

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09898

研究課題名(和文) 歯周病の進行を予測できる唾液バイオマーカーの検索

研究課題名(英文) Studies of Salivary Biomarkers for Predicting Periodontitis Progression

研究代表者

友藤 孝明 (Tomofuji, Takaaki)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：80335629

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)：本研究は、歯周炎の重症化を予測する唾液中のマイクロRNA(miRNA)を探索した。慢性歯周病患者44名を対象とした。2年間の観察期間の後、歯周病の進行の有無で2群に分けた。その結果、唾液中のhsa-miR-5571-5p、hsa-let-7f-5p、hsa-miR-99a-5p、hsa-miR-28-5p、hsa-miR-320dは、歯周炎の進行を予測するバイオマーカーであると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、個人レベルにおいて歯周病の発症や重症化をある程度予測し、早期に治療介入をするという「先制医療」を実現させるための基礎的な知見となる。歯周組織の異常の発見は、早ければ早いほど健康な状態にまで戻る可能性が大きい。先を見越した医療の実現は、歯周組織の健康の保持・増進をより確実なものとし、質の高い生活を歯科の立場から支えることに大きく貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：This study explored salivary microRNAs (miRNAs) that predict the progression of periodontitis. Forty-four patients with chronic periodontitis were included in the study. After a 2-year follow-up period, they were divided into two groups according to the presence or absence of periodontitis progression. The results suggest that hsa-miR-5571-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-99a-5p, hsa-miR-28-5p, and hsa-miR-320d in saliva could be biomarkers that predict progression of periodontitis.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：歯周病 重症化予測 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

近年、「先制医療」と呼ばれる予防医学的医療戦略が国内における医療の先端部分で展開されている。「先制医療」とは、発症前に高い精度で発症予測あるいは正確な発症前診断を行い、病気の症状や重大な組織の障害が起こる前の適切な時期に治療的介入を実施して発症を防止または遅らせるという、新しい医療コンセプトである。なお、このコンセプトには発症後の重症化の予防も含まれる。そして、「先制医療」の鍵となるのは、発症前診断や重症化予測を行うのに有効なバイオマーカーの開発である。

歯周病は、多くの国民が罹患する歯科疾患の一つである。これまでの国内外の研究から、歯周病はリスク要因の蓄積による細胞障害や異常タンパク質の蓄積等の組織異常から、徐々に重症化してくることが分かってきた。しかし、これらの組織異常が始まる時点(発症前期)では臨床症状がなく、臨床症状が現れたとき(臨床的疾患期)には、不可逆的な病態となっている場合が多い。それゆえに、歯周病の「先制医療」を行うためには、感受性期と発症前期を対象とした検査技術の開発が不可欠である(下図参照)。

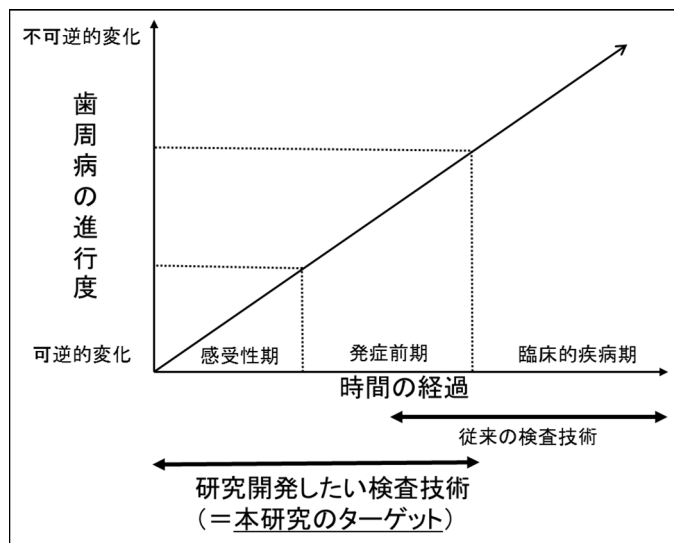


図. 歯周病の検査技術

しかし、今までの歯周検査では、歯周病の発症や重症化が起きた結果を診断しており、歯周病の発症前(感受性期)や重症化前(発症前期)の評価が正確にできていなかった。一方、研究代表者らは、動物実験を通して、体液中の遺伝子発現(microRNA発現)が歯周病の病態によって変動することを明らかにしてきた。すなわち、体液中の遺伝子発現は、歯周病の診断に有用であると考えられる。また、創薬・診断学の分野では、遺伝子発現の網羅的検索(トランスクリプトーム解析)により発症予測・予後予測できるバイオマーカーの誕生が報告されている。以上のことから、「唾液のトランスクリプトーム解析によって、歯周病の発症前診断や重症化予測に有用なバイオマーカーが発見できるのではないか」と考えた。

