

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17071

研究課題名(和文) 抗炎症miRNA内包エクソソームを用いた肥満糖尿病性歯周炎の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new treatment for obese diabetic periodontitis using anti-inflammatory miRNA-encapsulating exosomes

研究代表者

佐野 朋美 (SANO, TOMOMI)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：50782075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：LPS刺激下でマクロファージと共培養すると、脂肪細胞および歯肉線維芽細胞からのmiR-146a-5pの発現が亢進し、単独培養群ではマクロファージにおいてmiR-146a-5pは発現が亢進した。また、マクロファージにmiR-146a-5pを導入すると、炎症性サイトカイン発現が抑制された(in vitro)。さらに、マウス尾静脈からmiR-146a-5pを投与すると、食事誘発性肥満が軽減し、脂肪・歯周組織における炎症性サイトカイン発現も抑制された(in vivo)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TNF- α 中和抗体添加によりサイトカイン産生が抑制するという過去の結果から、今回用いた共培養系においてもmiR-146a-5pがマクロファージからのTNF- α 発現を抑制し、結果的に炎症抑制につながったと考える。miR-146a-5pは肥満糖尿病などにおいて脂肪・歯周組織の炎症に共通の制御因子として働く可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In vitro study revealed that miR-146a transfection into either adipocytes or gingival fibroblasts, has resulted in a reduced cytokine gene expression, observed on co-culturing the cells with macrophages in the presence of LPS, in comparison to the control miRNA transfected. Similarly, miR-146a transfection into macrophages resulted in a reduced expression of TNF- α gene and protein in response to LPS stimulation.

In vivo study revealed that a continuous intravenous miR-146a administration into mice via tail vein, protected the mice from developing obesity and the inflammatory cytokine gene expression was down-regulated in both adipose and periodontal tissues.

研究分野：歯周病学

キーワード：炎症 肥満 歯周病 microRNA

1. 研究開始当初の背景

肥満等を基盤として発症する糖尿病は歯周病に対する重要な危険因子として知られる。また、こうして発症・重症化した歯周病が、2型糖尿病の血糖コントロールに影響を与え、さらに虚血性心疾患の進行に関わることも明らかにされつつある。肥満はインスリン抵抗性を基盤として2型糖尿病・動脈硬化性疾患といった代謝性疾患に対する最大の危険因子である。その背景には、内臓脂肪に蓄積した成熟脂肪細胞から産生される一連の生理活性物質(アディポカイン)の分泌異常が深く関わっている。

一方、microRNA (miRNA) は21-25塩基 (nt) 長の1本鎖 RNA 分子であり真核生物において遺伝子の転写後発現調節に関与する。miRNA が介する転写抑制は、発生、細胞増殖および細胞分化、アポトーシスまたは代謝といった広範な生物学的プロセスに重要な役割を担うことが知られている。また、エクソソームは、さまざまな細胞が細胞外へ分泌する直径 30-100nm の脂質二重膜で覆われた小胞であり、その膜には接着分子やサイトカイン受容体などのタンパクが存在する。また、内部にもさまざまなタンパクならびに mRNA および miRNA などの遺伝物質が含まれており、疾患や老化などのさまざまな生命現象における細胞間コミュニケーションに役割を担っているとされるのみでなく、次世代のドラッグデリバリーシステムを担う微粒粒子として注目されている。そこで、本研究では、miRNA が慢性炎症に及ぼす影響を検討し、エクソソームを介したデリバリーが歯周炎や肥満の治療に有用であるとの仮説を設け、これを検証することとした。

2. 研究の目的

本申請は、抗炎症効果を発揮する miRNA を特定し、エクソソームによるドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System, DDS) を構築することを目的とする。miRNA はその標的 mRNA に対して不完全な相同性をもって結合し、一般に標的遺伝子の 3'UTR を認識して、標的 mRNA を不安定化するとともに翻訳抑制を行うことでタンパク質産生を抑制する。また、目標とする患部に薬物を効果的かつ集中的に送り込む技術である DDS は薬剤の治療効果を高めるだけでなく、副作用の軽減も期待できるというメリットがある。この DDS のキャリアーとして注目されているのがエクソソームであり、エクソソームは RNA 分解酵素に富む血液中でも安定して mRNA および miRNA を運搬することができる。

