

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03864

研究課題名(和文) 歯周病進行の細菌・分子間ダイナミクス制御に基づく歯周病重症化予測診断法の開発

研究課題名(英文) Prediction of periodontal disease progression by a mathematical model

研究代表者

藤原 千春 (Fujihara, Chiharu)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：00755358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病の進行過程において歯肉組織を用いた細菌叢・RNAシーケンス解析を展開し、解析の結果から、細菌・分子レベルで歯周病の進行に特異的な経路を同定した。そして、同定された分子と細菌の相互作用を数理モデル化した。さらに、数理モデルを解析することにより、システムレベルにおいて歯周病の重症化に大きな影響を与える要因を検討した。その結果、単球の遊走に関わる分子並びに細菌の感染が歯槽骨の吸収量に影響を及ぼすことが予測された。そこで、これらモデルで予測された結果を、*in vivo*実験にて検証した。本研究により、構築した数理モデルの有用性が示され、歯周病重症化の予測診断技術開発に向けた基盤が構築できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は歯の喪失を招く第一の原因である。そのため、歯周病が重症化するのを予測・予防することが、人々の健康増進やQOLの維持には重要である。しかしながら、歯周病の重症化を正確に予測する実用的な診断技術は未だ開発されていない。そこで本研究では、歯周病の重症化を制御している細菌や遺伝子発現変化のダイナミクスをシステムレベルで捉えるために、システムバイオロジーの解析法を取り入れて歯周病重症化を予測する技術開発の基盤となる研究を実施した。本研究で構築されたモデルは、ヒト検体を用いて改良することで、個々の歯周病患者の重症化を予測することが可能となり、歯周病の個別化医療の実現に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We performed microbiome analysis and RNA sequencing analysis using gingival tissue during the progression of periodontal disease in mice and identified pathways specific to periodontal disease progression at the bacterial and molecular levels. We then developed a mathematical model of the interaction between the identified molecules and bacteria. Furthermore, by analyzing the mathematical model, we identified the factors that significantly influence the alveolar bone integrity in periodontal disease at the systems level. As a result, we predicted that molecules involved in monocyte migration and bacterial infection would affect alveolar bone resorption. We further validated the predictions by *in vivo* experiments. This study demonstrated that the mathematical model is useful for the development of prognosis and diagnosis of periodontal disease progression.

研究分野：歯学

キーワード：歯周病重症化予測 RNAシーケンス マイクロバイオーム マウスモデル 数理モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯の喪失を招く第一の原因である。そのため、歯周病が重症化するのを予測・予防することが、人々の健康増進や QOL の維持には重要である。しかしながら、歯周病の重症化を正確に予測する実用的な診断技術は未だ開発されていない。歯周病は、複数の遺伝子が遺伝因子や細菌因子に影響することで、同疾患の発症や進行を誘導すると考えられるので、その重症化を予測するためには、これら複数の因子が、時間の経過と共に、相互にどの程度寄与・連携しているのかを評価し、システムレベルでの理解を追求する必要がある。しかしながら、従来の *in vitro* や *in vivo* の実験的研究法では困難であった。そこで本研究では、これらの因子を制御している細菌や遺伝子発現変化のダイナミクスをシステムレベルで捉えるために、システムバイオロジーの解析法を取り入れて歯周病重症化を予測する技術の基盤研究を実施した。

2. 研究の目的

- (1) 歯周病学とシステムバイオロジーの融合研究を遂行し、従来の研究手法では困難であった、歯周病重症化の細菌・分子間のダイナミクスを数理モデル化する。
- (2) 構築した数理モデルを解析することにより、歯周病重症化の病態制御機構をシステムレベルで解明し、歯周病で誘導される歯槽骨の吸収を予測する技術の基盤を構築する。