2 . 研究の目的

本研究の目的は、歯周病の発症前診断や重症化予測を可能とする唾液中のバイオマーカーを検索することである。

3 . 研究の方法

1) 研究デザイン

慢性歯周炎患者を対象とした前向きコホート研究を行う。主要アウトカムは、歯周病の発症もしくは重症化の有無とし、“歯周病進行群(歯周病の重症化を認めた群)”と“対照群(歯肉が安定していた群)”の2群に分ける。唾液中の遺伝子発現について、2群間における違いを網羅的に解析し、歯周病の発症・重症化を予測できるバイオマーカーを特定する。

2) 歯周病進行群と対照群の群わけ

ベースライン時と比べて、クリニカルアタッチメントレベルが2mmを超えて大きくなる歯が1歯以上認める場合を、歯周病進行群と定義する (Morozumi et al. 2016)。

3) 唾液のトランスクリプトーム解析

安静時唾液を採取する。採取時間は10分間とし、唾液分泌量を記録する。唾液からRNAを抽出し、-80℃で凍結保存する。

本研究では、トランスクリプトーム解析として、microRNAの発現解析を実施する。冷凍保存したRNAを外部機関(東レ)にマイクロアレイを委託し、歯周病進行群と対照群とのmicroRNA発現を網羅的に比較する。さらに、歯周病進行群と対照群との間で2倍以上発現に違いがあったmicroRNAについては、Mx3000P Real-Time PCR System (Agilent technology)にてReal-time PCRを行う。

唾液のmicroRNAの発現の違いを2群間で比較検討し、バイオマーカーとしての有用性を統計学的に検証する。

4 . 研究成果

歯周病進行群のmiR-200a-3p、miR-let-7f-5p、miR-17-3p、miR-5571-5p、miR-28-5p、miR-320dの発現は、対照群よりも有意に高かった($p < 0.05$)。一方、歯周炎進行群のmiR-99a-5pの発現は、対照群よりも有意に低い値となった($p < 0.05$)。本研究の結果は、唾液中の7種類のmicroRNAが慢性歯周炎の進行を予測するバイオマーカーとなり得ることを示唆している。

Table 1. Characteristics of the participants at baseline (n [%] or mean [SD]).

Variables	Categories	Total (n=44)	Progression (n=22)	Control (n=22)	p-value
Age (years)		67.1 (9.9)*	65.8 (11.1)	68.1 (8.5)	0.433‡
Gender	Male	15 (34.1)†	8 (36.4)	7 (31.8)	1.000‡
Number of teeth present		25.3 (2.9)*	24.9 (2.5)	25.8 (3.3)	0.333‡
Mean PPD (mm)		2.0 (0.3)*	2.0 (0.3)	2.0 (0.3)	0.751
Mean CAL (mm)		2.3 (0.7)*	2.6 (0.8)	2.4 (0.6)	0.360‡
BOP (%)		7.0 (8.3)*	7.4 (9.9)	6.6 (6.3)	0.751‡
Plaque control record (%)		24.6 (21.8)*	20.8 (19.0)	28.4 (24.1)	0.253‡
Diabetes mellitus	Present	3 (6.8)†	2 (9.1)	1 (4.54)	1.000 [§]

* Mean (SD), † number (%), ‡ Mann-Whitney U-test, § Chi-square test, ^{||} Student's t-test.

PPD, probing pocket depth; CAL, clinical attachment level; BOP, bleeding on probing.

