

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17174

研究課題名(和文) オッセオインテグレーションに関するmicroRNAの同定

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

研究代表者

岩脇 有軌 (IWAWAKI, Yuki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教

研究者番号：10754624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、機械研磨、サンドブラスト、酸エッチング処理チタンプレート上でのMC3T3-E1培養で変動するmiRNAの同定、機能分析を行った。

マイクロアレイ解析では470種類のmiRNA発現上昇、2290種類のmiRNA発現低下を認めた。発現変動するmiRNAについてRT-qPCRを行ったが同様の結果を得ることは出来なかった。一方、発現を認めたmiR-671-5pの過剰発現は細胞増殖に影響を与え、Fgfr2を標的に持つ可能性が示された。

以上より、チタンプレート上でのMC3T3-E1培養ではmiRNA発現を変動させる可能性、miR-671-5pが細胞増殖に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

チタン上で骨芽細胞を培養し、細胞増殖能の検討とその中で発現変動するmicroRNAの同定を行った。microRNAは各々特定の遺伝子の制御に関与しており、本研究結果より細胞増殖との関連が考えられる。また、本研究で同定されたmicroRNAは骨とチタンが結合するオッセオインテグレーションに関連すると考えられ、今後歯科におけるインプラント治療の向上に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, identification and functional analysis of differentially expressed microRNA(miRNA) in MC3T3-E1 cell(a mouse osteoblast-like cell line) cultured on mechanically polished, sandblasted or acid etched titanium plates was performed.

470 of up-regulated miRNA expression and 2290 of down-regulated miRNA expression were observed in MC3T3-E1 cell on each treated titanium plate by microarray analysis. However, it was not possible to obtain similar results in the miRNA expressing variation by RT-qPCR. On the other hand, overexpression of miR-671-5p, which was expressed in MC3T3-E1 cell on variously treated titanium plates, affected cell proliferation and may target Fgfr2.

Therefore, it was suggested that MC3T3-E1 cell culture on various treated titanium plates might fluctuate miRNA expression, and that miR-671-5p might affect cell proliferation.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：microRNA MC3T3-E1細胞 細胞増殖 チタン 表面粗さ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オッセインテグレーションとはインプラントの骨内支持構造であり、骨組織とチタンが拒否反応することなく結合する生体内で生じる現象である。チタンインプラントを長期的に維持・安定させるためには、このオッセオインテグレーションの獲得が非常に重要となるがその分子生物学的機序には未だ解明されていない部分が多い。

一方で、インプラント表面をサンドブラスト処理や酸エッチング処理することでオッセオインテグレーションが促進されることが分かっており、実際に実用化されたインプラント表面にも表面処理がされているものを多く認める。*in vitro* の研究では表面加工したチタンプレート上での骨芽細胞を培養では細胞増殖能や分化能に影響を与える報告ある。しかし、用いた細胞の種類や材料表面の微細構造の差異による各条件で相反した結果が得られるなど統一した見解は得られていない。しかしながら、表面の微細構造がオッセオインテグレーションの程度に影響を与える要因の一つであることはコンセンサスが得られている。

miRNA は 18~25 塩基からなるタンパク質をコードしない RNA (non-coding RNA) の一種で、遺伝子の転写後における発現調節に関与し、ヒトにおいては約 2,500 種類が報告されている。miRNA は Ago タンパク質と RISC (RNA 誘導型サイレンシング複合体) を形成し、標的メッセージンジャーRNA (mRNA) の 3'-UTR に相補的に結合し、その mRNA の分解や、翻訳阻害を行う。miRNA による遺伝子発現調節は細胞の増殖、分化、発生など様々な生体反応に関与し、様々な疾患のバイオマーカーや核酸医薬品の開発につながる研究対象として関心を高めている。オッセオインテグレーションには骨表面のタンパク質や骨芽細胞が関与していることより、その分子制御機序には miRNA の遺伝子発現調節が関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

マウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を表面処理されたチタンプレート上で培養する *in vitro* モデルにてオッセオインテグレーションに関わる miRNA を同定し、その作用機序を明らかにすることで、オッセオインテグレーション獲得の分子生物学的機序を解明する。

3. 研究の方法

【試料製作】

直径3.4 mm×厚径1.0 mmのチタンプレートを用意した。機械研磨処理群として耐水ペーパー #280、#600、#1200にて機械研磨処理を行った。サンドブラスト処理群として、HiBlaster Ovaljet (松風) およびアルミナ (トクヤマデンタル) を用い、0.2MPaでサンドブラスト処理を行った。酸エッチング処理群として48%硫酸溶液中で、60℃、1時間の酸エッチング処理を行った。各試料共にアセトン、アルコール処理後、超純水中で超音波洗浄を行いオートクレーブにて滅菌後実験を行った。

【表面性状の分析】

各試験片の表面像の観察をレーザー顕微鏡OPTEICS HYBRID L3 (レーザーテック) にて行った。また、表面粗さの測定をポータブル表面輪郭ゲージSRT-6223 (サトテック) およびレーザー顕微鏡OPTEICS HYBRID L3にて行った。

【細胞培養】

MC3T3-E1 細胞を 10% FBS (Vita) および 1% Penicillin - Streptomycin- Amphotericin B 懸濁溶液 (ナカライ) 添加 MEM α 培地 (和光純薬) にて、6-well dish 中に静置された表面処理されたチタンプレート上で 24 時間培養した。また、コントロール群としてチタンプレートなしの同条件で培養を行った。

【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の品質Checkはナンドロップ (Thermo Fisher) および2100バイオアナライザ (Agilent Technologies) にて行った。次に、抽出したtotal RNAを100 ng用い、Cyanine3-pCpで標識し、SurePrint G3 Mouse miRNAマイクロアレイ (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 14.9.1 (Agilent Technologies) にて行った。

【RT-qPCR】

miScript PCR system (QIAGEN) を用い、Total RNAからのcDNA合成を行った。PCRのForward Primerは各miRNAに特異的なものを、Reverse Primer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)、THUNDERBIRDTMSYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用い、各々mRNAのcDNA合成を行った。Primer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RT-qPCRを行った。内部コントロールとしてmiRNAではsnoRNA420、mRNAでは β -actinを用いた。

【細胞へのmiRNAのトランスフェクション】

MC3T3-E1細胞を 5.0×10^3 個/well播種し、24時間後に 20 nMのmiR-671-5p mimic (Life Technologies)、miR-200b mimic (Life Technologies)、negative control oligonucleotide (Life Technologies) をHiPerFect (QIAGEN) でトランスフェクションした。4時間後にTotal RNAを抽出した。

【細胞増殖能測定の検討】

MC3T3-E1細胞をチタンプレート上で培養したものと、MC3T3-E1細胞へmiRNA mimicをHiPerFectにてトランスフェクションしたものにおいて、24、48、72 時間培養した後、各々の培養時間での細胞活性（細胞増殖能）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】

オープンソースデータベースであるTarget Scan（www.targetscan.org）での検索によってmiRNAの標的遺伝子の予測を行った。

【統計処理】

レーザー顕微鏡による表面粗さの測定におけるデータは箱ひげグラフにて表された。ポータブル表面輪郭ゲージによる表面粗さの測定および RT-qPCR におけるデータは平均値±標準偏差で表された。統計処理は student's t-test、One way-ANOVA、Tukey post hoc test を用い、P 値は 5% 以下 ($p < 0.05$) を有意とした。

