

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月17日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592230

研究課題名（和文） 顎関節の炎症性病態に関与する microRNA の解析

研究課題名（英文） Analysis of microRNA in temporomandibular joint inflammation

研究代表者

近藤壽郎（Kondoh Toshirou）

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：70178416

研究成果の概要（和文）：顎関節炎症病態形成に関与する microRNA の検索を目的として、ヒト培養顎関節滑膜細胞に interleukin (IL)-1 β および tumor necrosis factor (TNF)- α を作用させ、microRNA および DNA マイクロアレイ解析を行なった。IL-1 β または TNF- α によって発現変動した microRNA の標的候補遺伝子をデータベースから検索後、標的候補遺伝子発現量を DNA マイクロアレイ解析から検索した。microRNA-mRNA 比較発現解析は新規病態関連因子の検索や、診断および治療の開発に有意義であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：MicroRNA (miRNA) are a class of small non-coding RNAs that mediate the post-transcriptional regulation of target mRNA expression. miRNA are associated with pathologic conditions. We have investigated of IL-1 β or TNF- α -responsive miRNA and mRNA in synoviocytes for putative genes associated with the synovitis using microarray analysis. The target genes for IL-1 β - and/or TNF- α -responsive miRNA were searched by the databases such as TargetScan. The expressions of the target genes were analyzed by DNA microarray. The knowledge of miRNA-miRNA studies would help to understand the pathologic conditions in TMJ.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：顎関節，滑膜炎，滑膜細胞，microRNA，マイクロアレイ解析，interleukin-1 β ，tumor necrosis factor- α

1. 研究開始当初の背景

内在性の small RNA である microRNA (miRNA) は、部分的相補性を有する標的遺伝子の 3'非翻訳領域に結合することにより、翻訳を制御していることが明らかとなった。また、miRNA は、病態形成、細胞増殖、細

胞分化、発生等に関与していることも報告されている。一方、我々は、顎関節の炎症病態関連因子の検索を目的として、培養ヒト顎関節滑膜由来線維芽細胞（滑膜細胞）に炎症性サイトカイン刺激を行い、網羅的遺伝子発現解析を行ってきた。今回は、滑膜細胞の

microRNA 発現を網羅的に解析し、炎症病態関連 microRNA の標的遺伝子を検索する。

2. 研究の目的

顎関節包内の炎症病態関連 miRNA および炎症病態関連 miRNA の標的候補遺伝子を検索することを目的とする。

(1) microRNA 発現解析

滑膜細胞を IL-1 β または TNF- α で刺激後、microRNA マイクロアレイ解析を行い、顎関節炎症病態に関与する microRNA を検索する。

(2) microRNA 標的候補遺伝子検索

IL-1 β または TNF- α 刺激滑膜細胞で発現変動した microRNA の標的候補遺伝子を検索する。

(3) microRNA-mRNA 解析

IL-1 β または TNF- α 刺激滑膜細胞で DNA マイクロアレイ解析を行い、発現変動した microRNA の標的候補遺伝子群と比較発現解析を行う。

(4) ネットワーク解析

IL-1 β または TNF- α 刺激滑膜細胞で発現変動した miRNA 群およびその標的候補遺伝子群間の分子間相互作用およびシグナリングパスウェイ解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 滑膜細胞の分離・培養

顎関節内視鏡洗浄療法の際に採取した顎関節滑膜組織から out growth 法を用いてヒト顎関節滑膜細胞（滑膜細胞）を分離し、初代および継代培養を行った。

(2) microRNA マイクロアレイ解析

滑膜細胞を IL-1 β または TNF- α で刺激後、miRNeasy kit を用いて total RNA を抽出し、miRXplore Microarray を用いて、microRNA 発現量を測定した。

(3) microRNA 標的候補遺伝子検索

IL-1 β または TNF- α 刺激滑膜細胞で発現変動の認められた miRNA の標的候補遺伝子を TargetScan, microRNR.org 等の miRNA database から検索した。また、IPA miRNA Target Filter を用いて標的候補遺伝子の絞り込みを行った。

(4) DNA マイクロアレイ解析

滑膜細胞を IL-1 β または TNF- α で刺激後、AGPC 法を用いて total RNA を抽出し、Affymetrix GeneChip HG U133 Plus 2.0 Array を用いて網羅的に遺伝子発現を測定

した。発現解析は GeneSpring を用いた。

(4) microRNA-mRNA 比較解析

IL-1 β または TNF- α 刺激滑膜細胞で発現変動の認められた miRNA の標的候補遺伝子を GeneSpring にインポートし、遺伝子発現を DNA マイクロアレイ解析と比較した。

