

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2019～2020
課題番号：19K24113
研究課題名（和文）歯髄炎におけるマイクロRNAクラスターの炎症制御および組織修復における機能解析

研究課題名（英文）a

研究代表者
奈良 圭介（Nara, Keisuke）
東京医科歯科大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：00844333
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：炎症性物質であるLPSをヒト歯髄組織から採取した歯髄細胞に加えた際、発現が上昇するmicroRNAについて、miRNAアレイにて網羅的解析を行い、炎症性サイトカイン産生制御に関わるmiRNAをスクリーニングした結果、miR-146bが候補として浮上した。その後の研究によって、miR-146bは炎症性刺激によって発現が上昇し、ターゲット解析により炎症抑制に関わる可能性が高いことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、歯髄炎におけるmiRNAの動態を包括的に解析し、miRNAの炎症および治癒・再生プロセスに対する調節機能の解明を進めることができた。生体内では複数のmiRNAがクラスターとして機能し、複雑な遺伝子発現を同時に制御し、生体ネットワーク全体の正常化に関与すると考えられるため、炎症で発現が促進されるmiRNAの動態や機能の解明を進めることで、炎症と組織再生のクロストークの仕組みの解明につながると期待できる。

研究成果の概要（英文）：a miRNA array was used to comprehensively analyze microRNAs which expression increased by LPS stimulation, an inflammatory substance, in human dental pulp cells. As a result of screening miRNAs involved in the regulation of inflammatory cytokine production, miR-146b emerged as a candidate. Subsequent studies suggested that miR-146b was upregulated by inflammatory stimuli and that target analysis was more likely to be involved in inflammatory regulation.

研究分野：歯髄生物学分野

キーワード：歯髄炎 miRNA

1. 研究開始当初の背景

歯髄の炎症は、体内の他の結合組織と同様、メディエーターのバランスで制御されており、炎症性メディエーターの過剰産生で組織破壊がもたらされるが、IL-10 などの抗炎症メディエーターによるネガティブフィードバックも考えられている。また、歯髄に特有の修復機転である修復象牙質形成は軽度の炎症に反応して促進される (Thomas MV *et al.*, J Dent Res. 2011; 90: 1052-61)。これらの観点から、炎症と再生のクロストークおよび組織修復バランスの回復が、歯髄疾患の新規治療法創成の基礎となる知見として注目を集めている。

近年、様々な生物学的機能を制御する仕組みとして、miRNA による制御機構が注目されている。miRNA はそれぞれの標的 mRNA に結合し、その発現を抑制することが知られており、炎症反応においては、miR-21 や miR-146a/b、miR-155 などの産生が誘導され、炎症プロセスに関わるシグナルの調節を介して炎症反応を制御することが報告されている (Roy S, Sen CK, Physiol Genomics. 2011; 43: 557-65.)。これまでに申請者らは、miR-21 が LPS 刺激された歯髄細胞で IL-1 α 、IL-6、TNF α などの炎症性メディエーターの産生を制御することを明らかにした。しかし、歯髄炎でどのような miRNA がいかなる機序で炎症制御や組織修復に関わっているのかについては、さらなる解明が必要である。

2. 研究の目的

本研究は、歯髄炎における miRNA の動態を包括的に解析し、miRNA の炎症および治癒・再生プロセスに対する調節機能を解明することを目的とする。

炎症が組織破壊を促進する反応であることは論を待たないが、治癒機転のトリガーとの側面も備えていることが近年着目されている。したがって、治癒機転を誘導する炎症性因子をスクリーニングし、その因子を有効に利用することで、効率的な治癒の誘導が可能と考えられる。本研究の究極の目的は、生体に生来備わる組織修復過程を活用した覆髄剤の開発と位置付けられるが、これは生体為害性の低い治療法として有用と思われる。

申請者らのこれまでの研究結果は、miR-21 が複数の遺伝子発現を制御することにより、炎症抑制と修復象牙質形成に関与する可能性を示唆している。しかし、炎症性細胞浸潤の抑制や象牙芽細胞分化促進などの修復機転が miR-21 単独の作用で展開されるとは考えづらい。むしろ、複数の miRNA がクラスターとして機能し、複雑な遺伝子発現を同時に制御し、生体ネットワーク全体の正常化に関与すると予想される。したがって、炎症で発現が促進される miRNA の動態や機能を包括的に検討することで、炎症と組織再生のクロストークの仕組みの解明につながると期待できるが、歯髄炎における miRNA の発現動態と炎症及び治癒・再生プロセスへの調節機能に関して網羅的解析を行った研究は未だない。

