

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463026

研究課題名(和文) 歯嚢由来細胞におけるRNA-タンパク質相互作用解析

研究課題名(英文) Study of RNA-protein interaction in dental follicle cells

研究代表者

小倉 直美 (OGURA, Naomi)

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：10152448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、mRNAの非翻訳領域にmicroRNAやRNA結合タンパク質が結合し、mRNAの分解や翻訳を制御していることが報告されている。一方、歯科治療過程で破棄される歯嚢には間葉系幹細胞が存在し、歯嚢細胞は骨芽細胞や神経系細胞へ分化することから、骨再生医療の細胞源として注目されている。本申請では、歯嚢細胞の骨芽細胞分化・石灰化、神経系細胞への分化に関するmicroRNAおよびRNA結合タンパク質を検索し、その標的遺伝子を検索した。さらに、滑膜細胞のcolony stimulating factor発現にIL-1 とTNF- の相乗作用にRNA結合タンパク質の関与についても検討した。

研究成果の概要(英文)：Post-transcriptional gene regulation such as mRNA processing, stability, and translation are controlled by microRNA (miRNA) and RNA binding proteins that predominantly bind to specific elements located in the untranslated regions (UTRs) of target mRNAs. miRNA binding to partially complementary site 3'-UTR of target mRNA. Several RNA binding proteins can interact with AU-rich elements.

The dental follicle contains stem cells and/or progenitor cells of the periodontium. Human dental follicle cells (hDFCs) have the ability to differentiate for osteoblasts and neural cells. hDFCs have great potential for utilized in regenerative cell therapy. In this study, we investigated miRNA and RNA binding proteins in hDFCs during differentiation for osteogenic or neural cells. In addition, we examined that the IL-1 and TNF- synergistic effect on GM-CSF and G-CSF expression in synovial cells are involved mRNA stability by RNA binding protein and AU-rich element in their mRNA 3'-UTR.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯嚢由来細胞 骨芽細胞分化 神経系細胞分化 RNA結合タンパク質 microRNA トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

近年、タンパク質翻訳には microRNA (miRNA) や RNA 結合タンパク質による複雑な制御が行われていることが明らかとなってきた。miRNA は、mRNA 3'末端非翻訳領域の自身と相補性を有する領域に、また mRNA 結合タンパク質は、AU-rich element や Poly A 領域に結合することによって、mRNA の安定性や分解、翻訳の制御に寄与していることが報告されている。また、miRNA や RNA 結合タンパク質は発生や分化、病態形成に関与すると示唆されている。

歯嚢は、歯嚢は歯科治療過程で破棄される組織である。歯嚢組織には間葉系幹細胞が存在し、骨芽細胞、脂肪細胞や神経細胞へと分化することが明らかとなっている。歯嚢細胞は、骨髄由来間葉系幹細胞比べて増殖がよく、基礎研究用細胞および再生医療用細胞として有用と示唆される。廃棄される組織から再生医療用細胞を採取することは、患者の身体的負担を軽減できる。

2. 研究の目的

歯嚢から分離した歯嚢細胞を、骨芽細胞および神経系細胞へ分化誘導を行い、歯嚢細胞の骨芽細胞や神経系細胞への分化に関与する miRNA および RNA 結合タンパク質を検索するとともに、その標的となる mRNA についても検索することを目的とする。さらに、滑膜細胞の colony stimulating factor 産生において、IL-1 β と TNF- α の相乗効果に RNA 結合タンパク質が関与している可能性についても検討する。

(1) miRNA 発現解析

歯嚢細胞の骨芽細胞分化過程で発現変動する miRNA を検索する。

(2) RIP Assay

歯嚢細胞の骨芽細胞分化過程で発現変動した miRNA を歯嚢細胞に遺伝子導入し、Ago-RNA 複合体について RIP-Chip Assay によって検討する。

(3) 神経系細胞への分化誘導

歯嚢細胞を神経系細胞へ分化誘導を行い、神経系細胞への分化に関与する RNA 結合タンパク質を検索する。

(4) CFSs 産生における RNA 結合タンパク質の関与

IL-1 β および TNF- α による顎関節滑膜細胞の colony stimulating factor (CSF) 産生に RNA 結合タンパク質が関与する可能性についても検討した。

