

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06449

研究課題名(和文)インプラント周囲炎に関連するmicroRNAの同定

研究課題名(英文)Identification of microRNA related to periimplantitis

研究代表者

岩脇 有軌 (IWAWAKI, Yuki)

徳島大学・病院・医員

研究者番号：10754624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、MC3T3-E1細胞へのTNF- α 刺激または圧縮応力負荷で変動するmiRNAの同定、機能分析を行った。MC3T3-E1細胞へのTNF- α 刺激または圧縮応力負荷ではmiR-146a-5pの発現が上昇し、その過剰発現で細胞増殖の初期に影響を与えた。また、in silico解析で標的遺伝子がTRAF6、IRAK1と予測されたが、発現変動は認めず、細胞増殖の関与も認められなかった。

以上より、MC3T3-E1細胞でのTNF- α 刺激または圧縮応力負荷はmiR-146a-5pの発現を上昇させ、細胞増殖に影響を与えた。miR-146a-5pの標的遺伝子同定と更なる機能解析が今後の課題となる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we attempted to identify miRNAs in response to TNF- α stimulation or compressive force and to analyze those functions in MC3T3-E1 cells.

Microarray analysis followed by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction revealed that TNF- α stimulation or compressive force at 294 Pa for 24 h in MC3T3-E1 cells increased levels of miR-146a-5p. Overexpression of miR-146a-5p in MC3T3-E1 showed effects on early stage of cell proliferation. Furthermore, in silico analysis predicted TRAF6 and IRAK1 as target genes of miR-146a-5p. However, TRAF6 and IRAK1 mRNA levels did not alter in MC3T3-E1 cells overexpressing miR-146a-5p gene and did not affect cell proliferation.

In conclusion, TNF- α stimulation and compressive force affected expressions of miR-146a-5p in MC3T3-E1 cells. In addition, miR-146a-5p affects early stage of cell proliferation. Further studies to investigate the target genes and functions of miR-146a-5p in MC3T3-E1 cells will be required.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：microRNA 炎症性刺激 細胞増殖 MC3T3-E1細胞

1. 研究開始当初の背景

生体は日常活動および生活環境において様々なストレスに曝されており、その影響として、細胞レベルでの機能および形態的な変化が認められる。炎症性刺激もその1つで、細胞から分泌される TNF- α 、IL-1 β などのサイトカインの複雑なネットワークにより媒介される。また、microRNA (miRNA) による遺伝子発現調節がエピジェネティクス機構の一つとして様々な生命現象に関与していることが分かってきている。内因性の small RNA の一つである miRNA は 18~25 塩基程度の non-coding RNA で、核外において RNA-induced silencing complexes (RISC) を形成し、標的 mRNA の 3' 非翻訳領域 (UTR) に結合して翻訳抑制や切断を行う。これにより、造血、免疫応答及び炎症を含む生物学的プロセスの広い範囲を調節する因子として注目を浴びている。

一方、近年インプラントに治療におけるインプラント周囲炎が社会的にも問題となっている。インプラント周囲炎により骨組織が破壊されることはインプラントの動揺・脱落へと直接的に繋がり、その原因として細菌感染や過剰な力学的負荷による炎症性反応が挙げられる。歯科補綴学領域では、インプラント周囲炎における分子生物学的経路の解明が求められており、これまでに、*in vitro* 試験として骨芽細胞に対する TNF- α 刺激や過度な力学的負荷が細胞増殖を抑制することが報告されてきた。しかしながら、その分子調節機構は未だ不明な点が多く、機序の解明が求められている。このインプラント周囲炎の発症機序において、特定の miRNA の調節破綻が関与している可能性は高いと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、インプラント周囲炎の原因

を想定した様々なストレス応答が骨機能調節に及ぼす影響を検討するために、骨組織において骨添加の役割を担う骨芽細胞へ炎症性刺激、圧縮応力負荷、低酸素状態での培養などのストレス刺激を付与し、変動する miRNA のプロファイリングや変動する miRNA の細胞増殖への影響、およびその標的遺伝子について検討することとした。