3. 研究の方法

hDPCs の分離・培養：ヒト歯髄組織から単離した hDPCs を 10%FBS 添加 MEM を使用し、5%CO₂、37°C で培養した (倫理審査承認番号 D2014-039)。LPS は 100 ng/ml で添加した。

miRNA Array: LPS 刺激および非刺激 hDPCs より抽出した RNA を Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 Array (Thermo Fisher Scientific)、Microarray Data Analysis Tool Ver. 3.2 (Filgen, Nagoya, Japan) を使用して分析した。

RT-qPCR: LPS 刺激および非刺激 hDPCs より抽出した RNA より cDNA を合成し、特異的なプライマーを用いてリアルタイム PCR を行った。nuclear factor-kappa B (NF κ B) シグナルの阻害には caffeic acid phenethyl ester (CAPE; 5 μ M) を使用した。

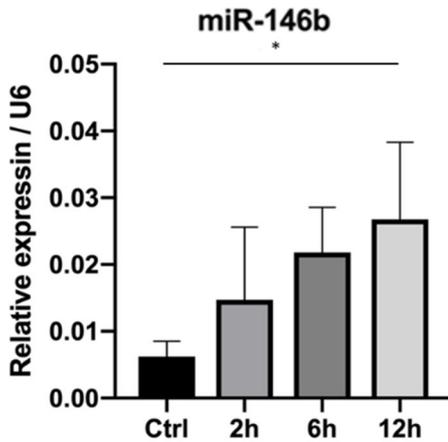
Pathway 解析: パスウェイデータとして

「WikiPathways (<http://www.wikipathways.org/index.php/WikiPathways>)」を使用し、「MicroArray Data Analysis Tool Ver3.2 (Filgen, Inc)」で解析を行った。

