

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18526

研究課題名（和文）miRNA内包エクソソームによる歯髄炎抑制・修復促進機構の解明と臨床応用への展開

研究課題名（英文）Mechanism of miRNA-encapsulated exosomes to suppress pulpitis and promote repair and application to clinical practice

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・非常勤講師

研究者番号：00844333

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）：本研究では、いくつかのmiRNAを介した調節機序が、歯髄炎における治癒・修復プロセスで演じる役割を解明した。さらに、炎症及び修復に関与するmiRNAを内包するエクソソームを利用し、歯髄保存に寄与するための新たな覆髄剤の開発などの臨床応用を検討した。炎症時に産生されるmiR-21やmiR-146b、miR-27aが炎症抑制機能を有し、miR-27aは歯髄の治癒形態の1つである硬組織形成を誘導する機能も有し、それはエクソソームを介していることが示唆された。これらの結果により、歯髄の病態制御、あるいは再生療法の成功率向上を意図した新規治療法の創成につながるものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症は組織破壊にのみ加担すると考えられてきたが、近年では治癒機序のトリガーともなっていることも判明している。したがって、治癒機序を誘導する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、効率的な治癒を誘導することが可能であると考えられる。歯髄炎において炎症と組織修復のクロストークの視点からエクソソームの放出動態や内包されるmiRNAを介した調節機序を解析した報告は未だ多くなく、さらに、エクソソームを利用した覆髄剤の開発は生体が生来備える組織修復機構を応用した生体為害性の低い治療法としての有用性が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we elucidated the roles played by several miRNA-mediated regulatory mechanisms in the healing and repair processes in pulpitis. Furthermore, we investigated the clinical applications of exosomes encapsulating miRNAs involved in inflammation and repair, such as the development of new pulp covering agents to contribute to pulp preservation. It was suggested that miR-21, miR-146b, and miR-27a, which are produced during inflammation, have an anti-inflammatory function, and miR-27a also has a function of inducing hard tissue formation, one of the healing forms of dental pulp, which is mediated by exosomes. These results are expected to lead to the creation of novel therapies intended to control pulp pathology or improve the success rate of regenerative therapy.

研究分野：歯髄生物学

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をもたらされるが、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応答して促進される (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-1a, 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。さらに、miRNA を内包するエクソソームを用いたドラッグデリバリーシステムを開発し、新たな覆髄剤としての臨床応用を見据えた検討を行う。本研究は歯髄の病態制御、あるいは再生療法の成功率向上を意図した新規治療法の創成につながるものと期待される。

2. 研究の目的

本研究では、miRNA 内包エクソソームを介した調節機序が、歯髄炎における治癒・修復プロセスで演じる役割を解明する。さらに、炎症及び修復に関与する miRNA を内包するエクソソームを利用し、歯髄保存に寄与するための新たな覆髄剤の開発などの臨床応用を検討する。これまで、炎症は組織破壊にのみ加担すると考えられてきたが、近年では治癒機転のトリガーともなっていることも判明している。したがって、治癒機転を誘導する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、効率的な治癒を誘導することが可能であると考えられる。ところが、歯髄炎において炎症と組織修復のクロストークの視点からエクソソームの放出動態や内包される miRNA を介した調節機序を解析した報告は未だ行われておらず、さらに、エクソソームを利用した覆髄剤の開発は生体が生来備える組織修復機構を応用した生体為害性の低い治療法としての有用性が期待される。

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。

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。

エクソソームの分離：ヒト歯髄細胞を培養した培養液から Total Exosome Isolation™ kit (Thermo fisher Scientific, Waltham, MA) を使用して分離した。分離したエクソソームは透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。

RT-qPCR: LPS 刺激および非刺激 hDPCs を培養した培養液から分離したエクソソームより抽出した 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。