4. 研究成果

実験 1.チタンプレートの製作と表面性状の分析

チタンプレートに対して機械研磨処理、サンドブラスト処理、酸エッチング処理を行い、各々の表面性状をレーザー顕微鏡 OPTEICS HYBRID L3、ポータブル表面輪郭ゲージ SRT-6223 にて検討した。レーザー顕微鏡にて各処理されたチタン表面を観察したものを図 1 に示す。図 1 の試料の表面観察より各処理がチタン表面に均一に行われており、機械研磨群と比較してサンドブラスト群、酸エッチング群では表面の凹凸が大きくなっていることが分かる。また、ポータブル表面輪郭ゲージにて測定した表面粗さを図 2 にレーザー顕微鏡にて測定した算術的平均粗さ (Ra および Sa) を図 3 示す。図 2、3 とともに機械研磨群、サンドブラスト群、酸エッチング群の順に表面粗さが有意に増加した。また、接触式の表面輪郭ゲージと比較しレーザー顕微鏡の方が全体的に低い値となった。これより微細な構造まで計測できていることが考えられる。

実験 2.チタンプレート上で培養した骨芽細胞様細胞の細胞増殖能の検討

MC3T3-E1 を各処理されたチタンプレート上で 24、48、72 時間培養し、MTT Assay にて測定した各々の細胞活性値を比較し細胞増殖能の検討を行った。24 時間における細胞活性値にはほとんど変化は認められなかったが、48 時間、72 時間と時間が経過するにつれ表面粗さが大きな酸エッチング処理されたチタンプレート上での細胞活性値が有意に抑制された。

実験 3.チタンプレート上で培養した骨芽細胞様細胞に発現する miRNA の網羅的解析

各処理されたチタンプレート上で MC3T3-E1 を培養し、Total RNA を抽出してナノドロップおよび 2100 バイオアナライザを用い RNA の品質チェックを行った。RNA の品質に問題は認められず (表 1)、miRNA 含む small RNA 部でのピークを認めた (図 5)。この Total RNA を用い、miRNA マイクロアレイにより miRNA を網羅的に解析した。クラスター解析では表面粗さの大きいサンドブラスト群と酸エッチング群において発現変動の類似性を認めた (図 6)。また、コントロール群と比較して、68 種類の miRNA に 1.5 fold 以上の発現上昇が認められ、機械研磨群で 51 種類、サンドブラスト群で 39 種類、酸エッチング群で 40 種類あった (図 7a)。一方で、コントロール群と比較して、140 種類の miRNA に 1.5 fold 以上の発現低下が認められ、機械研磨群では 37 種類、サンドブラスト群で 76 種類、酸エッチング群で 117 種類であった (図 7b)。

実験 4. *in silico* 解析による標的遺伝子の解析と qRT-PCR による発現量の検討

Target Scan を用いた *in silico* 解析にて、cut off 値を 0.05 未満に設定して標的遺伝子の予測解析を行った。予測された標的遺伝子候補数は、発現上昇する miRNA においては機械研磨群で 284 種類、サンドブラスト群で 157 種類、酸エッチング群で 165 種類であり、全体で 470 種類であった。一方、発現低下する miRNA においては機械研磨群で 896 種類、サンドブラスト群で 505 種類、酸エッチング群で 1625 種類であり、全体で 2290 種類であった (図 8)。

また発現変動する miRNA において、機械研磨群よりもサンドブラスト群および酸エッチング群において発現が上昇する miRNA について RT-qPCR により発現変動の検証を行った (図 9)。RT-qPCR では発現量の標準偏差が大きく、データにバラツキが認められマイクロアレイと同様の結果を得ることは出来なかった。今後、RT-qPCR の試薬・システムを変更して再度検証する必要があると考える。

実験 5.miRNA の MT3T3-E1 細胞への影響

miR-671-5p は我々が行った以前の研究より高齢者唾液中に多く含まれることが分かっており、口腔関連細胞への影響を考えている。本実験のマイクロアレイ解析の結果においても MT3T3-E1 中に発現しており、その影響が考えられる。また、miR-200b は、今回のマイクロアレイ解析により MT3T3-E1 での発現は認めなかったが、間葉系細胞に多く発現していることが知られている。口腔内の細胞には他の間葉系細胞も多く存在し、MT3T3-E1 では発現がないもののエクソソームなどを通じその影響を受けている可能性はある。よってこれら miRNA が MC3T3-E1 の細胞増殖に影響を及ぼすか検討するため、20 nM miR-671-5p mimic または miR-200b を MC3T3-E1 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 を同様に MC3T3-E1 へトランスフェクションし用いた。培養 48 時間において、コントロール群と比較して miR-671-5p または miR-200b mimic 群で有意に細胞増殖を抑制した。また培養 72 時間において、コントロール群と比較して miR-200b 群で有意に細胞増殖を抑制した。(図 10)。また、miR-671-5p の標的候補の一つである