(5) Ingenuity Pathway Analysis

IL-1 β または TNF- α 刺激滑膜細胞で発現変動の認められた miRNA の標的候補遺伝子で、かつ IL-1 β または TNF- α 刺激滑膜細胞で発現変動の認められた遺伝子群を Ingenuity Knowledge Database にアップロードし、分子間相互作用およびシグナリングパスウェイ解析を行った。

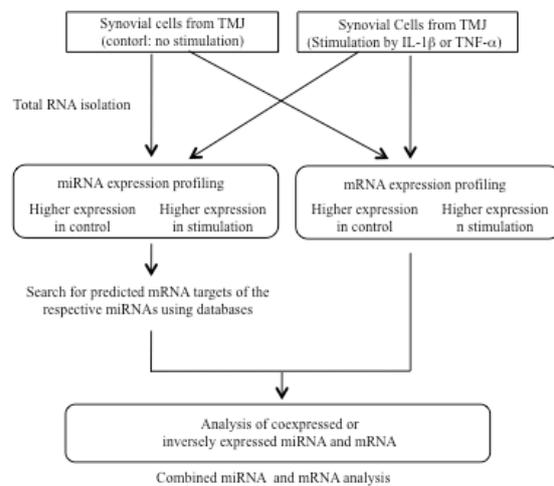


Fig. 1 Experimental procedure

4. 研究成果

(1) IL-1 β の影響

① microRNA マイクロアレイ解析

滑膜細胞を IL-1 β で 6 時間刺激した時の miRNA の発現変動を調べた。

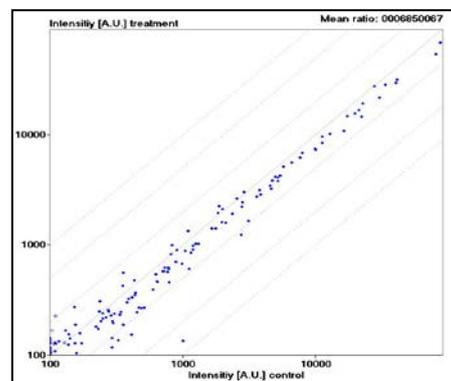


Fig. 2 Scatter plots of miRNA microarray
Synovial cells were treated with IL-1 β .

IL-1 β 刺激滑膜細胞では，無刺激細胞（コントロール）に比べ，多くの miRNA の発現量は減少傾向を示した。

Table 1 IL-1 β -response microRNA

	IL-1 (Fold)	Mature Acc.
hsa-mir-612	0.13426	MIMAT0003280
hsa-mir-494	0.448801	MIMAT0003193
hsa-mir-610	0.376198	MIMAT0003278
hsa-mir-583	0.484202	MIMAT0003248
hsa-mir-423	0.397705	MIMAT0004748
hsa-mir-26b	2.05069	MIMAT000079

滑膜細胞を IL-1 β 刺激した時，1/2 以下に発現減少したのは 5 miRNA，2 倍以上発現上昇したのは 1 miRNA であった。

② microRNA 標的候補遺伝子検索

IL-1 β 刺激滑膜細胞で発現変動の認められた miRNA の標的候補遺伝子を検索した。

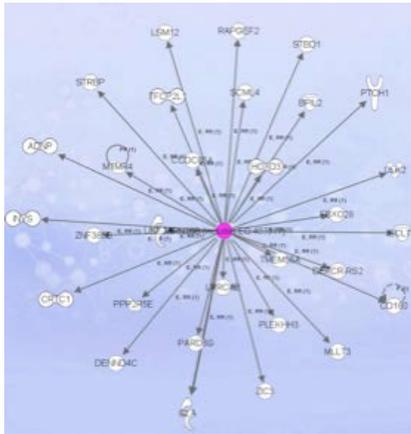


Fig. 3 miR-26b target genes

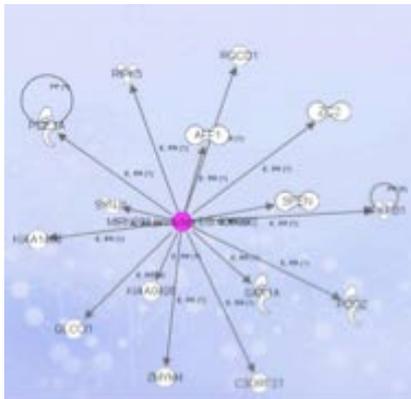


Fig. 5. miR-203 target genes

miR-26b および miR-203 の標的候補遺伝子について Network が形成された。

次に，IPA の miRNA Target Filter を用いて発現変動が認められた 6 miRNA について標的候補遺伝子群を検索した。

Table 2 Number of microRNA target genes

		gene number
update to IPA miRNA number		6
target gene	experimentally verified	18
	predicted high confidence	3,320
	moderate confidence	3,798