3. 研究の方法

(1) 歯嚢細胞の分離・培養

埋伏歯の抜歯の際に採取した歯嚢を collagenase/dispase 処理し、歯嚢細胞を分離、

初代培養および継代培養を行った。

(2) 歯嚢細胞の骨芽細胞への分化誘導

歯嚢細胞を骨芽細胞誘導培地 (OIM; mesenchymal stem cell osteogenic induction medium) で培養を行った。

(3) 歯嚢細胞の神経系細胞への分化誘導

歯嚢細胞を B-27, b-FGF, EGF 添加無血清 DMEM で培養し、Neurosphere 形成後、神経細胞分化誘導培地で培養を行った。

(4) 歯嚢細胞の細胞学的性質

歯嚢細胞の細胞表面マーカーは免疫染色法を用いて調べた。

(5) 遺伝子発現

歯嚢細胞から miRNeasy kit または RNeasy kit を用いて total RNA を抽出した。遺伝子発現は、real time-PCR 法を用いて、遺伝子の発現量を測定した。

(6) タンパク質量の測定

タンパク質量を Western-blot 法または ELISA kit を用いて調べた。

(7) microRNA マイクロアレイ解析

歯嚢細胞を骨芽細胞誘導培地または増殖培地で培養後、Agilent human miRNA Rel. 12.0 array を用いて、microRNA 発現量を測定した。

歯嚢細胞を骨芽細胞分化過程で発現変動した miRNA の標的候補遺伝子を miRNA Database, Ingenuity Pathway Analysis (IPA) miRNA Target Filter を用いて標的候補遺伝子の絞り込みを行った。

(8) microRNA 遺伝子導入

歯嚢細胞に HiPerFect Transfection 試薬を用いて miRNA 遺伝子導入を行った。

(9) RIP-Chip Assay

miR-204 を遺伝子導入した歯嚢細胞および導入していない歯嚢細胞を骨芽細胞誘導培地で培養して細胞を可溶化後、Ago2 抗体で免疫沈降して RIP-Chip Assay を行った。

(10) 滑膜細胞の分離・培養

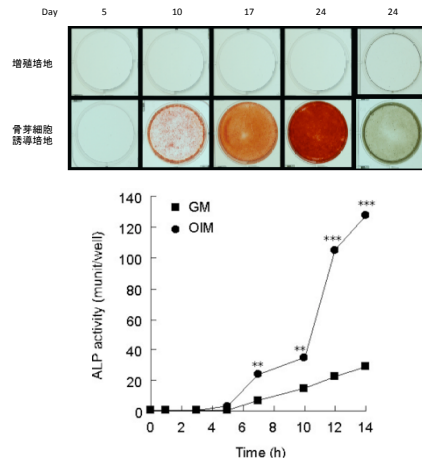
顎関節内視鏡洗浄療法の際に採取した顎関節滑膜組織から out growth 法を用いてヒト顎関節滑膜細胞 (滑膜細胞) を分離し、初代および継代培養を行った。滑膜細胞に IL-1 β および TNF- α を作用させた。

4. 研究成果

(1) 歯嚢細胞の骨芽細胞分化

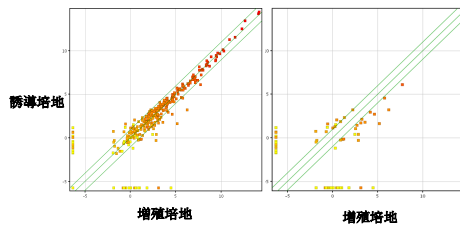
歯嚢細胞を骨芽細胞分化誘導培地で培養するとアルカリホスファターゼ (ALP) 活性の上昇し、アリザリン染色によって石灰化することが認められた。

アリザリン染色および ALP 活性



(2) miRNA マイクロアレイ解析

歯囊細胞の骨芽細胞分化・石灰化に関与する miRNA の検索を目的に、ALP 活性の上昇する骨芽細胞誘導培地で培養 7 日について、miRNA マイクロアレイ解析を行った。

