

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 10 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592800

研究課題名(和文) 新たな細胞間情報伝達分子としての唾液miRNAの基盤的研究

研究課題名(英文) Salivary miRNA as new cell-to-cell communication molecules

研究代表者

水澤 典子 (MIZUSAWA, Noriko)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：80254746

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)：マイクロRNA(miRNA)は、短い二本鎖RNAで、唾液や血清など、あらゆる体液中にも安定して存在することが近年明らかにされてきた。我々はマイクロアレイ解析により、唾液に含まれるmiRNAの分子種を明らかにした。また、検出が容易で疾患の早期発見につながるバイオマーカーとして、あるいはmiRNAは体液を介して他の細胞内で機能する細胞間情報伝達分子としてとらえ、miRNAの臨床につながる可能性を検討した。本研究においては対象とするmiRNA分子種の選択を行い、唾液に多いmiR-1290と、細胞の種類や状態によって変動する可能性があるmiR-222の機能の一部を明らかにし、今後の基盤とした。

研究成果の概要(英文)：microRNAs (miRNAs), function as important regulators of a wide range of cellular processes by modulating gene expression. The functions and relate pathway of miRNAs have been extensively studied, but additional roles in various cellular processes remain to be understood. We investigated the biological importance of individual miRNA to target-mRNA interactions by comparing miRNA-mRNA expression profiles in two normal human salivary gland cell lines named NS-SV-AC (AC) and NS-SV-DC (DC). Our results supports a miRNA can regulate several transcripts and the target-mRNAs are often context specific.

研究分野：分子生物学

キーワード：microRNA

## 1. 研究開始当初の背景

マイクロRNA (以下 miRNA) は、約 22 mer の蛋白をコードしない RNA で、標的となる mRNA の 3' 非翻訳領域 (UTR) に結合し、遺伝子発現を抑制する。現在ヒトで 2,000 種を超える存在が確認され、細胞内における新たな遺伝子発現調節因子として、急速に研究が進められている。

miRNA は、血液・乳汁・尿など、あらゆる体液に存在し、癌の早期診断などのバイオマーカーとして期待されている。しかし、体液 miRNA の由来組織や発現・分泌調節および機能は不明な点が多い。我々は唾液 miRNA のプロファイリングを行う一方で、表現型の異なる 2 種の唾液腺細胞株で miRNA-mRNA プロファイリングを比較し、より有用な miRNA 分子を探索した。

## 2. 研究の目的

miRNA をバイオマーカーあるいは、細胞内情報伝達物質として考え、具体的な miRNA 分子の選択を行い、唾液および唾液腺細胞株からアプローチ方法を見つける。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト唾液 miRNA マイクロアレイ解析

ボランティアの成人 11 名より、口腔内を水道水でうがいした後の自然分泌唾液を採取した。唾液は、室温 6,000 rpm、20 分間の遠心で食物残渣等を除去し、0.4 ml について mirVana PARRIS キット (Ambion) を用いて totalRNA を抽出した。100 ng 相当の totalRNA を用い、マイクロアレイ解析 (Agilent) を行った。

### (2) ヒト顎下腺細胞株に発現する miRNA および mRNA のマイクロアレイ解析

NS-SV-AC (腺房様細胞、以下 AC)

NS-SV-DC (導管様細胞、以下 DC)

これらは徳島大学口腔内科、東雅之博士により、同一人物の手術時に得られた顎下腺から樹立され、コロニー形成能やヌードマウス移植実験で、いずれも正常顎下腺上皮細胞株であることが確認されている。

AC および DC より mirVana PARRIS キットを用いて発現する miRNA および mRNA のマイクロアレイ解析を行った。また、各 miRNA および mRNA レベルの検証には、qRT-PCR 法を用いた。

### (3) 注目した miRNA の標的部位の決定

miRNA の機能として標的となる mRNA の

3'UTR への結合について、mirGLO ベクターシステム (promega) による Dual Luciferase 解析を行った。標的遺伝子および miRNA 認識部位の予測には、主に 2 種類のデータベース「miRDB」および「TargetScan」を用いた。

## 4. 研究成果

(1) 唾液中に高頻度かつ高レベルに認められた miR-1290: ヒト唾液 miRNA のプロファイリングでは、成人 11 名のうち 8 名の唾液において、miR-1290 が上位 10 位以内かつ高レベルに認められ、現時点で最も主たる唾液 miRNA の一つであると考え、miR-1290 を詳細な機能解析の対象として選択した。

ヒト唾液腺細胞株 AC、DC、およびマウス歯肉上皮細胞株である GE1 に miR-1290 mimics を導入した結果、AC でのみ miR-1290 導入による細胞増殖の亢進が認められた。miR-1290 の直接標的として遺伝子 X を確認した。しかし、miR-1290 導入での細胞増殖の亢進は AC のみで認められた一方、遺伝子 X の発現抑制は AC、DC いずれにおいても認められた。これにより、miR-1290 が遺伝子 X を発現抑制したことによる AC の細胞増殖の亢進には、他の遺伝子の関与が考えられた。

