

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10026

研究課題名（和文）歯周病の病態を反映する唾液中microRNAの探索

研究課題名（英文）Detection of salivary miRNAs that predict chronic periodontitis progression

研究代表者

藤森 浩平（Fujimori, Kohei）

岡山大学・歯学部・客員研究員

研究者番号：70813624

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）：microRNAなどの歯周病を反映するバイオマーカーに関する研究が行われているが、唾液を用いた報告は少ない。本研究では、ヒト唾液中のmicroRNA（hsa-mir-381-3p）が歯周炎群において対照群よりも有意に発現量が高く、歯周ポケットの深さと正の相関関係があることを明らかにした。続いて、歯周病原菌のPorphyromonas gingivalisをヒト免疫細胞（THP-1）と共存培養すると、hsa-mir-381-3pの発現量が経時的に増加した。このことから、歯周炎群でのヒト唾液中のhsa-mir-381-3pの発現は、免疫細胞による炎症反応を反映している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は多くの国民が罹患する歯科疾患のひとつであり、発症の予防と早期診断が重要である。近年では歯周病を反映するバイオマーカーの探索に関する研究が盛んに行われているが、唾液を用いた報告は少なく、不明な点が多い。我々は唾液中の特定のmicroRNAの発現が歯周病の状態によって変化することを明らかにした。さらに、そのmicroRNAが歯周病原菌に対する炎症反応を反映している可能性を見出した。唾液を用いた方法による、簡便で侵襲性のない新しい歯周病の診断法の開発において寄与することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Previous studies have been conducted about biomarkers that reflect periodontal disease, including microRNA. However, there are few studies using saliva. In this study, the salivary expression of hsa-mir-381-3p (microRNA) in the periodontitis group was significantly higher than that in the control group. There was a positive correlation between the expression of hsa-mir-381-3p and the mean probing pocket depth. Next, one of human immune cells (THP-1) were co-cultured with Porphyromonas gingivalis. As a result, the expression level of hsa-mir-381-3p in the THP-1 was increased over time. Our results suggest that the salivary expression of hsa-mir-381-3p in the periodontitis group reflects inflammatory response by immune cells.

研究分野：予防歯科学分野

キーワード：歯周病 miRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は多くの国民が罹患する歯科疾患のひとつであり、発症の予防と早期診断が重要である。従来、歯周病の重症度は患者の口腔内を確認し、歯周ポケットの深さなどの指標をもとに診査を行ってきた。しかし、このような診査方法では、歯科医師などによる高度な技術が必要なことや、患者に侵襲を加えてしまうという欠点がある。また、これらの方法での測定値は、必ずしも現在の歯周状態を反映しているものばかりではなく、これまでに歯周組織が破壊された累積の結果を示しているものである。簡便で新しい歯周状態の評価や診断法を確立することは重要な課題であり、歯周病の病理や進行のメカニズムを明らかにするうえでも有効である。

近年では歯周病の病態を反映するバイオマーカーの探索に関する研究が盛んに行われている。体液中に存在するバイオマーカーの一種として、microRNA (miRNA)が注目されている。歯肉などの歯周組織を用いたmiRNAの研究報告は多いものの、唾液を用いた報告は少ない。歯周組織由来のmiRNAが歯周病に関連している可能性が示唆されているが [1,2]、唾液中のmiRNAについては不明な部分が多い [3]。唾液中において、miRNAはエクソソームのような小胞に包含されることで分解酵素によって分解されず、安定した状態で存在している。我々は歯周病を反映するバイオマーカーとして、唾液エクソソーム中のmiRNAの発現について着目した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯周病の病態を反映するバイオマーカーとして、唾液中のmiRNAを探索することである。

3. 研究の方法

岡山大学病院予防歯科の患者を対象として研究を実施した。歯周状態の検査を行ったのちに、米国歯周病学会の定義に基づいて軽度群、中等度群、重度群に分類し、合計120名の患者から安静時唾液サンプルを採取した。唾液サンプルからエクソソーム中に含まれている安定した状態のmiRNAを抽出した。マイクロアレイ解析を行い、候補となるmiRNAについて絞りこんだ。その後、逆転写Real-time PCRを行い、候補miRNAの発現についてさらなる分析を行った。

また、培養細胞を用いた検証を行った。臨床研究で絞られたmiRNAにおいて、その発現がどのような細胞に認められるのかを培養細胞で確認した。歯周病菌の一種である*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)を免疫担当細胞の一つである単球系のヒト急性単球性白血病由来細胞株 (THP-1)と共存培養した。細胞内でのmicroRNAの発現量の変化を確認した。

