

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16976

研究課題名(和文) 接合上皮の歯面への付着に着目した歯周病発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of periodontal disease focusing on adhesion of junctional epithelium to tooth surface

研究代表者

高井 瑞穂(山崎瑞穂)(TAKAI, Mizuho)

日本大学・松戸歯学部・助教

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)：接合上皮特異的に発現するアメルチン(AMTN)の遺伝子発現に対するMicroRNA(miRNA)の影響について解析した。ヒト歯肉上皮細胞(Ca9-22)におけるTNF- $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ 誘導性のAMTN遺伝子発現は、miR-150、miR-200bおよびmiR-223過剰発現により抑制された。TNF- $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ 刺激に应答する細胞内シグナル伝達経路中の因子のうち、IKK $\alpha$  mRNA発現がmiR-200b過剰発現によって抑制された。miR-200bはAMTN 3'-UTRおよびIKK $\alpha$  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

AMTNは歯肉接合上皮に特異的に発現し、炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ 刺激によって発現が増加することが示唆されている。本研究では、ヒト歯肉上皮細胞におけるIL-1 $\beta$ およびTNF- $\alpha$ 誘導性のAMTN遺伝子発現は、炎症性歯肉で発現が増加するmiR-150、miR-200bおよびmiR-223過剰発現により抑制されることが示された。さらに、miR-200bはAMTN遺伝子発現を直接的および間接的に抑制される可能性が示された。本研究の成果は、接合上皮領域におけるAMTN遺伝子発現は炎症環境下においてmiRNAによる調節を受け、歯周炎の発症に寄与する可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the effects of microRNAs (miRNAs) on the gene expression of amelotin (AMTN), which is specifically expressed in the junctional epithelium. TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ -induced AMTN gene expression in human gingival epithelial cells (Ca9-22) was suppressed by miR-150, miR-200b and miR-223 overexpression. Among the factors in the intracellular signaling pathways that respond to TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  stimulation, IKK $\alpha$  mRNA expression was suppressed by miR-200b overexpression. It was suggested that miR-200b targets AMTN 3'-UTR and IKK $\alpha$  mRNA and is involved in the transcriptional regulation of the human AMTN gene.

研究分野：歯周病学

キーワード：AMTN 接合上皮 miR-200b miR-223 miR-150 IKK-

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 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、ヘミデスモ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の理解は極めて重要である。

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、その局在から、接合上皮と歯質との付着に関与する可能性が示唆されている。これまでの AMTN に関する研究はタンパク質の発現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、歯周炎との関連に着目し、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、マウス歯肉上皮細胞における AMTN 遺伝子転写が TNF- $\alpha$  と IL-1 $\beta$  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- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  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) に結合し、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。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、上皮性付着への関与が示唆され、炎症性歯肉で発現が増加することが明らかとなっている。本研究では、慢性歯周炎患者から得た同一の炎症性歯肉を用いて、miRNA と AMTN の局在をそれぞれ解析する。また、培養細胞に対して TNF- $\alpha$  または IL-1 $\beta$  と miRNA 発現ベクターを用い、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-150、miR-223、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する。さらに、本研究の成果を踏まえ、炎症環境が AMTN 発現調節を介して接合上皮のバリア機能に及ぼす影響についても考察を行い、歯周病発症のメカニズムを解き明かす一端とする。

### 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-150、miR-200b および miR-223 発現ベクターを導入し、IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) または TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) で 12 時間刺激後の AMTN 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。さらに、Ca9-22 細胞に miR-200b 発現ベクターを導入し、TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) で 12 時間刺激後の IKK- $\beta$  の mRNA およびタンパク量を解析した。

#### (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-150、miR-200b および miR-223 発現プラスミドと共に Ca9-22 に導入後、TNF- $\alpha$  (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- $\alpha$  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-150、miR-200b および miR-223 による AMTN mRNA 発現量の変化

Ca9-22 細胞を IL-1 $\beta$  または TNF- $\alpha$  で刺激すると AMTN mRNA 量は増加したが、miR-150、miR-200b または miR-223 発現プラスミドを導入すると IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  誘導性の AMTN mRNA 量の増加は抑制された。Ca9-22 細胞に miR-200b inhibitor を導入し TNF- $\alpha$  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 IL-1 $\beta$  または TNF- $\alpha$  刺激によりルシフェラーゼ活性が上昇したが、miR-150、miR-200b および miR-223 発現プラスミドを導入すると IL-1 $\beta$  または TNF- $\alpha$  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 $\beta$  阻害剤である IMD0354 および NF- $\kappa$ B 阻害剤である Triptolide を作用させると、TNF- $\alpha$  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 $\beta$ 発現量の変化

Ca9-22 細胞を TNF- $\alpha$  で刺激すると IKK $\beta$  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- $\alpha$  IKK $\beta$  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

本研究では、ヒト歯肉上皮細胞において miR-150、miR-200b および miR-223 はヒト AMTN 3'-UTR を直接標的として IL-1 $\beta$  または TNF- $\alpha$  誘導性の AMTN 遺伝子発現を調節する可能性が示唆された。また、miR-223 は IKK $\beta$  を介して間接的にも調節している可能性が示唆された。

これらの成果のうち、miR-200b に関して論文を執筆し英文誌に掲載された (Yamazaki-Takai M et al. MiR-200b suppresses TNF- $\alpha$  induced AMTN production in human gingival epithelial cells. *Odontology*. 109:403-410. )。ヒト AMTN 遺伝子発現に対する miRNA の影響についてはこれまでに報告がなく、今後は、miR-150 および miR-223 についても、ヒト AMTN 遺伝子発現に及ぼす直接的及び間接的影響を解析し、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、AMTN 以外の接合上皮特異的に発現するタンパク質についても遺伝子発現調節機構に関する研究を進める予定である。歯肉接合上皮領域におけるタンパク質発現について、これまでにすでに複数報告されている組織学的な解析結果と併せて考察することで、歯周病発症のメカニズムを解明する足掛かりとなることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuruya Yuto, Yamaguchi Arisa, Yamazaki-Takai Mizuho, Zhenyu Jin, Takai Hideki, Nakayama Yohei, Ogata Yorimasa	4. 巻 -
2. 論文標題 Interleukin-1 regulates odontogenic ameloblast-associated protein gene transcription in human gingival epithelial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10266-022-00689-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuruya Yuto, Yamaguchi Arisa, Yamazaki-Takai Mizuho, Mezawa Masaru, Takai Hideki, Nakayama Yohei, Ogata Yorimasa	4. 巻 71
2. 論文標題 Transcriptional regulation of human odontogenic ameloblast-associated protein gene by tumor necrosis factor-	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inflammation Research	6. 最初と最後の頁 119 ~ 129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00011-021-01523-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 鶴屋 祐人, 山口 亜利彩, 高井 瑞穂, 目澤 優, 高井 英樹, 中山 洋平, 小方 頼昌
2. 発表標題 FDC-SP遺伝子発現に対するIL-6の影響
3. 学会等名 第64回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------