

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K19015

研究課題名（和文）RNA-Seq解析を用いた高齢マウスにおける歯周炎関連骨吸収因子の同定

研究課題名（英文）Identification of periodontitis-associated bone resorption factors in aged mice using RNA-Seq analysis

研究代表者

大方 広志（OKATA, Hiroshi）

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：70709138

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：歯周病は加齢に伴い罹患率が上昇する疾患であるが、加齢と歯周炎の病態を関連付けた報告はほとんどなく、加齢が歯周炎関連の骨吸収に与える影響については知見が乏しい。本研究では、歯周炎により歯槽骨吸収を起こした組織に発現している遺伝子を網羅的に解析し、高齢マウスと若齢マウスとで比較検討した。その結果、歯槽骨吸収に対して歯周炎による炎症と加齢に交互作用はなく、それぞれ独立して歯槽骨吸収に関与することがわかった。一方で、歯周炎による炎症は破骨細胞数の増加に影響するが、加齢は影響しないことが示された。また、歯周炎が起こると炎症関連遺伝子の発現が上昇し、加齢に伴い免疫関連の遺伝子発現が上昇することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周炎に起因する歯槽骨吸収に関する従来の研究の多くは成熟した若い個体を対象にしており、高齢個体における詳細は不明であったが、本研究において、加齢により影響を受ける歯周炎関連骨吸収因子の遺伝子発現パターンを明らかにした。本研究により得られた成果は、歯周炎による歯槽骨吸収の分子メカニズムの解明に貢献するものである。

研究成果の概要（英文）：Periodontitis is a disease whose prevalence increases with age and is a major cause of tooth loss in the elderly. Despite this, there have been few reports on the relationship between aging (physiological aging) and periodontitis, and there is little biological knowledge on the effect of aging on periodontitis-associated bone resorption. In this study, the genes expressed in the tissues that experimentally caused periodontitis were comprehensively analyzed and compared between aged and young mice. The results showed that there was no interaction between inflammation caused by periodontitis and aging on alveolar bone resorption, and each was independently involved in alveolar bone resorption. While inflammation due to periodontitis affected the number of osteoclasts, but not aging. It also showed that inflammation-related gene expression increases with periodontitis and immune-related gene expression increases with aging.

研究分野：保存治療系歯学関連

キーワード：老化 歯周炎 歯槽骨吸収 網羅的遺伝子解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周病は歯周病性細菌により惹起される感染症で、加齢に伴い罹患率が上昇する疾患である。特に、歯槽骨の吸収を伴う歯周炎は歯を喪失する主な原因となることから、歯科臨床において歯周炎の予防と治療は重要な課題となっている。骨量や骨塩量は加齢(生理的老化)に伴い減少することが知られているが、加齢と歯周炎の動態を関連付けた報告はなく、高齢における歯周炎性骨吸収の分子メカニズムは不明である。

(2) ノーザンプロットや定量 PCR に代表される従来の遺伝子発現解析方法は、目的分子の遺伝子配列情報を基にして特異的なプライマーあるいはプローブを作製し、それらを標的遺伝子に結合させることで遺伝子発現を検出していた。この方法では、多数の分子の遺伝子発現情報を得るために、多大な時間と労力を要することになる。一方、次世代シーケンサーを用いた新規の遺伝子発現解析手法である RNA-seq や CAGE (cap analysis of gene expression) は、未知の遺伝子を含めて、数千万から数億の DNA 断片の塩基配列を同時並行的に解読し、発現遺伝子を同定することを可能とする。

2. 研究の目的

網羅的遺伝子解析法の一つである CAGE を用いて、歯周炎により歯槽骨吸収を起こした組織における遺伝子発現パターンを高年齢マウスと若年齢マウスとで比較検討することで、加齢が歯周炎関連の骨吸収に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウス実験的歯周炎モデルの作製

実験動物として、生後 10 週齢と 78 週齢の C57BL/6 系雄性マウスを用いた。
全身麻酔下にて上顎左側第一臼歯歯頸部を 5-0 絹糸で結紮し、若年齢結紮群と高齢結紮群とした。反対側(右側)は結紮を行わず、若年齢非結紮群と高齢非結紮群とした。
結紮後 10 日目に結紮糸を除去し、以下の解析に用いた。

