

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09922

研究課題名(和文) miRNAを用いた転写因子制御による歯周組織関連細胞の分化誘導

研究課題名(英文) Differentiation and induction of periodontal tissue constituent cells by transcription factor regulation using miRNA

研究代表者

高井 英樹 (TAKAI, Hideki)

日本大学・松戸歯学部・准教授

研究者番号：30453898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞を異なる性質の細胞に分化させるためには、特異的な転写因子(TFs)の発現誘導が必要である。MicroRNA(miRNA)は、mRNAの3'-UTRに結合し、翻訳抑制を引き起こす。我々は、歯周組織で発現量が多いTFsをmiRNAで抑制することで、歯肉線維芽細胞(HGF)がどのような細胞に分化誘導されるかを解析した。miR200aがTwist2 3'-UTRに結合し、DLX5およびRUNX2 mRNAおよびタンパク質量を増加させた。以上の結果から、miR200aは、HGFを骨芽細胞に分化誘導する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本実験では歯周病治療の実用化を目指して、ヒト歯周組織構成細胞に特異的な転写因子の発現をmiRNAで調節するところが独創的であると思われる。予想される結果としてヒト歯周組織構成細胞を異なる性質の細胞に分化誘導されると考えられる。以上のことから、本研究の意義は、歯周組織構成細胞に発現する特異的な転写因子をmiRNAで調節することにより、将来の歯周治療に応用することである。

研究成果の概要(英文)：To differentiate stem cells into cells with different properties, it is necessary to induce the expression of specific transcription factors (TFs). MicroRNAs (miRNAs) bind to the 3'-UTR of mRNA and cause translational repression. We analyzed the type of cells that are induced to differentiate into gingival fibroblast (HGF) by suppressing TFs that are highly expressed in periodontal tissue using miRNA. miR200a bound to Twist2 3'-UTR and increased DLX5 and RUNX2 mRNA and protein levels. These results suggested that miR200a may induce differentiation of HGF into osteoblasts.

研究分野：歯周病学

キーワード：分化誘導 miRNA 転写因子

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周組織再生療法の確立は各々の歯周組織（歯槽骨、歯根膜、歯肉およびセメント質）に存在する細胞（歯周組織構成細胞）の生物学的特性を理解する事が重要である。未分化間葉系幹細胞は、骨形成因子（BMPs, WNTs, FGFS）に応答し、骨関連転写因子（Runx2, Osx, C/EBPS, Hox）を活性化することで骨芽細胞への分化誘導が開始することが知られている。また、近年、遺伝子発現の調節には転写因子以外に miRNA による翻訳調節が重要であり、miRNA は様々な細胞において、骨関連転写因子を調節し、骨芽細胞への分化を誘導すると報告されている。

2. 研究の目的

本実験では、研究期間内に患者から採取した歯肉線維芽細胞（HGF）を用い、歯周組織構成細胞に発現する特異的な転写因子（TWIST2 および KLF12）の 3'-UTR に結合する miRNA を検索し、miRNA による歯周組織構成細胞の分化・誘導を検討することを研究目的とした。

3. 研究の方法

HGF は 10%ウシ胎児血清および抗生物質（100unit/ml ペニシリンおよび 100 μ g/ml ストレプトマイシン）を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培養液を用いて、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ インキュベーター内で培養した。歯周組織構成細胞に優位に発現している転写因子（TWIST2 および KLF12）の 3'-UTR に結合する miRNA を公開データベースの TargetScan にて検索した。次に、miRNA が結合する 3'-UTR を PGL3 promoter プラスミドに挿入し、シークエンス解析を行い、正しい配列が挿入されたか確認し、Luciferase assay にて miRNA が予想される配列に結合するかを検索した。さらに、歯周組織構成細胞に優位に発現している転写因子（TWIST2 および KLF12）をノックダウンするために miRNA を導入する 1 日前に細胞を 100 mm² に播種した。細胞が 40~60% コンフルエントの状態では 3 μ g miRNA を Lipofectamine 2000 を用いて細胞内に導入した。その後 10%FBS を含む DMEM で 68 時間細胞培養後、細胞を回収し、全 RNA およびタンパク質を抽出した。Real-time PCR にて各種転写因子の RNA の発現量、Western Blot 法にてタンパク質量を検索した。また、miRNA を導入後、石灰化誘導培地で培養した HGF をアリザリンレッド染色で染色し、HGF が骨芽細胞に分化誘導されるかを検索した。

4. 研究成果

TWIST2 および KLF12 の 3'-UTR に結合する miRNA を公開データベースの TargetScan にて検索した結果、miR200a が結合する可能性があることが確認された（図 1）。miRNA が結合する 3'-UTR 配列を挿入した PGL3 promoter プラスミドまたは miRNA が結合する 3'-UTR に mutation を挿入した配列を挿入した PGL3 promoter プラスミド、miR-200a 過剰発現プラスミドを用いた Luciferase assay の結果、200a が予想される配列に結合することが証明された（図 2）。