4. 研究成果

対象者特性を表1に示す。各患者から採取した唾液サンプルを用いて分析を行った。特定のmiRNA (hsa-mir-381-3p) が歯周病重度群において有意に発現が増加しており (表2)、また hsa-mir-381-3p の発現量は歯周ポケットの深さと正の相関関係があることが明らかになった (図1)。この研究成果の一部をまとめたものは学術誌に掲載されるに至った [4]。

表 1.患者対象者表

評価項目	全体	歯周病重症度		
	(N= 120)	軽度群 (N= 26)	中等度群 (N= 58)	重度群 (N= 36)
平均年齢 (歳)	68.4 (10.2)*	63.3 (13.9)	68.6 (8.7)	71.7 (7.9)
男性	38 (31.7)	6 (23.1)	18 (31.0)	14 (38.9)
現在歯数 (本)	23.6 (5.0)	25.5 (3.7)	24.3 (4.3)	21.0 (6.0)
平均 PPD (mm)	2.0 (0.4)	1.9 (0.2)	2.0 (0.3)	2.3 (0.5)
平均CAL (mm)	2.8 (1.2)	1.9 (0.2)	2.6 (0.7)	3.9 (1.4)
BOP (%)	7.7 (9.0)	6.9 (9.2)	5.8 (4.9)	11.3 (12.7)
PCR (%)	22.2 (20.3)	18.1 (14.7)	24.0 (20.3)	22.3 (24.0)
喫煙習慣あり	6 (5.0)	0 (0)	2 (3.4)	4 (11.1)
BMI	22.5 (3.0)	22.0 (2.7)	22.2 (2.7)	23.3 (3.3)
糖尿病服薬中	12 (10.0)	2 (7.7)	8 (13.8)	3 (5.6)
1日のブラッシング回数	2.5 (0.7)	2.6 (0.6)	2.3 (0.7)	2.7 (0.8)

*人数 (%) または平均 (標準偏差)

表 2.重度群と軽度群におけるマイクロアレイ解析の結果
(Fold change が 2 倍以上または 0.5 倍以下のものを抜粋)

miRNAs	Fold Change (重度群/軽度群)	p値
hsa-miR-381-3p	3.63	0.015*
hsa-miR-543	2.70	0.123
hsa-miR-144-3p	2.16	0.511
hsa-miR-30b-5p	0.42	0.136

* $p < 0.05$ *t*検定

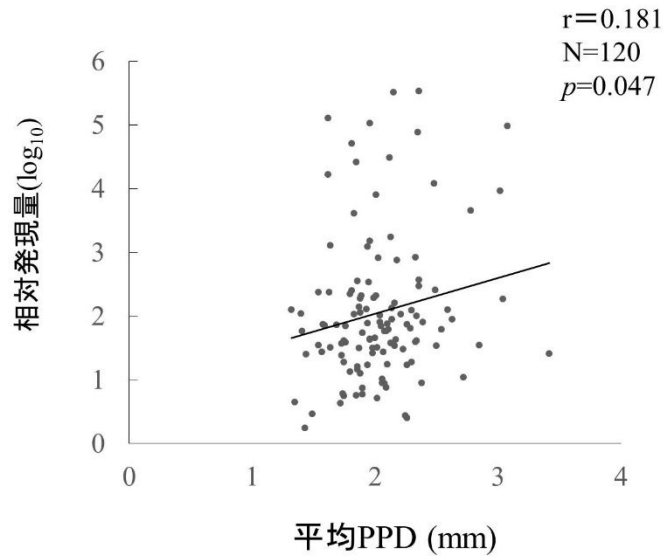


図 1.hsa-miR-381-3p の発現量と歯周ポケットの深さとの相関

続いて、*P.gingivalis*をヒト由来の細胞と共存培養し、miRNAの発現量の変化をみた。THP-1と*P.gingivalis*を共存培養した群（導入群）とTHP-1のみを培養した対照群で、hsa-mir-381-3pの発現について、*P.gingivalis*導入時（0h）、6h、12h後に確認した。その結果、0hでは、hsa-mir-381-3pの発現量に差は認めなかったが、6h、12h後では*P.gingivalis*導入群においてhsa-mir-381-3pの発現量が増加していた（図2）。なお、骨芽細胞（MC）においても同様の手法で検証を行ったが、誘導は認めなかった。