本研究より、骨芽細胞において、インプラント周囲炎によって生じる炎症反応で変動する miRNA が同定されれば、インプラント周囲炎予防・治療薬への応用、およびバイオマーカーとしての可能性を探ることができると考えられる。

3. 研究の方法

【細胞培養】

マウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1細胞) を 10% FBS (Vita) 添加 MEM α 培地 (和光純薬) にて、6-well dish でコンフルエントになるまで培養した。次に、TNF- α (和光純薬) を添加、または重りを入れたガラスシリンダーを細胞上へ静置し、24 時間炎症性刺激、または持続的圧縮応力負荷を行った。また、低酸素状態で 24 時間培養することで低酸素によるストレス刺激を負荷した。過去の文献および実験を参考に TNF- α 濃度は 10 ng/ml、圧縮応力強度は 294 Pa、低酸素状態における酸素濃度は 1% に設定した。

【miRNA マイクロアレイ解析】

培養した細胞より、ISOGEN II (ニッポンジーン) を用いて、total RNA を抽出した。抽出した total RNA を 100 ng 用い、Cyanine3-pCp で標識し、Agilent Technologies oligonucleotide microarray (Agilent Technologies) へのハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションを行った microarray を Agilent Microarray Scanner (Agilent Technologies) でシグナルを読み取り、Software Feature Extraction (Agilent

Technologies) にて定量した。発現解析は Gene Spring GX (Agilent Technologies) にて行った。

【定量的PCR】

miScript PCR system (QIAGEN) にて miRNA の cDNA 合成および PCR の調整を行った。PCR のフォワードプライマーは各 miRNA に特異的なものを、リバープライマーはキットに付随するユニバーサルプライマーを使用した。また、PrimeScript RT reagent Kit (タカラバイオ)、THUNDERBIRD™ SYBR qPCR Mix (東洋紡) を用い、各々 mRNA の cDNA 合成または PCR の調整を行った。プライマーは各遺伝子特異的なものを作製した。これらを用い、7300 real time PCR system (Applied Biosystems) にて定量的 PCR を行った。miRNA では snoRNA420、mRNA では TATA-binding protein (TBP) の発現量を同時に測定し、内部コントロールとして用いた。これにより、各遺伝子発現の補正を行った。

【細胞への miRNA または siRNA のトランスフェクション】

MC3T3-E1 細胞を 5.0×10^3 個/well ずつ 24-well dish へ播種し、24 時間後に 50 nM または 100 nM の miR-146a-5p mimic (Life Technologies)、negative control oligonucleotide (Life Technologies)、30 nM の TNF receptor associated factor 6 (TRAF6) と Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1) に対する各 small interference RNA (siRNA) (Sigma)、negative control siRNA (Sigma) を HiPerFect (QIAGEN) にてトランスフェクションした。

【細胞増殖能測定の見直し】

MC3T3-E1 細胞へ miRNA mimic または各 siRNA をトランスフェクションした後、0、24、48、72 時間培養した。各々の培養時間での細胞活性を Cell Counting Kit 8 (同仁化

学) を用いて測定した。

【miRNA 標的遺伝子候補の予測】

Target Scan (www.targetscan.org)、miRDB (www.mirdb.org)、の 2 種のデータベースにて検索し、同定した miRNA の標的遺伝子の予測を行った。

【統計処理】

各データは、平均値 ± 標準偏差で表した。student's t-test を用いて統計処理を行い、P 値が 5% 以下 ($p < 0.05$) を有意とした。

