

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19595

研究課題名（和文）p-dentistry確立に向けた歯周病発症予測法の開発

研究課題名（英文）Developing prediction of periodontal disease to realize p-dentistry

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） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：歯周病の発症・進行を予測するための指標を検討するために、歯周病誘導マウスの歯肉を回収し、RNAシーケンス解析を実施した。結果、歯周病誘導の初期にミトコンドリア関連遺伝子の発現変動を認めた。そこで、歯周組織におけるミトコンドリアの機能が歯周病に及ぼす影響について検討した。歯周組織を構成する歯根膜細胞において、ミトコンドリアの機能低下が同細胞の硬組織形成細胞への分化を抑制することが示された。また、ミトコンドリアの機能を向上させる薬剤を投与したマウスでは、歯周病による歯槽骨吸収が抑制された。これにより、歯周病におけるミトコンドリア機能の関与が明らかとなり、疾患予測の指標となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果より、歯周病の発症・進行にミトコンドリア機能が重要であることが明らかとなった。この結果により、ミトコンドリアの機能を測定することにより、将来的に歯周病の発症や進行が予測できる診断法を開発することができる。それにより、歯周病の発症や重症化を防ぐことで、歯周病にかかるリスクの低下、歯周病に伴う全身疾患の合併症の回避、予防処置による歯科医療費の削減につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：To investigate indicators for predicting the onset and progression of periodontitis, we collected gingival tissue from mice induced with periodontitis and performed RNA sequencing. The results revealed changes in the expression of mitochondrial-related genes in the early stages of periodontitis. Consequently, we examined the impact of mitochondrial function in periodontal tissues on periodontitis. It was demonstrated that mitochondrial dysfunction in periodontal ligament cells, which consist of periodontal tissue, inhibits the differentiation of these cells into hard tissue-forming cells. Furthermore, in mice administered with drug that enhances mitochondrial function, alveolar bone resorption caused by periodontitis was suppressed. This study elucidates the involvement of mitochondrial function in periodontitis and suggests its potential as an indicator for predicting the disease.

研究分野：歯学

キーワード：歯周病 RNAシーケンス ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

近年欧米を中心として、Predictive (予測的)、Prevention (予防的)、Preemptive (先制)、Personalized (個別的) な医療 (p-medicine) が 21 世紀の目指すべき医療の理想像として提唱されている。すべからく、歯科医療においてもこの新潮流を汲み、患者別に疾患発症のタイミングを検知し、発症前に診断することにより、未病段階で超先制的医療介入を施す医療 (p-dentistry) が次世代型歯科医療として期待されている。しかしながら、今日において、p-dentistry を実現するための具体的な議論や戦略立案は全く為されていない。仮に、p-medicine を実現するために必要な、病気の発症前段階を検知する手段や方法論が特定できれば、従来の治療中心の医療システムとは全く異なる新しい予防を中心とした医療システムへの変革が可能となる。

## 2. 研究の目的

そこで申請者らは、歯周治療における p-dentistry の実現を目指すために、自身が構築した歯周病進行の時系列網羅的遺伝子発現データベースを用いて歯周病の発症・進行を予測するための指標を探索することを目的として研究を実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) 歯周病進行時において特徴的な発現変化を示す遺伝子ネットワークについての検討

野生型マウスの第二臼歯に絹糸を巻き、歯周病を誘導した。また、絹糸を巻いていない群を健常群とした。歯周病誘導後 4 日おきに歯肉組織を回収し、RNA シークエンス解析を実施した。得られた結果の DEG 解析を実施し、健常群と比較して 2 倍以上の発現上昇を認めた遺伝子群のクラスター解析を実施した。そして、各クラスターの遺伝子ネットワーク解析を実施した。

### (2) 歯周組織構成細胞におけるエネルギー代謝経路の同定

歯根膜細胞を用いて、同細胞が硬組織形成細胞へと分化する過程においてどのようなエネルギー代謝経路を利用するのかを Seahorse XF を用いて検討した。さらに、歯根膜細胞を脂質代謝阻害薬である Lalistat-2 (10  $\mu$ M) で処理した際の、ミトコンドリアの機能を Seahorse XF Cell Mito Stress キットを用いて評価した。

