

令和 6 年 5 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18512

研究課題名(和文) 肥満および歯周炎に共通のmiRNAを標的とした新規抗炎症治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of a novel anti-inflammatory drug targeting miRNAs common to obesity and periodontitis

研究代表者

佐野 朋美 (Sano, Tomomi)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：50782075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：炎症脂肪組織で発現抑制したmiRNAの中からmiR-582-5pに着目した。RAW264.7細胞にmiR-582-5pを導入しLPS刺激をすると、炎症性サイトカインが有意に発現抑制した。またSKP1がmiR-582-5pの直接のターゲットであることが分かった。SKP1は複合体を形成し、IκBαの分解とp65のリン酸化を誘導するが、miR-582-5pの導入でSkp1発現が下がり、IκBαの分解とp65のリン酸化、p65の核内移行が抑制した。以上、炎症状態ではmiR-582-5pの発現抑制し炎症性サイトカインの発現は亢進するが、このmiRNAはSkp1に結合することで抗炎症作用を示す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪組織炎症状態で発現が変動し、抗炎症作用のあるmiRNAを同定した。また、Skp1を直接のターゲットとすること、さらにはSkp1発現が抑制することによるmiR-582-5pの抗炎症メカニズムも明らかにした本研究は、動脈硬化症や高血圧症、LDLコレステロール値の上昇といった病態を示す日本人に多い軽度肥満型のメタボリックシンドロームに対する新たな治療戦略の構築において多大な貢献をもたらすと考えている。

研究成果の概要(英文)：We identified miR-582-5p that was significantly downregulated in inflamed murine adipose tissues and RAW264.7 cells. SKP1, a core component of an E3 ubiquitin ligase that regulates the NF- $\kappa$ B pathway, was proposed as a biological target of miR-582-5p by using TargetScan. The binding of miR-582-5p to a 3'-untranslated region site on Skp1 was confirmed using a dual-luciferase reporter assay; in addition, transfection with a miR-582-5p mimic suppressed SKP1 expression in RAW264.7 cells. Importantly, exogenous miR-582-5p attenuated the production of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 beta, and interleukin-6 through suppressing the degradation of the NF- $\kappa$ B inhibitor alpha, followed by the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B. Therefore, exogenously applied miR-582-5p can attenuate the NF- $\kappa$ B signaling pathway via targeting Skp1; this provides a prospective therapeutic strategy for treating inflammatory and immune diseases.

研究分野：分子生物学

キーワード：microRNA 炎症 マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病は歯周病に対する重要な危険因子である。また、こうして重症化した歯周病が、糖尿病の血糖コントロールに影響を与え、虚血性心疾患の進行を促進させる可能性も示唆されている。また、肥満はインスリン抵抗性を基盤として2型糖尿病・動脈硬化といった代謝性疾患に対する危険因子となる。その背景には、内臓脂肪に蓄積した成熟脂肪細胞から産生される一連の生理活性物質(アディポカイン)の分泌異常が深く関わっており、アディポカインの多くは炎症性サイトカインであることから、炎症疾患である歯周病の進行を促進すると考えられる。

歯周病と miRNA の関係について、健康歯肉と歯周炎罹患歯肉中での miRNA の発現を比較検討した結果が報告されている (Stoecklin-Wasmer C *et al.*, *J Dent Res*, 2012)。また、肥満者の歯周炎歯肉中では、健常者の歯周炎歯肉中と比べいくつかの miRNA の発現量が上昇することが示されている (Kalea AZ *et al.*, *J Dent Res*, 2015)。小胞体に内包された miRNA についての報告として、ヒトとマウスの肥満細胞によって放出されたエクソソームの miRNA が、機能的に受取側の肥満細胞へ引き渡されることが示されている (Valadi H *et al.*, *Nat Cell Biol*, 2007)。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、脂肪細胞-マクロファージ相互作用による脂肪組織炎症に関与する miRNA を同定し、その miRNA を内包したナノサイズカプセルは肥満およびインスリン抵抗性の発症を抑制し、さらには歯周炎による組織破壊も抑えることを実証することである。

## 3. 研究の方法

脂肪組織において肥満誘導性の炎症を調節する新規 miRNA を同定するために、高脂肪食 (HFD) および通常食 (ND) を摂取させたマウスの精巣上体白色脂肪組織 (eWAT) 使用して miRNA マイクロアレイ解析を行った。

