

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11042

研究課題名(和文) 唾液マイクロRNAの加齢変動と機能解析

研究課題名(英文) miR-1290 promotes cell growth in NS-SV-AC, human submandibular gland cell line

研究代表者

水澤 典子 (MIZUSAWA, NORIKO)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・助教

研究者番号：80254746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：高齢者(70歳以上)と若年者(20-40歳代)の唾液マイクロRNA(以下miRNA)を解析し、有歯(20本以上)高齢者にmiR-1290が高レベルである可能性を見いだした。miR-1290の機能を調べた結果、唾液を産生する腺房細胞に似た顎下腺細胞株(NS-SV-AC)の細胞増殖をmiR-1290が促進する可能性が示唆された。歯の数が20本以上維持され、口腔内の衛生管理が比較的良好な高齢者の唾液に豊富なmiR-1290は、今後引き続き産生機構および機能を解明することで、口腔内のみならず全身性への影響を含め、加齢にともなう防御機構の一つとしての展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs (miRNAs) are short noncoding RNA molecules that regulate gene expression post-transcriptionally by binding to complementary sequences on 3' UTR of target mRNAs. Although miRNAs have been found in all known biological fluids, their functions are not clear. To identify the specific miRNAs present in saliva, microarrays and real-time PCR (qPCR) were used, and we found miR-1290 was one of major miRNA in human saliva. We analyzed the potential target genes of miR-1290 using computer-aided algorithms: TargetScan and miRDB. Using a cell line from human submandibular gland, NS-SV-AC, overexpression of miR-1290 via transfection of miR-1290 mimic showed that the cell growth was significantly enhanced by miR-1290. It was suggesting that miR-1290 function in NS-SV-AC cells.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：microRNA

1. 研究開始当初の背景

マイクロRNA (miRNA) は、ヒトで現在 2000 種類以上が同定され、多くの細胞内で遺伝子発現調節に参与しているほか、細胞外に分泌され、血清等あらゆる体液中にも安定して存在することから、癌をはじめとした疾患の早期発見バイオマーカーや細胞間情報伝達物質としての利用が期待される。

我々は、唾液中に miRNA が安定して存在することを確認し、マイクロアレイを用いたプロファイリングを行った。高齢者 (70 歳以上) では、唾液 miRNA 量が他の成人に比べ多い可能性が認められ、さらに、miR-1290 が唾液中に多量に存在し、唾液腺および歯肉上皮に影響を及ぼす可能性が考えられたため、検証を行った。

2. 研究の目的

高齢者の唾液中に miRNA が多いことを明らかにする。唾液 miRNA の一つ miR-1290 の機能を解析し、唾液線および歯肉への影響を検討する。

3. 研究の方法

3-1 ヒト唾液 miRNA プロファイリングおよび、機能解析に用いる細胞株に発現する miRNA のプロファイリング: マイクロアレイ解析データの検証を行った。

3-2 miR-1290 の標的予測と細胞株を用いた miR-1290 の機能解析: miR-1290 の標的を予測は 2 種類のデータベース miRDB および TargetScan を用いた。ヒト正常唾液線細胞株 (NS-SV-AC 細胞および NS-SV-DC 細胞)、一部、マウス歯肉上皮細胞株 (GE1 細胞) を用い miR-1290 模倣核酸を遺伝子導入試薬で導入し、細胞増殖能、標的 mRNA の検討により、miR-1290 の機能解析を行った。

4. 研究成果

4-1 高齢者の唾液 miRNA 量・種類

7 名の高齢者 (およそ 70 歳以上) の唾液 miRNA について、マイクロアレイを行った解析結果を比較した。miR-1290 の蛍光強度を例に、miRNA 発現量の多さの目安として年齢・性別・残存歯数に対し、miR-1290 の発現量 (蛍光強度)、および、成熟 miRNA の 866 種中で、個人で検出された miRNA 種数 (検出数) あたりの検出ランクを表に示す。

	年齢	性別	残存歯 (本)	miR-1290 蛍光強度	miR-1290 検出ランク/検出数
A1	76	男性	0	19	12位 / 64
A2	80	女性	8	1219	3位 / 202
A3	73	女性	0	-	- / 139
A4	79	女性	1	99	5位 / 79
B1	83	男性	24	84506	3位 / 352
B2	80	男性	28	17782	4位 / 340
B3	69	女性	30	30741	4位 / 355

miRNA マイクロアレイ Agilent v3、ヒト成熟 miRNA、866 種を検出

表 高齢者 miRNA の比較

約 70 歳以上の高齢者 7 名の miRNA プロファイリングにより、miR-1290 の蛍光強度を例に、発現量の多さを目安として示す。miR-1290 が検出された者ではいずれも上位で検出されていた。

