

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09586

研究課題名(和文) 歯周炎自然発症サルを用いた歯周炎関連分子の探索と歯周炎発症前診断への応用

研究課題名(英文) Exploration of periodontitis-related molecules by using spontaneous periodontitis monkey

研究代表者

小牧 基浩 (Komaki, Motohiro)

神奈川県立歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：30401368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯の喪失原因である歯周炎は、30-40歳で増加することが知られている。しかし、加齢変化が歯周炎の発症に直接関与するか否かについて統一見解が得られていない。我々は同一飼育環境下にあるサルを対象として、加齢と歯周炎の重症度との間に優位な相関が認められることを明らかにした。つづいて、マウス口腔内に歯周病原細菌を塗布し、歯周組織破壊を生じる系を用いて若齢と高齢マウスにおける組織破壊について歯を支える骨の3次元解析を行い、高齢マウスでは若齢マウスに比べ細菌感染により優位に歯槽骨吸収を生じることを明らかにした。現在、若齢マウスと接合された高齢個体で組織破壊が軽減されるか検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢に伴う変化として、体の機能維持や修復・再生に関与する幹細胞が減少またはその機能を失うことが報告された。疫学研究によって重症歯周炎は、一定の年齢を境に増加するという報告があるが、加齢変化と歯周病との関係についてコンセンサスは得られていない。本研究は、サルならびに高齢マウスをもちいて高齢群でより高い歯周組織破壊が生じることを明らかにした。現在、若齢マウスとの接合により高齢マウスで生じる歯周組織破壊が軽減されるか否か検討しており、今後幹細胞との関係を明らかにすることで歯周炎の新たな予防法の開発のための基礎となる。

研究成果の概要(英文)：Periodontitis, the leading cause of tooth loss, is known to increase between the ages of 30-40 years. However, no consensus has been reached on whether age-related changes are directly related to the development of periodontitis. We found a predominant correlation between aging and the severity of periodontitis in monkeys kept in the same rearing environment. We then applied periodontopathogenic bacteria to the oral cavity of mice to induce periodontal tissue destruction, and performed a three-dimensional analysis of the bone supporting the teeth in young and aged mice. The results showed that alveolar bone resorption occurs predominantly in aged mice compared to young mice due to bacterial infection. We are currently examining whether the tissue destruction is reduced in the old mice joined to the young mice.

研究分野：歯周病学

キーワード：カニクイザル 歯周炎 パラピオシス 高齢マウス

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は細菌感染と生体応答により発症し、継続的な炎症と歯周組織の破壊を特徴とする疾患である。歯周炎は歯の喪失の主因であり、咀嚼・消化機能の低下だけでなく、糖尿病や心血管疾患など全身疾患と関連し、健康寿命を短縮させる。これまで、歯周炎の診断には歯周ポケット深さ、動揺度、レントゲンによる歯槽骨吸収が用いられてきた。しなしながら、これらの臨床指標は、歯周炎による付着ならびに歯周組織破壊の結果であり、簡便かつ非侵襲的な歯周炎の早期診断法の確立が求められている。最近では、ゲノム研究が進み、遺伝子感受性などの歯周病リスク因子を検出することが可能になった。健康寿命の延伸は健康日本 21 (第二次) の中心課題であり、超高齢社会を迎えた我が国において、国民病とも言える歯周炎の予防は急務である。超高齢社会の進展に伴い歯科治療の難度やリスクが増加することが予測される。このため、健常者では一次予防として歯周病の発症を未然に防ぎ、また歯周病患者においては二次予防として歯周病の再発と重症化を防ぐため歯周炎発症に関わる生体変化を検出可能にする診断法の確立が望まれる。