(2) マイクロ CT を用いた歯槽骨吸収量の解析

結紮後 10 日目にマウスの上顎を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定した。
マイクロ CT を用いて固定後の試料を撮影した。
歯周炎による歯槽骨吸収部の三次元画像を構築し、骨吸収量を三次元的に解析し、4 群で統計学的に比較検討した。

(3) 酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色

マイクロ CT 撮影後の試料を脱灰し、パラフィン包埋後、5 μ m 厚の連続切片を作製した。
切片に TRAP 染色を施して光学顕微鏡で観察した。
TRAP 陽性細胞数をカウントし、4 群で統計学的に比較検討した。

(4) CAGE

結紮後 10 日目にマウスの上顎を摘出し、超音波ホモゲナイザーで破碎後、トータル RNA を抽出した。
RNA サンプルを株式会社ダナフォームに送り、CAGE を依頼した。
CAGE 法による網羅的遺伝子解析のデータを受領後、発現変動遺伝子について GO 解析を行った。

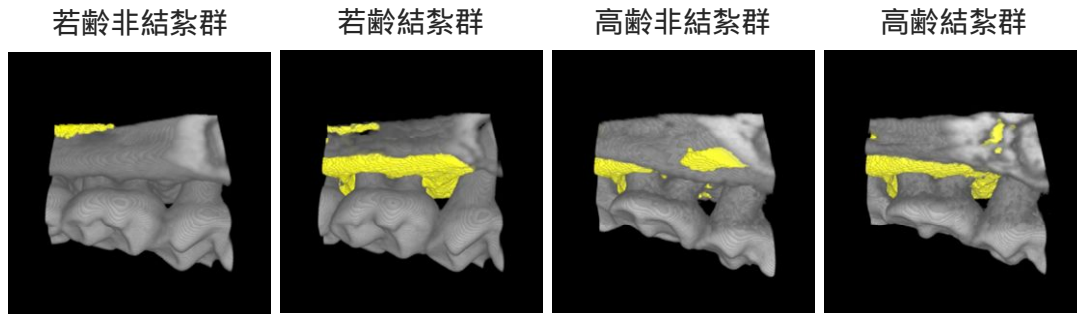
(5) 免疫組織化学による MMP-9 と MMP-13 のタンパク質発現の検討

マイクロ CT 撮影後の試料を脱灰し、パラフィン包埋後、5 μ m 厚の連続切片を作製した。
切片を脱パラフィン後、3%過酸化水素水加メタノールにて内因性ペルオキシダーゼ不活性化処理を行った。
PBS で洗浄後、5%ヤギ血清/PBS を切片に滴下してブロッキング処理し、MMP9 と MMP13 の一次抗体を用いて室温にて 2 時間反応させた。
PBS で洗浄後、30 分間二次抗体を反応させ、DAB 染色を施し、メチルグリーンにて対比染色を行った。

4. 研究成果

(1) マイクロ CT 解析による歯槽骨吸収の評価

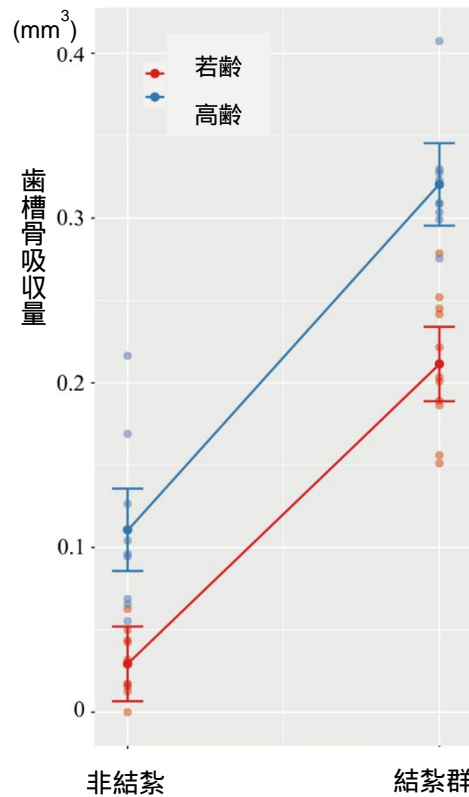
上顎第二臼歯部付近のマイクロ CT 画像を図 1 に示す。若年齢と高齢の結紮群で、第二臼歯部周囲に歯槽骨吸収がみられた。また高齢では、非結紮群でも骨吸収が認められた。



