

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462853

研究課題名(和文)エクソソームで運ばれるmicroRNAは歯周病における歯槽骨破壊に関与するか？

研究課題名(英文)Are microRNAs in Exosomes Involved in Alveolar Bone Loss in Periodontal Disease?

研究代表者

鍵谷 忠慶 (KAGIYA, Tadayoshi)

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：30405774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、microRNAはエクソソームと呼ばれる細胞が分泌するナノ粒子の中に存在して、レシピエント細胞に対して機能することが判ってきた。本研究では、これまで炎症性サイトカインやLPSを中心に議論されていた歯周病の病態を、エクソソームという全く新しい視点から解明することを目的とする。炎症性サイトカインのTNF- α が、歯周病における免疫反応で重要なマクロファージへ作用すると、エクソソームの分泌が促進されて、その中のmicroRNA発現プロファイルが変化した。また、歯根膜線維芽細胞は、豊富にsmall RNAを含むエクソソームを分泌した。

研究成果の概要(英文)：Periodontal disease is an inflammatory disease caused by bacterial infection of tooth-supporting structures, which results in the destruction of alveolar bone. Exosomes are nano-sized particles, which contain microRNAs, mRNAs, proteins, and lipids. Recent studies have begun to uncover that exosomes play a role in cell-to-cell communication by the transfer of microRNAs to recipient cells. Focusing on alveolar bone loss in periodontal disease, this study aims at revealing functions of microRNAs in exosomes. TNF- α promoted the secretion of exosomes by macrophages, and it altered the expression profile of microRNAs in exosomes. Periodontal ligament fibroblasts abundantly secreted exosomes, which contain small RNAs.

研究分野：細胞生物学

キーワード：エクソソーム microRNA 細胞外小胞 破骨細胞 歯周病 ナノ粒子 バイオマーカー リキッドバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

近年、microRNA と呼ばれる新しい RNA の存在が明らかとなった。microRNA は、約 22 塩基長からなる 1 本鎖の non-coding RNA で、真核生物のゲノムにコードされており、細胞の分化、増殖、癌化などを制御することが報告されており、遺伝子発現制御を行う新たな分子であると考えられている。多くの microRNA は、RNA ポリメラーゼ II によってゲノム DNA から転写され、標的 mRNA の 3' 非翻訳領域 (UTR) に結合し、タンパク質への翻訳を制御する。発見当初、生成された microRNA は、細胞内で発現・機能すると考えられていたが、最近、細胞外へも放出され、機能するという報告が相次いでおり (Valadi *et al.*, *Nat Cell Biol*, 2007, Zhang Y *et al.*, *Cell*, 2010)、我々もマクロファージや破骨細胞について報告してきた。細胞外へ放出される microRNA には、Argonaute などのタンパク質と結合して直接放出される場合と細胞外小胞 (Extracellular Vesicles) に含まれて放出される場合がある。後者の場合、Extracellular Vesicles のなかでも特に、エクソソーム (Exosomes) と呼ばれる直径 50-100nm のエンドソームに由来する小胞が microRNA 輸送の中心的役割を担っていると考えられている。

さて、歯周病は、*P. gingivalis* に代表される歯周病原性細菌が、歯周組織に感染することによって引き起こされる。歯周病が進行すると歯槽骨が破壊されて、患者は歯を失うことになる。現在、この歯槽骨の破壊には、単球やマクロファージから分泌される TNF- α や IL-1 等の炎症性サイトカイン、あるいはグラム陰性菌の LPS が破骨細胞の分化や骨吸収を促進することが主たる原因と考えられている。

2. 研究の目的

上記のような背景のもとで、我々は新たな

視点からアプローチするべく、エクソソームが歯周病における歯槽骨の破壊に関与しているという仮説を立てて、これを証明することを研究目的とした。今回の研究では、特に以下を目標とする。