MiR-1290 が検出された 6 名において、個人内での miRNA 検出ランクとして 3 位から 12 位と、いずれも上位にランクされ、miR-1290 は唾液の主要 miRNA である可能性が示された。一方で、検出された蛍光強度には差が大きく、7 名の miRNA の全体像は、主成分分析の図で示される 2 群に分けられた (図 1)。

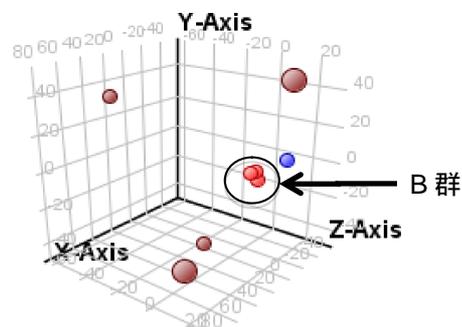


図 1 主成分分析プロット解析

ほぼ同様の miRNA プロファイリングの 3 例 (赤丸) と、多様な (ばらつきが多い) miRNA プロファイリングの 4 例 (茶丸) が示された。1 例 (青丸) は NS-SV-AC 細胞株の培養上清コントロール。

すなわち、比較的多様な miRNA か

らなる4名(表中A群:A1-A4)と、ほぼ同様のmiRNAプロファイリングを示す3名(表中B群:B1-B3)の2群である。これら2群はmiRNA発現量の目安としたmiR-1290の蛍光強度に差異が大きいことと一致して、A群ではmiRNA種が比較的少なく(64-202種)、B群ではmiRNA種が多い(340-355種)という違いが認められ、さらに、この2群では残存歯数に大きな差が認められ、A群での残存歯は8本以下で、いわゆる無歯顎者(残存歯0本)が2名含まれていた(表)。また、B群は20本以上の残存歯であった。

4-2a miR-1290の機能解析

ヒトの三大唾液腺の一つである顎下腺から樹立された、顎下腺細胞株2種(NS-SV-AC細胞・NS-SV-DC細胞)、およびマウス歯肉より樹立された細胞株(GE1)を用い、miR-1290模倣核酸(miR-1290mimics)を細胞内に導入した。MiR-1290の標的予測より、独自に選出した標的候補の一つ、MIG6(Mitogen-inducible gene-6)は、NS-SV-AC、NS-SV-DCいずれの細胞でも発現が低下し、miR-1290によってMIG6-3'UTRが標的とされることが示唆された。一方で、GE1も含めた3細胞株で、細胞増殖能の変化を検討した結果、NS-SV-AC細胞でのみ、miR-1290による細胞増殖能の亢進が認められた。

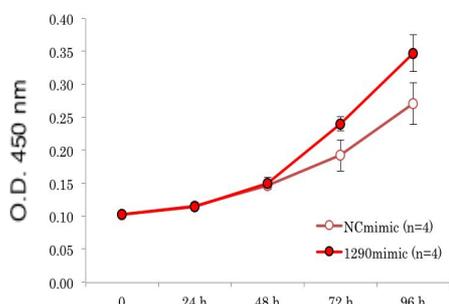


図2 miR-1290による細胞増殖亢進機能(NS-SV-AC)

miR-1290mimics 導入時より、Cell-Counting Kit8 (Dojindo) 試薬を用いて測定した。

4-2b ヒト唾液腺細胞株 NS-SV-AC、

NS-SV-DCの違い

NS-SV-AC細胞、NS-SV-DC細胞のmiRNAプロファイリングを検証した結果、NS-SV-AC細胞はmiR-200ファミリー(miRs-200a、-200b、-200c、-429、-141)を発現しないためEMT(Epithelial-to-Mesenchymal Transition; 上皮-間葉転換)様細胞株であった。一方で、NS-SV-DC細胞はmiR-200ファミリーの一部(miR-200a、-200b、-429)を発現しない、部分的EMT様細胞であった。

