

令和元年6月4日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17371

研究課題名(和文) 歯周病が非アルコール性脂肪性肝炎の病態進行に及ぼすメカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of periodontal disease on disease progression of non-alcoholic steatohepatitis

研究代表者

丸山 貴之 (Maruyama, Takayuki)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：30580253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性肝炎(Non-alcoholic steatohepatitis: NASH)は歯周病のリスク要因となりうるが、NASHが歯周病の病態進行に及ぼすメカニズムについては不明な点が多い。一方、血液中のmicroRNAは、全身疾患と歯周病のコミュニケーション媒体となる。本研究の目的は、NASHによる歯周組織への影響について、血液中のmicroRNAと歯周組織における遺伝子発現とのペアリング解析によって明らかにすることである。その結果、NASHにより血液中のmicroRNAを介して、歯周組織における遺伝子発現が調節されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、NASHにより血液中のmicroRNAを介して、歯周組織における遺伝子発現が調節されることが明らかとなった。このことは、NASHが歯周病の病態進行に及ぼすメカニズムの解明に重要なエビデンスとなる。

研究成果の概要(英文)：Non-alcoholic hepatitis (NASH) can be a risk factor for periodontal disease, however, the mechanism that NASH exerts on the pathological progression of periodontal disease is unclear. On the other hand, microRNA in blood serves as a communication medium for systemic disease and periodontal disease. The purpose of this study was to clarify the influence of NASH on periodontal tissue by pairing analysis of microRNA in blood and gene expression in periodontal tissue. As a result, it is suggested that NASH regulates gene expression in periodontal tissue via microRNA in blood.

研究分野：歯科

キーワード：歯周病 非アルコール性脂肪性肝炎 microRNA 動物実験

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

1. 研究開始当初の背景

全身疾患と歯周疾患との関係について注目されている。このような中、非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis : NASH) が歯周疾患の関連疾患である可能性が高まってきた。例えば、ラット歯周疾患モデルにおいて、NASH 様所見が観察されることが明らかになっている。また、NASH マウスモデルにおいて歯周病病原菌が検出された症例では、肝臓の線維化が進行していたことも報告されている。このように、歯周疾患が NASH の病態進行におよぼす影響についての報告はあるが、NASH が歯周疾患の病態進行におよぼす影響についての報告はない。

近年、血液中の microRNA が注目を集めている。microRNA は標的 mRNA を不安定化するとともに、翻訳抑制を行うことでタンパク質産生を抑制する。また、エキソソームのような名のサイズの小胞顆粒に包埋されることによって、多くの酵素が存在する血液中でも分解されずに安定している。したがって、microRNA は血液を介して臓器間における疾病の発症や重症化に関与していると推測される。

以上のことから、NASH による microRNA 発現の変動は、歯周疾患の病態に関わる遺伝子発現に影響を与えるのではないかと、この仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、NASH が歯周疾患の病態に及ぼす影響のメカニズムについて、疾病モデルを用いた動物実験を行い、血液中の microRNA 発現と歯周組織の mRNA 発現に注目して解明することである。

3. 研究の方法

(1) 実験方法

8 週齢 Wistar 系雄性ラット 8 匹を、NASH 発症群 4 匹と対照群 4 匹に分けた。NASH 発症群には高脂肪食 (F2HFD2) を 8 週間与え、NASH を惹起させた。一方、対照群には普通食 (MF 飼料) を 8 週間与えた。実験期間終了後、多量のジエチルエーテルにて両群のラットを屠殺し、肝臓、歯周組織および血液を採取した。

(2) 血液生化学検査

採取した血液を遠心分離し、血清を抽出した。その後、血清中のトリグリセライド、総コレステロール、Low density lipoprotein (LDL) コレステロール、High density lipoprotein (HDL) コレステロール値を測定した。

(3) 肝臓、歯周組織の病理学的解析

採取した肝臓、歯周組織をホルマリン固定し、4 μ m の厚さの組織切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色を行い、病理学的変化を観察した。

(4) 血液中の microRNA 解析

血清サンプルから、3D-Gene® RNA extraction reagent from liquid sample kit を用いて RNA の抽出を行った。抽出された RNA は電気泳動装置 (Agilent 2100 Bioanalyzer) および分光光度計 (NanoDrop) を用いて、品質確認を行った。その後、抽出された RNA をサーマルサイクラーにてインキュベートを行い、3D-Gene® miRNA labeling kit を用いて蛍光標識を行った。蛍光標

識したサンプルを 3D-Gene® Rat miRNA Oligo chip にアプライし、ハイブリダイゼーションを行った。その後、マイクロアレイリーダー (3D-Gene® Scanner 3000) を用いて、蛍光シグナルをスキャンし、数値化した。

(5) 歯周組織中の mRNA 解析

歯周組織サンプルから、RNeasy Plus Universal Kit を用いて RNA の抽出を行った。抽出された RNA は電気泳動装置 (Agilent 2100 Bioanalyzer) および分光光度計 (NanoDrop) を用いて、品質確認を行った。その後、Amino Alkyl MessageAmpII Amplification Kit を用いて amplified RNA (aRNA) 増幅を行い、CyDye にて aRNA を標識した。標識したサンプルを 3D-Gene® Rat mRNA Oligo chip にアプライし、ハイブリダイゼーションを行った。その後、マイクロアレイリーダー (3D-Gene® Scanner 3000) を用いて、蛍光シグナルをスキャンし、数値化した。