4. 研究成果

実験 1 力学的負荷または TNF- α 処理で変動する miRNA の RT-qPCR による検証

MC3T3-E1 細胞へ 294 Pa の持続的圧縮応力、10 ng/ml の TNF- α 刺激を 24 時間負荷したもの、および 1% O₂ の低酸素状態で 24 時間培養したものにおいて変動する miRNA を miRNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。コントロール群と比較して、持続的圧縮応力負荷群では 35 種類、TNF- α 刺激群で 18 種類、低酸素状態で 17 種類の miRNA に 2 倍以上の発現上昇が認められた (図 1)。一方、持続的圧縮応力負荷群では 27 種類、TNF- α 刺激群で 25 種類、低酸素状態で 35 種類の miRNA に 2 倍以上の発現低下が認められた (図 2)。少なくとも 2 種類以上のストレス刺激により発現上昇を認める miRNA のうちヒト-マウス間で高度に保存されている miR-1247-3p、miR146a-5p、miR-210-3p について検討することとした (表 1)。

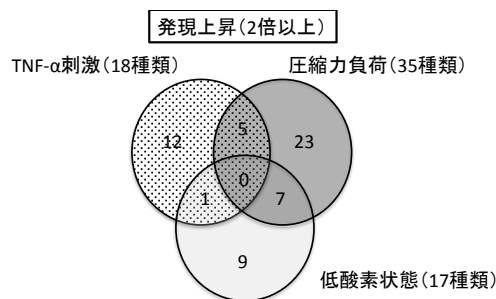


図 1

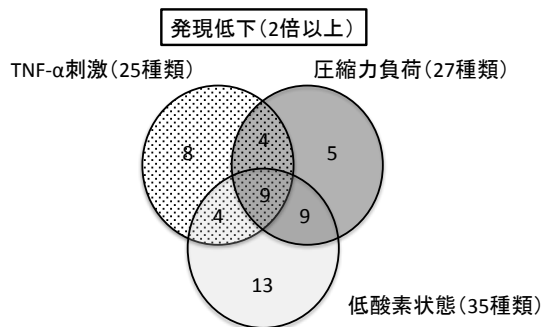


図2

TNF- α 刺激、圧縮力負荷

	Fold Change		ヒト
	TNF- α 刺激	圧縮力負荷	
mmu-miR-1247-3p	52.57	88.17	○
mmu-miR-208a-5p	21.94	67.92	
mmu-miR-146a-5p	298.71	49.57	○
mmu-miR-5118	15.50	17.65	
mmu-miR-466g	13.02	13.49	

TNF- α 刺激、低酸素状態

	Fold Change		ヒト
	TNF- α 刺激	低酸素状態	
mmu-miR-3102-3p,2-3p	20.30	38.47	

低酸素状態、圧縮力負荷

	Fold Change		ヒト
	低酸素状態	圧縮力負荷	
mmu-miR-210-5p	42.91	36.00	
mmu-miR-1196-5p	40.26	24.35	
mmu-miR-3082-5p	4.14	4.30	
mmu-miR-1187	2.58	2.76	
mmu-miR-210-3p	2.63	2.51	○
mmu-miR-466i-5p	2.18	2.46	
mmu-miR-3470a	2.14	2.41	

表1

これらのmiRNAにおいて、定量的PCRにより発現変動の検証を行ったところ、miR146a-5pにおいmiR-210-3p, においてマイクロアレイの結果と一致した発現上昇が確認できた。一方、miR-1247-3pの発現変動は、圧縮応力では上昇したがTNF- α 刺激での上昇は認められなかった(図3)。

