

令和元年5月30日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11855

研究課題名(和文) 歯周病の病状に反映するバイオマーカーに関する研究

研究課題名(英文) Biomarker to reflect for condition of periodontitis

研究代表者

宮井 久敬 (Miyai, Hisataka)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80761155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ラット歯周病モデルを用いて歯周病の病態を反映し全身の健康に影響を与え得る血液中のmiRNAを特定することである。8週齢ラットを歯周病群(絹糸巻きつけ)と対照群に分け、歯周病を反映する血液中miRNAの特定のためmiRNAをマイクロアレイおよび逆転写PCR法を実施し、歯周病のバイオマーカーとして血液中のmiR-376b-3pが示唆された。また、歯周病群の病理組織増において肝細胞の変性および炎症性細胞浸潤を認めた。肝臓のマイクロアレイも行い、血液中のmiR-376b-5pとのペアリング解析を行ったところ、歯周病が血液中のmiRNAを介して肝臓に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、歯周病の病態を反映し、かつ歯周病と全身との関連を説明できる血液中のバイオマーカーとして「microRNA」という新しい切り口から探索したことにある。近年歯周病が全身の健康状態に影響を与えることが解明されつつあるが、全身の健康状態に対する歯周病の影響を評価するための検査技術はまだ確立されていない。すなわち、臨床の現場では、目の前にいる歯周病患者の病態が、歯周組織に限局しているのか全身に影響を及ぼしているのかが診断できない状況にある。本研究の成果により、この問題点を解決するための検査技術を開発するためのエビデンスを社会に提示できるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to explore serum miRNAs which reflect periodontal condition and which can influence systematic condition. Wistar rats aged 8-weeks old (n=16) were divided into two groups. Cotton ligature was placed in a submarginal position on the maxillary second molars for 4 weeks to induce periodontitis in periodontitis group. Control groups received no treatment for 4 weeks. Ligation around teeth induced periodontal inflammation and periodontal tissue destruction. In serum investigation, microarray and real-time PCR results showed that miR-376b-3p could be biomarker for periodontitis. Microarray of liver and integrated analysis between serum miR-376b and mRNA of liver was examined. Periodontitis could affect the liver through serum miRNAs.

研究分野：予防歯科学

キーワード：歯学 歯周炎 ラット microRNA バイオマーカー

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

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病が全身の健康状態に及ぼす影響について、数多くの報告がなされている。申請者らは、動物実験を通じて、歯周病が血液中の酸化ストレスや炎症性サイトカインを増加させると共に、肝臓や腎臓にダメージを与えていることを報告した (Tomofuji et al. 2011)。このことから、申請者らは、歯周病が血液中の酸化ストレスや炎症性サイトカインの増加という蛋白レベルで全身の健康状態に悪影響を与えていると考えている。しかし、歯周病による臓器 (肝臓や腎臓等) ダメージは、蛋白レベルだけではなく遺伝子レベルでも起きている可能性がある。そのため、臓器間のコミュニケーションの媒介となり、かつ歯周病の病態を遺伝子レベルで反映した新たなバイオマーカーの特定が求められている。

## 2. 研究の目的

近年、血液中の microRNA(miRNA)が臓器間のコミュニケーションを担う物質として注目されている。歯周病が全身の健康状態に影響を与えていることはよく知られており、そのメカニズムの一つに miRNA の関与が考えられる。また、歯周組織における miRNA の発現が歯周病の病態に従い変化する可能性のあることも分かってきた。すなわち、血液中の miRNA は、全身の健康に対する歯周病の影響を反映する新たなバイオマーカーとなり得る。

そこで本研究では、ラット歯周病モデルを用いて、歯周病の病態を反映する血液中の miRNA を特定することを目的とする。また、特定された miRNA が歯周病と全身の健康との間においてどのような役割を果たすかについても検討を加える。