滑膜細胞を IL-1 β で刺激によって発現変動した miRNA の標的候補遺伝子を miRNA database を用いて検索した。その結果，7,136 遺伝子が候補にあがった。次に，IPA の miRNA Target Filter で標的候補遺伝子のフィルタリングを行ったところ，実験的に証明されているのは，18 遺伝子，標的遺伝子の可能性の高い遺伝子は 3,320 遺伝子であった。

③ microRNA-mRNA 比較解析

DNA マイクロアレイ解析を行ったところ，約 8,500 遺伝子中 IL-1 β によって有意に発現変動したのは 170 遺伝子で，発現上昇したのは 139 遺伝子，発現減少したのは 31 遺伝子であった。

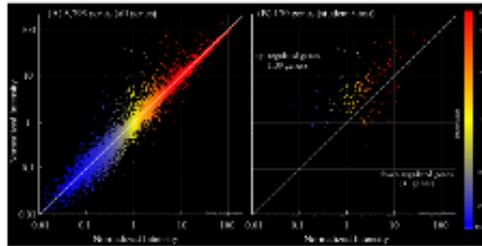
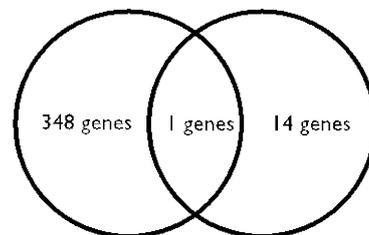


Fig. 6 Scatter plots of microarray analysis
Synovial cells were treated with IL-1 β

マイクロアレイ解析結果と発現変動した miRNA の標的候補遺伝子群について比較検討した。



発現変動した遺伝子 miRNA 標的候補遺伝子

Fig. 7 Venn diagram of microarray analysis and target genes of miRNA

実験的に証明されている 18 miRNA 標的遺伝子を GeneSpring にインポートし、マイクロアレイ解析結果と比較したところ、multiple inositol polyphosphate phosphatase (PTEN) 1 遺伝子が IL-1 β により発現変動していた。TargetScan から PTEN を標的にする miRNA を検索したところ、miR-26b が候補にあがった。

(2) TNF- α の影響

① microRNA マイクロアレイ解析

滑膜細胞を TNF- α で 6 時間刺激した時の miRNA の発現変動を調べた。

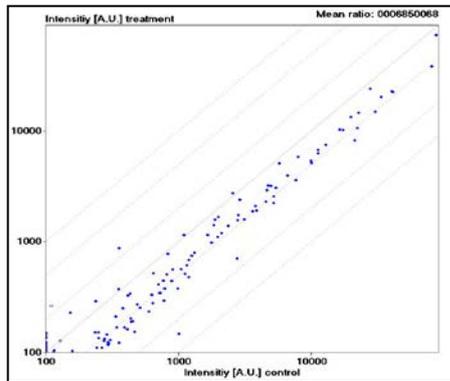


Fig. 8 Scatter plots of miRNA microarray
Synovial cells were treated with TNF- α .

滑膜細胞を IL-1 β または TNF- α で刺激すると発現減少する miRNA が多く認められた。

Table 3 に、TNF- α 刺激によって発現した miRNA を示す。2 倍以上または 1/2 以下に発現変動した miRNA は IL-1 β 刺激に比べ TNF- α 刺激の方が多かった。

