

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19039

研究課題名(和文) 歯周病発症予防のための接合上皮発現タンパク質の転写メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of transcription mechanism of junctional epithelial expressed protein for periodontal disease prevention

研究代表者

能田 佳祐 (NODA, Keisuke)

日本大学・松戸歯学部・兼任講師

研究者番号：30822621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではmicroRNAが接合上皮に特異的なタンパク質であるアメロチン(AMTN)の遺伝子発現にどう影響するかを解析することで、炎症時の接合上皮におけるその複雑な動態を理解することを目的とする。miRNA発現ベクターを導入した培養細胞にTNF- α を用い、炎症性歯肉で発現が増加するmiR-150、miR-223およびmiR-200bによるAMTN遺伝子発現調節機構を解明した。それらの結果からmiRNAがAMTN遺伝子の発現を部分的に抑制していることが考えられた。このことから、miRNAは接合上皮に特異的に発現するAMTNの発現を調節している可能性を見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、miRNA発現ベクターを導入した培養細胞に対して炎症性サイトカインのTNF- α を用い、炎症時の細胞環境を再現することで、炎症性歯肉で発現が増加するmiR-150、miR-223およびmiR-200bによるAMTN遺伝子発現調節機構を解明してきた。それらの解析結果からmiRNAがAMTN遺伝子の発現を部分的に抑制していることが考えられた。接合上皮は歯周組織において防御機構としての働きがあるとされており、miRNAはそこに特異的に発現するAMTNの発現を調節している可能性を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to understand the complex dynamics of microRNAs in the junctional epithelium during inflammation by analyzing how microRNAs affect the gene expression of amelotin (AMTN), a protein specific to the junctional epithelium. Using TNF- α in cultured cells into which a miRNA expression vector was introduced, we elucidated the mechanism of AMTN gene expression regulation by miR-150, miR-223, and miR-200b whose expression is increased in inflammatory gingiva. From these results, it was considered that miRNA partially suppressed the expression of AMTN gene. Therefore, it was found that miRNA may regulate the expression of AMTN, which is specifically expressed in the junctional epithelium.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 アメロチン microRNA 接合上皮

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究では、培養細胞に対して炎症性サイトカインの TNF- α または IL-1 β と miRNA 発現ベクターを用い、炎症時の細胞環境を再現することで、炎症性歯肉で発現が増加する miR-150、miR-223 および miR-200b による AMTN 遺伝子発現調節機構を解明し、炎症時の接合上皮におけるその複雑な動態を理解することを目的とし、歯周病発症機序を解き明かす一端とする。さらに本研究課題を解明することは、新たな視点に立った歯周病の病態を理解できることが考察でき、新しい治療および予防法の開発に繋がることが期待される。

2. 研究の目的

歯肉接合上皮に特異的に発現するタンパク質であるアメロチン (AMTN) は、これまでの研究において、上皮性付着への関与が示唆され、炎症性歯肉で発現が増加することが明らかとなっている。MicroRNA (miRNA) は、長さ約 22 塩基の一本鎖ノンコーディング RNA で、標的 mRNA の 3' 側非翻訳領域 (3' -UTR) に結合し、遺伝子発現を抑制し、形態形成、発生、癌化、細胞増殖、炎症などの様々な疾患に関与する。本研究では、培養細胞に対して炎症性サイトカインの TNF- α または IL-1 β と miRNA 発現ベクターを用い、炎症時の細胞環境を再現することで、炎症性歯肉で発現が増加する miR-150、miR-223 および miR-200b による AMTN 遺伝子発現調節機構を解明し、炎症時の接合上皮におけるその複雑な動態を理解することを目的とし、歯周病発症機序を解き明かす一端とする。

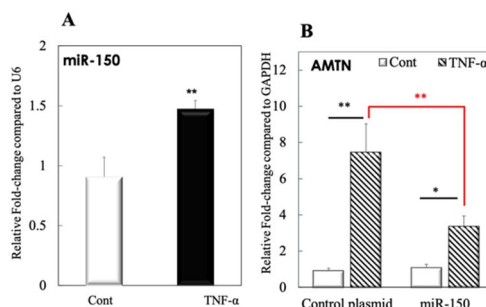
3. 研究の方法

miRNA 発現ベクターを歯肉上皮細胞 (GE1 細胞) に導入し、TNF- α で刺激後に RNA を抽出し、AMTN mRNA 量をリアルタイム PCR で定量的に確認した。また Western blot 法にて AMTN タンパク質量の変化を解析するため、タンパク質の抽出も行った。マウス AMTN 遺伝子の 3' 非翻訳領域 (UTR) への miR-150、miR-223、miR-200b の結合を検証するため、マウス歯肉上皮細胞に miRNA 発現ベクターとヒト AMTN 遺伝子 3' -UTR を挿入したコンストラクトを導入し、ルシフェラーゼアッセイを行い、AMTN 遺伝子の転写活性に対する miRNA の影響を解析した。さらに、炎症サイトカインである TNF- α で刺激した時のシグナル伝達経路である MAP キナーゼ系のシグナル因子内における miR-150、miR-223、miR-200b の影響の解析を行った。