(図 1：結紮後 10 日目の歯槽骨吸収部 (黄色で示す領域が骨吸収部))

(2) 歯槽骨吸収に対する加齢と炎症の影響

マイクロ CT 画像をもとに歯槽骨吸収量を算出し、統計学的に評価した(図 2)。非結紮群では、若齢よりも高齢で骨吸収量が大きいことがわかった。結紮群においても、骨吸収量は若齢よりも高齢で大きいことが示された。また、若齢と高齢の両方において、非結紮群より結紮群で有意に骨吸収量が増加した。二元配置分散分析の結果、結紮、つまり結紮により誘導された炎症と加齢はそれぞれ骨吸収に対して有意であったが、炎症と加齢の二要因に交互作用は認められなかった。



(図 2:結紮後 10 日目の歯槽骨吸収量)

(3) 破骨細胞数に対する加齢と炎症の影響

破骨細胞を検知するため、TRAP 染色を行い、TRAP 陽性細胞の数をカウントし(表 1)、二元配置分散分析を行った。

群	若齢		高齢	
	非結紮群	結紮群	非結紮群	結紮群
TRAP陽性細胞数	1	53	11	32
	14	35	17	39
	6	42	10	50
	9	29	19	25
	13	24	23	21
平均値	8.6	36.6	16.0	33.4
標準偏差	5.3	11.4	5.5	11.5

(表 1：TRAP 陽性細胞数)

若齢においても高齢においても、結紮群で TRAP 陽性細胞数を増加し、若齢では有意差が認められたが、高齢では有意差はみられなかった。また、非結紮群では若齢より高齢で、結紮群では高齢より若齢で TRAP 陽性細胞数が多いことがわかった。さらに、結紮により誘導された炎症は TRAP 陽性細胞数に有意に影響したが、加齢は影響せず、炎症と加齢の二要因に交互作用がみられなかった。