3. 研究の方法

- (1) 歯周病誘導歯肉の時系列マイクロバイオーム解析及び RNA シークエンス解析
歯周病の重症化を制御する細菌や遺伝子のダイナミクスを検討するために、歯周病誘導マウスと非歯周病マウスから経時的に歯肉を採取して 16s rRNA シークエンス解析及び RNA シークエンス解析を遂行した。加えて、RNA シークエンス解析で検出された遺伝子の発現細胞を同定するために、歯周病を誘導したマウスの歯肉を用いて、シングル核 RNA シークエンス解析を実施した。さらに、マイクロ CT 解析により、歯槽骨の吸収量を測定した。これらの結果を基に、歯周病進行の制御図を作成した。
- (2) 歯周病重症化の数理モデルの構築とその解析
歯周病進行の制御図と実験値を基に、歯周病が進行する様子を常微分方程式で記述した。そして、シミュレーションソフト BioMASS を用いて、パラメータ推定を行った。グラム陰性菌の割合を in put、歯槽骨量を out put として、歯槽骨量を *in silico* にてシミュレーション解析した。さらに、BioMASS を用いて、構築した数理モデルの感度解析を実施することにより、歯槽骨の吸収に影響を与えるリアクション (パラメータ) を予測した。
- (3) *in vivo* 実験による数理モデルの予測結果の検証
(2) で同定された分子を欠損したマウスに歯周病を誘導し、歯槽骨の量がどのように変化するかをマイクロ CT 解析にて検討した。
- (4) 臨床検体を用いた数理モデルの予測結果の検証
異なる重症度の歯周病患者と健康者の患歯より歯肉溝滲出液 (GCF) を採取して、GCF 中に含まれるケモカイン CCL2 の産生量を ELISA 法を用いて検討した。

4. 研究成果

- (1) 歯周病誘導歯肉の時系列マイクロバイオーム解析及び RNA シークエンス解析
歯周病誘導マウスと非歯周病マウスから経時的に歯肉を採取して 16s rRNA シークエンス解析及び RNA シークエンス解析を遂行した。16s rRNA シークエンス解析の結果を taxonomy 解析した結果、健常歯肉と比較して歯周病歯肉では Proteobacteria の割合が経時的に増加した (図 1)。また、時系列 RNA シークエンス解析のクラスタリング解析並びにエンリッチメント解析

を実施した結果、歯周病で機能上昇を認めることが報告されている Toll-like receptor シグナル、白血球の遊走、破骨細胞の分化、上皮の破壊と増殖、軟骨の分化などに関連する遺伝子の発現上昇を認めた。これらの解析結果を基に、歯周病重症化の制御図を作成した (図 2)。

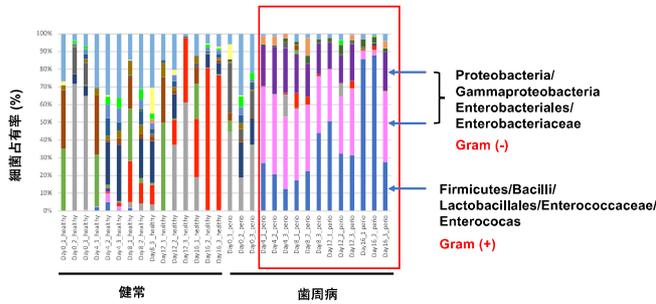


図 1 歯周病誘導マウスの歯肉では Proteobacteria の増加を認めた。

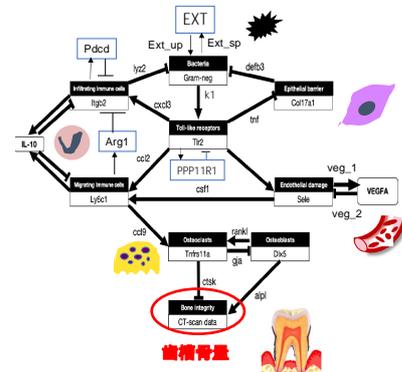


図 2 歯周病重症化制御図

(2) 歯周病重症化の数理モデル構築とモデルの解析

数理モデルの感度解析の結果より、グラム陰性細菌の増加、破骨細胞の活性、単球の遊走などに関わる因子が、歯周病病態下の歯槽骨吸収に影響を及ぼすことが予測された (図 3)。

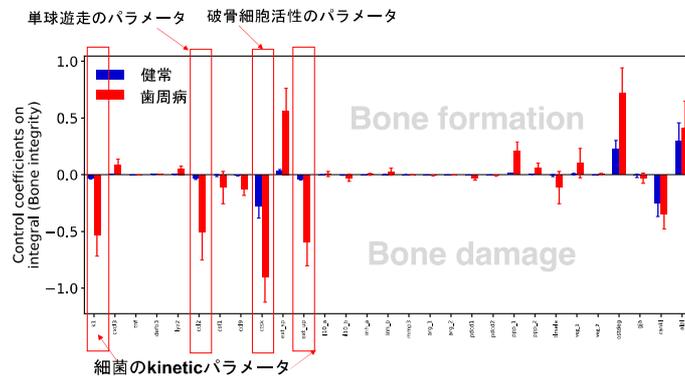


図 3 数理モデルの感度解析の結果

(3) *in vivo* 実験による数理モデルの予測結果の検証

モデルの解析で予測された単球の遊走を制御する *Ccl2* 並びに *Ccr2* 遺伝子を欠損させたマウス (*Ccl2* KO, *Ccr2* KO) と野生型マウス (WT) マウスに歯周病を誘導し、歯周病で誘導される歯槽骨吸収量を比較した。その結果、*Ccl2* KO 並びに *Ccr2* KO マウスでは歯周病で誘導される歯槽骨吸収の抑制を認めた (図 4)。