AC・DC の差異と miR-1290 の効果の差異を精査することで、唾液成分の新たな役割が得られる可能性を見出した。

(2) AC・DC 細胞間で最大の差異だった miR-222: AC、DC の 2 つの細胞株の miRNA マイクロアレイ解析から最も差異の大きい miRNA の一つとして miR-222 に注目した。miR-222 の標的 mRNA の検索には mRNA マイクロアレイの結果で差異の大きい候補について検討し、遺伝子 Y がこれまで報告されていない miR-222 の標的であることを明らかにした。さらに、miR-222 は炎症性サイトカイン TNF $\alpha$  で発現が誘導され、また、AC の TNF $\alpha$  処理で miR-222 発現の上昇に従って遺伝子 Y の発現が抑制されることも確認した。miR-222 は通常の唾液では低レベルで、全身の炎症状態あるいは特定の疾患に関連して変動する場合、バイオマーカーとして有用である可能性が考えられた。しかし、これまでに miR-222 と miR-1290 との関連は見いだされていない。

本研究では、唾液中に miRNA が安定して存在することを確認したことに加え、量的・頻度的に高レベルな miR-1290 に注目し、新たな唾液の機能成分である可能性を見いだした。また、通常は唾液中に低レベルの miR-222 が上昇することによって、なんらか(炎症など)の全身性あるいは口腔内の変動を知らせるバイオマーカーとなる可能性を示した。

#### 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 5 件)

1. 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**. (1). K1-K15. 2015. 査読あり
2. T Iwata, S Yamada, J Ito, N Inoshita, N Mizusawa, S Ono, K Yoshimoto. A novel c-terminal nonsense mutation, Q315X, of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in a Japanese familial isolated pituitary adenoma family. **Endocr Pathol**. 25.273-281. 2014. 査読あり
3. 吉本勝彦, 岩田武男, 水澤典子, 小野信二. 副甲状腺-顎腫瘍症候群・Hyper-prathyroidism-Jaw Tumor Syndrome **四国歯学雑誌**. 27. 35-39. 2014. 査読なし
4. K Yoshimoto, T Iwata, N Mizusawa, ZR Qian, SWN Shima, S Ono, K Ishimoto. Pituitary adenomas: role of cyclin-dependent kinase inhibitors. p133-139. Tumors of the Central Nervous System. volume 10 **Pineal, Pituitary, and Spinal Tumors**. 2013. 査読なし
5. 吉本勝彦, 水澤典子, 岩田武男, 小野信二. 家族性副甲状腺機能亢進症. **内分泌・糖尿病・代謝内科**. 37. 380-386. 2013. 査読なし

[学会発表](計 7 件)

1. 小野信二、岩田武男、水澤典子、岩脇有軌、吉本勝彦 ACTH産生腫瘍で低発現を認めたmiR-551bの腺腫発症への関与 第56回歯科基礎医学会学術大会総会 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市) 2014年9月25日-27日

2. 小野信二、岩田武男、水澤典子、吉本勝彦 成長ホルモン産生腫瘍におけるPRKACA遺伝子活性化変異の検討 第14回日本内分泌学会四国地方会 大塚講堂 (徳島県・徳島市) 2014年9月6日
3. 水澤典子、岩田武男、吉本勝彦 ヒト顎下腺細胞株を用いたmiRNA標的遺伝子の解析 第6回日本RNAi研究会・第1回細胞外小胞学会 広島プリンスホテル (広島県・広島市) 2014年8月28日-30日
4. 小野信二、岩田武男、水澤典子、吉本勝彦 下垂体腺腫におけるmiRNA発現解析 第55回歯科基礎医学会学術大会総会 岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市) 2013年9月20日-22日
5. 岩田武男、石本恭子、水澤典子、吉本勝彦 D-sopachrome tautomeraseのインスリン的構成改善機序に関連する分子の探索 第55回歯科基礎医学会学術大会総会 岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市) 2013年9月20日-22日
6. 岩田武男、谷口寿章、桑島正道、水澤典子、吉本勝彦 D-dopachrome tautomeraseの脂肪細胞への作用 第17回内分泌病理学会学術大会 関内新井ホール (神奈川県・横浜市) 2013年10月4日-5日
7. Noriko Mizusawa, Takeo Iwata, and Katsuhiko Yoshimoto. Profile of microRNA in human saliva. Asean plus Tokushima joint International Conference. Ambarukmo Royal Hotel (インドネシア・ジョグジャカルタ) 2012年12月7-8日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

水澤 典子 (MIZUSAWA, NORIKO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教  
研究者番号：80254746

(2)研究分担者

岩田 武男 (IWATA, TAKEO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教  
研究者番号：10350399

(3) 研究分担者

吉本 勝彦 (YOSHIMOTO, KATSUHIKO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・教授  
研究者番号：90201863