Table 3 TNF- α -response microRNA

	TNF (Fold)	Mature Acc.
hsa-mir-612	0.147155	MIMAT0003280
hsa-mir-494	0.255458	MIMAT0003193
hsa-mir-1275	0.330173	MIMAT0005929
ebv-mir-BART13	0.345983	MIMAT0003424
hsa-mir-214	0.377741	MIMAT0000885
hsa-mir-181a	0.382255	MIMAT0000858
hsa-mir-744	0.388494	MIMAT0004187
hsa-let-7a	0.389987	MIMAT0000774
hsa-mir-610	0.392407	MIMAT0003278
hiv-mir-TAR	0.398103	MIMAT0006017
hsa-mir-583	0.399105	MIMAT0003248
hsa-let-7g	0.400809	MIMAT0000121
hsa-mir-92b*	0.405219	MIMAT0004792
hsa-mir-15a	0.417585	MIMAT0000526
hsa-mir-423	0.420547	MIMAT0004748
hsa-mir-421	0.422146	MIMAT0003339
hsa-mir-187*	0.426369	MIMAT0004561
hsa-mir-320c	0.427622	MIMAT0005793
hsa-let-7i	0.429025	MIMAT0000779
hsa-mir-212	0.429885	MIMAT0000883
hsa-mir-320b	0.436521	MIMAT0005792
hsa-mir-371	0.457227	MIMAT0004687
hsa-mir-423	0.457582	MIMAT0003454
hsa-mir-99b	0.461862	MIMAT0000821
hsa-mir-30a	0.466728	MIMAT0000808
hsa-mir-26b	0.470125	MIMAT0000796
hsa-mir-30b	0.471866	MIMAT0000806
hsa-mir-320d	0.474089	MIMAT0006764
hsa-mir-151	0.475423	MIMAT0000613
hsa-mir-328	0.476244	MIMAT0000752
hsa-mir-1280	0.476288	MIMAT0005946
hsa-mir-1228*	0.47747	MIMAT0005582
hsa-mir-923	0.479157	MIMAT0004973
hsa-mir-602	0.489621	MIMAT0003270
hsa-mir-149*	0.490186	MIMAT0004609
hsa-let-7f	0.493393	MIMAT0000778
hsa-mir-23a	0.495959	MIMAT0000792
hsa-mir-487b	0.496632	MIMAT0003180
hsa-mir-16	0.496859	MIMAT0000785
hsa-mir-26b	2.385878	MIMAT000079
hsa-mir-1246	2.46506	MIMAT0005898

滑膜細胞を TNF- α 刺激した時、1/2 以下に発現減少したのは 37 miRNA、2 倍以上発現上昇したのは 2 miRNA であった。

② microRNA 標的候補遺伝子検索

TNF- α 刺激滑膜細胞で発現変動の認められた miRNA の標的候補遺伝子を検索した。

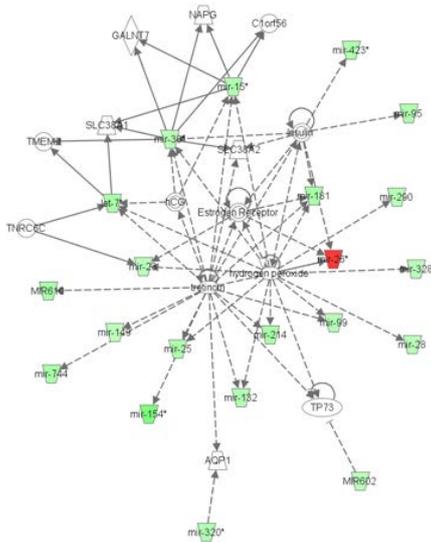


Fig. 9 Network of miRNAs regulated by TNF- α

滑膜細胞において、TNF- α 刺激によって発現変動した miRNA を IPA にアップロードし、分子間相互作用およびシグナリングパスウェイ解析を行ったところ、insulin や estrogen receptor を中心とする network が形成された。

次に、IPA の miRNA Target Filter を用いて発現変動が認められた 39 miRNA について標的候補遺伝子群を検索した。

Table 4 Number of microRNA target genes

update to IPA miRNA number		39
target gene	experimentally verified	508
	predicted high confidence	13,854
	moderate confi	13,321

滑膜細胞を TNF- α で刺激によって発現変動した 39 miRNA の標的候補遺伝子を miRNA database を用いて検索した。その結果、27,683 遺伝子が候補にあがった。次に、IPA の miRNA Target Filter で標的候補遺伝子のフィルタリングを行ったところ、実験的に証明されているのは、508 遺伝子、標的遺伝子の可能性の高い遺伝子は 13,854 遺伝子であった。

③ microRNA-mRNA 比較解析

DNA マクロアレイ解析を行ったところ、約 8,500 遺伝子中 TNF- α によって有意に発現変動したのは 245 遺伝子で、発現上昇したのは 196 遺伝子、発現減少したのは 49 遺伝子であった。

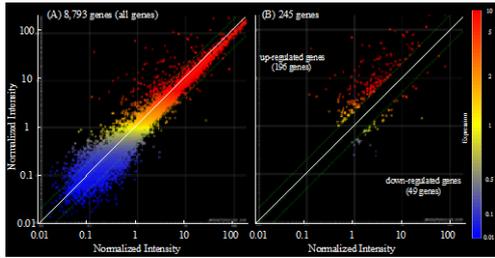
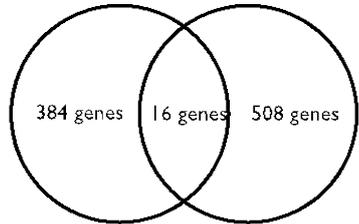