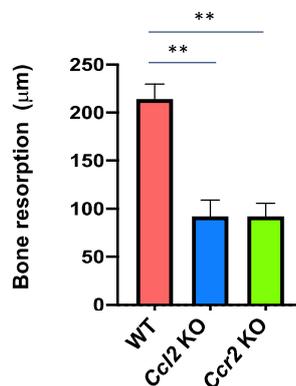


図 4 *Ccl2* KO 及び *Ccr2* KO マウスでは歯周病で誘導される歯槽骨吸収が抑制された。

(4) 臨床検体を用いた数理モデルの予測結果の検証

重症度の異なる歯周病患者 18 名の GCF 中に含まれる CCL2 タンパクの量を ELISA 法にて測定

した。その結果、歯周病の重症化に伴い、GCF 中に含まれる CCL2 量の増加を認めた (図 5)。

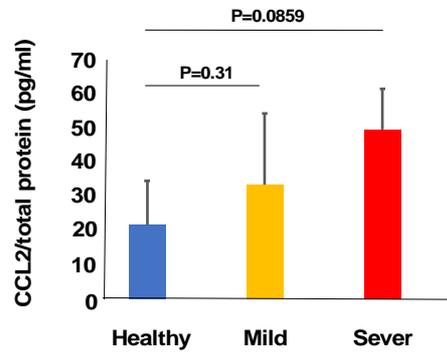


図 5 歯周病患者の GCF 中に含まれる CCL2 量は病気の重症度と比例して増加した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 村上伸也、藤原千春、岩山智明	4. 巻 39(2)
2. 論文標題 歯周病新分類の解釈とその応用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本臨床歯周病学会誌	6. 最初と最後の頁 20-26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Chiharu Fujihara, Teerachate Nantakeeratipat, Shinya Murakami	4. 巻 1
2. 論文標題 Energy Metabolism in Osteogenic Differentiation and Reprogramming: A Possible Future Strategy for Periodontal Regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Dental Medicine	6. 最初と最後の頁 815140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fdmed.2022.815140	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Chiharu Fujihara
2. 発表標題 Elucidation of pathogenesis of periodontal disease using a mathematical modeling
3. 学会等名 the 2nd Ankara-Osaka University Dental Workshop（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原 千春, Teerachate Nantakeeratipat, Wibisana, Johannes Nicolaus, 飯田 溪太, 井元 宏明, 岡田 眞里子, 村上伸也
2. 発表標題 オミクス解析を用いた歯周病による組織破壊機構の理解
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Teerachate Nantakeeratipat, Chiharu Fujihara, Johannes Nicolaus Wibisana, Hiroaki Imoto, Keita Iida, Mariko Okada and Shinya Murakami
2. 発表標題 Building a mathematical model of periodontal disease
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤原 千春, Teerachate Nantakeeratipat, 井元宏明、岡田眞里子、村上伸也
2. 発表標題 数理モデルを用いた歯周病重症化の病因解明
3. 学会等名 第43回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原千春、村上伸也
2. 発表標題 数理モデルを用いた歯周病進行の病態理解
3. 学会等名 第40回日本骨代謝学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原千春、村上伸也
2. 発表標題 歯周病における歯槽骨吸収に影響を及ぼす要因の検討 藤原千春、村上伸也
3. 学会等名 第157回日本歯科保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2022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
研究分担者	岡田 眞里子 (OKADA MARIKO) (10342833)	大阪大学・蛋白質研究所・教授 (14401)	
研究分担者	三木 康史 (MIKI KOJI) (10598395)	大阪大学・歯学部附属病院・助教 (14401)	
研究分担者	柏木 陽一郎 (KASHIWAGI YOICHIRO) (20598396)	大阪大学・大学院歯学研究科・助教 (14401)	
研究分担者	村上 伸也 (MURAKAMI SHINYA) (70239490)	大阪大学・大学院歯学研究科・教授 (14401)	

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			
英国	Imperial College London			
タイ	Srinakharinwirot University			