3. 研究の方法

- (1) 低濃度 LPS 刺激下脂肪細胞・マクロファージ共培養系において、発現変動(抑制または亢進)がみられる miRNA を抽出し、着目する miRNA を決定する。
- (2) 着目した miRNA は、低濃度 LPS 刺激下脂肪細胞・マクロファージ共培養系およびマクロファージ単独培養系において抗炎症作用を示すことを示す。同様に、低濃度 LPS 刺激下歯肉線維芽細胞・マクロファージ共培養系においても抗炎症作用を示すことを示す。
- (3) 着目した miRNA を実験動物に導入することで、肥満・インスリン抵抗性ならびに歯周炎が抑制されることを示す。

4. 研究成果

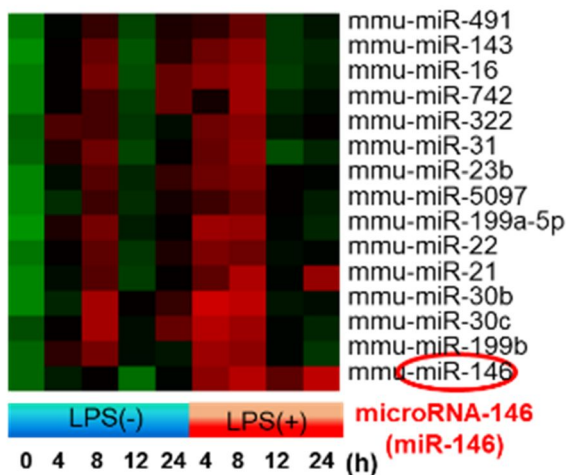
- (1) LPS (1 ng/mL) 刺激下でマクロファージ (RAW264.7) と共培養した脂肪細胞 (3T3-L1) において、マクロアレイ解析により miR-146a-5p 発現が有意に亢進したことから、miR-146a-5p に着目することとした(右図)。

次に、リアルタイム PCR 法による解析により miR-146a-5p の有意な発現亢進を検証した。LPS 刺激下でマクロファージと共培養した脂肪細胞および歯肉線維芽細胞 (ESK-1) からの miR-146a-5p の発現が有意に亢進し、単独培養群ではマクロファージにおいて miR-146a-5p は発現が有意に亢進した。

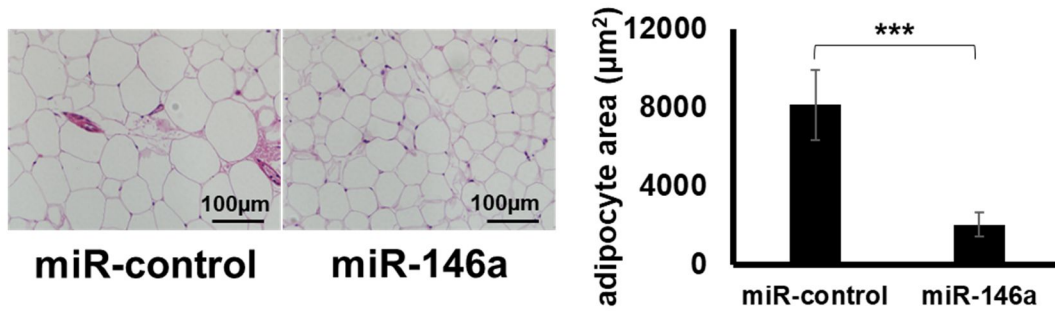
- (2) マクロファージに miR-146a-5p を導入すると、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6、MCP-1) 発現が有意に抑制し、miR-146a-5p を導入したマクロファージと共培養した細胞細胞や歯肉線維芽細胞においても、炎症性サイトカイン (IL-6、MCP-1) 発現が有意に抑制した。