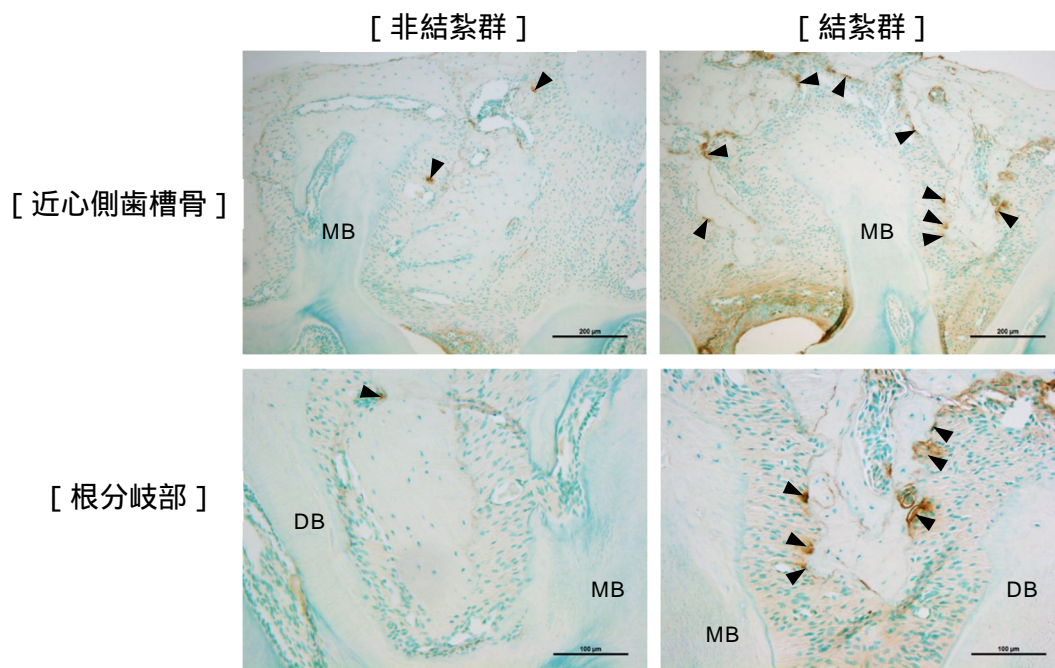
(4) GO (gene ontology) 解析の結果

CAGE を行い発現上昇する発現変動遺伝子を抽出し、GO 解析を行った。若齢では、非結紮群に比べて結紮群で 25 遺伝子の発現が有意に上昇した。上位 3 つの GO term は全て炎症に関連があった。つまり、結紮群で発現上昇した遺伝子は「炎症反応」に関連するものが多いことを示している。次に、高齢の非結紮群と結紮群との比較では、6 遺伝子が発現変動し、その全てが結紮群において発現上昇したが、非結紮群との間に有意差は認められなかった。また、非結紮群においては、若齢と比べて高齢で 199 遺伝子の発現が有意に上昇し、上位 5 つの GO term は全て免疫反応に関連するものであった。結紮群においても、若齢と比べて高齢で 331 遺伝子の発現が有意に上昇した。上位 3 つの GO term は全て免疫反応に関連があった。

(5) 若齢の歯周組織における MMP-9 の発現

破骨細胞のマーカー分子でもある MMP-9 の免疫染色を行った。MMP-9 免疫陽性細胞は骨表面に存在し、その多くが多核であったことから、破骨細胞であると推測される。MMP-9 免疫陽性細胞

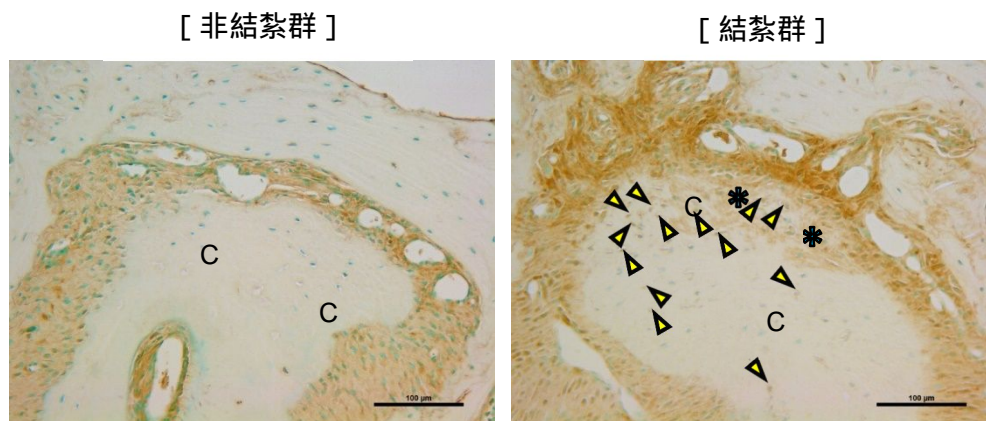
の数は結紮群において顕著に多く、非結紮群では少なかった（図3）。



（ 図3：若齢非結紮群と若齢結紮群の歯槽骨における MMP-9 の発現
 （MB：第二臼歯近心根、DB：第二臼歯遠心根、矢頭：MMP-9 免疫陽性細胞）

（6）若齢の歯周組織における MMP-13 の発現

非結紮群の上顎第二臼歯歯根では、セメント質に MMP-13 の免疫反応はみられなかったが、結紮群においては、上顎第二臼歯歯根の根尖部セメント質に強い MMP-13 の免疫陽性反応が認められ、その内部と周囲に存在するセメント細胞の多くが MMP-13 陽性であった（図4）。



（ 図4：若齢非結紮群と若齢結紮群のセメント質における MMP-13 の発現
 （C：セメント質、*：MMP-13 免疫陽性セメント質、矢頭：MMP-13 免疫陽性細胞）

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 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村恵, Mu-Chen Yang, 山口哲史, 大方広志, 笹野泰之
2. 発表標題 マウス実験的歯周炎モデルを用いた加齢と炎症が及ぼす歯槽骨吸収への影響
3. 学会等名 第66回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菅野千春, 中村恵, 大方広志, 山本寿則, 笹野泰之
2. 発表標題 マウス実験的歯周炎におけるMMP9とMMP13の発現に関する検討
3. 学会等名 第66回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 笹野泰之, 中村恵, 逸見晶子, 大方広志, 鈴木治, 眞柳みゆき
2. 発表標題 硬組織石灰化進行過程の分析走査電子顕微鏡による元素イメージング解析
3. 学会等名 第61回日本組織細胞化学会総会・学術集会シンポジウム「分子組織細胞化学の最前線と未来への展望」(招待講演)
4. 発表年 2020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
---------	---------