

## 論文審査の結果の要旨

氏名：松井 沙莉

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：MicroRNA-223 regulates inflammatory cytokine production in human gingival fibroblasts

（マイクロ RNA-223 はヒト歯肉線維芽細胞での炎症性サイトカインの合成を調節する）

審査委員：（主査） 日本大学教授 博士（理学） 吉垣 純子

（副査） 日本大学教授 歯学博士 松島 潔

（副査） 日本大学教授 歯学博士 小方 頼昌

歯周病は、歯周病原菌に起因する感染症であるが、環境および宿主因子が、歯周病の発症と進行に大きく影響する。歯周炎局所での慢性炎症は、持続的な炎症性サイトカインの産生を引き起こし、好中球、マクロファージおよび線維芽細胞からのマトリックスメタロプロテアーゼやプロスタグランジンの産生を誘導し、破骨細胞の活性化や歯周組織の破壊に関与すると考えられる。

microRNA (miRNA) は、細胞内に存在する長さ約 22 塩基のノンコーディング RNA で、遺伝子の発現調節機能を有し、様々な疾患に関係することが報告されている。歯周炎の発症と進行への miRNA の役割を解明するために、炎症性歯肉と非炎症性歯肉から抽出した全 RNA を使用した miRNA マイクロアレイを行い、炎症性歯肉で発現が増加または減少する miRNA の検索を行った。さらに、ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) での炎症性サイトカイン遺伝子発現に対する miRNA の影響について解析を行った。

歯肉剥離搔爬手術およびインプラント 2 次手術時に得られた炎症性および非炎症性歯肉から全 RNA を抽出し、miRNA マイクロアレイを行った結果、炎症性歯肉で最も発現が増加した 3 つの miRNA は、miR-150、miR-223 および miR-200b であった。一方、発現が減少した 3 つの miRNA は、miR-379、miR-199a-5p および miR-214 であった。miR-223 は、血小板から分泌され、終末糖化産物により誘導される血管内皮細胞のアポトーシスを引き起こし、ガン、炎症、2 型糖尿病、リウマチ、自己免疫性疾患等に関与することから、歯周病への関与が示唆される。そこで、miR-223 発現プラスミドを HGF に導入し、IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) または TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) で 24 時間刺激後、全 RNA およびタンパク質を抽出した。炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  および IL-6、miR-223 の標的遺伝子である I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  (IKK $\alpha$ ) および mitogen-activated protein kinase phosphatase 5 (MKP-5) の遺伝子発現レベルをリアルタイム PCR で、タンパク質発現レベルを ELISA または Western blot 法で検索した。

歯肉線維芽細胞 (HGF) を IL-1 $\beta$  または TNF- $\alpha$  で刺激すると、IL-1 $\beta$  と IL-6 の mRNA 量は増加し、miR-223 を過剰発現させると、IL-1 $\beta$  と IL-6 の mRNA 量はさらに増加した。HGF での IL-1 $\beta$  と IL-6 の mRNA 量は、IL-1 $\beta$  または TNF- $\alpha$  刺激で増加し、miR-223 インヒビターを導入すると、IL-1 $\beta$  および IL-6 の mRNA 量は減少した。HGF を IL-1 $\beta$  刺激し miR-223 を過剰発現させると、IL-1 $\beta$  および IL-6 タンパク質の顕著な増加が認められた。

miR-223 の標的遺伝子である MKP-5 の mRNA 量は、miR-223 を過剰発現させると減少したが、

IKK $\alpha$  の mRNA 量は、miR-223 を過剰発現しても変化しなかった。しかし、Western blot の結果から、miR-223 を過剰発現させると IKK $\alpha$  のタンパク質量は減少した。一方、miR-223 を過剰発現させるとリン酸化 p38 MAPK のタンパク質量は増加した。

以上の結果から、miR-223 は IKK $\alpha$  の発現を、mRNA の分解ではなく、翻訳阻害のプロセスで発現を抑制すると考えられた。IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  刺激で増加した IL-1 $\beta$  および IL-6 の発現が、miR-223 の作用でさらに増加したのは、miR-223 が NF- $\kappa$ B の活性を抑制する IKK $\alpha$  と p38 MAPK の活性を抑制する MKP-5 を阻害したためと考えられた。

miRNA マイクロアレイによる解析の結果、炎症性歯肉で miR-150、miR-223 および miR-200b の発現増加が認められた。miR-223 は、歯肉線維芽細胞での炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$  および IL-6) の発現を誘導し、歯周病の発症および進行に関与すると考えられる。miRNA と歯周炎の発症および進行のメカニズムを解明することは、新規の歯周病の診断や治療法の開発に役立つと考えられ、歯周治療の発展に大きく寄与するものである。

よって本論文の著者は、博士 (歯学) の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成27年12月24日