## 3. 研究の方法

8週齢の Wistar 系雄性ラットをコントロール群と歯周病群に分け、2群比較を行う。歯周病群にはイソフルレン・酸素混合気体による吸入麻酔下で上顎第一臼歯に絹糸を巻き、歯周病を惹起させる。対照群には歯周病群と同様に麻酔のみをかける。28日の実験期間の後、両群ともジエチルエーテルで安楽死させ、血液、歯周組織および肝臓を採取する。採取した血液中の miRNA を DNA チップを用いたマイクロアレイと逆転写 PCR 法により比較検討する。一方、肝臓からも mRNA を抽出して PCR で増幅した後、マイクロアレイ解析を行う。そして特定した血液中の miRNA とのペアリング解析を行い、特定された miRNA が歯周病と全身の健康との間のコミュニケーションの媒介として、どのような役割を果たすのかを解明する。歯周組織・肝臓については病理学的変化の比較検討も行う。

## 4. 研究成果

平成28年度では、8週齢 Wistar 系雄性ラット歯周病群 (上顎第二臼歯への絹糸巻きつけによる歯周病惹起) と対照群に分けた (実験期間28日)。組織学的分析の結果、歯周病群では炎症性細胞浸潤および歯槽骨吸収を認めた。血液中の miRNA をマイクロアレイによる網羅的解析を行ったところ、歯周病群は対照群より、3つの miRNA において2倍以上の発現を認め、22の miRNA において0.5倍以下の発現となった。

平成29年度では、上記の miRNA のうち、4の miRNA に絞って逆転写 PCR 法を実施した。miR-376-3p の発現において、歯周病群が対照群より有意に高くなり、血液中の miR-376b-3p が歯周病のバイオマーカーとなり得ることが確認された。肝臓の病理組織像において、歯周病群は僅かに肝細胞の変性および炎症性細胞の浸潤を認めた。

平成30年度ではマイクロアレイにて肝臓の mRNA の発現の網羅的解析を行った後にペアリング解

析を行い、血液中のmiR-376b-3pと肝臓miRNAと関連性を定性的に分析した。

その結果、血液中のmiR-376b-3pは、アポトーシスや炎症と関わる肝臓中のmRNA ( insulin-like growth factor 1 receptor、homocysteine-inducible endoplasmic reticulum stress-inducible ubiquitin-like domain member 1、NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 1、slit guidance ligand 2、neuropilin 1 ) を標的としている可能性があり、歯周病が血液中のmiRNAを介して肝臓に影響を与える可能性が示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

該当なし

〔学会発表〕(計 件)

該当なし

〔図書〕(計 件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

該当なし

取得状況(計 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.okayama-u.ac.jp/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：丸山 貴之

ローマ字氏名：Takayuki Maruyama

所属研究機関名：岡山大学

部局名：大学病院

職名：助教

研究者番号(8桁): 30580253

研究分担者氏名：森田 学

ローマ字氏名：Manabu Morita

所属研究機関名：岡山大学

部局名：医歯薬学総合研究科

職名：教授

研究者番号 (8桁): 40157904

研究分担者氏名: 米田 俊樹

ローマ字氏名: Toshiki Yoneda

所属研究機関名: 岡山大学

部局名: 医歯薬学総合研究科

職名: 助教

研究者番号 (8桁): 60756071

研究分担者氏名: 江國 大輔

ローマ字氏名: Daisuke Ekuni

所属研究機関名: 岡山大学

部局名: 医歯薬学総合研究科

職名: 准教授

研究者番号 (8桁): 70346443

研究分担者氏名: 友藤 孝明

ローマ字氏名: Takaaki Tomofuji

所属研究機関名: 朝日大学

部局名: 歯学部

職名: 教授

研究者番号 (8桁): 80335629

研究分担者氏名: 東 哲司

ローマ字氏名: Tetsuji Azuma

所属研究機関名: 朝日大学

部局名: 歯学部

職名: 助教

研究者番号 (8桁): 80432649