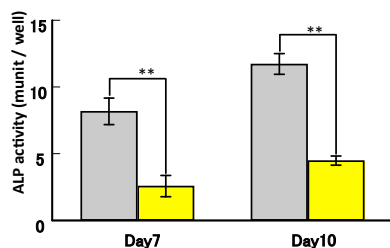


960 miRNA 中、歯囊細胞で発現が認められたのは、307 miRNA であった。骨芽細胞誘導培地で培養した時、増殖培地に比べ 2 倍以上発現上昇したのは 33 miRNA、1/2 以下に発現減少したのは 35 miRNA であった。

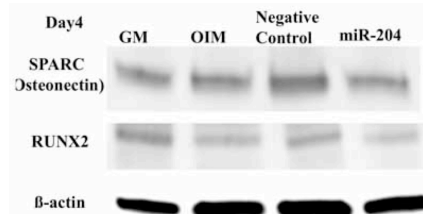
歯囊細胞の骨芽細胞分化過程において発現減少した miR-204 の標的候補遺伝子には、骨芽細胞分化マーカーの ALP, Runx2, SPARC (オステオネクチン) が認められた。また、miR-29 も骨芽細胞分化過程において発現減少しており、タイプ 1 コラーゲンを始めとして数種のコラーゲン、SPARC (オステオネクチン) を標的候補遺伝子としていることが認められた。

(3) miRNA-204 の影響

歯囊細胞の骨芽細胞分化過程における miR-204 の影響を調べるために、miR-204 または Negative Control を培養 0 日目および 3 日目に遺伝子導入し、骨芽細胞誘導培地で培養した。



miR-204 導入によってアルカリホスファターゼ活性の減少を認めた。



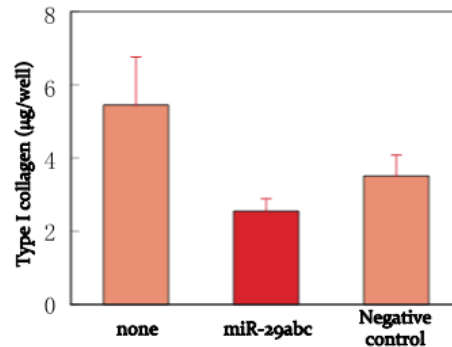
miR-204 導入によって、オステオネクチン Runx2 のタンパク質産生は減少を認めた。

(4) RIP-Chip Assay

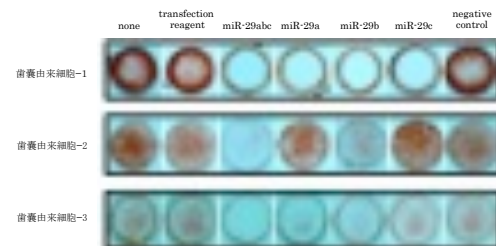
骨芽細胞誘導培地で培養 7 日目に miR-204 を遺伝子導入した歯囊細胞および遺伝子導入しない歯囊細胞で RIP-Chip Assay を行ったところ、miR-204 を遺伝子導入した系では 145.6 ng、遺伝子導入していない系では 65.7 ng の RNA を得た。miR-204 を導入すると Ago2 結合 RNA 量が増加することが示唆された。よって、miR-204 導入によって、RICE に取り込まれ Argonaute と結合し、翻訳および安定性が制御される mRNA が増加したと示唆された。

(5) miR-29 の影響

歯囊細胞の骨芽細胞分化過程における miR-29 の影響を調べるために、歯囊細胞に miR-29abc を遺伝子導入し、骨芽細胞誘導培地で培養後、ELISA 法でタイプ 1 コラーゲン産生を、アリザリン染色を用いて石灰化能を調べた。