マイクロアレイ解析の結果から着目した miRNA について、リアルタイム PCR 法でその発現変動を検証した。また、その miRNA の発現細胞を特定するために、eWAT を成熟脂肪細胞画分 (MAF) と間質血管画分 (SVF) に分画し、リアルタイム PCR 法で miRNA は発現を定量した。さらに、前駆脂肪細胞 (3T3-L1)、分化脂肪細胞、および RAW264.7 マクロファージ様細胞における miR-582-5p の発現も調べた。

RAW264.7 細胞に miR-582-5p を導入し、LPS 刺激下で培養した際の炎症性サイトカイン発現を遺伝子レベル (リアルタイム PCR 法) およびタンパク質レベル (ウエスタンブロットティング法) で調べた。

ルシフェラーゼアッセイを行い、miR-582-5p と Skp1 の結合を確認した。また、RAW264.7 細胞に miR-582-5p を導入した際の SKP1 発現を遺伝子レベルだけでなくタンパク質レベルで検証した。

miR-582-5p は Skp1 をターゲットとして NF- $\kappa$ B 経路の活性化を阻害することを確認するために I $\kappa$ B $\alpha$  の分解、p65 のリン酸化、それに続く p65 の核内移行をウエスタンブロットティング法および免疫蛍光染色法にて解析した。

## 4. 研究成果

炎症状態の脂肪組織で発現抑制した microRNA の中から miR-582-5p に着目した。この microRNA はリアルタイム PCR 法でも炎症脂肪組織で発現抑制し、また骨髄由来マクロファージや Cell Line のマクロファージを LPS 刺激した際にも有意に発現抑制したことから、少なくともマクロファージでは炎症状態で発現抑制することが分かった。よって、以下の検討では Cell Line のマクロファージ (RAW264.7 細胞) を用いた。

細胞に miR-582-5p を導入し LPS 刺激をすると、炎症性サイトカイン Tnfa、IL-1b、IL-6 は遺伝子レベルでもタンパク質レベルでも有意に発現抑制し、この microRNA の抗炎症効果が示された。

次に、この抗炎症メカニズムを解明するため、ターゲット予測サイトを用い miR-582-5p の標的遺伝子探索を行い、Skp1 に着目した。ルシフェラーゼアッセイにより Skp1 とこの microRNA が結合することを確認し、またこの microRNA の導入により SKP1 発現が有意に抑制することから、Skp1 は miR-582-5p のターゲットであると言える。

SKP1 は複合体を形成し、NF- $\kappa$ B 経路において I $\kappa$ B $\alpha$  の分解と p65 のリン酸化を誘導するが、Si-Skp1 を用いて Skp1 をノックダウンしたときだけでなく、miR-582-5p の導入によっても Skp1 発現が下がり、I $\kappa$ B $\alpha$  の分解と p65 のリン酸化、さらにはそれに続く p65 の核内移行が抑

制した。

以上をまとめると、炎症状態では miR-582-5p の発現抑制や炎症性サイトカインの発現亢進が起こるが、この microRNA を導入するとターゲットである Skp1 に結合することで抗炎症作用を示す。よって、本研究成果は新たな核酸医薬の開発につながる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Li Rongzhi, Sano Tomomi, Mizokami Akiko, Fukuda Takao, Shinjo Takanori, Iwashita Misaki, Yamashita Akiko, Sanui Terukazu, Nakatsu Yusuke, Sotomaru Yusuke, Asano Tomoichiro, Kanematsu Takashi, Nishimura Fusanori	4. 巻 734
2. 論文標題 miR-582-5p targets Skp1 and regulates NF- B signaling-mediated inflammation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 109501 ~ 109501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2022.109501	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 -

1. 著者名 Hayashi Chikako, Fukuda Takao, Kawakami Kentaro, Toyoda Masaaki, Nakao Yuki, Watanabe Yukari, Shinjo Takanori, Sano Tomomi, Iwashita Misaki, Yotsumoto Karen, Shida Miyu, Taketomi Takaharu, Sanui Terukazu, Uchiumi Takeshi, Kanematsu Takashi, Nishimura Fusanori	4. 巻 10
2. 論文標題 miR-1260b inhibits periodontal bone loss by targeting ATF6 mediated regulation of ER stress	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1061216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.1061216	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 -

1. 著者名 Nishimura Yuki, Iwashita Misaki, Hayashi Masato, Shinjo Takanori, Watanabe Yukari, Zeze Tatsuro, Yamashita Akiko, Fukuda Takao, Sanui Terukazu, Sano Tomomi, Asano Tomoichiro, Nishimura Fusanori	4. 巻 59
2. 論文標題 XAF1 overexpression exacerbates diabetes by promoting pancreatic -cell apoptosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Diabetologica	6. 最初と最後の頁 1275 ~ 1286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00592-022-01930-y	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 -