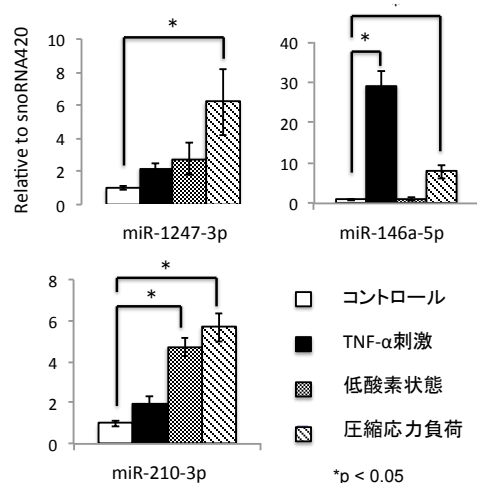


図3

実験2 *in silico*解析による標的mRNAの予測

2種のデータベースを用いた *in silico* 解析において、miR146a-5pの標的遺伝子候補を検索した。Target Scanで予測された標的遺伝子候補数は、miR-1247-3p、miR146a-5p、miR-210-3pで各々7種類、109種類、18種類であった。一方、miRDBで予測された標的遺伝子候補は各々33種類、195種類、38種類であった。

この3種の候補miRNA中、実験1の結果より、圧縮応力負荷およびTNF- α 刺激の2種類の炎症性刺激に対して応答を示し、発現変動量も大きく、実験2の結果より多くの標的遺伝子候補をもつmiR146a-5pに着目し、MC3T3-E1細胞における細胞増殖能への影響および標的遺伝子について検討を行った。

実験3 候補miRNA種の細胞増殖能への影響の検討

圧縮応力負荷またはTNF- α 刺激においてのmiR146a-5p発現上昇がMC3T3-E1細胞の細胞増殖に影響を及ぼすか検討するため、50 nM または 100 nM miR146a-5p mimicをMC3T3-E1細胞へトランスフェクションし、過剰発現させた状態でMTT Assayにて細胞増殖能を確認した。コントロール群としては、negative control oligonucleotideをMC3T3-E1細胞へ同様にトランスフェクションした。培養24時間において、コントロール群と比較して50 nM、100 nM miR146a-5p mimicトランスフェクション群で有意に細胞増殖を抑制した。しかし、培養48時間および72時間までの培養においては両者の細胞増殖に有意な差は認められなかった(図4)。

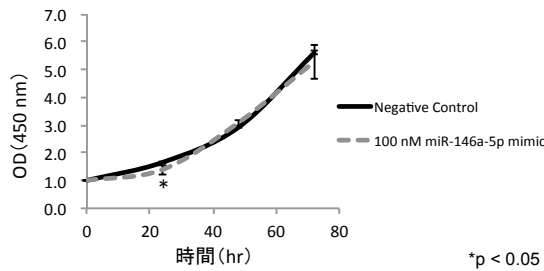
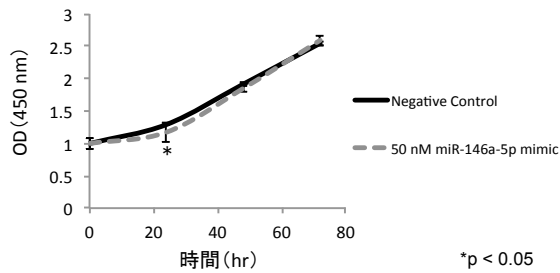


図 4

実験 4 標的 mRNA の発現変動と細胞増殖能への影響の検討

miR-146a-5p の標的候補は実験 2 より Target Scan で 109 種、miRDB で 195 種検索された。その中で、両データベースにおいてスコアが上位であった *TRAF6*、*IRAK1* を標的候補として検討することとした。

圧縮応力負荷または TNF- α 刺激を加えた MC3T3-E1 細胞での *TRAF6*、*IRAK1* の mRNA の発現を定量的 PCR により検討したところ、TNF- α 刺激により *TRAF6* の有意な上昇が認められ、有意差は認められなかったが *IRAK1* は上昇傾向を示した(図 5)。一方、圧縮応力の負荷では両標的とも発現変動を示さなかった。

次に、30 nM miR-146a-5p mimic をトランスフェクションした MC3T3-E1 細胞での *TRAF6*、*IRAK1* の mRNA 発現を確認したところ、negative control oligonucleotide を同様にトランスフェクションしたコントロール群に対して、有意な差は認められなかったが、*TRAF6* でやや発現低下傾向を示した(図 6)。