Fig. 10 Scatter plots of microarray analysis Synovial cells were treated with TNF- α

マイクロアレイ解析結果と発現変動した miRNA の標的候補遺伝子について比較検討した。



発現変動した遺伝子 miRNA 標的候補遺伝子

Fig. 7 Venn diagram of microarray analysis and target genes of miRNA

実験的に miRNA の標的遺伝子と証明された 508 遺伝子を GeneSpring にインポートし、マイクロアレイ解析結果と比較した。その結果、16 遺伝子が TNF- α によって発現変動した。この 16 遺伝子には、PTGS2 (COX2) 遺伝子等、炎症病態関連遺伝子が含まれていた。TargetScan から PTGS2 を標的にする miRNA を検索したところ、Let-7, miR-30ab, miR-340bc が候補にあがった。これらの miRNA は TNF- α によって発現が減少していた。

顎関節滑膜炎において、滑膜細胞の microRNA の発現変動が炎症病態関連因子の発現に関与している可能性が示唆された。今後、microRNA-mRNA の比較発現解析を推進することにより、新規炎症病態関連因子の検索や、炎症病態の診断および治療の開発に有意義であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

① Kawashima M, Ogura N, Akutsu M, Ito K, Kondoh T. The anti-inflammatory effect of cyclooxygenase inhibitors in fibroblast-like synoviocytes from the human temporomandibular joint results from the suppression of PGE2 production. J Oral Pathol Med. 査読有 in press. doi: 10.1111/jop.12045.

② Akutsu M, Ogura N, Ito K, Kawashima M, Kishida T, Kondoh T. Effects of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α on macrophage inflammatory protein-3 α production in synovial fibroblast-like cells from human temporomandibular joints. J Oral Pathol Med. 査読有 in press. doi: 10.1111/jop.12040.

③ 河島 睦, 小倉直美, 阿久津美和, 伊藤 耕, 近藤壽郎, IL-1 β および TNF- α 刺激ヒト顎関節滑膜細胞における IL-6 cytokine family の発現, 日本顎関節学会雑誌, 査読有, 24 巻 2 号, 91-99, <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/gakukansetsu/-char/ja/>

④ Ogura N, Takahashi K, Iwai S, Fujimoto Y, Hashimoto H, Kondoh T. Comparative analysis of MicroRNA-mRNA expression profiles of mesenchymal stem cells and dental follicle cells. In J Oral-Med Sci, 査読有, 11 (1): 13-21, 2012. <http://www.mascats.nihon-u.ac.jp/lab/info/index.html>

[学会発表] (計 11 件)

① Toshiro Kondoh. Predictive factors of temporomandibular joint disease in synovial tissues and fluid---A microarray analysis of synovial cells and a literature search on synovial fluid analysis---. International Conference on TMJ Biology, Diagnosis and Surgical Management. Oct 5, 2012. University Medical Center Groningen (Groningen, Netherland)

② 河島 睦 他 4 名, IL-1 β 刺激滑膜細胞における COX 阻害薬の効果, 日本顎関節学会, 2012 年 7 月 14 日, シャトレーゼガトーキングダムサッポロ (札幌)

③ 河島 睦 他 4 名, IL-1 β 刺激ヒト顎関節滑膜細胞における microRNA および

mRNA 発現解析, 日本口腔科学会, 2012 年 5 月 18 日, 広島国際会議場 (広島)

④ 小倉直美 他 4 名, TNF- α 刺激ヒト顎関節滑膜細胞における microRNA 発現解析, 日本顎関節学会, 2011 年 7 月 23 日, 広島県民分化センター (広島)

⑤ 伊藤 耕 他 4 名, IL-1 β 誘発滑膜炎における M-CSF 発現, 日本顎関節学会, 2010 年 7 月 24 日, タワーホール船堀 (東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 壽郎 (KONDOH TOSHIROU)
日本大学・松戸歯学部・教授
研究者番号: 7 0 1 7 8 4 1 6

(2) 研究分担者

小倉 直美 (OGURA NAOMI)
日本大学・松戸歯学部・講師
研究者番号: 1 0 1 5 2 4 4 8

阿久津 美和 (AKUTSU MIWA)
日本大学・松戸歯学部・助教
研究者番号: 1 0 5 2 3 5 2 4

伊藤 耕 (ITO KO)
日本大学・松戸歯学部・助教
研究者番号: 2 0 4 1 9 7 5 8

(3) 研究協力者

河島 睦 (KAWASHIMA MUTSUMI)
日本大学・松戸歯学部・大学院生
研究者番号: なし