

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21073

研究課題名（和文）歯周病発症における接合上皮発現タンパク質の関連メカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism involved in junctional epithelial-expressed proteins in the onset of periodontal disease

研究代表者

鶴屋 祐人 (TSURUYA, Yuto)

日本大学・松戸歯学部・兼任講師

研究者番号：20962278

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：炎症歯周組織でのODAMの転写調節機構とmiRNAの影響を解明するため、歯肉上皮Ca9-22細胞をTNF- α (10 ng/ml)またはIL-1 β (1 ng/ml)で刺激するとODAM mRNAとタンパク質量の増加が認められ、-480塩基対上流までのODAM遺伝子プロモーターを含むLUCコンストラクトの活性が上昇した。miR-200b発現プラスミドをCa9-22細胞に導入し、TNF- α で刺激すると、ODAM遺伝子発現は増加し、miR-200bの過剰発現により抑制された。miR-200bの標的であるIKK α の遺伝子およびタンパク発現量は、TNF- α 刺激で増加し、miR-200bの過剰発現で減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ODAMは接合上皮と歯面の接着に関与すると考えられる。歯肉上皮細胞をIL-1 β またはTNF- α で刺激すると、C/EBP β とYY1転写因子を介してODAM遺伝子発現が促進された。miRNAは遺伝子発現を抑制する。miRNAマイクロアレイでの解析の結果、炎症歯肉でmiR-200bとmiR-223の発現上昇が認められた。ODAMに結合配列を持つmiR-200bとmiR-223を歯肉上皮細胞に導入し、IL-1 β またはTNF- α で刺激することで、ODAMの転写調節がどのように変化し、歯周病の発症進行への新たな歯周病の治療および予防法の確立に役立てることができれば、社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：ODAM is specifically expressed in maturation stage ameloblasts and junctional epithelium. To elucidate the mechanism of transcriptional regulation of ODAM gene and the effect of miRNA on ODAM gene expression, human gingival epithelial Ca9-22 cells were stimulated with TNF- α (10 ng/ml) or IL-1 β (1 ng/ml). TNF- α and IL-1 β increased ODAM mRNA and protein levels, and the luciferase activities of -480ODAMLUC construct containing the ODAM gene promoter from the transcription start site to -480 base pairs upstream was increased, and the activities were suppressed by tyrosine kinase, MEK1/2 and PI3 kinase inhibitors. Stimulation with IL-1 β or TNF- α increased the binding of nuclear proteins to the YY1 and C/EBP response elements and regulate the transcription of ODAM. When miR-200b expression plasmid was transfected into Ca9-22 cells and stimulated with TNF- α for 12 h, ODAM gene expression was increased and suppressed by overexpression of miR-200b.

研究分野：歯周病

キーワード：歯周病 歯周組織 接合上皮 O DAM 炎症 TNF- α IL-1 β miRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ODAM は接合上皮特異的に発現することから、接合上皮と歯面の接着への関与が示唆されているが、ODAM の組織学的分布に着目した報告がほとんどであった。そこで炎症性刺激に着目し、IL-1 β または TNF- α による歯肉上皮細胞での ODAM 遺伝子の転写調節メカニズムを報告した。

(2) 近年では、miRNA が歯周病に関連した研究も増加しつつあるが、歯周病の発症にどのように関与するのかを解析した報告はまだない。本研究は、ODAM と miRNA を歯周病の発症メカニズムを新たな視点から解き明かすために重要な 2 つの要素として捉え、その関連性を検証しようとする点で、学術的独自性が強い。さらに、両者の関連を知ることによって、新規の歯周病の治療および予防法の開発につながる考察が期待できる。

2. 研究の目的

(1) 接合上皮特異的に発現するタンパク質である ODAM はこれまでの研究において、上皮性付着への関与が示唆され、炎症性歯肉で発現が増加することが明らかとなっている。本研究では、miRNA 発現ベクターを導入した歯肉上皮細胞を TNF- α または IL-1 β で刺激し、炎症時の細胞環境を再現することで、炎症性歯肉で発現が増加する miR-200b および miR-223 による ODAM 遺伝子発現調節機構を解析し、炎症時の接合上皮における動態を解明することを目的とする。

(2) 本研究の成果を踏まえ、炎症環境が ODAM 遺伝子発現調節を介して、接合上皮のバリア機能に及ぼす影響についても考察を行い、歯周病発症のメカニズムを解き明かす一端とする。

3. 研究の方法

(1) Ca9-22 ヒト歯肉上皮細胞を TNF- α または IL-1 β で刺激し、炎症性歯肉で発現増加を認めた miR-200b、miR-223 をそれぞれ定量 PCR にて解析する。

(2) miRNA 発現ベクターあるいは miRNA インヒビターを導入した、ヒト歯肉上皮細胞を TNF- α または IL-1 β で刺激することで、炎症時の細胞環境を再現し、ODAM mRNA およびタンパク質発現量の変化を、定量 PCR およびウエスタンブロットで解析する。さらに、同条件下での細胞質内における ODAM タンパク質発現と局在を免疫蛍光染色にて観察する。

(3) ヒト ODAM 遺伝子の 3'非翻訳領域(UTR)への miR-200b、miR-223 の結合を検証するため、ヒト歯肉上皮細胞に miRNA 発現ベクターと、ヒト ODAM 遺伝子 3'-UTR を挿入したコンストラクトを導入し、ルシフェラーゼアッセイを行う。