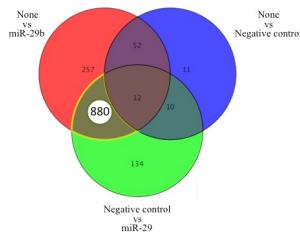


歯囊細胞に miR-29abc を遺伝子導入したところ、タイプ I コラーゲン産生は減少した。

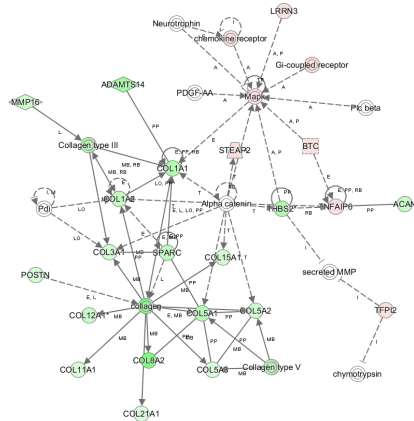


歯囊細胞に miR-29a, b, c を遺伝子導入したところ、石灰化の遅延が認められた。最も miR-29b が石灰化を抑制した。

歯囊細胞に miR-29b を遺伝子導入して、DNA マイクロアレイ解析を行った。



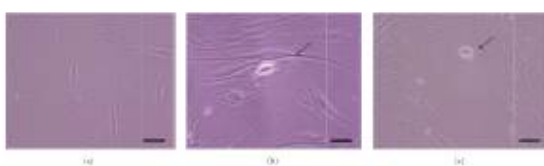
miR-29b, negative control を導入した歯囊細胞, 導入なし歯囊細胞を骨芽細胞誘導培地で7日間培養を行い、DNA マイクロアレイ解析を行った。各サンプル間で発現が3倍以上、1/3以下になった遺伝子を発現変動した遺伝子とした。遺伝子導入なしまたはnegative control を導入した細胞と比較し、miR-29b を導入した細胞で発現変動した遺伝子群のうち、遺伝子導入なしと比較しnegative control 導入で発現変動した遺伝子を除いた遺伝子群を、miR-29b によって発現変動した遺伝子とした。miR-29b によって発現変動した遺伝子は、約54,000遺伝子中880遺伝子であった。



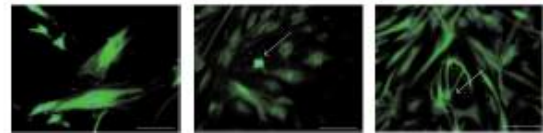
miR-29b によって発現減少した遺伝子が多く認められた。Type 1 collagen α 1 (Col1A1) および Type 1 collagen α 2 (Col1A2), Osteonectin (SPARC) 等細胞外基質が多く認められた。

(6) 歯囊細胞の神経系細胞への分化誘導

歯囊細胞を神経細胞誘導培地で培養を行った。(a) 培養0日, (b) 培養3日, (c) 培養7日。神経細胞誘導培地で培養3日目から神経細胞様の形態を示す細胞が認められた。

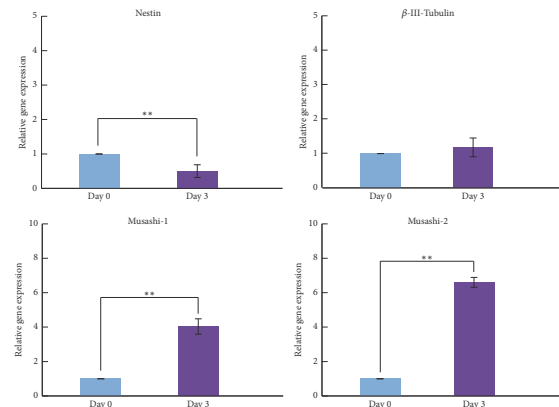


神経細胞マーカーの免疫染色を行った。

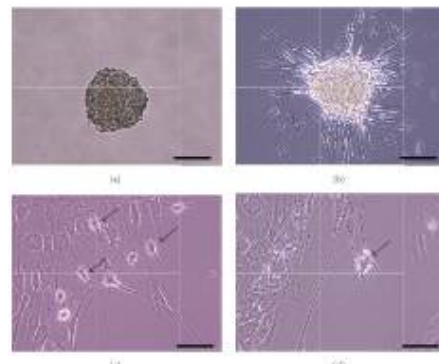


nestin β -III tubulin S100

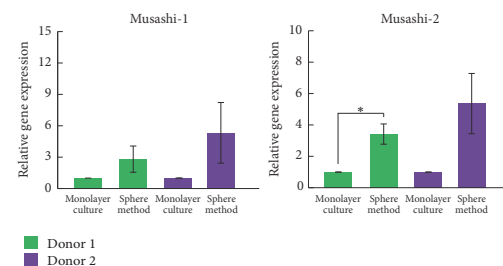
歯囊細胞は、神経幹細胞マーカーのネスチンや神経細胞マーカーの β -III チューブリンおよび S100 タンパク質を発現していることが認められた。



