

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463229

研究課題名(和文) microRNAが関与する歯周病の発症と進行メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanistic analysis of onset and progress of periodontitis causing microRNA

研究代表者

小方 頼昌 (OGATA, Yorimasa)

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：90204065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：miRNAマイクロアレイの結果、炎症歯肉でmiR-223の発現が増加したため、miR-223発現プラスミドをヒト歯肉線維芽細胞(HGF)に導入後、IL-1 とTNF で刺激し、IKK の発現を検索した。TNF mRNA量は、IL-1、TNF 刺激で約20倍増加し、miR-223発現下で両方で刺激すると、さらに増加した。IL-1 mRNA量は、IL-1、TNF 刺激で約400または90倍増加し、miR-223発現下でIL-1 刺激で約2倍増加し、TNF 刺激で減少した。miR-223発現で、IKK 発現は減少したため、miR-223はIKK を阻害し、NF B活性を促進すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs (miRNAs) can bind to target mRNAs through partial complementarity and regulate many genes. To determine the effects of miR-223 on the expressions of IL-1 and IL-6, HGF were stimulated by IL-1 (1 ng/mL) or TNF (10 ng/mL) and transfected with a miR-223 expression plasmid. Levels of mRNA for IL-1, IL-6, inhibitor of kappa-B kinase (IKK) and mitogen-activated protein kinase phosphatase-5 (MKP-5) were measured by real-time PCR, and levels IL-1, IL-6 and IKK protein were determined by enzyme-linked immunosorbent assay and Western blotting. Expression of IL-1 and IL-6 mRNAs was induced by IL-1 and TNF and further increased by miR-223 overexpression. IL-1 and TNF induced the expression of IL-1 and IL-6 mRNAs, and this was reduced by miR-223 inhibitor. Overexpression of miR-223 decreased the levels of IKK protein and MKP-5 mRNA in HGF. These findings indicate that miR-223 might control the inflammatory response via IKK and MKP-5 in periodontal tissue.

研究分野：歯周病学

キーワード：microRNA サイトカイン 遺伝子発現 タンパク質発現 歯肉線維芽細胞 炎症 歯周炎

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周病のリスク因子である、細菌、宿主、環境因子は、複雑に絡みあい歯周炎の発症と進行に關与する。MicroRNA(miRNA)は、長さ約 22 塩基の 1 本鎖 RNA で、標的遺伝子の発現を抑制するノンコーディング RNA であり、発生、形態形成、細胞増殖、ガン、炎症等の疾患に關与する。

(2) Toll-like receptor 4 (TLR4)遺伝子の 3'側非翻訳領域(3'-UTR)の一塩基多型が、miRNA の結合を介して TLR4 の発現量と歯周炎の発症に關連することを以前に報告した(J Biol Chem 284; 25163-25172, 2012)。本研究では、炎症時に増加または減少する miRNA の同定とそのメカニズムを解明するために、炎症歯肉と健康歯肉で発現する遺伝子と miRNA を解析し、*in situ* ハイブリダイゼーションと免疫組織化学を併用して、炎症の発症に關与する遺伝子と miRNA を同定する。

2. 研究の目的

(1) 歯周炎の発症と進行に關与する miRNA の同定とそのメカニズムを解明するために、炎症歯肉と健康歯肉で発現する遺伝子の違いをマイクロアレイで検索し、炎症歯肉を使用した *in situ* ハイブリダイゼーションと免疫組織化学の結果から、歯周炎発症と進行に重要な遺伝子と miRNA を同定することを目的とする。

(2) miR-223 は、ガン、炎症や自己免疫性疾患等に關与し、miR-150 の過剰発現は、リウマチ、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデス等の自己免疫性疾患に關与する。また、2 型糖尿病マウスの血管平滑筋細胞で、miR-200b の発現が増加することから、miR-200b が炎症に關与すると考えられる。以上のことから、上記 3 種類の miRNA は、歯周病への關与が示唆される。

(3) 炎症歯肉と非炎症歯肉を使用した再度の miRNA マイクロアレイ解析と、同じ全 RNA を使用した DNA マイクロアレイを行い、炎症歯肉組織における miRNA と miRNA に關連した遺伝子を同時に解析する。また、リアルタイム PCR でこれらの遺伝子発現を定量的に解析する。歯周外科手術時に切除除去した炎症性歯肉中の miRNA の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション(ISH)で、miRNA の作用で発現が変化する関連タンパク質発現を免疫組織化学で検索することで、miRNA および miRNA の作用で発現が変化する遺伝子またはタンパク質の歯肉組織中での局在および発現する細胞等が明らかになると思われる。