Camkk2、そのパスウェイに含まれる Camk1、ヒトにおいて標的候補となる Fgfr2 について、同様に過剰発現させた状態で RT-qPCR にてその発現変動を確認した (図 11)。miR-671-5p mimic では Camkk2、Camk1 では発現抑制傾向、Fgfr2 では有意に発現を抑制した。miR-200b mimic では Camkk2、Camk1、Fgfr2 全てにおいてその発現を有意に抑制した。

【総括】

今回の実験結果より、MC3T3-E1を各表面処理されたチタンプレート上で24時間培養した際に、その細胞増殖を測定したところ表面粗さが最も粗い酸エッチング群で細胞増殖の抑制を認めた。これより、チタンプレートの表面粗さは細胞増殖に関与することが示唆される。

一方、機械研磨処理、サンドブラスト処理、酸エッチング処理上で培養されたMC3T3-E1においてマイクロアレイ解析を行ったところ、発現上昇するmiRNAとして各処理を行ったチタンプレートで51種類、39種類、40種類、発現低下するmiRNAとして各々37種類、76種類、117種類を確認した。また、*in silico*解析にてmiRNAの標的遺伝子を予測したところ、発現上昇するmiRNAにおいては各々284種類、157種類、165種類、発現低下するmiRNAにおいては各々896種類、505種類、1625種類の標的遺伝子が予測された。これより、miRNA発現にはチタンプレート表面の表面粗さが影響しており、それによりマイクロアレイ解析での発現変動の違いを認めたと考えられる。また、miRNAの発現変動が各々の標的遺伝子の発現にも影響を及ぼすため、今回予測された標的遺伝子のうち細胞増殖に影響しているものが存在する可能性は高いと考えられる。発現変動を認めるmiRNAの内、全ての条件において発現上昇または低下するmiRNAに注目し、その中でも表面粗さが小さい機械研磨群よりも表面粗さの大きいサンドブラスト群、酸エッチング群にて発現が上昇するmiRNAにおいて発現変動をRT-qPCRにて確認した。しかし、マイクロアレイと一致した結果は得られなかった。バラツキが大きかったことやPCRシステムの影響であると考えられ、今後の検討課題と考える。

一方、miR-671-5p は我々の以前の研究より高齢者唾液中に多く含まれることが分かっており、マイクロアレイ解析において候補とはならなかったが骨芽細胞中に発現しており、MC3T3-E1 含む口腔関連細胞への影響を考えている。また miR-200b は、今回のマイクロアレイ解析によりMC3T3-E1 内での発現は認めなかったが、間葉系細胞に多く発現していることが知られており、MC3T3-E1 もエキソソームなどを介して生体内ではその影響を受けている可能性がある。これら miRNA を miRNA mimic のトランスフェクションによって過剰発現させた状態で MTT Assay にて細胞増殖能を確認したところ培養 48 時間において、miR-671-5p および miR-200b mimic 群で有意に細胞増殖を抑制した。また miR-200b 群では培養 72 時間においても有意に細胞増殖を抑制した。また、miR-671-5p の標的候補の一つである Camkk2、そのパスウェイに含まれる Camk1、ヒトにおいて標的候補となる Fgfr2 について miR-671-5p mimic では Camkk2、Camk1 では発現抑制傾向、Fgfr2 では有意に発現を抑制した。miR-200b mimic では Camkk2、Camk1、Fgfr2 全てにおいてその発現を抑制した。よって、miR-671-5p および miR-200b は MC3T3-E1 細胞にて細胞増殖能に影響を与え、標的遺伝子としては Camkk2、Camk1、Fgfr2 を持つ可能性が示された。