(1) 免疫反応で重要なマクロファージに着目し、炎症性サイトカインがマクロファージへ作用した時に放出されるエクソソームを含む細胞外小胞について解析する。

(2) ヒト口腔上皮細胞およびヒト歯根膜線維芽細胞が、エクソソームを分泌するかどうか検討する。分泌する場合、炎症性サイトカインがこれらの細胞にどのように影響するのか検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト単球様細胞株 THP-1 を 200nM PMA で 3 日間処理し、マクロファージ様細胞を誘導した。TNF- α 存在下、および非存在下で 3 日間培養し、培養上清を回収した。1,400 $\times g$ で 5 分間遠心後、200-nm pore size filter でろ過し、得られた培養上清中のエクソソームを含む細胞外小胞の直径と粒子数 NanoSight で計測した。また、培養上清を ExoQuick-TC で処理し細胞外小胞のペレットを回収し、RNA を抽出してマイクロアレイ法およびリアルタイム RT-PCR 法で microRNA の発現を解析した。

(2) 初代ヒト口腔上皮細胞と初代ヒト歯根膜線維芽細胞を 3 日間培養し、培養上清を回収した。前者については無血清で、後者については、細胞外小胞を除去した FBS を用いて培養した。上清を 1,400 $\times g$ で 5 分間遠心後、200-nm pore size filter でろ過し、得られた培養上清中のエクソソームを含む細胞外小胞の直径と粒子数を NanoSight で計測した。ヒト歯根膜線維芽細胞については、培養上清を ExoQuick-TC で処理して、エクソソームを含む細胞外小胞のペレットを回収し、RNA を抽出して Agilent 2100 Bioanalyzer で

解析した。更に、この RNA を用いて small RNA-Seq を行った。ライブラリー構築後、次世代シーケンサー Illumina HiSeq 2500 を使用し、Pair-End 法 100 塩基読み取りにより、塩基配列データを取得した。

4. 研究成果

ヒトマクロファージ様細胞から得られたエクソソームを含む細胞外小胞の粒子数と大きさの分布を TNF- α 刺激の前後で計測したところ、TNF- α 刺激前の粒子径の平均値は 133nm、モード値 117nm (図 1)、刺激 72 時間後の平均値は 136nm、モード値 117nm (図 2) であった。粒子数は刺激前で 2.99×10^8 個/mL、刺激 72 時間後 4.07×10^8 個/mL であった。このことから、ヒトマクロファージ様細胞が分泌する細胞外小胞は、TNF- α 刺激によって増加するが、粒子径はほとんど変化しないことが、示唆された。

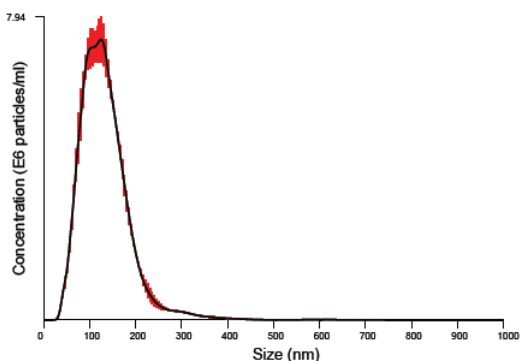


図 1 TNF- α 刺激前
横軸は粒子径、縦軸は粒子数を示す

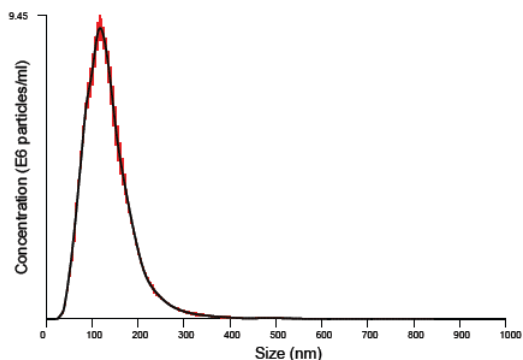


図 2 TNF- α 刺激後
横軸は粒子径、縦軸は粒子数を示す

次に、TNF- α 刺激の前後で細胞外小胞内の RNA を回収し、microRNA の発現をマイクロアレイ法で網羅的に解析した。TNF- α 刺激前の生理的状態の細胞外小胞内では、調べた 1,222 種類の microRNA のうち、53 種類の発現が確認された。特に、miR-1246, miR-574-5p, miR-4281 がこの順に多く発現していた。一方、TNF- α 刺激 72 時間後の細胞外小胞内では、発現する microRNA の種類が増えた。解析した 1,222 種類のうち、100 種類が 2 倍以上の発現変動を示した。発現量の多い上位 10 種類程度の microRNA のプロファイルには、TNF- α 刺激の前後で大きな変化はなかった。しかし、それ以下の発現順位のプロファイルは大きく変化していた。特に、miR-146a, miR-378, let-7b, miR-16, miR-21, および miR-670 については、TNF- α 刺激で有意に発現が上昇した。

