

令和元年6月17日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17348

研究課題名(和文) NGSを用いた結紮誘導歯周炎の網羅的解析による急速な歯周組織破壊メカニズムの解明

研究課題名(英文) Differentially expressed genes analysis by RNA-seq : Inflamed periodontal tissue of ligature-induced periodontitis in mice

研究代表者

前川 祥吾 (MAEKAWA, Shogo)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・特任助教

研究者番号：20793574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：結紮誘導歯周炎は結紮3日後から歯槽骨の破壊を呈し、急速な歯周組織破壊を認めた。結紮したマウス歯肉組織のRNAシーケンス解析により、78個の発現変動遺伝子(DEGs)を同定した。発現上昇していたDEGsに対するGO解析より、免疫応答、結合組織代謝に注目し、定量的PCRを行なったところ、S100a8 mRNAの顕著な発現上昇を認めた。傷害関連分子パターン(DAMPs)であるS100A8は、接合上皮に限局して発現しており、結紮による歯周組織の破壊に伴い、接合上皮におけるS100A8の発現の増加、結合組織内の発現が確認された。急速な歯周組織破壊にDAMPsであるS100A8の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果より、急速な歯周組織破壊において、傷害関連分子パターンであるS100A8の関与が認められた。かねてより歯周組織の破壊は不定期かつ不規則に進行する(Random Burst Theory)とされていたが、本研究の結果より急速に進行する歯周炎のメカニズムの一端が解明された。今後、侵襲性歯周炎のような急速な歯周組織の破壊を伴う若い患者に対する、新たな治療のターゲットとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A silk ligature around second molar induced severe bone loss at 8 days after ligation. In vivo MicroCT analysis revealed that bone loss was initiated 3 to 5 days post ligation. RNA-seq analysis detected 12,852 genes (FPKM > 1.0 in at least one sample) that were categorized into 10 patterns by a hierarchical clustering approach. GO term enrichment analysis revealed that neutrophil chemotaxis and inflammatory responses expression profiles were significantly high in ligated gingiva. Interestingly, S100a8 mRNA expression level was significantly elevated in ligated gingiva. Histological analysis showed an increased number of TRAP-positive multinucleated cells at the ligated sites and higher S100A8 expressions in attached gingiva with ligation. GO term enrichment analysis suggests that innate immune response related burst destruction of periodontal tissue in ligature-induced periodontitis mice model. Therefore, S100A8 may act as important role for rapid periodontal destruction.

研究分野：歯周病

キーワード：結紮誘導歯周炎 RNA sequencing DAMPs 発現変動遺伝子

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯周組織の破壊を伴う炎症性疾患であり、歯の周りに付着したプラークに含まれる歯周病原細菌によって歯周組織に炎症が惹起され、付着の喪失および歯槽骨の吸収が起こる。次世代シーケンサー（Next Generation Sequencer：NGS）を用いた遺伝子の網羅的な解析が発達し、炎症性腸疾患、糖尿病、関節リウマチなどの様々な疾患は、腸内細菌の構成の不調和（ディスバイオーシス）と関連していることが明らかとなっている。歯周病の原因は、*Porphyromonas gingivalis*を代表とする歯周病原細菌の感染によるものとされており、近年ディスバイオーシスの概念に則り、結紮による歯周炎モデルがマウスで確立された。この結紮誘導歯周炎マウスモデルでは結紮後5日で骨吸収が起こり、また結紮した糸に付着していた嫌気性細菌の増加も起きていた。結紮誘導歯周炎は従来の口腔内に歯周病原細菌を感染させるマウスモデルと異なり、数日で急速な歯周組織の破壊を呈しているが、結紮による歯周組織への影響に関してまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、結紮誘導歯周炎モデルマウスにおいて、RNA シーケンスを用いて歯周組織破壊に関わる遺伝子の網羅的な解析を行うことである。

3. 研究の方法

9週齢の C57BL/6J 雄野生型マウスを用いて、#6-0 の絹糸を上顎左側第二臼歯に結紮し、結紮誘導歯周炎を惹起させた。右側は非結紮とし、対照側とした。

(1) マイクロ CT による歯槽骨吸収の経時的な評価

イソフルランにてマウスに吸入麻酔を行い、結紮前、結紮 1、3、5、8 日後に in vivo micro CT imaging (R_mCT2, Rigaku corp.)撮影にて、経時的かつ 3 次元的な歯槽骨吸収の評価を行った。