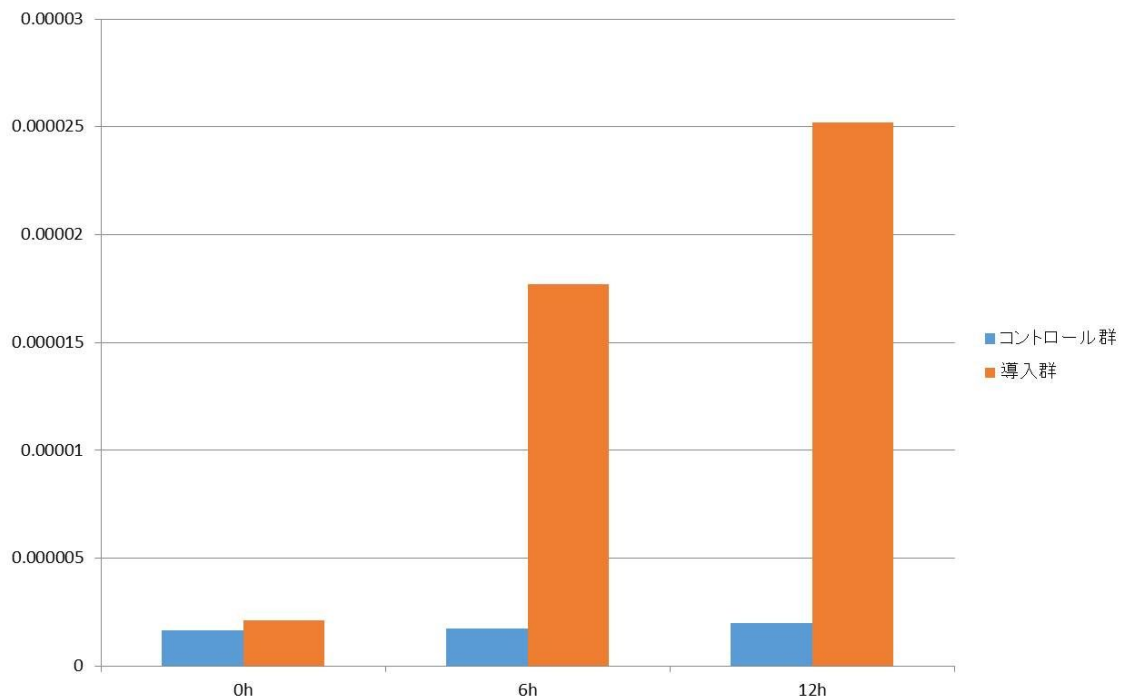


図 2. THP-1 における hsa-miR-381-3p の発現量

*P.gingivalis*との共存培養により、THP-1においてhsa-mir-381-3pの発現量が経時的に増加することが明らかになった。このことから、細胞内での免疫反応とhsa-mir-381-3pの発現に関連があることが示唆された。

以上の結果から、*P.gingivalis*によって生じた免疫反応によってhsa-mir-381-3pの発現が誘導され、重度歯周炎においてはその細胞由来のmiRNAが唾液中に反映される可能性が示唆された。

<引用文献>

1. Xie, Y., Shu, R., Jiang, S., Liu, D. & Zhang, X. (2011) Comparison of microRNA profiles of human periodontal diseased and healthy gingival tissues. *International Journal of Oral Science* **3**, 125–134. <https://doi.org/10.4248/IJOS11046>
2. Ogata, Y., Matsui, S., Kato, A., Zhou, L., Nakayama, Y. & Takai, H. (2014) MicroRNA expression in inflamed and noninflamed gingival tissues from Japanese patients. *Journal of Oral Science* **56**, 253–260. <https://doi.org/10.2334/josnugd.56.253>
3. Lee, Y. H., Na, H. S., Jeong, S. Y., Jeong, S. H., Park, H. R. & Chung, J. (2011) Comparison of inflammatory microRNA expression in healthy and periodontitis tissues. *Biocell* **35**, 43–49.
4. Fujimori, K., Yoneda, T., Tomofuji, T., Ekuni, D., Azuma, T., Maruyama, T., Mizuno, H., Sugiura, Y. & Morita, M. (2019) Detection of Salivary miRNAs Reflecting Chronic Periodontitis: A Pilot Study. *Molecules* **24**. <https://doi.org/10.3390/molecules24061034>

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 1件）

1. 著者名 Fujimori Kohei, Yoneda Toshiki, Tomofuji Takaaki, Ekuni Daisuke, Azuma Tetsuji, Maruyama Takayuki, Mizuno Hirofumi, Sugiura Yoshio, Morita Manabu	4. 巻 24
2. 論文標題 Detection of Salivary miRNAs Reflecting Chronic Periodontitis: A Pilot Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1034 ~ 1034
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules24061034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	森田 学 (Morita Manabu) (40157904)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	
研究分担者	米田 俊樹 (Yoneda Toshiki) (60756071)	岡山大学・歯学部・客員研究員 (15301)	
研究分担者	江國 大輔 (Ekuni Daisuke) (70346443)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授 (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
---------	---------