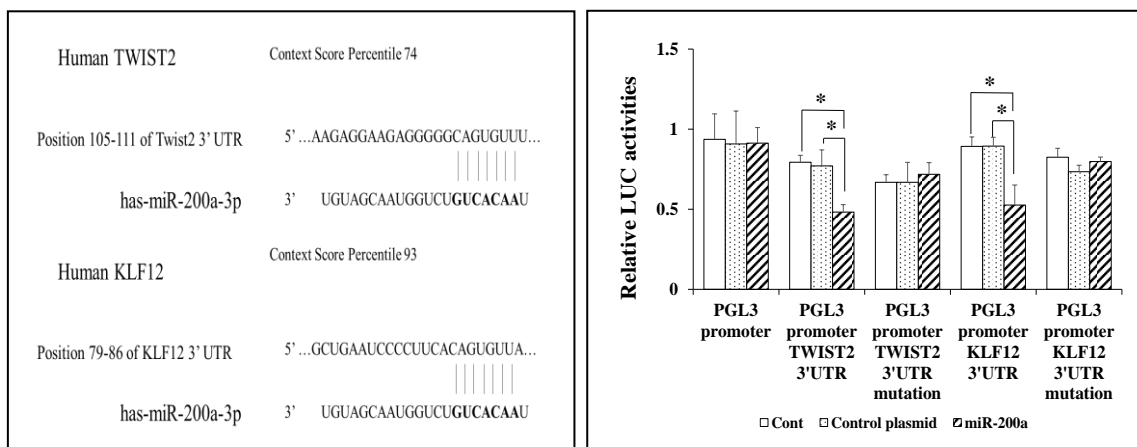


図 1 転写因子 3'-UTR に結合する miRNA 図 2 miR-200a の転写因子 3'-UTR の結合

次に、間葉系細胞に発現する転写因子 RNA およびタンパク質量を Real-time PCR および Western Blot にて検索を行った結果、miR-200a を過剰発現させると、TWIST2 および KLF12 mRNA およびタンパク質量を減少させ、軟骨芽細胞で優位に発現している DLX5 および RUNX2 mRNA およびタンパク質量を増加させた（図 3、4）。

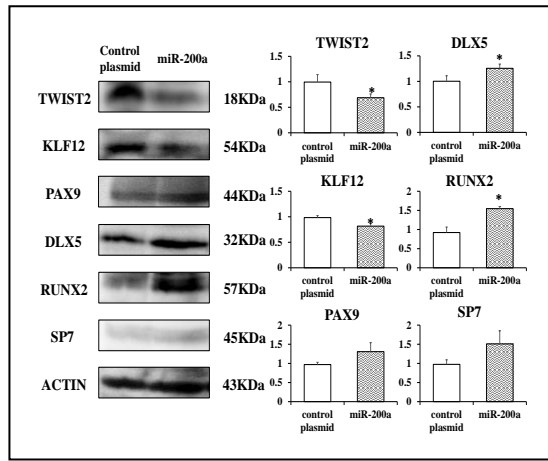
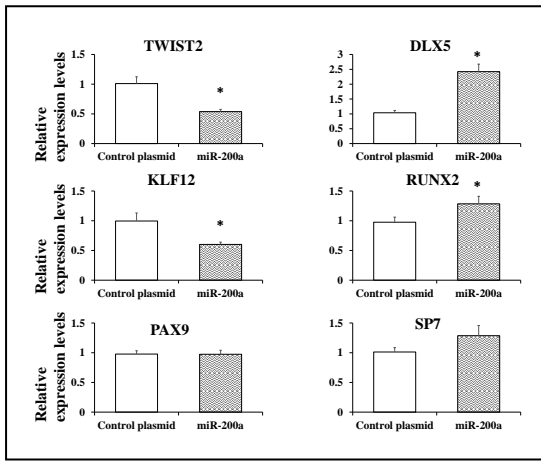


図3 転写因子 mRNA に対する miRNA の効果 図4 転写因子タンパク質に対する miRNA の効果

また、HGF をディッシュに播種し、miR-200a を細胞内に 72 時間導入後、石灰化誘導培地で 21 日間細胞培養した HGF をアリザリンレッド染色にて染色した。miR-200a を導入した細胞は miR を導入していない細胞と比較して強く染色された (図 5)。

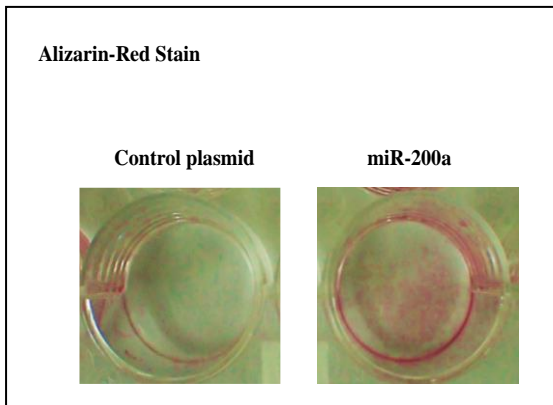


図5 アリザリンレッドによる細胞染色

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 高井英樹、小方頼昌	4. 巻 64
2. 論文標題 miRNA を用いた転写因子制御による歯周組織構成細胞の分化・誘導の可能性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本歯周病学会誌	6. 最初と最後の頁 51 57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2329/period.64.51	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 -

1. 著者名 Hideki Takai, Andre J. van Wijnen, Yorimasa Ogata	4. 巻 25
2. 論文標題 MicroRNA-141 and miR-200a induce the chondrogenic cell fate in human periodontal ligament cells by targeting TWIST2 and KLF12	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gene Reports	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） 10.1016/j.genrep.2021.101414	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 該当する

〔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 高井英樹、小方頼昌
2. 発表標題 歯肉線維芽細胞に高発現する転写因子阻害によるヒト歯肉線維芽細胞からの骨形成細胞へ
3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高井英樹、小方頼昌
2. 発表標題 miR-200aによる歯肉線維細胞の骨芽様細胞への分化誘導
3. 学会等名 第66回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 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
研究 分担 者	小方 頼昌 (OGATA Yorimasa) (90204065)	日本大学・松戸歯学部・教授 (32665)	

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