

令和 2 年 5 月 23 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06297・19K21385

研究課題名（和文）上皮性付着に関与するアメロチンに焦点をあてた歯周病発症メカニズムの解明

研究課題名（英文）The elucidation of the onset mechanism of periodontitis focusing on amelotin in junctional epithelium

研究代表者

高井 瑞穂（山崎瑞穂）（TAKAI, Mizuho）

日本大学・松戸歯学部・専修医

研究者番号：20822620

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）：MicroRNA（miRNA）は、標的mRNAの3'末端非翻訳領域（3'-UTR）に結合し遺伝子発現を調節する。アメロチン（AMTN）は、接合上皮の内側基底板に限局して発現する分泌エナメルタンパク質である。ヒト歯肉上皮細胞（Ca9-22）においてTNF- α 誘導性のAMTN遺伝子転写に及ぼすmiR-200bの影響を解析した。miR-200b過剰発現により、Ca9-22におけるTNF- α 誘導性のAMTNおよびIKK mRNA発現が抑制されたことから、miR-200bはAMTN 3'-UTRおよびIKK mRNAを標的として、ヒトAMTN遺伝子の転写調節に関与す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

歯肉接合上皮に特異的に発現するタンパク質であるアメロチンは、上皮性付着への関与が示唆され、TNF- α 刺激で発現が増加する。本研究では、ヒト歯肉上皮細胞におけるTNF- α 誘導性のアメロチン遺伝子発現は、miR-200b過剰発現により直接的に抑制され、さらにIKKを標的として間接的に抑制される可能性が示された。このことから、歯周病発症に重要な領域である接合上皮におけるアメロチン遺伝子調節機構の、炎症環境下での複雑な動態の一部が明らかとなった。本研究の成果は、歯周病発症メカニズムを解き明かす重要な足掛かりとなると考えられる。

研究成果の概要（英文）：MicroRNA is a small non-coding RNA that regulates gene expression at the post-transcriptional level by binding to the 3'-untranslated region (3'-UTR) of target mRNAs. Amelotin (AMTN) is an enamel protein that is localized in the internal basal lamina of junctional epithelium (JE). In this study, we have analyzed the effect of miR-200b on the AMTN gene transcription induced by TNF- α in human gingival epithelial cells (Ca9-22). TNF- α -induced AMTN mRNA levels were partially inhibited by miR-200b overexpression. TNF- α -induced IKK mRNA and protein levels were almost completely inhibited by miR-200b. These results suggest that miR-200b suppresses AMTN gene expression directly or indirectly by targeting to AMTN and IKK mRNAs in the human gingival epithelial cells.

研究分野：歯周病学

キーワード：アメロチン microRNA TNF- α 遺伝子転写調節 歯肉上皮細胞 接合上皮

1. 研究開始当初の背景

接合上皮は、歯肉溝底部に存在する非角化上皮組織で、ヘミデスマゾーム結合により歯面と有機的に結合し、歯周組織を外界から遮蔽・保護するバリア機能を担っている。口腔内細菌産物や炎症性サイトカインをはじめとする、さまざまな有害物質の作用を受けた接合上皮細胞の変性脱落により、接合上皮が歯面から剥離することで、歯周組織の破壊が根尖方向へと進展する。接合上皮の歯面への付着は歯周病の発症に深く関与することから、その付着メカニズムへの理解は極めて重要である。

アメロチン (AMTN) とは、主にエナメル質形成の成熟期に分泌されるエナメルタンパク質の一種で、成熟期エナメル芽細胞の基底膜および接合上皮内側基底板に限局して発現しており、接合上皮と歯質との付着に関与する可能性がある。これまでの AMTN に関する研究は局在を組織学的に解析したものが主であったが、当研究室では慢性歯周炎患者から得られた炎症性歯肉を用いて DNA マイクロアレイを行い、AMTN 遺伝子の発現が増加していることを明らかにした (Nakayama et al. J Oral Sci 2014)。さらに、我々は最近、マウス歯肉上皮細胞における AMTN 遺伝子転写が TNF- α と IL-1 β により促進されることを示し (Noda et al. J Oral Sci 2017)、ヒト歯肉上皮細胞においても TNF- α および IL-1 β によって AMTN 遺伝子転写が増大することを報告した (Yamazaki et al. Inflamm Res 2018, FEBS Open Bio 2018)。

miRNA は標的 mRNA の 3' 非翻訳領域 (UTR) に部分相補的に結合し標的 mRNA の不安定化・翻訳抑制を行うことで、遺伝子発現を抑制する能力をもつ短鎖ノンコーディング RNA で、発生、分化・増殖、炎症などさまざまな生物学的プロセスに関与する。当研究室では歯周病と miRNA の関連に着目し解析を行ってきた。炎症性 / 非炎症性歯肉を用いて行った miRNA マイクロアレイの結果、炎症性歯肉で miR-150、miR-223 および miR-200b の発現量は著しく増加しており (Ogata et al. J Oral Sci 2014)、これらの miRNA は歯周組織の炎症に際し何らかの役割を担うことが示唆された。

2. 研究の目的

歯肉接合上皮特異的に発現するタンパク質である AMTN は、これまでの研究において、接合上皮の歯面との付着への関与が示唆されているが、過去の報告は AMTN の組織学的分布に着目したものがほとんどだった。我々は、炎症性刺激に着目し、TNF- α および IL-1 β による歯肉上皮細胞での AMTN 遺伝子の転写調節メカニズムを世界で初めて報告した (Yamazaki et al. Inflamm Res 2018, FEBS Open Bio 2018)。近年では、miRNA は炎症や癌をはじめとするさまざまな疾患との関与が示されており、歯周病に関連した研究も増加しつつあるが、歯周病の発症にどのように関与するのかを詳細に解析した報告はまだない。