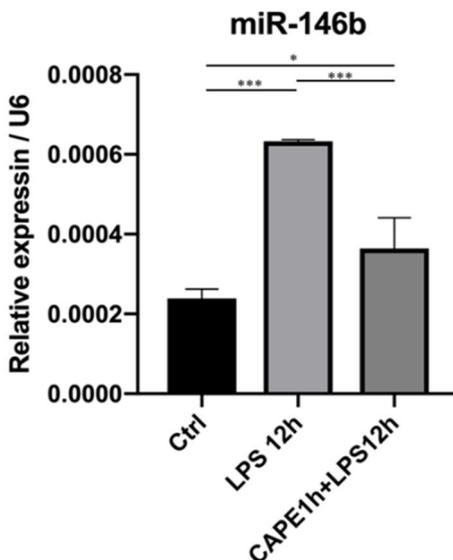
4. 研究成果

	Expression value (LPS)	Expression value (control)	Ratio
hsa-miR-21-5p	71.69581	46.19582	1.551997778
hsa-mir-132	3.557052	2.198732	1.617774244
hsa-miR-146b-5p	18.1958	11.69698	1.555598112
hsa-miR-197-5p	99.81138	65.50513	1.523718524
hsa-miR-224-3p	9.245615	5.306551	1.742302109
hsa-miR-601	15.84572	9.007134	1.759241064
hsa-miR-619-5p	27.96876	15.0405	1.859563179
hsa-miR-1180-3p	52.90979	33.2411	1.591697928
hsa-miR-1224-5p	25.1958	13.69585	1.83966676
hsa-miR-1246	77.22816	51.26089	1.506570799
hsa-mir-3679	39.56266	25.35616	1.560278055
hsa-miR-3911	226.3335	140.7299	1.608282959
hsa-miR-3935	24.95582	13.65939	1.82700838
hsa-miR-4304	28.32483	12.23925	2.314261903
hsa-miR-4478	6.597882	4.372982	1.508783251
hsa-mir-4529	5.149724	2.883605	1.785863182
hsa-miR-4529-3p	103.1958	59.19582	1.743295388
hsa-miR-4534	57.46783	28.06235	2.047862349
hsa-mir-4537	7.227849	4.607264	1.568794191
hsa-miR-4667-5p	14.35307	8.000989	1.793911978
hsa-miR-4669	349.1618	216.9819	1.609174774
hsa-mir-4716	21.36637	13.79339	1.549029644
hsa-mir-4716	33.64133	21.71768	1.549029639
hsa-miR-4793-3p	10.83849	6.447419	1.681058731
hsa-miR-5088-5p	11.0042	7.235097	1.520947128
hsa-miR-5195-3p	45.15764	15.64334	2.886700666
hsa-miR-6068	12.66413	7.386537	1.714488129
hsa-miR-6086	44.38855	29.23922	1.518116762
hsa-miR-6165	76.66915	43.51875	1.76174982
hsa-miR-6728-5p	57.18542	32.77493	1.744791522
hsa-miR-6740-5p	8.120941	5.382443	1.508783465
hsa-miR-6760-5p	6.510431	3.634842	1.791118018
hsa-miR-6777-5p	40.6246	17.24118	2.356254038
hsa-miR-6819-5p	102.2103	63.30923	1.614461272
hsa-miR-6831-5p	218.8476	145.1586	1.507644742
hsa-miR-6879-5p	47.08021	30.15082	1.561490202
hsa-miR-7162-3p	185.6449	101.7746	1.824078896
hsa-miR-8060	71.26439	42.73903	1.667431151

LPS 刺激ヒト歯髄細胞における miRNA Array で、30 以上の miRNA が同定された。炎症に伴って発現が増加し、炎症のネガティブフィードバックに関わるといわれる miR-146b に着目した。



LPS 刺激後 12 時間で miR-146b の発現上昇を認めた。



LPS 刺激による miR-146b の発現上昇は NFκB 阻害薬 (CAPE) によって阻害された

miR-146b が関連すると思われるパスウェイリスト

Hs_Ectoderm_Differentiation_WP2858_105577
Hs_PI3K-AKT-mTOR_-_VitD3_Signalling_WP4141_98518
Hs_Heart_Development_WP1591_105613
Hs_Exercise-induced_Circadian_Regulation_WP410_105590
Hs_ApoE_and_miR-146_in_inflammation_and_atherosclerosis_WP3926_105530
Hs_Interleukin-1_Induced_Activation_of_NF-kappa-B_WP3656_101835
Hs_Toll-like_Receptor_Signaling_WP3858_89945
Hs_Mesodermal_Commitment_Pathway_WP2857_105645
Hs_T-Cell_antigen_Receptor_(TCR)_Signaling_Pathway_WP69_103503
Hs_Epithelial_to_mesenchymal_transition_in_colorectal_cancer_WP4239_105464
Hs_Bone_Morphogenic_Protein_(BMP)_Signalling_and_Regulation_WP1425_105545
Hs_Cancer_immunotherapy_by_CTLA4_blockade_WP4582_104340
Hs_Melatonin_metabolism_and_effects_WP3298_105644
Hs_MECP2_and_Associated_Rett_Syndrome_WP3584_105641
Hs_Endoderm_Differentiation_WP2853_105583
Hs_Canonical_and_Non-Canonical_TGF-B_signaling_WP3874_105549
Hs_Platelet-mediated_interactions_with_vascular_and_circulating_cells_WP4478_103756
Hs_Simplified_Depiction_of_MYD88_Distinct_Input-Output_Pathway_WP3877_89291
Hs_Hepatitis_B_infection_WP4666_105200
Hs_Energy_Metabolism_WP1541_105585
Hs_Regulation_of_Microtubule_Cytoskeleton_WP2038_105148

miR-146b は TRAF6、IRAK1、RELA を標的にし、NFκB シグナルや TLR シグナルに関与し、炎症反応を制御する可能性が示唆された。

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 1件）

1. 発表者名 Keisuke Sunada-Nara
2. 発表標題 MicroRNA -146b downregulates proinflammatory cytokine expression in LPS-stimulated human pulp cells.
3. 学会等名 2021 IADR/AADR/CADR General Session (国際学会)
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
---------------------------	-----------------------	----

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