

令和 4 年 6 月 11 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21714

研究課題名（和文）医・歯・看護の医療連携を飛躍させる「歯周病関連疾患の一括予測リキッドバイオシー」

研究課題名（英文）The liquid biopsy to detect the risk of multiple periodontal diseases associated-diseases

研究代表者

吉田 賀弥（YOSHIDA, Kaya）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・准教授

研究者番号：60363157

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,200,000円

研究成果の概要（和文）：歯周病は、糖尿病やアルツハイマー、関節リウマチなどの多種類の歯周病関連疾患を発症させるが、その発症リスクを特異的に検出する検査方法は無い。本研究では、多種類の歯周病関連疾患発症を一括に予測するリキッドバイオプシーの確立を目指し、まず「歯周病原菌に感染したマクロファージ」が糖尿病モデル環境下で産生するexosome中のmicro RNAを同定した。高グルコースとAGEの両条件に共通して増加するmicro RNAとして、最終的に4種類を抽出した。今後、これらのmicroRNAが、実際に糖尿病病態を反映するかを実証実験し、リキッドバイオプシーとして応用可能を判定する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究が目指すリキッドバイオプシーは、「歯周病に罹患しているため特に関連疾患の発症に注意が必要な患者」を特異的にスクリーニングし、“複数の”歯周病関連疾患リスクを一括して検出できる。これは、がんなどを検出する既存のリキッドバイオプシーには無い革新的な特性であり、実現すれば国民の健康に大きく寄与できる。

本研究では、糖尿病モデル環境下で歯周病原菌に感染したマクロファージexosomeから、実際に4種類のmicroRNAを抽出することができた。これらmicroRNAが本リキッドバイオプシーに応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Periodontal diseases implicated in the pathology of many systemic diseases, such as diabetes mellitus, Alzheimer's disease and rheumatic arthritis. In this study, we tried to provide the liquid biopsy which collectively detect the risk of many types of periodontal diseases associated diseases. The macrophages infected with Porphyromonas gingivalis were cultured under diabetes mellitus-like conditions. The exosomes were isolated from condition medium and microRNAs contained in exosomes were analyzed using microarray. We identified four microRNA species which increased by high glucose and AGE. The further investigations are needed to evaluate their potential as liquid biopsy for periodontal diseases associated diseases.

研究分野：口腔保健学

キーワード：リキッドバイオプシー 歯周病 歯周病関連疾患 マクロファージ exosome 細胞外小胞 糖尿病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、糖尿病やアルツハイマー、関節リウマチなどの「多種類の」歯周病関連疾患」を発症させる。しかし、「歯周病が疾患を発症させるリスク」を特異的に検出する検査方法は無く、全身疾患の予防・治療に歯周治療は十分に取り入れられていない。

一方で、がん領域においてはがんの発症と進行を特異的にスクリーニングする方法として、リキッドバイオプシーが開発されてきた。

近年、米国では cfDNA と数種類の蛋白質の組み合わせを解析し、一般的な 8 種類の癌腫を同時に検出するリキッドバイオプシー Cancer SEEK が発表された。Cancer SEEK は 3mm の腫瘍部位を、99% 以上の特異度で検出し、偽陽性が無かったことから、がん早期発見を実現する次世代の検査法として期待されている。

もしも、Cancer SEEK のように「多種類の歯周病関連疾患の発症を一括に予測するリキッドバイオプシー」が確立できれば、「歯周病を患っているために全身疾患が特に悪化しやすい者」をスクリーニングし、重点的に歯周治療や内科的治療をすることができる。歯周治療は、現行の「口腔内のための治療行為」から、「全身疾患の発症を予防するための治療行為」へと、概念を大きく変える。それは国民の健康に寄与する上に、歯学教育や医科・看護との医療連携を変革し得る。

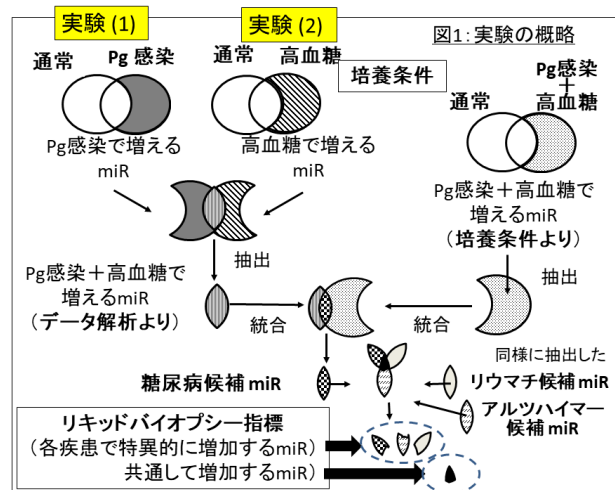
2. 研究の目的

本研究の目的は、「歯周病原菌に感染したマクロファージ」が様々な環境下で産生する exosome 中の micro RNA を同定し、多種類の歯周病関連疾患発症を一括に予測するリキッドバイオプシーを確立し、医療連携を広げ国民の疾病・介護予防に繋げることである。

3. 研究の方法

(1). 歯周病に特異的な exosome 含有 micro RNA の同定

ヒト単球由来細胞株 THP-1 を porbor myristate acetate (PMA) で刺激して、マクロファージに分化させ、100 MOI の歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) を感染させて、2 日間培養した。マクロファージが培養上清中に分泌した exosome を、高ポリマー法により抽出した。exosome から micro RNA (miR) を抽出し、3-D Gene® Human miRNA Oligo Chip (東レ) を用いて、マイクロアレイ解析を行ない、exosome に含有される miR を網羅的に検出した (図 1)。