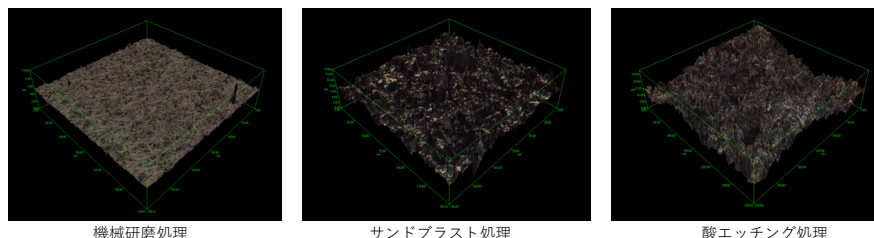


図1 各種処理されたチタンプレート表面

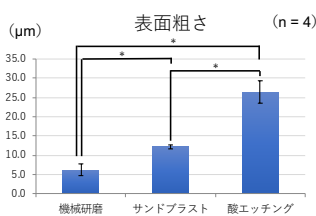


図2 チタンプレートの表面粗さ

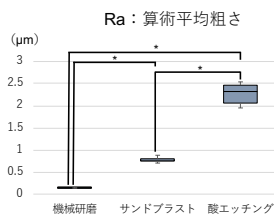


図3 チタンプレートの算術的平均粗さ

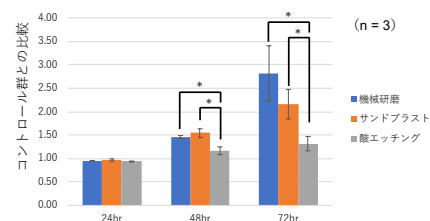


図4 チタンプレート上での培養時における細胞増殖能

表1 Total RNAの品質チェック

	濃度 (ng/ul)	A260/A280	A260/A230	rRNA ratio	RIN
コントロール 1	275.48	2.04	1.87	1.8	10
コントロール 2	230.54	2.01	1.85	1.9	10
機械研磨 1	277.38	2.02	1.74	1.8	10
機械研磨 2	325.58	2.02	2.07	1.8	10
サンドブラスト 1	238.23	2	2.15	1.9	10
サンドブラスト 2	299.64	2.02	1.83	1.8	10
酸エッチング 1	242.45	1.99	1.77	2.0	10
酸エッチング 2	184.69	1.97	1.98	2.0	10