これまで独自に行ってきたマイクロアレイ解析を統合することにより、唾液miRNAは高齢者(70歳以上)において、若年者(20-40歳代)に比して量、種類ともに多いことが示唆され、現在定量化を検討している。さらに、高齢者間での大きな差異が生じる原因の一つに、残存歯の違いが認められた。すなわち、高齢者のなかでも、20本以上の歯を維持している場合は、miRNAの量・種類ともに豊富であった。MiR-1290は唾液に豊富に存在しており、これらの口腔内での機能を検討した。用いた顎下腺(唾液腺)細胞株2種では、腺房様のNS-SV-AC細胞と導管様のNS-SV-DC細胞とで、いずれもMIG6の発現低下に機能している可能性が示された。MIG6はEGFRを介した細胞内情報伝達を負に制御することが知られ、MIG6のmiR-1290による発現抑制は細胞株の増殖へ影響すると考えられたが、NS-SV-AC細胞でのみ、細胞増殖能の亢進が認められた。

近年、老化細胞で炎症性サイトカインなどの分泌が亢進する現象を(SASP; 老化関連分泌現象 Senescence-Associated Secretory Phenotype)といい、免疫細胞の遊走促進など老化に伴った組織変化に関与している。この場合、炎症性サイトカイン(IL6)やケモカイン(IL8)、細胞外マトリクス分解酵素(MMP2)は

SASP 因子である。唾液中で miRNA は安定して存在し、miRNA 持続的供給による口腔内細胞への傍分泌作用あるいは循環を介した内分泌作用が予想される。miR-1290 は比較的口腔内の状況が健康に維持されている高齢者に多い miRNA であり、一部の細胞株にのみ影響を示した。我々は、高齢者の唾液中に多量に含まれる miRNA も SASP 因子として機能すると考え、高齢者の唾液中に多量に含まれる miR-1290 を SASP 因子のひとつとして捉え、NS-SV-AC 細胞で認められた細胞自体の特徴と、その他関わる因子について引き続き検討し、今後、加齢にともなう組織の変化への応用へと展開する。

5 . 主な発表論文等 (計 4 件)
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

1. T Iwata, K Kuribayashi, M Nakasono, N Saito-Tarashima, N Minakawa, N Mizusawa, R Kido, K Yoshimoto: The AMPK/mTOR pathway is involved in D-dopachrome tautomerase gene transcription in adipocytes differentiated from SGBS cells, a human preadipocyte cell line. **Cytokine** 96:195-202, 2017査読有

2. R Otsuka, N Harada, S Aoki, K Shirai, K Nishitsuji, A Nozaki, A Hatakeyama, M Shono, N Mizusawa, K Yoshimoto, Y Nakaya, H Kitahata, H Sakaue: C-terminal region of GADD34 regulates eIF2a dephosphorylation and cell proliferation in CHO-K1 cells. **Cell Stress Chaperones** 21:29-40, 2016査読有

3. T Iwata, T Tamanaha, R Koezuka, M Tochiya, H Makino, I Kishimoto, N Mizusawa, S Ono, N Inoshita, S

Yamada, A Shimatsu, K Yoshimoto: Germline deletion and a somatic mutation of the PRKAR1A gene in a Carney complex-related pituitary adenoma. **Eur J Endocrinol** 172:K5-10, 2015査読有

4. Y Iwawaki, N Mizusawa, T Iwata, N Higaki, T Goto, M Watanabe, Y Tomotake, T Ichikawa, K Yoshimoto: MiR-494-3p induced by compressive force inhibits cell proliferation in MC3T3-E1 cells. **J Biosci Bioeng** 120:456-462, 2015 査読有

[学会発表](計 2 件)

1. ヒト顎下腺細胞株NS-SV-ACにおけるmiR-1290の機能解析 第59回 歯科基礎医学会学術大会 (長野県・塩尻市) 2017年 9月20日

2. MiR-222 Regulates Proliferation via the Down-regulation of RNA-binding Protein in a Human Salivary Gland Cell Line, NS-SV-AC 第38回日本分子生物学会年会 (兵庫県・神戸市) 2015年 12月3日

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

水澤 典子 (MIZUSAWA, NORIKO)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号 : 80254746

(2) 研究分担者

岩田 武男 (IWATA, TAKEO)
新潟薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号 : 10350399

(3) 研究分担者

吉本 勝彦 (YOSHIMOTO, KATSUHIKO)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号 : 90201863