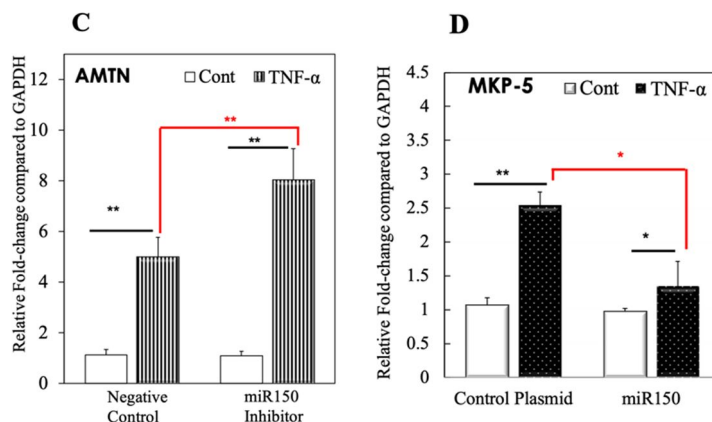
4. 研究成果

(1) リアルタイム PCR

GE1 細胞を TNF- α で 12 時間刺激すると miR-150 発現量はコントロールと比較して有意に増加した。(Fig. A) このことから、炎症性歯肉では miR-150 の発現が増加する事が考えられる。次に、GE1 細胞に miR-150 発現ベクターを導入し、TNF- α で刺激した時の AMTN mRNA 量の変化を解析した。miR-150 を過剰発現させると、TNF- α で刺激した時の AMTN mRNA 量の増加は部分的に抑制された。(Fig. B)

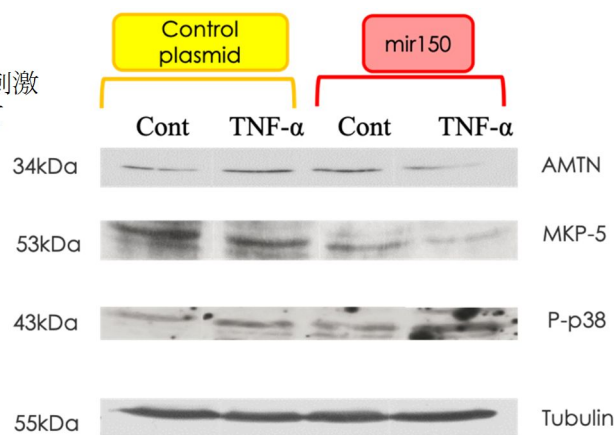


また GE1 細胞に miR-150 インヒビターを導入すると、miR-150 による AMTN mRNA 量の増加の抑制は見られなかった。(Fig. C) miR-150 発現ベクターを導入した GE1 細胞を TNF- α で刺激した時の、MAPK 系経路中の MKP-5 mRNA 量を解析すると、mRNA 量の増加は miR-150 により部分的に抑制された。(Fig. D)



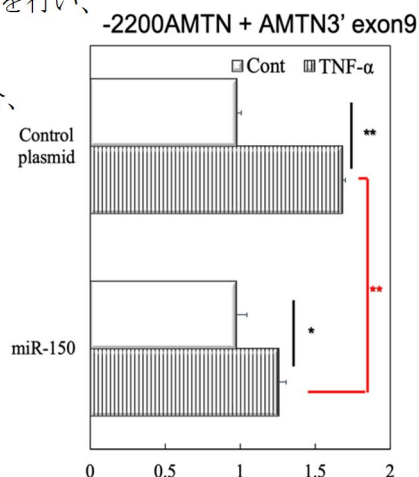
(2) Western blot

GE1 細胞にコントロールプラスミドまたは miR-150 発現ベクターを導入し、TNF- α で刺激した時のタンパク質量を Western blot にて解析を行った。miR-150 により AMTN および MKP-5 タンパク質量の増加は抑制された。また、MKP-5 がリン酸化を阻害している p-38 のタンパク質量は増加した。



(3) ルシフェラーゼアッセイ

マウス AMTN 遺伝子の 3' 非翻訳領域(UTR)への miR-150 の結合を検証するため、マウス歯肉上皮細胞に miRNA 発現ベクターとヒト AMTN 遺伝子 3' -UTR を挿入したコンストラクトを導入し、ルシフェラーゼアッセイを行い、AMTN 遺伝子の転写活性に対する miRNA の影響を解析すると、AMTN 遺伝子の転写活性は miRNA 発現ベクターを導入した場合、部分的に抑制された。



以上の結果から miR-150 は AMTN 遺伝子の 3' 非翻訳領域(UTR)に結合する事で直接的に AMTN 遺伝子発現を調節しており、さらにシグナル伝達経路である MAPK 系経路中の MKP-5 の発現を阻害することで、間接的にも AMTN の発現を調節している事が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 能田佳祐
2. 発表標題 miR-150は歯肉上皮細胞においてMKP-5を介してマウスアメロチン遺伝子発現を調節する
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

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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