

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792331

研究課題名(和文) miRNAを標的とした歯周炎症誘導性インスリン抵抗性の制御を目指す基礎研究

研究課題名(英文) Basic study aimed at the control of insulin resistance induced periodontal inflammation that target miRNA

研究代表者

山下 明子 (Yamashita, Akiko)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：70511319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪細胞とマクロファージを共培養を行った。数時間ごとのタイムコースを設定し、共培養したLPS刺激有無の脂肪細胞のmiRNAを回収し、マイクロアレイ法を用いてmiRNA発現を解析した。先行研究で明らかにした実験系から得られたDNAマイクロアレイデータ(Yamashita A.et al., Int J Obese.,2008)と今回の結果を照らし合わせ、産生性に著明な変化があったmiRNAの中から血管病変やインスリン抵抗性に関連するmiRNAを抽出した。LPS刺激下のマクロファージと共培養した脂肪細胞では、主に炎症、代謝、そして血管病変に関与するmiRNA群の増減があった。

研究成果の概要(英文)：RAW264.7, a murine macrophage cell line and differentiated 3T3-L1 adipocytes were co-cultured. I analyzed miRNA differentially expressed in adipocytes when co-cultured with macrophages in the presence of LPS. miRNA differentially expressed in adipocytes were analyzed by the microarray method following 4,8,12 and 24h stimulation with LPS. I compared these results with previously reports. (Yamashita A.et al., Int J Obese.,2008), extracted the data of relevant miRNA about vascular involvement and insulin resistance. The relevant miRNA about inflammation, metabolism and vascular involvement expression were significantly up and down regulated.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周病 メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

肥満等が危険因子となっ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(アディポサイトカイン)の分泌異常が深く関わっている。

近年、脂肪細胞からのアディポサイトカイン産生に、マクロファージが関与する脂肪細胞・マクロファージ相互作用説が報告され(Kathryn E *et al.*, *J Clin Invest*, 2003)、これは脂肪細胞周囲に末梢から遊走・浸潤したマクロファージから産生されるサイトカインが、脂肪細胞からのアディポサイトカイン産生異常を惹起し、2型糖尿病やメタボリックシンドロームの発症・進展をさらに促進するという説である。

申請者は、歯周病による局所の感染が全身に影響を及ぼすほどに増幅される機序を脂肪細胞・マクロファージ相互作用の観点から追及してきた。これまでに、脂肪細胞とマクロファージの共培養系を確立し(Yamashita A *et al.*, *obesity*, 2007)、両細胞を低濃度 LPS 刺激した際に発現量が変動する脂肪細胞中遺伝子群の網羅的解析を行い、血管病変やインスリン抵抗性といった2型糖尿病やメタボリックシンドローム関連遺伝子の動態が大きく変化することを報告した(Yamashita A. *et al.*, *Int J Obese.*, 2008)。

一方、非常に短いタンパク質をコードしていない RNA の一つであるマイクロ RNA (miRNA) は、一つの miRNA で約 100 以上もの遺伝子を標的にしており、細胞内の遺伝子調節の新機構として近年世界中で注目を集めている。軽微な局所の炎症が全身へ影響を与えるまで増幅する原因説として脂肪細胞・マクロファージ相互作用説が最も疑われる。以上から、低濃度 LPS 刺激下マクロファージ 脂肪

細胞の共培養系において炎症やメタボリックシンドローム関連 miRNA を見出しそれらを制御することで、血管病変やインスリン抵抗性を惹起する遺伝子の発現が抑制されるとの仮説を設け、脂肪細胞・マクロファージ共培養系を用いてにて miRNA の網羅的解析とメタボリックシンドロームとの関連を検討するという着想に至った。

2. 研究の目的

本申請は、局所の感染が全身に影響を及ぼすほどに増幅される機序を阻害する手段を検討し、これまでの研究成果をさらに発展させようとするものである。研究期間内に低濃度 LPS 刺激下脂肪細胞・マクロファージ共培養系において miRNA の網羅的解析を行い、血管病変やインスリン抵抗性に関与する miRNA を見出し、それらの働きを助長または阻止することで遺伝子の発現動態を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1). 供試細胞: マウスマクロファージ由来細胞株 RAW264.7 とマウス由来前駆脂肪細胞株 3T3-L1 を用いた。3T3-L1 を通常に従って分化誘導し、誘導開始から 14 日後の細胞を分化脂肪細胞とした。