今度は、初代ヒト口腔上皮細胞が、エクソソームを分泌するかどうかについて検討した。口腔上皮細胞から得られた培養上清中における細胞外小胞の粒子数と粒子径の分布を計測したところ、粒子径の Mode 値は 108.3nm、粒子数は 5.3×10^8 個/mL であった。初代ヒト歯根膜線維芽細胞についても同様な解析を行った。歯根膜線維芽細胞では、粒子径の Mode 値は 108.9nm、粒子数は 5.6×10^9 個/mL であった。これより口腔上皮細胞は、エクソソームを分泌するが、その量は少なく、歯根膜線維芽細胞の 1/10 程度である可能性が示唆された。そこで、ヒト口腔上皮細胞では、かなり大量に細胞培養する必要がある、予算等の都合もあるので、歯根膜線維芽細胞から分泌されるエクソソーム内の small RNA について解析した。Agilent 2100 Bioanalyzer による解析では、20 - 1,000 nt の範囲の RNA が多かった。特に 20 - 200 nt が豊富に存在した。small RNA-Seq 解析の結果、歯根膜線維芽細胞由来のエクソソームには、33 nt の isomiR-X1、32 nt の isomiR-X2、

そして miR-Y がこの順に多く存在することが判った。以上より、ヒト歯根膜線維芽細胞はヒト口腔上皮細胞よりも豊富に small RNA を含むエクソソームを分泌する可能性が示唆された。

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2件)

- ① Kagiya T. MicroRNAs: Potential Biomarkers and Therapeutic Targets for Alveolar Bone Loss in Periodontal Disease. International Journal of Molecular Sciences 2016; 17(8): e1317. (査読有)
DOI: 10.3390/ijms17081317

- ② Kagiya T. MicroRNAs and Osteolytic Bone Metastasis: The Roles of MicroRNAs in Tumor-Induced Osteoclast Differentiation. Journal of Clinical Medicine 2015; 4(9): 1741-1752. (査読有) DOI: 10.3390/jcm4091741

[学会発表] (計4件)

- ① 鍵谷 忠慶: TNF- α はマクロファージの microRNA を含む細胞外小胞エクソソームの分泌を促進しその発現プロファイルを変化させる 第 57 回日本組織細胞化学会 学術集会 2016 年 9 月 3 日 杏林大学 (三鷹市)
- ② 鍵谷 忠慶: 癌の骨転移における microRNA の関与の可能性について 九燦團会 2016 年 8 月 11 日 九州大学医学部 百年講堂 (福岡市)
- ③ 鍵谷 忠慶: 破骨細胞分化に関与する microRNA について 第 18 回 癌と骨病変研究会 2015 年 11 月 13 日 千代田放送会館 (東京都) (招待講演)

- ④ 鍵谷 忠慶: 破骨細胞分化過程における細胞外小胞での microRNA の発現について 第 120 回日本解剖学会全国学術集会 2015 年 3 月 22 日 神戸国際会議場 (神戸市)

[図書] (計1件)

- ① Kagiya T. Roles of MicroRNAs in Osteoclast Differentiation and Function. In: Cecelia Reeves, editor. Osteoclasts: Cell Biology, Functions and Related Diseases. New York: Nova Science Publishers 2015; Chapter1:1-18. (査読有)
ISBN: 978-1-63483-906-8
ISBN: 978-1-63483-927-3 (eBook)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等
Researchmap:
<http://researchmap.jp/read0124350/>

ResearchGate:
https://www.researchgate.net/profile/Tadayoshi_Kagiya

岩手医科大学リポジトリ:
<https://iwatemed.repo.nii.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鍵谷 忠慶 (KAGIYA, Tadayoshi)

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：30405774

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()