(2). 糖尿病発症に特異的な exosome 含有 micro RNA の同定

糖尿病を模倣する培養条件として、高グルコース及び最終糖酸化物 (Advance glycation end product, AGE) 存在下で、THP-1 を培養し、100 MOI の *Pg* を感染させて、2 日間培養した。上述と同様の方法で、exosome を抽出し、マイクロアレイ解析により含有される micro RNA を同定した。

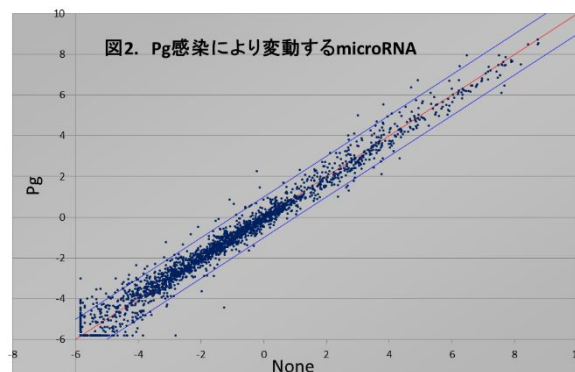
4. 研究成果

(1). *Pg* 感染により増える exosome 含有 micro RNA

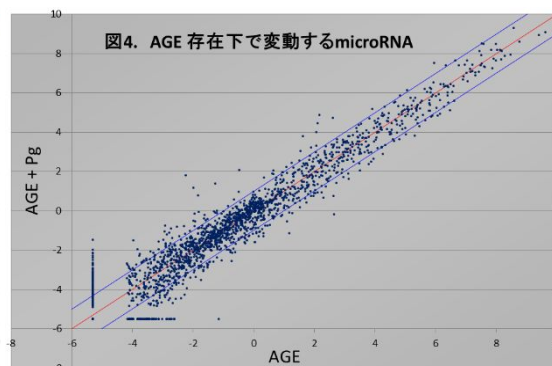
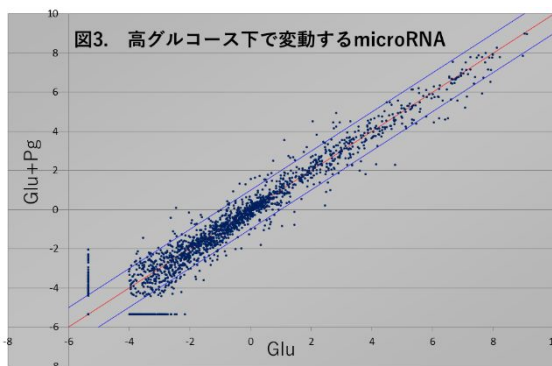
Pg 感染により exosome 内への含有が増加する micro RNA は 73 種類 (内、4 倍以上の変化を示す micro RNA は 3 種類)、減少する micro RNA 34 種類 (内、4 倍以上は 2 種類) であった (図 2)。

(2). 高血糖下で増える exosome 含有 micro RNA

高グルコース下で *Pg* 感染により exosome 内への含有が増加する micro RNA 118 種類 (内、4 倍以上の変化を示す micro RNA は 23 種類)、減少する micro RNA 177 種類 (内、4 倍以上は 44 種類) であった (図 3)。



AGE については、同様に、増加 micro RNA 192 種類（4 倍以上は 43 種類）、減少 micro RNA 198 種類（4 倍以上は 27 種類）であった（図 4）。



高グルコースと AGE の両条件に共通して増加する micro RNA として 32 種類の、減少する micro RNA として 54 種類を、候補として絞り込んだ。さらに、その中から、データベースを活用し、4 種類を最有力な増加 micro RNA とした（インスリンシグナルを阻害する micro RNA として miR#A の 1 種類を、発現倍率が高い micro RNA として miR#B, miR#C, miR#D の 3 種類を絞り込んだ）。

本研究では、主要な歯周病関連疾患である糖尿病をモデルとして、マクロファージの培養条件を確立した。放出される exosome を抽出して、含有される microRNA を同定できた。糖尿病を予測する 4 種類の microRNA 候補を決定できた。

4 種類のうち、3 種類（miR#B, miR#C, miR#D）については、データベース上で特異な機能報告は得られなかったものの、残る 1 種類（miR#A）は、インスリンシグナルを阻害する microRNA として報告されていた。これらの microRNA が、実際に糖尿病病態を反映するかを実証実験し、歯周病関連疾患（糖尿病）の発症を予測するリキッドバイオプシーとして応用可能を判定する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 0件）

1. 著者名 Kaya Yoshida, Kayo Yoshida, Mariko Seyama, Kazumi Ozaki and Hirohiko Okamura	4. 巻 Vol.33
2. 論文標題 Extracellular Vesicles in Periodontal Medicine: The Candidates Linking Oral Health to General Health	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Health and Biosciences	6. 最初と最後の頁 15-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20738/johb.33.1_15	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kaya Yoshida
2. 発表標題 Periodontal disease-derived Extracellular vesicles: Potential as regulator of systemic diseases.
3. 学会等名 The 3rd International Conference on Bioinformatics, Biotechnology, and Biomedical Engineering (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田 賀弥, 岡村 裕彦
2. 発表標題 歯周病原菌-マクロファージ間コミュニケーションに起因する全身疾患発症機構
3. 学会等名 第62回 日本歯科基礎医学会学術大会・アップデートシンポジウム05 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田 佳世, 吉田 賀弥, 瀬山 真莉子, 尾崎 和美
2. 発表標題 歯周病原菌感染マクロファージの細胞外小胞が肺に線維化を誘導する可能性の検証
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
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
研究 分担 者	岡村 裕彦 (OKAMURA Hirohiko) (20380024)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	

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
---------	---------