本研究は、ヒト歯肉上皮細胞 (Ca9-22) に対して TNF- α と miRNA 発現プラスミドを用い、炎症時の細胞環境を再現することで、炎症性歯肉で発現が増加する miR-200b による AMTN 遺伝子発現調節機構を解明し、炎症時の接合上皮におけるその複雑な動態を理解することを目的として行った。

3. 研究の方法

(1) リアルタイム qPCR および western blot

Ca9-22 細胞に miR-200b 発現ベクターを導入し、TNF- α (10 ng/ml) で 12 時間刺激後の AMTN と IKK β の mRNA およびタンパク量を、それぞれリアルタイム qPCR または western blot で解析した。

(2) ルシフェラーゼアッセイ

-353 塩基上流から +60 までのヒト AMTN プロモーター領域を含むルシフェラーゼ (LUC) プラスミドのルシフェラーゼ遺伝子下流の XbaI 切断部位に、exon9-88、83-707、および 708-1692 の異なる AMTN 3'-UTR 配列を挿入し、miR-200b 発現プラスミドと共に Ca9-22 に導入後、TNF- α (10 ng/ml) で 12 時間刺激し、LUC 活性を測定した。さらに、ヒト AMTN 3'-UTR 708-1692 を挿入したコンストラクトと、コントロールプラスミドまたは miR-200b 発現プラスミドを導入した Ca9-22 細胞に、リン酸化阻害剤を作用させ、TNF- α で 12 時間刺激を行った場合の LUC 活性を測定した。

4. 研究成果

(1) miR-200b による AMTN mRNA 発現量の変化

Ca9-22 細胞を TNF- α で刺激すると AMTN mRNA 量は増加したが、miR-200b 発現プラスミドを導入すると TNF- α による AMTN mRNA 量の増加は抑制された。一方、Ca9-22 細胞に miR-200b inhibitor を導入し TNF- α で刺激すると、negative control を導入して刺激した場合に比較し AMTN mRNA 量はさらに増加した。

(2) ルシフェラーゼアッセイ

ヒト AMTN 3'-UTR を挿入した LUC コンストラクトでは、それぞれ TNF- α 刺激によりルシフェラーゼ活性が上昇したが、miR-200b 発現プラスミドを導入すると TNF- α 刺激による活性上昇は部分的に抑制された。ヒト AMTN 3'-UTR 708-1692 を挿入したコンストラクトと、コントロールプラスミドまたは miR-200b 発現プラスミドを導入した Ca9-22 細胞に、IKK β 阻害剤である IMD0354 および NF- κ B 阻害剤である Triptolide を作用させると、TNF- α による活性上昇はほとんど完全に抑制された。

(3) miR-200b による IKK β 発現量の変化

Ca9-22 細胞を TNF- α で刺激すると IKK β mRNA 量は増加し、miR-200b 発現プラスミドを導入すると無刺激時、刺激時ともに mRNA 量は減少した。Western blot の結果、Ca9-22 細胞を TNF- α IKK β タンパク量は増加し、miR-200b 発現プラスミドを導入すると減少した。

(4) 考察および今後の展望

本研究の結果、ヒト歯肉上皮細胞において、miR-200b はヒト AMTN 3'-UTR を直接標的として、あるいは IKK β の発現抑制を介して、TNF- α 誘導性の AMTN 遺伝子発現を調節していると考えられ、炎症時歯肉においてヒト AMTN 遺伝子発現が直接または間接的に miR-200b によって調節される可能性が示された。これらの成果は、歯周病発症に重要な領域である接合上皮と歯面との付着に關与する AMTN の発現が炎症環境下でどのような影響を受けるかを、すでに報告した TNF- α 誘導性ヒト AMTN 遺伝子発現に miR-200b の存在を加味して、より複合的に解析したものである。miRNA とヒト AMTN 遺伝子発現との関連についてはこれまでに報告がなく、本研究の成果について、複数回の学会発表を経てブラッシュアップし、執筆した論文を現在英文誌に投稿中であることから、出版された際には AMTN 遺伝子転写調節への理解を深めるのに広く役立つことが期待される。

今後は、miR-200b と同様に炎症性歯肉で発現が増加していた miR-150 および miR-223 についても、AMTN をはじめとする接合上皮に特異的なタンパクの発現に及ぼす影響を解析し、AMTN 遺伝子の転写調節機構をさらに多面的にとらえることで、炎症時の接合上皮における複雑な分子メカニズムの理解に役立てたい。さらに、それらの成果を、これまでにすでに複数報告されている AMTN の分布についての組織学的な解析結果と併せて考察することで、歯周病発症メカニズムを解き明かす重要な足掛かりとなると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高井瑞穂、能田佳祐、岩井泰伸、目澤優、高井英樹、中山洋平、小方頼昌
2. 発表標題 miR-200bはヒト歯肉上皮細胞におけるアメロチン遺伝子発現を抑制する
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takai M, Noda K, Tsuruya Y, Mezawa M, Takai H, Nakayama Y, Ogata Y
2. 発表標題 Mir-200b suppresses amelotin gene expression in human gingival epithelial cells
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 高井瑞穂、岩井泰伸、能田佳祐、加藤彩子、目澤優、高井英樹、中山洋平、小方頼昌
2. 発表標題 ヒト歯肉上皮細胞においてmiR-200bがTNF-誘導性アメロチン遺伝子発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第18回日本大学口腔科学会学術大会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----