また、miR-146a-5p は IRAK1 や TRAF6 の発現を有意に抑制させることを確認した。

- (3) マウス尾静脈から miR-146a-5p を投与すると、食事誘発性肥満が軽減し、脂肪組織にお



ける脂肪細胞径の増大抑制がみられた（下図）。



また脂肪・歯周組織における炎症性サイトカイン（TNF- α 、MCP-1、IL-1 β ）発現が有意に抑制された。

以上より、miR-146a-5p は肥満糖尿病などにおいて脂肪・歯周組織の炎症に共通の制御因子として働く可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Maetani Yuka, Asano Satoshi, Mizokami Akiko, Yamawaki Yosuke, Sano Tomomi, Hirata Masato, Irifune Masahiro, Kanematsu Takashi	4. 巻 552
2. 論文標題 Expression of PRIP, a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding protein, attenuates PI3K/AKT signaling and suppresses tumor growth in a xenograft mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 106 ~ 113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mukai Satoru, Mizokami Akiko, Otani Takahito, Sano Tomomi, Matsuda Miho, Chishaki Sakura, Gao Jing, Kawakubo-Yasukochi Tomoyo, Tang Ronghao, Kanematsu Takashi, Takeuchi Hiroshi, Jimi Eijiro, Hirata Masato	4. 巻 296
2. 論文標題 Adipocyte-specific GPRC6A ablation promotes diet-induced obesity by inhibiting lipolysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100274 ~ 100274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100274	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Alshargabi Rehab, Shinjo Takanori, Iwashita Misaki, Yamashita Akiko, Sano Tomomi, Nishimura Yuki, Hayashi Masato, Zeze Tatsuro, Fukuda Takao, Sanui Terukazu, Nishimura Fusanori	4. 巻 533
2. 論文標題 SPOCK1 induces adipose tissue maturation: New insights into the function of SPOCK1 in metabolism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1076 ~ 1082
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.09.129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Alshargabi Rehab, Sano Tomomi, Yamashita Akiko, Takano Aiko, Sanada Taiki, Iwashita Misaki, Shinjo Takanori, Fukuda Takao, Sanui Terukazu, Kishida Shosei, Nishimura Fusanori	4. 巻 10
2. 論文標題 SPOCK1 is a novel inducer of epithelial to mesenchymal transition in drug-induced gingival overgrowth	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-66660-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Taiki Sanada, Tomomi Sano, Yusuke Sotomaru, Rehab Alshargabi, Yosuke Yamawaki, Akiko Yamashita, Hiroaki Matsunaga, Misaki Iwashita, Takanori Shinjo, Takashi Kanematsu, Tomoichiro Asano, Fusanori Nishimura	4. 巻 Jul
2. 論文標題 Anti-inflammatory Effects of miRNA-146a Induced in Adipose and Periodontal Tissues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep.	6. 最初と最後の頁 eCollection
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100757	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sano Tomomi, Sanada Taiki, Sotomaru Yusuke, Shinjo Takanori, Iwashita Misaki, Yamashita Akiko, Fukuda Takao, Sanui Terukazu, Asano Tomoichiro, Kanematsu Takashi, Nishimura Fusanori	4. 巻 16
2. 論文標題 Ccr7 null mice are protected against diet-induced obesity via Ucp1 upregulation and enhanced energy expenditure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutrition & Metabolism	6. 最初と最後の頁 43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12986-019-0372-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Inoue MasaKi, Matsunaga Yasuka, Nakatsu Yusuke, Yamamotoya Takeshi, Ueda Koji, Kushiyama Akifumi, Sakoda Hideyuki, Fujishiro Midori, Ono Hiraku, Iwashita Misaki, Sano Tomomi, Nishimura Fusanori, Morii Kenichi, Sasaki Kensuke, Masaki Takao, Asano Tomoichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Possible involvement of normalized Pin1 expression level and AMPK activation in the molecular mechanisms underlying renal protective effects of SGLT2 inhibitors in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diabetology & Metabolic Syndrome	6. 最初と最後の頁 57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13098-019-0454-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Suzuki Shigeki, Fukuda Takao, Nagayasu Shintaro, Nakanishi Jun, Yoshida Kazuma, Hirata-Tsuchiya Shizu, Nakao Yuki, Sano Tomomi, Yamashita Akiko, Yamada Satoru, Ohta Kouji, Shiba Hideki, Nishimura Fusanori	4. 巻 9