### (3) 歯周病誘導過程におけるミトコンドリア発現の検討

ミトコンドリアのマーカー遺伝子 COX8 発現細胞において GFP の発現を認めるマウス (mtGFP マウス) に歯周病を誘導し、day 0 (誘導直後) と day 8 (歯周病による病態がピークになる前) に歯周組織を回収して、免疫染色とフローサイトメーターにより GFP 陽性細胞数の変化を検討した。

### (4) ミトコンドリア機能回復薬の投与による歯周病抑制効果の検討

野生型マウスにコーン油に混ぜたミトコンドリア機能回復薬を経口投与した。コントロールマウスにはコーン油単独を経口投与した。これらマウスに歯周病を誘導し、歯周病誘導による歯槽骨吸収量を  $\mu$ CT を用いて測定し、その量を比較・検討した。

### (5) 歯周病患者の検体におけるミトコンドリア関連因子の発現検討

メンテナンス中の患者より歯肉溝滲出液 (GCF) を採取し、歯周検査、レントゲン撮影を実施した。GCF 中に含まれるシトクロム c の量を ELISA を用いて測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 歯周病進行時において特徴的な発現変化を示す遺伝子ネットワークについての検討:

歯周病と健常マウスの歯肉の RNA シークエンス解析を実施し、パイオインフォーマテ

イクス解析を実施した結果、クラスター5において、一過性に発現低下を認める特徴的な遺伝子群を認めた。これら遺伝子群のネットワーク解析を実施した結果、エネルギー代謝に関する遺伝子が多く検出された (図 1)。

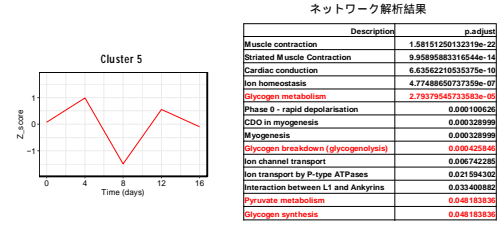


図1 マウス歯肉 RNA シークエンス解析の Cluster 解析結果とネットワーク解析結果

## (2) 歯周組織構成細胞におけるエネルギー代謝経路の同定

歯周組織を構成する歯根膜細胞が分化過程でどのようなエネルギー代謝経路を利用するのかを検討した。その結果、主にミトコンドリアを介した酸化的リン酸化 (OXPHOS) を利用して、ATP を産生することが明らかとなった (図 2)。

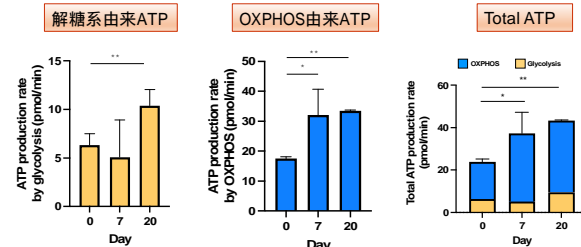


図2 歯根膜細胞の硬組織石灰化誘導過程におけるエネルギー代謝経路

歯周病病態下では、歯根膜細胞において、脂質代謝が低下することが我々のこれまでの研究より明らかとなっている。そこで、脂質代謝阻害薬 Lalistat-2 で処理した歯根膜細胞におけるミトコンドリアの機能を詳細に検討した。その結果、歯周病の病態下では、ミトコンドリアの予備呼吸能が低下することが示された (図 3)。これにより、歯周病病態下では、歯根膜細胞のミトコンドリアの機能が抑制されることにより、同細胞の硬組織形成細胞への分化が抑制され、歯周組織の恒常性が破綻する可能性が示唆された。