1. 著者名 Mori Kayo, Mizokami Akiko, Sano Tomomi, Mukai Satoru, Hiura Fumitaka, Ayukawa Yasunori, Koyano Kiyoshi, Kanematsu Takashi, Jimi Eijiro	4. 巻 254
2. 論文標題 RANKL elevation activates the NIK/NF- B pathway, inducing obesity in ovariectomized mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Endocrinology	6. 最初と最後の頁 27 ~ 36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JOE-21-0424	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Masato, Iwashita Misaki, Nishimura Yuki, Shinjo Takanori, Sano Tomomi, Yamashita Akiko, Fukuda Takao, Sanui Terukazu, Asano Tomoichiro, Nishimura Fusanori	4. 巻 9
2. 論文標題 Adipose-specific C-C motif chemokine ligand (CCL) 19 overexpression drives the mice to both insulin resistance and weight gain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMJ Open Diabetes Research & Care	6. 最初と最後の頁 e001871 ~ e001871
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjdr-2020-001871	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 -

1. 著者名 Yamashita Akiko, Sano Tomomi, Iwashita Misaki, Nishimura Fusanori	4. 巻 2021
2. 論文標題 A Case Report of Improved Palmoplantar Pustulosis following Periodontal Treatment and Possible Association with Diminished Systemic Subclinical Inflammation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Case Reports in Dermatological Medicine	6. 最初と最後の頁 1 ~ 5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2021/5548760	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 -

1. 著者名 Sanada Taiki, Sano Tomomi, Sotomaru Yusuke, Alshargabi Rehab, Yamawaki Yosuke, Yamashita Akiko, Matsunaga Hiroaki, Iwashita Misaki, Shinjo Takanori, Kanematsu Takashi, Asano Tomoichiro, Nishimura Fusanori	4. 巻 22
2. 論文標題 Anti-inflammatory effects of miRNA-146a induced in adipose and periodontal tissues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100757 ~ 100757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100757	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 -

1. 著者名 Alshargabi Rehab, Sano Tomomi, Yamashita Akiko, Takano Aiko, Sanada Taiki, Iwashita Misaki, Shinjo Takanori, Fukuda Takao, Sanui Terukazu, Kishida Shosei, Nishimura Fusanori	4. 巻 10
2. 論文標題 SPOCK1 is a novel inducer of epithelial to mesenchymal transition in drug-induced gingival overgrowth	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-66660-z	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 -

1. 著者名 Alshargabi Rehab, Shinjo Takanori, Iwashita Misaki, Yamashita Akiko, Sano Tomomi, Nishimura Yuki, Hayashi Masato, Zeze Tatsuro, Fukuda Takao, Sanui Terukazu, Nishimura Fusanori	4. 巻 533
2. 論文標題 SPOCK1 induces adipose tissue maturation: New insights into the function of SPOCK1 in metabolism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1076 ~ 1082
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.09.129	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 -

1. 著者名 Mukai Satoru, Mizokami Akiko, Otani Takahito, Sano Tomomi, Matsuda Miho, Chishaki Sakura, Gao Jing, Kawakubo-Yasukochi Tomoyo, Tang Ronghao, Kanematsu Takashi, Takeuchi Hiroshi, Jimi Eijiro, Hirata Masato	4. 巻 296
2. 論文標題 Adipocyte-specific GPRC6A ablation promotes diet-induced obesity by inhibiting lipolysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100274 ~ 100274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100274	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 -

1. 著者名 Maetani Yuka, Asano Satoshi, Mizokami Akiko, Yamawaki Yosuke, Sano Tomomi, Hirata Masato, Irifune Masahiro, Kanematsu Takashi	4. 巻 552
2. 論文標題 Expression of PRIP, a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding protein, attenuates PI3K/AKT signaling and suppresses tumor growth in a xenograft mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 106 ~ 113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.045	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐野朋美、李栄智、溝上顕子、西村英紀、兼松隆
2. 発表標題 MicroRNA targeting Skp1 regulates inflammatory response through NF- $\kappa$ B signaling pathway
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomomi Sano, Malaz Elsheikh, Akiko Mizokami, Takashi Kanematsu
2. 発表標題 Identification of microRNA regulated by CCL19-CCR7 signaling in adipose tissue inflammation
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐野朋美他	4. 発行年 2021年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 204
3. 書名 徹底解説！糖尿病合併症管理・フォローアップ	

〔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
---------	---------