(2). 共培養と miRNA の回収: 分化マウス脂肪細胞とマウスマクロファージ細胞を、メンブレンで上室と下室が分離され液性因子のみが各室間を移動できるようにしたトランズウェルシステムで共培養し、LPS (1ng/ml) 刺激開始 0, 4, 8, 12, 24 時間後のタイムコースを設定し、miRNA を回収した。

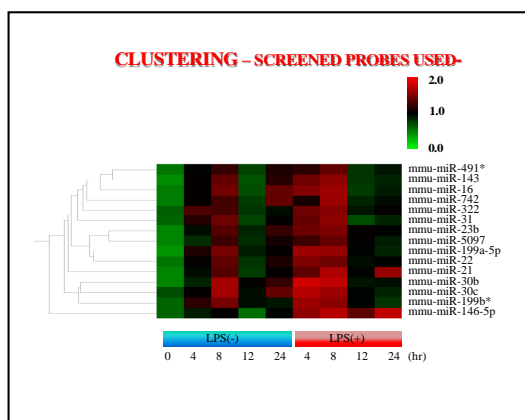
(3). 脂肪細胞の miRNA 発現解析; miRCURY LNA microRNA arrayDNA 法 (Exiqon) にて各時間における脂肪細胞の miRNA 群を LPS 未刺激の細胞における発現 miRNA 群と比較した。

(4). (3) で得た結果と既報のメタボリックシンドローム関連遺伝子群の結果を解析ソフト IPA を用いて解析し、これらと関連する miRNA 群を抽出した。

4. 研究成果

LPS 刺激下のマクロファージと共培養した脂肪細胞では、主に炎症、代謝、そして血管病変に関与する miRNA 群の増減を確認した。特に、LPS 刺激開始後 8 時間では、CXCL10 や CCL7 といったケモカインなどに関与すると報告される miRNA の発現変動が著明であった。今後、これらの働きを助長または阻止し、遺伝子の発現動態を明らかにすることで、脂肪組織の抗炎症に関わる分子基盤解明につながる可能性があると考えられる。

スクリーニングされたプローブ全てを使ってクラスタリングを行った結果 (Fold Change が 2 倍以上、データの信頼性、重複スポットの再現性による絞込みを行った。)



以下に、LPS 刺激なしと比較して、LPS 刺激ありで miRNA の発現が 2 倍以上亢進したもののうち、先行研究の結果とを照らし合わせ、関連する DNA の発現が 6 倍以上亢進するものを記載する。

Symbol	Fold Change (LPS(+)/LPS(-))	Symbol	Fold Change (LPS(+)/LPS(-))
miR-135a	2	CD47	7
miR-135b		RAPGEF6	8
		CCL7	15
		CXCL10	49
		TNFAIP3	8
miR-154	2	IFIT2	9
	TYR	10	
	TLR2	11	
	RSAD2	12	
	IL20	13	

Symbol	Fold Change (LPS(+)/LPS(-))	Symbol	Fold Change (LPS(+)/LPS(-))
miR-188-3p	2	TSPAN2	7
/miR-188*		RAPGEF6	8
		IL13RA1	10
		MYO5B	11
		HNF4A	-10.9
	CYP2B6	-7	
miR-4756-5p	2	PTGES	6
/miR-1943/		FGF23	18
miR-149*		ABCC3	23
		HNF4A	-10.9
		TCF4	-9.6
miR-216b/miR-216b-5p	2	PDE3A	-9
	CYP2B6	-7	
	TSPAN2	7	
	FAS	7	
	MYO5B	11	
	CD47	7	
	NT5C3	8	
miR-708/miR-28/-28-5p	2	CD38	9
	PTGS2	14	
	CSF3	15	
	FGF23	18	
	FAS	7	
miR-28*/miR-28-3p	2	MYO5B	11
	GCH1	14	
miR-490-5p/miR-490*	2	SEPT7	11
miR-881/miR-892a	2	GCH1	14

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 山下明子, 岩下未咲, 鈴木茂樹, 櫛山暁史, 安孫子宜光, 浅野知一郎, 西村英紀。マクロファージと共存する脂肪細胞を LPS 刺激した際に発現変動する miRNA の網羅的解

析，第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会，
2012 年 5 月 18 日，横浜

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山下 明子 (Akiko Yamashita)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：70511319