歯囊細胞を神経細胞分化誘導培地で培養を行うと、神経幹細胞マーカーのネスチンの遺伝子発現は減少した。一方、神経細胞マーカーの β -III チューブリンは発現が上昇した。RNA 結合タンパク質で、神経前駆細胞マーカーのムサシ-1, -2 発現は、著しい上昇が認められた。



Neuroshpere 形成後、神経細胞誘導培地で培養を行うと、Neuroshpere 形成させない時と比べ神経細胞様細胞が多く認められた。

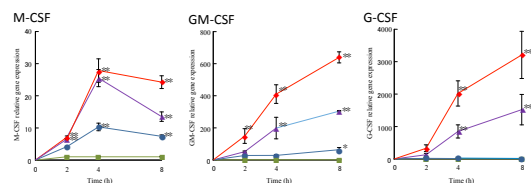


Neuroshpere 形成後、RNA 結合タンパク質で、神経前駆細胞マーカーのムサシ-1, -2

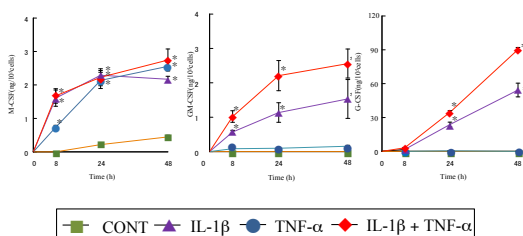
発現は上昇した。よって、神経前駆細胞マーカーのムシシ-1, -2 は神経細胞への分化に関与している可能性が示唆された。

(7) CSF 産生における IL-1 β と TNF- α の作用
滑膜細胞に IL-1 β および TNF- α を作用させて、macrophage colony stimulating factor (M-CSF), granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) 発現を測定した。

遺伝子発現



タンパク質産生



GM-CSF と G-CSF 発現で、IL-1 β と TNF- α の相乗効果が認められた。一方、M-CSF では IL-1 β と TNF- α の相乗効果は認められなかった。IL-1 β と TNF- α と作用させた物質は同じなのに、相乗効果がみとめられる CSF と認められない CSF の差は、転写の亢進ではなく、転写後の mRNA の安定性によるものではないかと考えた。そこで、CSFs について、mRNA の安定性に関与する RNA 結合タンパク質が結合する 3'末端の AU Rich element 数を調べた。



その結果、AU Rich element の数は、GM-CSF が 8 カ所、G-CSF が 6 カ所、M-CSF は 1 カ所であった。

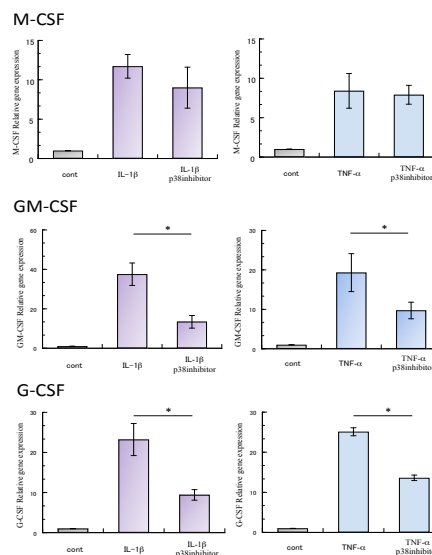
次に、AU Rich element に結合する RNA 結合タンパク質が滑膜細胞で発現しているのかを調べた。



Ladder HuR AUH

AU Rich element に結合する HuR および AUH は滑膜細胞で発現していた。

HuR が AU Rich element に結合して mRNA の安定に関与するためには、HuR がリン酸化される必要がある。このリン酸化には p38 MAPK が関与するとの報告がある。そこで、p38 MAPK 阻害剤を添加して、CSFs の産生を測定した。



p38 MAPK 阻害剤に添加によって、IL-1 β と TNF- α の相乗効果が認められた GM-CSF と G-CSFs 産生は減少したが、相乗効果の認められなかった M-CSF 産生は減少が認められなかった。よって、GM-CSF と G-CSFs 産生における IL-1 β と TNF- α の相乗効果は、RNA 結合タンパク質の HuR 等が関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

① Shingo Kanao, Naomi Ogura, Kosuke Takahashi, Ko Ito, Masaaki Suemitsu, Kayo Kuyama, Toshiro Kondoh. Capacity of human dental follicle cells to differentiation into neural cells in vitro. Stem Cells International, 査読有, 2017, 2017, 8371326, doi.org/10.1155/2017/8371326.