エクソソームは各種細胞から恒常的あるいは各種刺激に応じて産生される脂質二重膜で覆われた膜小胞で、核酸、タンパク質、脂質を包含する。分泌されたエクソソームを他の細胞が取り込むことで分泌細胞と受容細胞間の情報交換に機能することが明らかになった。申請者は、これまでにエクソソームの機能に関する研究を行い、エクソソームが標的細胞に取り込まれ遺伝子発現や細胞分化を調節することを報告した。このことは、エクソソームが、生体内において細胞細胞間および細胞細胞外環境との情報交換を担っている可能性がある。さらに、エクソソームは脂質二重膜で覆われ生体内の酵素などから内容物が保護されており安定的に回収することが可能であるため、サンプリングが容易である。このような背景から、エクソソームは「診断のための理想的なツール」として近年注目され、エクソソームを用いたがんの診断に関する研究が報告されている。しかしながら、これまでの報告は、従来の検査法の代替でしかなく、疾患が発症する前の生体の変化を検出するものではない。

霊長類センターは、ポリオ生ワクチン検定用サル国内安定供給を目的に設立された国立研究開発法人施設で、サル類の大規模繁殖コロニーを有し、高品質のサル類の繁殖とそれらを用いた医学研究を行う我が国唯一の施設である (<http://tprc.nibiohn.go.jp/index.html>)。最近、コロニー内に歯周炎を発症するサルが存在することが明らかになった。コロニー内のサルは、飼育環境と遺伝的背景が明らかであることから、本研究の目的や、口腔内細菌の垂直・水平感染経路や発症機序を究明するためにも世界的にも大変貴重なフィールドである。以上より、申請者は、サルの大規模研究より歯周炎に関連する候補 miR をエクソソーム中の microRNAs 解析により検出し、細菌に対する生体応答の微細な変化と関連するか否かを明らかにすることで、歯周炎の発症前診断が可能になるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、サル類の大規模繁殖コロニーの歯周炎を発症したサルとそうでないサルを比較検討し、歯周炎発症を予測可能にする候補分子を模索し、歯周炎の発症前診断法を確立することである。歯周炎の診断に関しては、細菌関連因子や炎症に伴う生体由来の代謝産物のプロファイリングにより歯周炎活動度を予測する分子が同定された。しかしながら、歯周炎発症を予測可能にする分子は見つかっていない。

エクソソームは、あらゆる細胞から分泌される脂質二重膜に覆われた小胞であり、これまでに血液、唾液、尿、母乳、精液中にその存在が明らかになっている。また、内部にタンパク質、核酸などを含み、他の細胞に取り込まれることで細胞間情報伝達や新たな機能発現を担うことが報告された。エクソソームは細胞より恒常的に分泌される。また、細胞外部からの刺激によりエクソソームの内容物が変化することが知られている。既に、この様なエクソソームの特徴を活かしたがんの診断への応用に向けた研究が行われている。生体において細胞は恒常的にエクソソームを介した情報交換を行っており、細胞外からの刺激時によりエクソソームの内容物を変化させるため唾液由来エクソソーム中には口腔内環境の変化とこれに対する生体応答を反映する分子を含むと考えられる。そこで本研究では歯周炎の原因である細菌や炎症関連分子を検出するのではなく、唾液由来エクソソーム中の miR に注目し、歯周炎の発症とその慢性化における生体の微細変化を検出し、これを診断に応用しようとする独自の発想に基づく。また、歯周炎は多因子性疾患であり、細菌、環境、宿主等の因子がその発症と進展に関わる。そのため、ヒトを対象とした研究では、ヒト臨床サンプルを用いて行われる miR 発現解析では、宿主、細菌、食餌、投薬などによる非関連因子の発現変動により微細変化はマスクされてしまう。そこで本研究では、飼育環境と遺伝的背景が明らかな霊長類センターのサルに対して口腔内の全頭検査 (1600 頭) を行い、歯周炎発症群と健常群のエクソソーム中の microRNA (miR) の発現比較から歯周炎関連 miR (PAmiR) の同定を試みる。本研究では、飼育環境と遺伝的背景が明らかなサルとエクソソーム由来 miR 解析を組み合わせることで歯周病発症を予測可能にする生体変化を検出することが可能になると考えている。加えて、サルの口腔全頭検査では、歯周炎罹患率、口腔細菌の感染時期と経路の調査を同時に行う計画であるため歯周炎発症の機序について新た