(2) 組織切片における歯周組織の評価

8 日後における結紮側および対象側の組織切片を作製し、HE 染色、TRAP/ALP 染色を行った。

(3) RNA シーケンス解析

非結紮側および結紮側の辺縁歯肉組織から抽出した total RNA をそれぞれ 3 サンプルずつ Illumina 社の Mi-seq を用いてシーケンス解析を行った。FastQC や Tophat2 cufflinks パイプラインを用いて今回のシーケンスデータの質を確認し、FPKM が 1 以上の 12,853 遺伝子に関して本研究で使用した。さらに結紮による歯肉組織の変化に着目するため、fold change が 2 倍以上、q 値が 0.05 未満のものを発現変動遺伝子(DEGs)と定義し、78 個の DEGs を同定した。

(4) DEGs の定量的 PCR

RNA シーケンス解析の結果で得られた 78 個の DEGs のうち、自然免疫応答や結合組織の代謝に関連する遺伝子に関して qPCR を行い、結紮 1、3、7 日後の経時的な遺伝子の発現パターンを解析した。

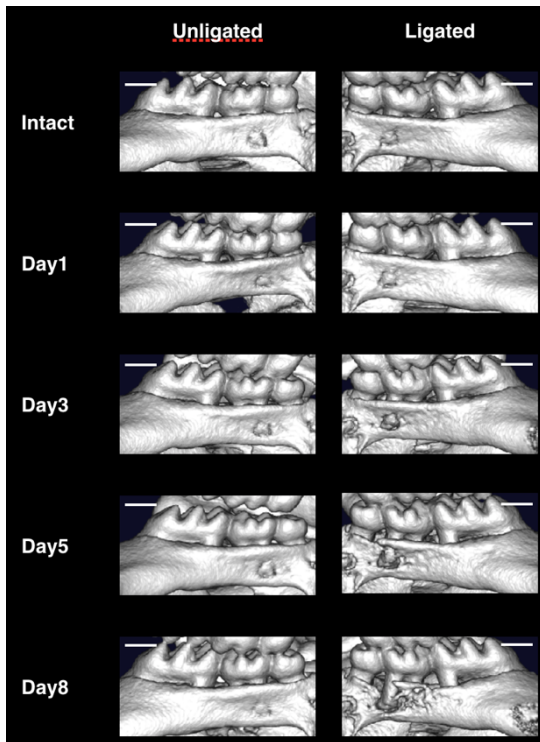
(5) S100A8 免疫組織染色

3、8 日後における結紮側および対象側の組織切片を作製し、S100A8 の免疫組織染色を行い、発現部位の評価および発現量に関して解析した。

4. 研究成果

(1) マイクロ CT による歯槽骨吸収の経時的評価

結紮 3 日後から歯槽骨吸収が認められ、8 日後には大きな歯槽骨吸収が確認された。

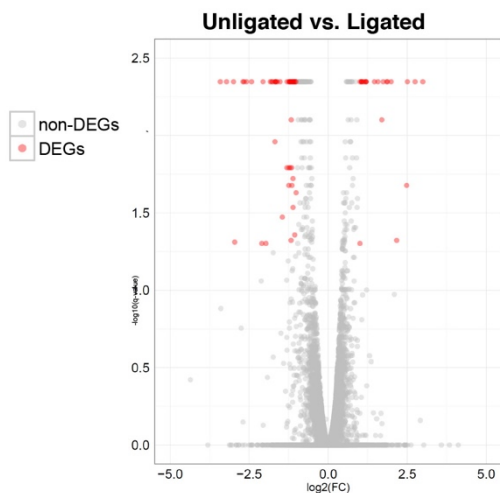


(2) 組織切片における歯周組織の評価

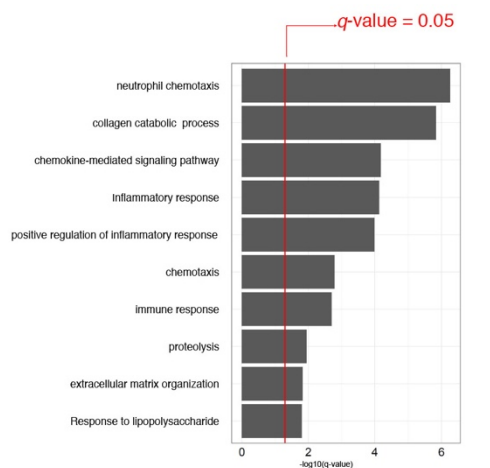
組織切片において、破骨細胞が結紮側の歯根周囲の歯槽骨に多く認められた。

(3) RNA シーケンス解析

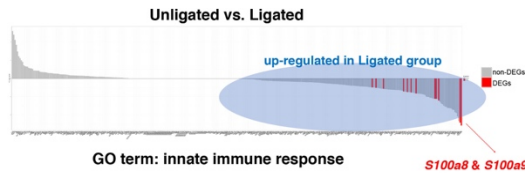
RNA シーケンス解析により、78 個の DEGs を同定した。結紮側歯肉で発現上昇していた DEGs に対する GO 解析より、免疫応答、結合組織代謝が有意に亢進していた。さらに自然免疫応答の GO-term に注目すると、結紮側において *S100a8*、*S100a9* の有意な発現上昇が確認された。



Total 78 DEGs

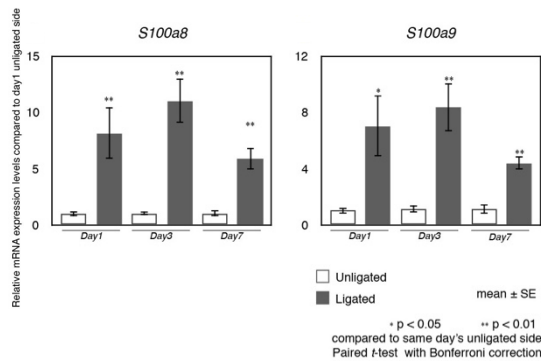


**Enriched GO-terms
(upregulated-DEGs in Ligated group)**



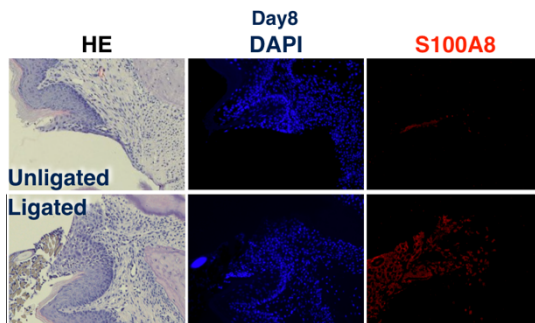
(4) DEGs の定量的 PCR

顕著な *S100a8*、*S100a9* の発現上昇を認めた。



5) S100A8 免疫組織染色

傷害関連分子パターン(DAMPs)である S100A8 は接合上皮に限局して発現するが、歯周組織の破壊に伴い、発現が増加、結合組織内にまで拡大していた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

1. Udagawa S, *Katagiri S, ***Maekawa S**, Takeuchi Y, Komazaki R, Ohtsu A, Sasaki N, Shiba T, Watanabe K, Ishihara K, Sato N, Miyasaka N, Izumi Y. Effect of Porphyromonas gingivalis infection in the placenta and umbilical cord in pregnant mice with low birth weight. Acta Odontol Scand 2018. Aug;76(6):433-441.