2. 論文標題 Dental pulp cell-derived powerful inducer of TNF- comprises PKR containing stress granule rich microvesicles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3825
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40046-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yusuke Nakatsu, Yasuka Matsunaga, Takeshi Yamamotoya, Koji Ueda, Masa-ki Inoue, Yu Mizuno, Mikako Nakanishi, Tomomi Sano, et.al.	4. 巻 26
2. 論文標題 Prolyl Isomerase Pin1 Suppresses Thermogenic Programs in Adipocytes by Promoting Degradation of Transcriptional Co-activator PRDM16	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 3221-3230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.02.066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 眞田大樹、佐野朋美、岩下未咲、山下明子、兼松隆、西村英紀
2. 発表標題 脂肪・歯周組織で発現誘導されるmiRNAによる抗炎症効果の検討
3. 学会等名 第62回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 眞田大樹、佐野朋美、松永紘明、Rehab Alshargabi、岩下未咲、山下明子、西村英紀
2. 発表標題 脂肪・歯周組織で発現誘導されるmiRNA-146aによる抗炎症効果の検討
3. 学会等名 第151回日本歯科保存学会2019年度秋季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sano T, Sanada T, Rehab A, Sotomaru Y, Iwashita M, Yamashita A, Nishimura F.
2. 発表標題 IDENTIFICATION OF MICRORNAS INVOLVED IN ADIPOSE TISSUE INFLAMMATION.
3. 学会等名 13th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomomi Sano, Taiki Sanada, Rehab Alshargabi, Akiko Yamashita, Hiroaki Matsunaga, Misaki Iwashita, Fusanori Nishimura.
2. 発表標題 Anti-inflammatory effects of miRNA-146a induced in adipose and periodontal tissues.
3. 学会等名 The 59th General Session of Korean Academy of Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sano T, Sanada T, Rehab A, Shinjo T, Li R, Iwashita M, Yamashita A, Nishimura F.
2. 発表標題 Identification of microRNAs involved in adipose tissue inflammation.
3. 学会等名 2019 Taiwan Academy of Periodontology Annual Meeting and International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 眞田大樹、佐野朋美、福田隆男、岩下未咲、山下明子、藤田剛、讃井彰一、栗原英見、西村英紀
2. 発表標題 炎症脂肪/歯周組織における抗炎症分子の探索研究
3. 学会等名 第148回日本歯科保存学会2018年度春季学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐野朋美、眞田大樹、竹村翼、Rehab Alshargabi、岩下未咲、山下明子、藤田剛、栗原英見、西村英紀
2. 発表標題 CCR7欠損マウスにおける脂肪および歯周組織炎症抑制機序の考察
3. 学会等名 第61回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Rehab Alshargabi, Tomomi Sano, Akiko Yamashita, Taiki Sanada, Takao Fukuda, Misaki Iwashita, Terukazu Sanui, Fusanori Nishimura
2. 発表標題 The Role of Proteoglycans In Drug Induced Gingival Overgrowth (DIGO)
3. 学会等名 第149回日本歯科保存学会2018年度秋季学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 眞田大樹、佐野朋美、西村英紀
2. 発表標題 脂肪・歯周組織における抗炎症効果の検討
3. 学会等名 平成30年度 日本歯周病学会九州五大学・日本臨床歯周病学会九州支部・合同研修会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sano T, Sanada T, Shinjo T, Iwashita M, Yamashita A, Kanematsu T, Nishimura F.
2. 発表標題 Increased energy expenditure and resistance to obesity in CCR7KO mice.
3. 学会等名 The 96th General Session of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 佐野朋美、西村英紀	4. 発行年 2021年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 204
3. 書名 糖尿病合併症 管理・フォローアップ 章「慢性合併症の管理」. 13(132-137)	

1. 著者名 佐野朋美、西村英紀	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医学出版	5. 総ページ数 112
3. 書名 月刊糖尿病 6「歯周病と糖尿病」. Vol.11 No.4 (56-61)	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------