な知見が得られる可能性があり、本研究の成果は歯周病学分野の発展に寄与することが期待される。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、飼育環境と遺伝的背景が明らかな霊長類センターのサル全頭(5~31.5歳)に対して2年毎に行われる健康診断に合わせて口腔内検査(口腔内写真、Plaque Index (PII), Gingival Index (GI), Periodontal Index (PI), 歯周ポケット深さ, 診査時出血の有無)を行い、歯周炎罹患率、口腔粘膜のパップテストと定量PCR法によりサル口腔内細菌を検出し、親子関係や飼育環境データと照合し、口腔細菌の感染時期と感染経路を検討する。

(2) 口腔検査によりサルを歯周病群と健常群を分け、抹消血または唾液よりエクソソームを回収し、RNAを単離し、miRアレイ解析と定量的PCR法による発現解析で歯周炎に関連する候補miRを選定する。

(3) ヒト健常者群、歯肉炎患者群、歯周炎患者群より超遠心法を用いて唾液または末梢血由来エクソソームを採取、RNAを単離し、(2)で選定された候補miRを定量PCR法で検出可能であるか否かと歯周炎発症との関連について検討する。

4. 研究成果

本研究では、歯周炎の発症前の生体変化を検出可能な新たな診断方法の確立を目指し、申請期間においてはまず同一環境、同一飼料で飼育されているカニクイザルにおける(1)年齢と歯周炎重症度の関連を明らかにすること、(2)歯周炎罹患サルにおける病原細菌の特定ならびに分離菌株の病原因子、伝播経路を明らかにすることを目的とした。

(1) 被験个体数が同一飼育環境にあるサルを、Young群(5-9歳)、Middle群(10-19歳)、Old群(20-32歳)の3群に分け、Plaque Index (PII), Gingival Index (GI), Probing pocket depth (PPD), Bleeding on probing (BOP)を検査した。細菌検査は、口腔内より歯垢を採取し、*Porphyromonas macacae* (*P. macacae*)に対するPCR検査を行った。初年度調査では年齢別飼育个体数に偏りがため、各群における統計学的解析に必要な个体数を確保し、各群における被験个体数を調整した。サルの口腔内特徴は、う蝕の个体が少なく、加齢に伴い多量の歯垢、歯石の付着が認められる。高齢个体では、歯肉に発赤と主張、著しい咬耗が認められる。一方、歯肉退縮も進行しているために深い歯周ポケットを有する个体は少ない。

PIIの結果は、加齢に伴いプラーク付着量の増加を認めた。

GIの結果、加齢に伴い辺縁歯肉の炎症が多く認められた。

PPDの結果、加齢に伴い深い歯周ポケットを有する个体が多く認められた。

BOPの結果、加齢に伴い歯肉の炎症が多く認められた。

以上の結果より、施設内サルを年齢階級別に分け、歯周組織検査を行うと加齢と歯周病の重症化との関連が認められた。

(2) カニクイザルの歯周病原細菌と考えられる *Porphyromonas macacae* (*P. macacae*)の歯周炎罹患状況について検討すると、検出率(PCR検査陽性个体数/被験个体数)は、Young群、Middle群で約40%で、Old群では100%であった。*Porphyromonas macacae* (*P. macacae*)は、ラット実験的歯周炎モデルを用いたマイクロCT解析において明らかな歯槽骨吸収が認められ、サルにおける歯周病原細菌である可能性が示された。歯垢細菌をBHI血液寒天培地と *Porphyromonas* 選択培地であるKVLB培地を用いて分離し、総菌数に対する黒色色素産生嫌気性桿菌(BPAR)の割合を算出した。歯垢細菌の総菌数は、全群で同程度であった。BPARは、Young群に比してOld群では5倍高値を示した。

(3) サルを歯周組織の炎症状態でグループ分けし、歯周炎発症に伴う変化を抹消血エクソソームを用いて網羅的に解析することを予定したが、新型コロナウイルス感染による移動制限等のため当初の予定を変更し高齢マウスを用いた小動物実験を計画した。計画変更後は、老齢マウス



材料と方法

・ 霊長類医学科学研究センター施設内カニクイザル (5歳~31.5歳)

・ 歯周病検査評価項目:

口腔内写真

Plaque Index (PII)

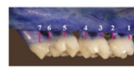
Gingival Index (GI)