2. Suzuki S, Aoki A, Katagiri S, **Maekawa S**, Ejiri K, Kong S, Nagata M, Yamaguchi Y, Ohshima M, Izumi Y. Detection of hepatocyte growth factor in oral rinses using water for possible periodontal diagnosis. J Oral Sci. 2018 (in press)
3. Komazaki R, *Katagiri S, *Takahashi H, **Maekawa S**, Shiba T, Takeuchi Y, Kitajima Y, Ohtsu A, Udagawa S, Sasaki N, Watanabe K, Sato N, Miyasaka N, Eguchi Y, Anzai K, Izumi Y. Periodontal pathogenic bacteria, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* affect non-alcoholic fatty liver disease by altering gut microbiota and glucose metabolism. Sci Rep 2018. Sci Rep. 2017 Oct 24;7(1):13950.
4. Sasaki N, *Katagiri S, Komazaki R, Watanabe K, **Maekawa S**, Shiba T, Udagawa S, Takeuchi Y, Ohtsu A, Kohda T, Tohara H, Miyasaka N, Hirota T, Tamari T, Izumi Y. Endotoxemia by *Porphyromonas gingivalis* injection aggravates non-alcoholic fatty liver disease, disrupts glucose/lipid metabolism, and alters gut microbiota in mice. Front Microbiol 2018. Mar 12;8(1):4620. doi: 10.1038/s41598-018-23000-6.
5. Saito A, Horie M, Ejiri K, Aoki A, Katagiri S, **Maekawa S**, Suzuki S, Kong S, Yamauchi T, Yamaguchi Y, Izumi Y, *Ohshima M. MicroRNA profiling in gingival crevicular fluid of periodontitis-a pilot study. FEBS Open Bio 2017. Jun 5;7(7):981-994. (査読あり)
6. **Maekawa S**, *Katagiri S, Takeuchi Y, Komazaki R, Ohtsu A, Udagawa S, Izumi Y. Bone metabolic microarray analysis of ligature-induced periodontitis in streptozotocin-induced diabetic mice. J Periodontal