3. 研究の方法

(1) 中等度～重度慢性歯周炎患者のフラップ手術時に切除除去する炎症性歯肉(歯肉上皮および歯肉結合組織を含む)と、デンタルイ

ンプラント 1 次または 2 次手術時に切除除去する炎症のほとんど無い歯肉(非炎症性歯肉)から低分子 RNA を含む全 RNA を抽出する。炎症性歯肉と正常に近い非炎症性歯肉での miRNA 発現量の違いを Agilent Human miRNA マイクロアレイにて比較検討する。次に、miRNA マイクロアレイと同じ全 RNA を使用して、炎症性歯肉と非炎症性歯肉での遺伝子発現の違いを Agilent Human Gene Expression DNA マイクロアレイで解析する。miRNA マイクロアレイおよび DNA マイクロアレイの結果は、GeneSpring GX ソフトウェアを用いてデータ解析を行う。miRNA マイクロアレイと DNA マイクロアレイの分析結果を基盤に、遺伝子ネットワーク、情報伝達系の關連性について IPA を用いて歯周炎と關連する遺伝子ネットワーク、情報伝達系を解析し、さらに、両マイクロアレイの結果を IPA を用いて關連遺伝子発現、情報伝達系の検索を実施する。

(2) miRNA マイクロアレイの結果から、歯周炎で発現増加または減少した miRNA に関して、miRNA リアルタイム PCR を用いて、miRNA の発現変化を定量的に検索する。同様に DNA マイクロアレイの分析結果から、歯周炎で発現上昇または低下した遺伝子に関して、リアルタイム PCR を用いて、遺伝子発現変化を定量的に検索する。miRNA マイクロアレイとリアルタイム PCR の結果が一致したことを確認後、炎症性歯肉で有意に増加または減少した miRNA の Precursor 配列を設計し、GeneCopoeia 社の miExpress Precursor miRNA Expression plasmid (pEZX-MR04) にライゲーションにより挿入する。

(3) 培養歯肉線維芽細胞(HGF)または歯肉上皮細胞に、miRNA の Precursor 配列を挿入しないコントロールプラスミドと、上記の miRNA マイクロアレイとリアルタイム PCR の結果から同定した miRNA の Precursor 配列を挿入した miRNA 発現プラスミドを遺伝子導入試薬を使用して細胞に導入し、さらに炎症性サイトカイン(IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 等)で刺激することで、炎症歯肉組織内の環境を再現する。

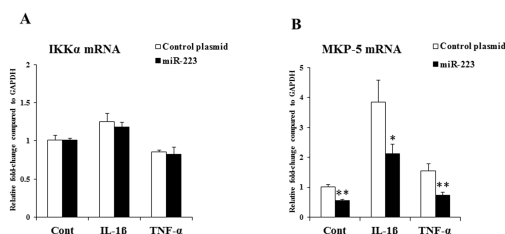
(4) miR-223 発現プラスミドを HGF に導入し、IL-1 β (1 ng/ml)または TNF- α (10 ng/ml)で 24 時間刺激後、全 RNA およびタンパク質を抽出した。炎症性サイトカインである IL-1 β および IL-6、miR-223 の標的遺伝子である I κ B kinase α (IKK α) および mitogen-activated protein kinase phosphatase 5 (MKP-5)の遺伝子発現レベルをリアルタイム PCR で、タンパク質発現レベルを ELISA または Western blot 法で検索した。

4. 研究成果

(1) 歯周外科手術時に切除除去した炎症性歯

肉とインプラント手術時に切除した非炎症性歯肉から全 RNA を抽出し、両歯肉組織での miRNA の発現量の違いを miRNA マイクロアレイで解析した。炎症性歯肉で最も発現が増加した 3 つの miRNA は、miR-150、miR-223 および miR-200b であった。一方、最も発現が減少した 3 つの miRNA は、miR-379、miR-199a-5p および miR-214 であった。

(2) HGF を IL-1 β または TNF- α で刺激すると、IL-1 β と IL-6 の mRNA 量は増加し、miR-223 を過剰発現させると、IL-1 β と IL-6 の mRNA 量はさらに増加した。HGF での IL-1 β と IL-6 の mRNA 量は、IL-1 β または TNF- α 刺激で増加し、miR-223 インヒビターを導入すると、IL-1 β および IL-6 の mRNA 量は減少した。HGF を IL-1 β 刺激し miR-223 を過剰発現させると、IL-1 β および IL-6 タンパク質の顕著な増加が認められた。miR-223 の標的遺伝子である MKP-5 の mRNA 量は、miR-223 を過剰発現させると減少したが、IKK α の mRNA 量は、miR-223 を過剰発現しても変化しなかった。しかし、Western blot の結果から、miR-223 を過剰発現させると IKK α のタンパク量は減少した。



(3) 以上の結果から、miR-223 は IKK α の発現を、mRNA の分解ではなく、翻訳阻害のプロセスで発現を抑制すると考えられた。IL-1 β と TNF- α 刺激で増加した IL-1 β および IL-6 の発現が、miR-223 の作用でさらに増加したのは、miR-223 が NF- κ B の活性を抑制する IKK α と MAPK の p38 の活性を抑制する MKP-5 を阻害したためと考えられた。

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 11 件)

(1) Matsui S, Ogata Y. Effects of miR-223 on expression of IL-1 β and IL-6 in human gingival fibroblasts. 査読有 J Oral Sci 58, 2016, pp.101-108. Doi.org/10.2334/josnusd.58.101.

