力者	鈴木 麻美 (SUZUKI Aasami) (60318540)	日本歯科大学・生命歯学部・准教授 (32667)	

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