Probing pocket depth (PPD)

Bleeding on probing (BOP)

* 対象部位 (11,16,24,36,31,44)

・ Polymerase chain reaction法 (PCR法)



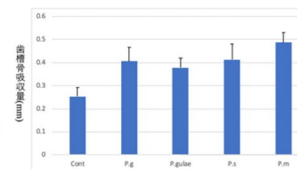
歯槽骨吸収測定域



非感染群 (Control)



感染群 (*P. macacae*)

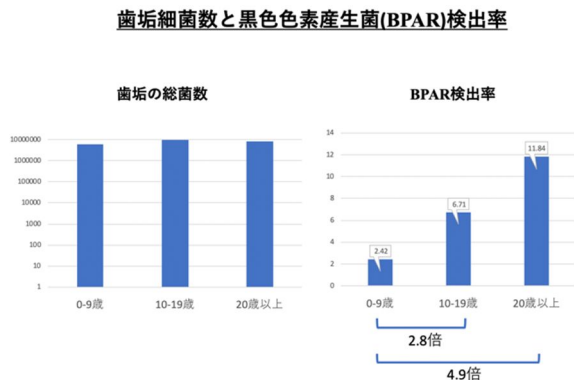


*in vivo*実験は、実験的歯周炎モデルを使用し、ラット口腔内へ *P. macacae* を直接投与する感染実験を行った結果。

非感染群 (Control) よりも感染群 (*P. macacae*) に、明らかに歯槽骨吸収が認められた。

また、その他の *Porphyromonas* 属の細菌についても同様の成果を得た。

(72週齢)と若齢マウス(8週齢)において歯周病関連細菌塗布により惹起された歯周炎による骨破壊の程度をマイクロCTを用いて比較検討した。細菌塗布をしないコントロール群について、老齢マウスは若齢マウスと比較し高い歯槽骨吸収を示すこと、P.g 菌塗布による歯槽骨吸収は、老齢マウスでは、若齢に比べ P.g 菌塗布により誘発される歯槽骨吸収が統計学的に優位におおきかった。



<引用文献>

- (1) Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF, Stoorvogel W, Geuze HJ. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. J Cell Sci. 2000 Oct;113 Pt 19:3365-74.
- (2) Tooi M, Komaki M, Morioka C, Honda I, Iwasaki K, Yokoyama N, Ayame H, Izumi Y, Morita I. Placenta Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes Confer Plasticity on Fibroblasts. J Cell Biochem. 2016 Jul;117(7):1658-70.
- (3) Komaki M, Numata Y, Morioka C, Honda I, Tooi M, Yokoyama N, Ayame H, Iwasaki K, Taki A, Oshima N, Morita I. Exosomes of human placenta-derived mesenchymal stem cells stimulate angiogenesis. Stem Cell Res Ther. 2017 Oct 3;8(1):219.
- (4) Schmalz G, Li S, Burkhardt R, Rinke S, Krause F, Haak R, Ziebolz D. MicroRNAs as Salivary Markers for Periodontal Diseases: A New Diagnostic Approach? Biomed Res Int. 2016;2016:1027525.
- (5) Kuboniwa M, Sakanaka A, Hashino E, Bamba T, Fukusaki E, Amano A. Prediction of Periodontal Inflammation via Metabolic Profiling of Saliva. J Dent Res. 2016 Nov;95(12):1381-1386.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 曾根 崇晴、小牧 基浩、山海 直、平嶺 浩子1、渡辺 清子、浜田 信城、児玉 利朗
2. 発表標題 大規模繁殖コロニーのカニクイザルにおける歯周病実態調査
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
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	児玉 利朗 (Kodama Toshiro) (20170269)	神奈川歯科大学・歯学部・教授 (32703)	
研究分担者	平嶺 浩子 (Hiramine Hiroko) (30386841)	神奈川歯科大学・歯学部・助教 (32703)	
研究分担者	山海 直 (Sankai Tadashi) (80300937)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 霊長類医学研究センター・再雇用職員 (84420)	
研究分担者	鎌田 要平 (Kamata Yohei) (80385070)	神奈川歯科大学・歯学部・助教 (32703)	

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