(4) miRNA 発現ベクターを導入したヒト歯肉上皮細胞を用い、TNF- α および IL-1 β に誘導されるシグナル伝達経路中に存在する miR-200b、miR-223 の標的遺伝子の mRNA およびタンパク質発現量について、定量 PCR およびウエスタンブロットにて解析する。

4. 研究成果

(1) MicroRNA (miRNA) は、長さ約 22 塩基の一本鎖ノンコーディング RNA で、標的 mRNA の 3'末端非翻訳領域(3'-UTR)に結合し翻訳を抑制する。炎症と非炎症性歯肉を用いた miRNA マイクロアレイの結果、炎症歯肉で miR-200b および miR-223 の発現が上昇すること報告した Odontogenic ameloblast-associated protein (ODAM) は、成熟期エナメル芽細胞と歯

肉接合上皮特異的に発現するタンパク質で、接合上皮と歯面の接着への関与が示唆されている。炎症歯周組織での ODAM の転写調節機構と遺伝子発現に対する miRNA の影響を解明するため、ヒト歯肉上皮細胞 (Ca9-22 細胞) を TNF- α (10 ng/ml) または IL-1 β (1 ng) で刺激した際 ODAM の遺伝子発現の変化を解析した。

(2) Ca9-22 細胞を TNF- α または IL-1 β で刺激すると ODAM の mRNA およびタンパク質量の増加が認められ、転写開始点から-480 塩基対上流までの ODAM 遺伝子プロモーターを含む LUC コンストラクトの活性が上昇し、チロシン kinase、MEK1/2 および PI3 kinase 阻害剤により LUC 活性は抑制された。

(3) IL-1 β または TNF- α で刺激すると ODAM 遺伝子プロモーター中の YY1 および C/EBP 結合配列への核内タンパク質の結合が増加したことから、IL-1 β と TNF- α 刺激により誘導された転写因子が YY1 および C/EBP 配列に結合し、ODAM の転写を調節していると考えられた。

(4) Ca9-22 細胞を TNF- α (10 ng/ml) で刺激した際の ODAM 遺伝子発現に対する miR-200b の影響を解析した。miR-200b 発現プラスミドを Ca9-22 細胞に導入後、TNF- α (10 ng/ml) で 12 時間刺激すると、TNF- α 刺激で ODAM 遺伝子発現は増加するが、miR-200b の発現により抑制された。miR-200b 発現プラスミドの代わりに、miR-200b インヒビターを Ca9-22 細胞に導入すると、TNF- α 刺激で増加した ODAM 遺伝子発現が、miR-200b インヒビターによりさらに増加した。miR-200b の標的である IKK β の遺伝子およびタンパク発現を検索した。Ca9-22 細胞での IKK β mRNA とタンパク発現量は、TNF- α 刺激で増加し、miR-200b の過剰発現で減少した。以上の結果から miR-200b は IKK β の発現を抑制し ODAM mRNA とタンパク発現量を調節していると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tsuruya Y, Yamaguchi A, Yamazaki-Takai M, Mezawa M, Takai H, Nakayama Y, Ogata Y	4. 巻 71
2. 論文標題 Transcriptional regulation of human odontogenic ameloblast-associated protein gene by tumor necrosis factor-	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inflammation Research	6. 最初と最後の頁 119-129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00011-021-01523-5	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 Tsuruya Y, Yamaguchi A, Yamazaki-Takai M, Zhenyu J, Takai H, Nakayama Y, Ogata Y	4. 巻 110
2. 論文標題 Interleukin-1 regulates odontogenic ameloblast-associated protein gene transcription in human gingival epithelial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 557-568
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10266-022-00689-6	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 Yamaguchi A, Tsuruya Y, Zhenyu J, Yamazaki-Takai M, Takai H, Nakayama Y, Ogata Y	4. 巻 21
2. 論文標題 Inflammatory cytokines stimulate exosomal microRNA and protein expressions in osteoblast-like Saos2 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Oral-Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5466/ijoms.21.1	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 Nakayama Y, Tabe S, Yamaguchi A, Tsuruya Y, Kobayashi R, Oyama K, Kitano D, Kojima K, Kogawa R, Okumura Y, Ogihara J, Senpuku H, Ogata Y	4. 巻 15
2. 論文標題 Identification of nutritional factors to evaluate periodontal clinical parameters in patients with systemic diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 365
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu15020365	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 Yamaguchi A, Tsuruya Y, Igarashi K, Jin Z, Yamazaki-takai M. Takai H, Nakayama Y, Ogata Y	4. 巻 53
2. 論文標題 Changes in the components of salivary exosomes due to initial periodontal therapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal & Implant Science	6. 最初と最後の頁 e3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5051/jpis.2203700185	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 Yamazaki-Takai M, Saito Y, Ito S, Ogihara-Takeda M, Katsumata T, Kobayashi R, Nakagawa S, Nishino T, Fukuoka N, Hosono K, Yamasaki M, Yamazaki Y, Tsuruya Y, Yamaguchi A, Ogata Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Impact of COVID-19 spread on visit intervals and clinical parameters for patients with periodontitis in supportive periodontal therapy: a retrospective study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal & Implant Science	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) 10.5051/jpis.2300620031	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1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 鶴屋祐人
2. 発表標題 C/EBPおよびYY1を介した炎症性サイトカインによるODAM遺伝子発現の転写調節
3. 学会等名 第65回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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