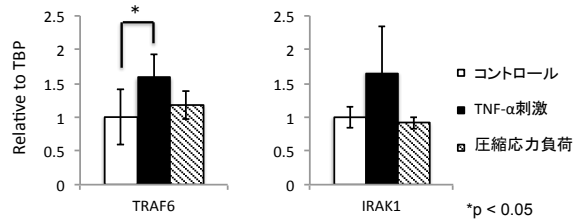


図 5

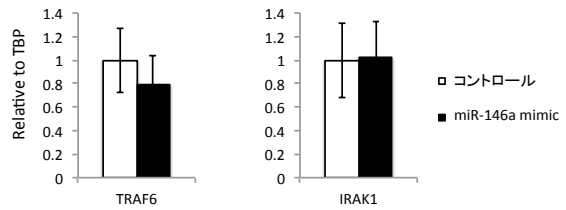


図 6

次に *TRAF6* と *IRAK1* の発現低下が MC3T3-E1 細胞の細胞増殖能に影響を及ぼすか MTT Assay により検討を行った。*TRAF6*、*IRAK1* あるいはその両方に対する siRNA をトランスフェクションした MC3T3-E1 細胞では、negative control siRNA をトランスフェクションしたネガティブコントロール (NC) 群に対して培養 72 時間までにおいて細胞増殖に有意な差は認められなかった(図 7)。

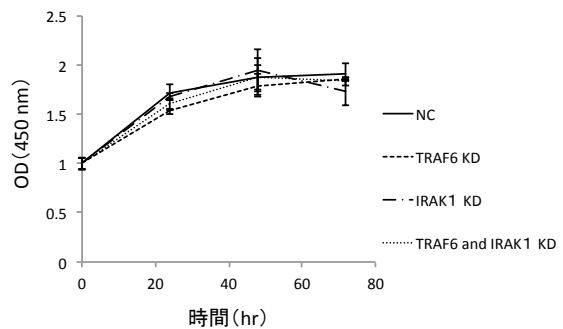


図 7

【総括】

今回の実験結果より、MC3T3-E1細胞へ 10 ng/mlのTNF- α 刺激または294 Paの圧縮応力を24 時間負荷した際に誘導されるmiRNA としてmiR-146a-5pが、1%低酸素状態または294 Paの圧縮応力を24 時間負荷した際に誘導されるmiRNAとしてmiR-210-3pが同定された。この両miRNA

はヒト-マウス間で高度に保存されている。本実験条件においては、miR-146a-5pはMC3T3-E1細胞において培養24時間と比較的早期の細胞増殖を抑制したが、それ以降の細胞増殖には関与せず、*in silico*解析による標的候補である*TRAF6*および*IRAK 1*をmRNAレベルで発現抑制することはなかった。*TRAF6*および*IRAK 1*においてもMC3T3-E1細胞での細胞増殖能に関与することは認められなかった。

本実験では、炎症性刺激や圧縮応力で発現が上昇するmiR-146a-5pの標的遺伝子の同定に至ることはできなかった。しかし、miRNA mimicの濃度や細胞培養条件を変更することで、miR-146a-5pが今回の標的に対して発現抑制に働く可能性もある。タンパクレベルでの発現抑制やルシフェラーゼアッセイによる発現部位の確認ができれば、今後有力な標的となり得る可能性もあり今後の検討課題として考える。

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)

[学会発表] (計 1 件)

① 岩脇有軌, 後藤崇晴, 渡邊 恵, 友竹偉則, 市川哲雄. マウス骨芽細胞におけるストレス誘導性microRNAの解析. (公社)日本補綴歯科学会平成28年度九州支部, 中国・四国支部合同学術大会. 2016.9.4 熊本県歯科医師会館(熊本県・熊本市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩脇 有軌 (IWAWAKI, Yuki)

徳島大学・病院・医員

研究者番号: 10754624