4 . 研究成果

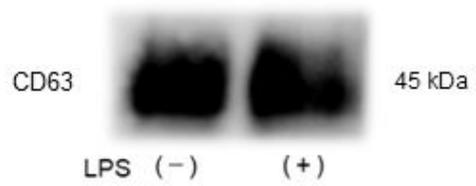
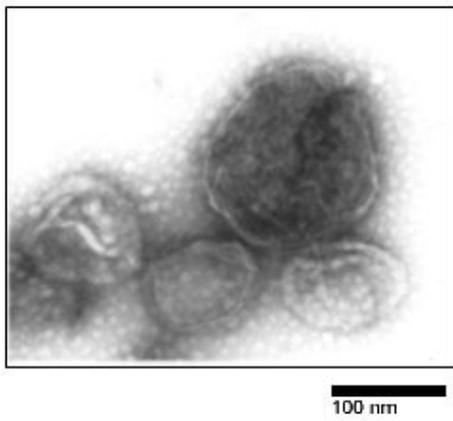
	Expression value {LPS}	Expression value {control}	Ratio
hsa-miR-4324	44.99907	11.81275333	3.809363383
hsa-miR-4304	32.19419333	8.908726667	3.613781693
hsa-miR-27a-5p	43.59172667	13.87551333	3.141629835
hsa-miR-16-1-3p	4.31416	1.419723333	3.038732899
hsa-miR-338-5p	3.927536667	1.512123333	2.597365294
hsa-miR-642b-3p	11.80337667	4.61548	2.557345426
hsa-miR-668-5p	5.755066667	2.344673333	2.454528136
hsa-miR-3124-5p	19.53938	8.565693333	2.281120657
hsa-miR-4306	5.458193333	2.406993333	2.267639572
hsa-miR-202-3p	5.816556667	2.589626667	2.246098537
hsa-miR-204-3p	9.12383	4.132966667	2.207574059
hsa-miR-378a-3p	23.59666667	11.83610667	1.993617271
hsa-miR-8085	3.969403333	2.04349	1.942462813
hsa-miR-103a-2-5p	2.50183	1.3007	1.923448912
hsa-miR-23a-5p	146.6357	76.68859667	1.912092624
hsa-miR-6781-5p	5.216833333	2.738343333	1.905105642
hsa-miR-6829-5p	3.895046667	2.086453333	1.86682664
hsa-miR-1281	8.197336667	4.535716667	1.807285875
hsa-miR-619-5p	19.45916667	10.84234	1.794738651
hsa-miR-6836-5p	5.1611	2.913216667	1.771615568
hsa-miR-3934-5p	2.50984	1.44937	1.731676522
hsa-miR-200a-5p	2.17442	1.262983333	1.721653756
hsa-miR-6768-5p	12.16537	7.088226667	1.716278355
hsa-miR-4470	2.34713	1.369606667	1.713725595
hsa-miR-17-3p	2.585816667	1.52557	1.694983951
hsa-miR-6748-5p	2.780746667	1.648776667	1.686551443
hsa-miR-30e-3p	3.21398	1.941606667	1.655319821
hsa-miR-195-3p	2.820573333	1.708696667	1.650716238
hsa-miR-542-3p	3.549153333	2.1536	1.648009534
hsa-miR-26b-3p	2.660596667	1.62919	1.633079424
hsa-miR-6891-5p	23.29169667	14.44852	1.612047232
hsa-miR-4791	3.677226667	2.372303333	1.55006597
hsa-miR-6876-5p	1.921643333	1.246806667	1.541252052
hsa-miR-381-3p	1.938883333	1.27242	1.523776216
hsa-miR-187-5p	3.029903333	1.991296667	1.521573045
hsa-miR-3186-3p	1.469506667	0.96682	1.519938217

LPS 刺激ヒト歯髄細胞における miRNA Array で、36 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思われる miR-27a に着目した。

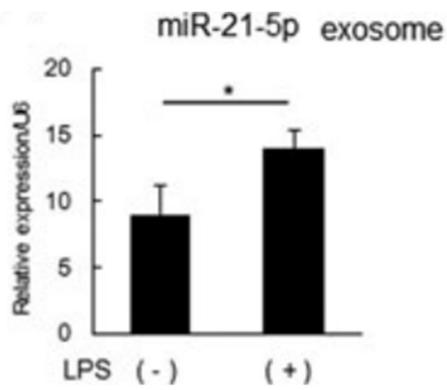
miR-27a が関連すると思われるパスウェイリスト

Hs_Phosphodiesterases_in_neuronal_function_WP4222_105135
Hs_G_Protein_Signaling_Pathways_WP35_105604
Hs_B_Cell_Receptor_Signaling_Pathway_WP23_105541
Hs_IL-2_Signaling_Pathway_WP49_95132
Hs_Non-small_cell_lung_cancer_WP4255_105481
Hs_Hedgehog_Signaling_Pathway_WP4249_105491
Hs_NLR_Proteins_WP288_80026
Hs_Tgif_disruption_of_Sh signaling_WP3674_103865
Hs_RAC1-PAK1-p38-MMP2_Pathway_WP3303_96971

miR-27a は TAB1 や DKK3 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とともに、Wnt シグナルを制御することで硬組織形成を誘導する可能性が示唆された。



透過型電子顕微鏡によって LPS 刺激 hDPC から放出されたエクソソームが同定された。エクソソームマーカー蛋白である CD63 をウェスタンブロットで検出した。



LPS 刺激 hDPC から放出されたのエクソソームで miR-21-5p の発現の上昇が確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Han Peifeng, Sunada-Nara Keisuke, Kawashima Nobuyuki, Fujii Mayuko, Wang Shihan, Kieu Thoai Quoc, Yu Ziniu, Okiji Takashi	4. 巻 24
2. 論文標題 MicroRNA-146b-5p Suppresses Pro-Inflammatory Mediator Synthesis via Targeting TRAF6, IRAK1, and RELA in Lipopolysaccharide-Stimulated Human Dental Pulp Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7433 ~ 7433
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24087433	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Han P, Sunada-Nara K, Kawashima N, Wang S, Thoai KQ, Yu Z, Okiji T.
2. 発表標題 MicroRNA-146b suppresses proinflammatory mediators synthesis in lipopolysaccharide-stimulated dental pulp cells.
3. 学会等名 The 100th General Session & Exhibition of the IADR（国際学会）
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 Wang S, Sunada-Nara K, Kawashima N, Han P, Okiji T.
2. 発表標題 MicroRNA-27a downregulates proinflammatory cytokines expression in LPS-stimulated human pulp cells.
3. 学会等名 The 100th General Session & Exhibition of the IADR（国際学会）
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 Yu Z, Sunada-Nara K, Kawashima N, Kieu QT, Han P, Okiji T.
2. 発表標題 MicroRNA-27a upregulates osteoblastic markers-expression in human dental pulp cells.
3. 学会等名 The 100th General Session & Exhibition of the IADR（国際学会）
4. 発表年 2022年 ~ 2023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
---------	---------