② Suguru Watanabe, Naomi Ogura, Miwa Akutsu, Mutsumi Kawashima, Toshio Hattori, Teruo Yano, Ko Ito, Toshiro Kondoh. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α synergistically induce expression of colony stimulating factors in synovial fibroblasts from the human temporomandibular joint. International Journal of Oral-Medical Sciences, 査読有, 15 (3-4), 2017, 74-84.

<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/ijoms>

③ Risa Tomoki, Naomi Ogura, Kosuke Takahashi, Ko Ito, Toshiro Kondoh. MicroRNA-29 Family Suppresses Mineralization in Dental Follicle Cells. *Journal of Hard Tissue Biology*, 査読有, 24 (1), 2015, 23-28.
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jhtb/-char/ja/>

〔学会発表〕(計14件)

① 吉本秀輔, 小倉直美, 高橋康輔, 友木里沙, 金尾真吾, 加藤有悟, 青木暁宣, 清水一, 伊藤 耕, 近藤壽郎. ヒト歯嚢由来細胞の石灰過程における miR-29 の影響. 第71回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 2017. 4. 27. ひめぎんホール (愛媛, 松山).

② 金尾真吾, 小倉直美, 高橋康輔, 友木里沙, 枝 卓志, 吉本秀輔, 伊藤 耕, 末光正昌, 久山佳代, 近藤壽郎. ヒト歯嚢由来細胞の神経細胞への分化誘導における神経細胞関連遺伝子の発現. 第61回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会, 2016. 11. 25. 幕張メッセ・国際会議場(千葉, 千葉市).

③ 渡邊 駿, 小倉直美, 阿久津美和, 河島睦, 山崎文恵, 服部俊夫, 矢野照雄, 石上大輔, 伊藤 耕, 近藤壽郎. ヒト顎関節滑膜細胞の BM-CSF および G-CSF 産生における IL-1 β および TNF- α の相乗効果. 第61回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会, 2016. 11. 25. 幕張メッセ・国際会議場(千葉, 千葉市).

④ 渡邊 駿, 小倉直美, 阿久津美和, 河島睦, 服部俊夫, 矢野照雄, 伊藤 耕, 近藤壽郎. IL-1 β および TNF- α 刺激ヒト顎関節滑膜由来線維芽細胞様細胞における M-CSF, GM-CSF, G-CSF の発現. 第70回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会. 2016. 4. 17. 福岡国際会議場(福岡, 福岡市).

⑤ 金尾真吾, 小倉直美, 高橋康輔, 友木里沙, 枝 卓志, 岡田仁恵, 岩井 聡, 伊藤 耕, 久山佳代, 近藤壽郎. ヒト歯嚢由来細胞の神経細胞への分化誘導. 第60回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会, 2015. 10. 16. 名古屋国際会議場(愛知, 名古屋市).

⑥ Ogura N, Takahashi K, Tomoki R, Ito K, Kondoh T. Effect of miR-29 in Dental Follicle Cells during Osteogenic Differentiation. 93rd International Association For Dental Research, 2015. 3. 14. Boston (USA).

⑦ 友木里沙, 小倉直美, 高橋康輔, 岡田仁恵, 伊藤 耕, 近藤壽郎. ヒト歯嚢由来細胞の骨芽細胞分化過程における microRNA-204 の影響. 第32回日本骨代謝

学会学術集会, 2014. 7. 24. 大阪国際会議場(大阪, 大阪市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小倉 直美 (OGURA, Naomi)
日本大学・松戸歯学部・講師
研究者番号: 10152448

(2) 研究分担者

伊藤 耕 (ITO, Ko)
日本大学・松戸歯学部・講師
研究者番号: 20419758

高橋 康輔 (TAKAHASHI, Kosuke)
日本大学・松戸歯学部・講師
研究者番号: 30705687

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

友木 里沙 (TOMOKI, Risa)
日本大学・松戸歯学部・助手(専任扱)
研究者番号: 70758060

金尾 真吾 (KANAOKA, Shingo)
日本大学・松戸歯学部・大学院生

渡邊 駿 (WATANABE, Suguru)
日本大学・松戸歯学部・大学院生