〔学会発表〕（計 3 件）

1. **Maekawa S**, Katagiri S, Komazaki R, Ohtsu A, Izumi Y. The pathogenesis of periodontal tissue destruction and the association between diabetes and periodontal disease. NTU-TMDU Periodontology Joint Symposium. Taipei, Taiwan. 2018.
2. **Maekawa S**, Onizuka S, Katagiri S, Ogura K, Ohtsu A, Komazaki R, Udagawa S, Sasaki N, Watanabe K, Takeuchi Y, Miyoshi-Akiyama T, Nitta H, Iwata T, Izumi Y. Differentially expressed genes analysis by RNA-seq : Inflamed periodontal tissue of ligature-induced periodontitis in mice. 103rd Annual meeting American Academy of Periodontology. Boston, USA. 2017.
3. **Maekawa S**, Matsuura T, Hoshi S, Mizutani K, Izumi Y. Patient-Reported Outcomes and Clinical Evaluation of Combination Therapy of GTR with Autograft or Xenograft: Interim report of a Randomized Controlled Trial. National Symposium OSTEOLOGY JAPAN. Tokyo, Japan. 2017. **最優秀賞受賞**

〔図書〕（計 8 件）

1. 水谷幸嗣、**前川祥吾**
・高齢患者に対する歯周治療の実際 外科治療で対応した症例
日本歯科評論 2018; 78(4) 65-75
2. **前川祥吾**
・歯周病が妊婦と対峙に影響を与えるというのは本当？
・歯周治療 3 咬み合わせの回復
書籍 歯周病と全身の健康 Q&A 補訂版 2017 年 6 月
3. **前川祥吾**、片桐さやか、和泉雄一。
・総論 「女性のライフステージと口腔管理の意義」
書籍 母子にやさしい歯科医院 ”女性のライフステージ”と口腔管理 2017 年 6 月
4. **前川祥吾**
歯周治療における歯周外科の立ち位置
歯界展望別冊 歯周外科のテクニック 術前検査からメンテナンスまで p12-17, 2017
5. **前川祥吾**
歯周治療における歯周外科の立ち位置
歯界展望別冊 歯周外科のテクニック 術前検査からメンテナンスまで p12-17, 2017
6. 駒崎利奈、**前川祥吾**、片桐さやか、和泉雄一
歯周病治療は血糖コントロールの改善に有効なのか
月刊糖尿病 9(10):58-66, 2017
7. **前川祥吾**、片桐さやか、和泉雄一。
総論 「女性のライフステージと口腔管理の意義」
母子にやさしい歯科医院 ”女性のライフステージ”と口腔管理 p10-16, 2017
8. 片桐さやか、**前川祥吾**
歯周病のリスクファクター 糖尿病、白血病、骨粗しょう症、AIDS、後天性好中球減少症、薬物
Periodontics for Special needs Patients 障害者・有病者の歯周治療 p10-19, 2017

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究分担者
無し

(2)研究協力者

研究協力者氏名：片桐 さやか
ローマ字氏名：KATAGIRI, sayaka

研究協力者氏名：鬼塚 理
ローマ字氏名：ONIZUKA, satoru
研究協力者氏名：佐々木 直樹
ローマ字氏名：SASAKI, naoki
研究協力者氏名：渡辺 数基
ローマ字氏名：WATANABE, kazuki
研究協力者氏名：大津 杏理
ローマ字氏名：OHTSU, anri
研究協力者氏名：駒崎 利奈
ローマ字氏名：KOMAZAKI, rina
研究協力者氏名：小倉 康平
ローマ字氏名：OGURA, kohei
研究協力者氏名：秋山 徹
ローマ字氏名：AKIYAMA, tohru
研究協力者氏名：岩田 隆紀
ローマ字氏名：IWATA, takanori
研究協力者氏名：新田 浩
ローマ字氏名：NITTA, hiroshi
研究協力者氏名：和泉 雄一
ローマ字氏名：IZUMI, yuichi