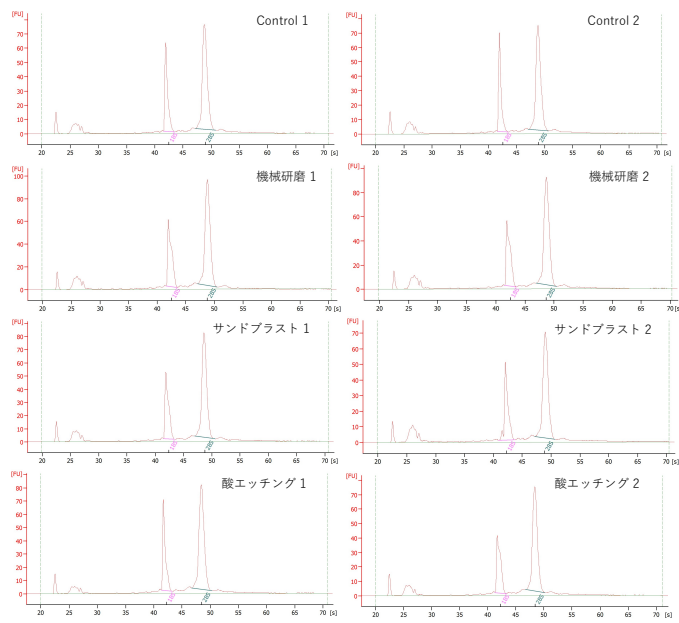


図5 2100バイオアナライザによる分析

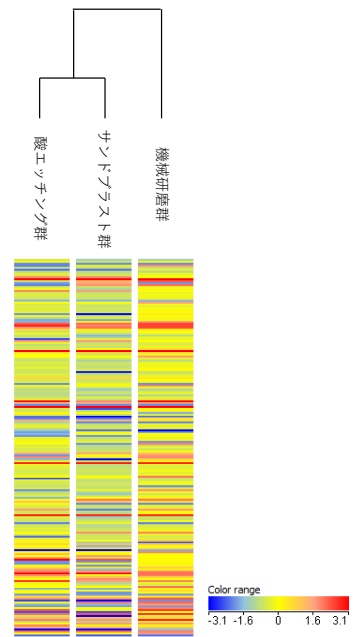


図6 miRNA発現のクラスター解析

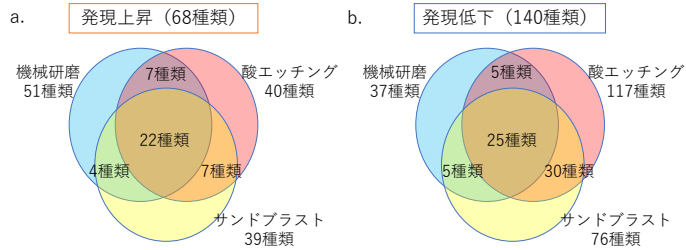


図7 miRNAの発現変動数

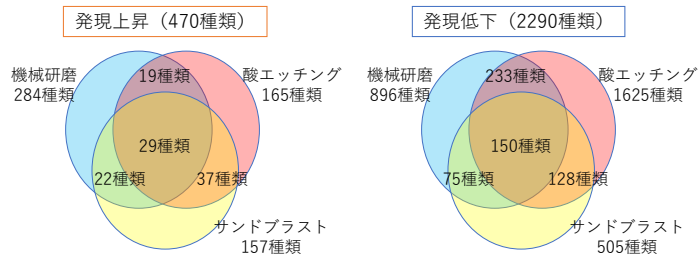


図8 標的遺伝子の検索

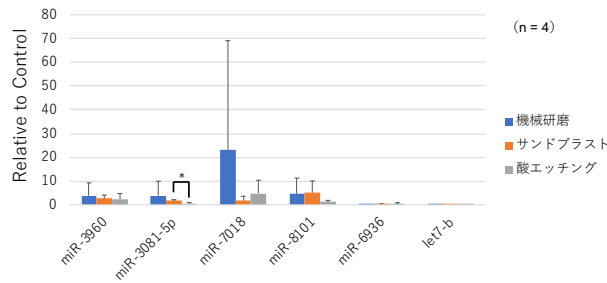


図9 候補miRNAのRT-qPCRによる検証

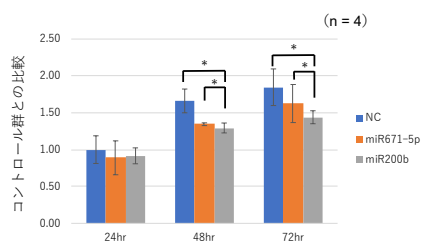


図10 miRNA mimicによる細胞増殖能

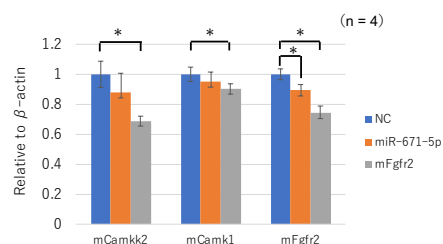


図11 miRNA mimicによる標的mRNAの発現変動

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩脇 有軌, 後藤 崇晴, 南 憲一, 友竹 偉則, 市川 哲雄
2. 発表標題 異なる表面性状を持つチタン上での骨芽細胞におけるmicroRNA発現の同定
3. 学会等名 第49回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----