(6) 血液中の miRNA、歯周組織中の mRNA の候補の絞り込み

血清中 miRNA、歯周組織中 mRNA の発現量について、対照群と NASH 発症群で比較し、発現比 (Fold Change : FC) (NASH 発症群 / 対照群) を算出した。血清中 miRNA については、q 値が 0.05 未満、かつ、FC が 0.67 以下または 1.5 以上のものを選択した。また、歯周組織中 mRNA については、q 値が 0.05 未満、かつ、FC が 0.5 以下または 2 以上のものを選択した。

(7) 血液中 miRNA と歯周組織中 mRNA の統合解析

Targetscan (<http://www.targetscan.org>) を用いて、NASH 発症により変化した血液中 miRNA の標的となる歯周組織中 mRNA を予測した。

4. 研究成果

NASH 発症群は対照群と比較して、血清中のトリグリセライド、総コレステロール、LDL コレステロール値が高く、HDL コレステロール値が低かった。

また、NASH 発症群の肝臓は、対照群と比較して、肝細胞の空胞変性を認めた。一方、歯周組織については、著明な病理学的変化は認められなかった。

血液中 miRNA について、2 群比較を行った。その結果、対照群と比較して NASH 発症群の血液中 miRNA に有意な発現変化を認めたものは、表 1 のとおりであった。

表 1. NASH 発症ラットモデルにおける血液中 miRNA の発現変化

| miRNA | FC | q 値 |
|-----------------|------|-------|
| rno-miR-376c-3p | 2.59 | 0.01 |
| rno-miR-759 | 2.07 | <0.01 |
| rno-miR-205 | 1.93 | 0.03 |
| rno-miR-9a-3p | 1.91 | 0.02 |
| rno-miR-203b-3p | 1.76 | 0.02 |
| rno-miR-137-5p | 1.74 | 0.04 |
| rno-miR-434-5p | 1.66 | 0.03 |
| rno-miR-878 | 0.61 | 0.01 |

対照群との比較

つづいて、歯周組織中 mRNA の発現について、2 群比較を行った。その結果、対照群と比較して NASH 発症群の歯周組織中 mRNA に有意な発現変化を認めたものは、表 2 のとおりであ

った。

また、血液中 miRNA と歯周組織中 mRNA の統合解析の結果は、表 3 のとおりであった。

表 2 . NASH 発症ラットモデルにおける

歯周組織中 mRNA の発現変化

| mRNA | FC | q 値 |
|----------|------|-------|
| Kif1b | 2.32 | 0.04 |
| Myt1 | 2.26 | 0.05 |
| Klrg2 | 2.18 | 0.01 |
| Als2cr12 | 2.15 | 0.05 |
| Nrg2 | 2.12 | 0.04 |
| Ly86 | 0.5 | 0.02 |
| Ackr1 | 0.49 | 0.03 |
| Rgs18 | 0.49 | 0.04 |
| Hoxb5 | 0.49 | 0.01 |
| Arid5b | 0.48 | <0.01 |
| Lcelm | 0.48 | <0.01 |
| Gbp5 | 0.47 | <0.01 |
| Slc13a1 | 0.44 | 0.04 |
| Bpifa5 | 0.43 | 0.02 |
| Fabp12 | 0.42 | <0.01 |
| Borcs6 | 0.41 | 0.01 |
| Mlana | 0.4 | 0.05 |
| P2ry13 | 0.4 | 0.02 |
| Rtp4 | 0.39 | 0.04 |
| Tmem253 | 0.34 | 0.03 |
| Atp6v1g3 | 0.34 | 0.02 |
| Mrps10 | 0.34 | 0.02 |
| Atp6v1b1 | 0.31 | 0.02 |

対照群との比較

表 3 . NASH 発症ラットモデルにおける

血液中 miRNA と歯周組織中 mRNA の変化

| miRNA | mRNA |
|----------------|------------|
| 増加 rno-miR-759 | Myt1 増加 |
| | Als2cr12 |
| | Ly86 減少 |
| | Rgs18 |
| | Arid5b |
| | Atp6v1g3 |
| | Mrps10 |
| | Atp6v1b1 |
| rno-miR-9a-3p | Kif1b 増加 |
| | Myt1 |
| | Nrg2 |
| | Slc13a1 減少 |
| | Mlana |
| | P2ry13 |
| miR-203b-3p | Arid5b 減少 |
| | Fabp12 |
| | Atp6v1g3 |
| | Mrps10 |
| | Atp6v1b1 |
| 減少 miR-878 | Myt1 増加 |
| | Rtp4 減少 |
| | Mrps10 |

以上の結果より、NASH 発症に伴い、血液中の microRNA の発現の変化を介して、歯周組織中の mRNA の発現が変化し、歯周組織に影響を与えることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Takayuki Maruyama, Takaaki Tomofuji, Terumasa Kobayashi, Hisataka Miyai, Toshiki Yoneda, Kohei Fujimori, Yoshio Sugiura, Daisuke Ekuni, Manabu Morita. Effects of MicroRNA related to Obesity on Gingival Gene Expression in a Rat Model. The 13th International Conference of Asian Academy of Preventive Dentistry, 2018.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

なし

6．研究組織

該当なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。