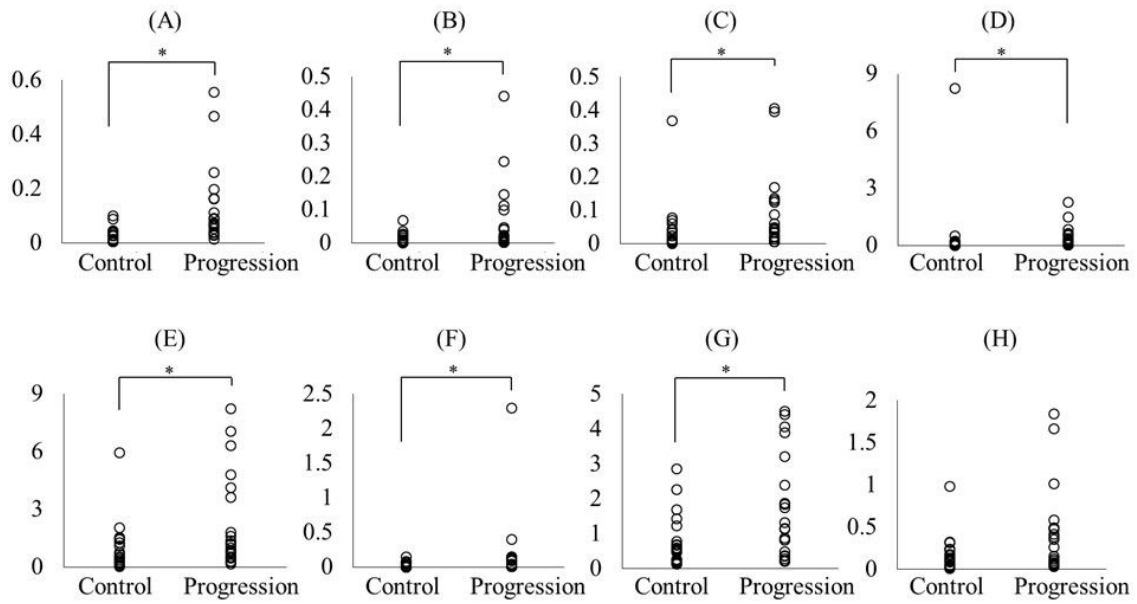


Figure 1. Expression rates of hsa-miR-5571-5p (A), hsa-miR-17-3p (B), hsa-let-7f-5p (C), hsa-miR-99a-5p (D), hsa-miR-200a-3p (E), hsa-miR-28-5p (F), hsa-miR-320d (G) and hsa-miR-31-5p (H) in saliva using the quantitative real-time PCR assays. Circles represent the relative expression rate of each sample. Data with threshold cycle (Ct) values were included. Statistical significance was calculated using the Mann-Whitney

U-test. *p < 0.05. N=44

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sugiura Y, Yoneda T, Fujimori K, Maruyama T, Miyai H, Kobayashi T, Ekuni D, Tomofuji T, Morita M	4. 巻 34
2. 論文標題 Detection of serum miRNAs affecting liver apoptosis in a periodontitis rat model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 117-123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.11752.	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 山下喜久、天野敦雄、伊藤博夫、友藤孝明、久保庭雅恵.	4. 巻 39
2. 論文標題 口と全身の疾患と健康を評価する唾液検査法の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本歯科医学学会誌	6. 最初と最後の頁 38 - 43
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 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 Fujimori Kohei, Yoneda Toshiki, Tomofuji Takaaki, Ekuni Daisuke, Azuma Tetsuji, Maruyama Takayuki, Mizuno Hirofumi, Sugiura Yoshio, Morita Manabu	4. 巻 24
2. 論文標題 Detection of Salivary miRNAs Reflecting Chronic Periodontitis: A Pilot Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1034 ~ 1034
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules24061034	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 -
1. 著者名 Yoneda Toshiki, Tomofuji Takaaki, Ekuni Daisuke, Azuma Tetsuji, Maruyama Takayuki, Fujimori Kohei, Sugiura Yoshio, Morita Manabu	4. 巻 101
2. 論文標題 Serum microRNAs and chronic periodontitis: A case-control study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 57 ~ 63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.archoralbio.2019.03.009	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 -

1. 著者名 Fujimori K, Yoneda T, Tomofuji T, Ekuni D, Azuma T, Maruyama T, Mizuno H, Sugiura Y, Morita M.	4. 巻 24
2. 論文標題 Detection of Salivary miRNAs Reflecting Chronic Periodontitis: A Pilot Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 E1034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24061034	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4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤森浩平、米田俊樹、杉浦嘉雄、丸山貴之、江國大輔、東 哲司、友藤孝明、森田 学
2. 発表標題 慢性歯周炎患者の歯周状態の悪化に関連する唾液中miRNAの探索：コホート研究
3. 学会等名 第69回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 友藤孝明、東 哲司、羽田未奈子
2. 発表標題 慢性歯周炎の進行を予測する唾液microRNAの探索
3. 学会等名 第62回東海口腔衛生学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉浦嘉雄、米田俊樹、藤森浩平、丸山貴之、宮井久敬、小林暉政、江國大輔、友藤孝明、森田 学
2. 発表標題 歯周病ラットにおける血清miRNAの肝臓mRNAへの影響
3. 学会等名 第68回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 友藤孝明
2. 発表標題 体液中のmicroRNAを用いた予測医療に向けた研究
3. 学会等名 第188回岐阜歯科学会例会（招待講演）
4. 発表年 2019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	岩崎 理浩 (Iwasaki Takahiro) (30815569)	朝日大学・歯学部・助教 (33703)	
研究分担者	東 哲司 (Azuma Tetsuji) (80432649)	朝日大学・歯学部・助教 (33703)	
研究分担者	森田 学 (Morita Manabu) (40157904)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	
研究分担者	米田 俊樹 (Yoneda Toshiki) (60756071)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	
研究分担者	藤森 浩平 (Fujimori Kohei) (70813624)	岡山大学・大学院・医員 (15301)	

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	廣瀬 晃子 (Hirose Akiko) (90173278)	朝日大学・歯学部・講師 (33703)	

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