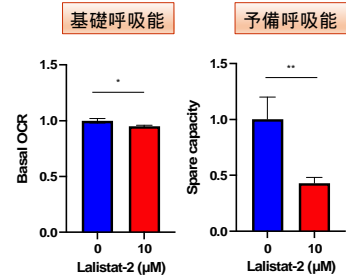


図3 脂質代謝抑制下におけるミトコンドリア機能の解析

## (3) 歯周病誘導過程におけるミトコンドリア発現の検討

歯周病を誘導した mtGFP マウスの歯周組織において、GFP (COX8) の発現を免疫組織染色にて検討した。しかしながら、歯周組織における GFP の発現が低いため、GFP 陽性細胞を検出することができなかった。そこで、フローサイトメーターを用いて、GFP 発現細胞の割合を検討した。その結果、歯周病誘導 8 日目において、COX8 発現細胞の割合が減少した (図 4)。

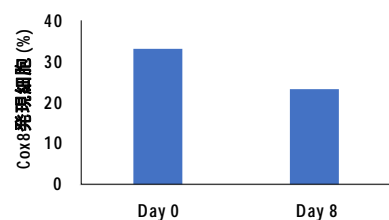


図4 歯周病誘導マウスの歯肉におけるCox8発現細胞の割合

## (4) ミトコンドリア機能回復薬投与による歯周病抑制の検討

ミトコンドリアの発現低下が歯周病と関連していることを検証するために、野生型マウスにミトコンドリア機能回復薬を投与して歯槽骨吸収量の変化を検討した。その結果、ミトコンドリア機能回復薬を投与したマウスでは、歯周病によって誘導される歯槽骨吸収が抑制された (図 5)。

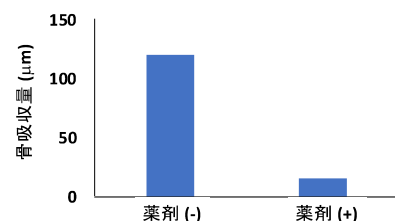


図5 ミトコンドリア機能促進薬MA-5を歯周病誘導マウスに投与した際の、歯槽骨吸収の抑制

## (5) 歯周病患者の検体におけるミトコンドリア関連因子の発現検討

歯周病の再発を認めた患者より採取した GCF 中におけるミトコンドリア関連タンパクシクロム c の量を ELISA 法にて測定した。しかしながら、GCF 量が少ないこともあり、タンパクを検出することができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masahiro Matsumoto, Chiharu Fujihara, Teerachate Nantakeeratipa, Jirouta Kitagaki, Yu Yamamoto, Satoru Yamada, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami	4. 巻 0
2. 論文標題 Lipase-a single-nucleotide polymorphism rs143793106 is associated with increased risk of aggressive periodontitis by negative influence on the cytodifferentiation of human periodontal ligament cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jre.13079. Epub 2022 Dec 9.	査読の有無 有
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 Teerachate Nantakeeratipat, Chiharu Fujihara, Takuto Nogimori, Masahiro Matsumoto, Takuya Yamamoto, Shinya Murakami	4. 巻 662
2. 論文標題 Lysosomal acid lipase regulates bioenergetic process during the cytodifferentiation of human periodontal ligament cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 84-92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.04.041	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 C Fujihara , K Murakami , S Magi , D Motooka, T Nantakeeratipat, A Canela 6 , R J Tanaka 7 , M Okada 2 8 , S Murakami 1	4. 巻 102(3)
2. 論文標題 Omics-Based Mathematical Modeling Unveils Pathogenesis of Periodontitis in an Experimental Murine Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Dent Res	6. 最初と最後の頁 1468-1477
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/00220345231196530	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

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
3. 学会等名 第157回日本歯科保存学会学術大会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原千春、Nantakeeratipat T, 村上伸也
2. 発表標題 脂質代謝を介した歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化におけるエネルギー供給機構の解明
3. 学会等名 第41回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤原千春、Nantakeeratipat T, 村上伸也
2. 発表標題 リソソーム酸性リパーゼを介した脂質代謝による歯根膜細胞の分化制御機構の解明
3. 学会等名 第44回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Chiharu Fujihara, Shinya Murakami
2. 発表標題 The localization and timing of MCP-1 expression during periodontitis progression
3. 学会等名 International Association for Dental Research
4. 発表年 2024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	柏木 陽一郎  (Kashiwagi Yoichiro)  (20598396)	大阪大学・大学院歯学研究科・助教    (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	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			
タイ	Srinakharinwirot University			