(2) Imamura K, Takayama S, Saito A, Inoue E, Nakayama Y, Ogata Y (他 7 名, 5 番目, 6 番目) Evaluation of a novel immunochromatographic device for rapid and accurate clinical detection of Porphyromonas gingivalis in subgingival plaque.

J Microbiol Methods. 査読有 117, 2015, pp.4-10. Doi: 10.1016/j.mimet.

(3) Shimabukuro Y, Nakayama Y, Ogata Y (他 7 名, 2 番目, 3 番目) Effects of an ascorbic Acid-derivative dentifrice in patients with gingivitis: a double-masked, randomized, controlled clinical trial. 査読有 J Periodontol 86, 2015, pp.27-35. Doi: 10.1902/jop.

(4) Oh H, Hirano J, Takai H, Ogata Y. Effects of initial periodontal therapy on interleukin-1 β level in gingival crevicular fluid and clinical periodontal parameters. 査読有 J Oral Sci 57, 2015, pp.67-71. Doi.org/10.2334/josnusd.57.67.

(5) Choe J, Sasaki Y, Zhou L, Takai H, Nakayama Y, Ogata Y. Insulin-like growth factor-II regulates bone sialoprotein gene transcription. 査読有 Odontology <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10266-015-0205-6>

(6) Kato A, Imai K, Ochiai K, Ogata Y. Prevalence and quantitative analysis of Epstein-Barr virus DNA and Porphyromonas gingivalis associated with Japanese chronic periodontitis patients. 査読有 Clin Oral Investig. 19, 2015, pp.1605-1610. Doi: 10.1007/s00784-014-1387-y.

(7) Matsumura H, Nakayama Y, Takai H, Ogata Y. Effects of interleukin-11 on the expression of human bone sialoprotein gene. 査読有 J Bone Miner Metab 33, 2015, pp.142-153. Doi: 10.1007/s00774-014-0576-8.

(8) Nakayama Y, Takai H, Matsui S, Matsumura H, Zhou L, Kato A, Ganss B, Ogata Y. Proinflammatory cytokines induce amelotin transcription in human gingival fibroblasts. J Oral Sci 査読有 56, 2014, pp.261-268. Doi.org/10.2334/josnusd.56.261.

(9) Ogata Y, Matsui S, Kato A, Zhou L, Nakayama Y, Takai H. MicroRNA expression in inflamed and noninflamed gingival tissues from Japanese patients. J Oral Sci 査読有 56, 2014, pp.253-260. Doi.org/10.2334/josnusd.56.253.

(10) Matsumura H, Ogata Y. Melatonin regulates human bone sialoprotein gene transcription. 査読有 J Oral Sci 56, 2014, pp.67-76. Doi.org/10.2334/josnusd.56.67.

(11) Takai H, Matsumura H, Matsui S, Kim KM, Mezawa M, Nakayama Y, Ogata Y. Unliganded estrogen receptor α stimulates bone sialoprotein

gene expression. 査読有 Gene. 2014 539, 2014, pp.50-57. Doi: 10.1016/j.gene.2014.01.063.

〔学会発表〕(計5件)

(1) 松井沙莉、ヒト歯肉線維芽細胞での炎症性サイトカイン発現に対する microRNA の影響 日本歯科保存学会 2015 年度秋季学術大会 (第 143 回) 2015 年 11 月 12-13 日 文京シビックホール (東京都・文京区)

(2) Sari Matsui, MicroRNA-223 regulates inflammatory cytokines in human gingival fibroblasts. JADR 2015 年 10 月 30-31 日 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

(3) Matsui S, Effects of miRNAs on the expression of inflammatory cytokines in human gingival fibroblasts. EuroPerio 8, 2015 年 6 月 3-6 日 (London, England)

(4) 松井沙莉、慢性歯周炎歯肉で発現が増加した miR-223 による炎症性サイトカイン発現の調節 第 58 回春季日本歯周病学会学術大会 2015 年 5 月 15 日 幕張メッセ (千葉県・千葉市)

(5) 松井沙莉、ヒト歯肉線維芽細胞での炎症性サイトカイン発現に対する miRNA の影響 第 57 回春季日本歯周病学会学術大会 2014 年 5 月 23 日 長良川国際会議場 (岐阜県・岐阜市)

〔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：
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

小方 頼昌 (OGATA, Yorimasa)
日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：90204065

(2) 研究分担者

中山 洋平 (NAKAYAMA, Yohei)
日本大学・松戸歯学部・専任講師
研究者番号：30434088

高井 英樹 (TAKAI, Hideki)
日本大学・松戸歯学部・専任講師
研究者番号：30453898

(3) 研究協力者

松村 浩禎 (MATSUMURA, Hiroyoshi)

松井 紗莉 (MATSUI, Sari)

加藤 彩子 (KATO, Ayako)