

令和 4 年 5 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19314

研究課題名（和文）歯周病を反映した血液中のmicroRNAの探索

研究課題名（英文）Detection of serum microRNA that reflect chronic periodontitis

研究代表者

米田 俊樹（Yoneda, Toshiki）

岡山大学・歯学部・客員研究員

研究者番号：60756071

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、歯周状態を反映する血液中microRNAバイオマーカーを探索することである。慢性歯周炎患者30名およびコントロール群30名の血液サンプルからmiRNAを抽出しマイクロアレイおよび逆転写PCR法を実施したところ、hsa-miR-664a-3p、hsa-miR-501-5pおよびhsa-miR-21-3pが歯周状態を反映するバイオマーカーとなり得ることが分かった。また、これらのmicroRNAについてバイオインフォマティクス解析を行ったところ、hsa-miR-664a-3p およびhsa-miR-21-3pは糖尿病の進行に関わるMAPKシグナル伝達経路と強く関連していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的な特色は、microRNAを切り口にして、歯周病を反映したバイオマーカーを探索することにある。特に、血液に注目して歯周病のバイオマーカーを探索する点、歯周病重症度とmicroRNAの発現に関連があることを明らかにする点、などが挙げられる。本研究の成果は、歯周状態を反映するバイオマーカーを開発するための重要な知見となり、歯周病の早期発見の診断技術の向上にも貢献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. We enrolled 30 healthy patients without periodontitis and 30 patients with chronic periodontitis. Serum miRNA profiles were compared in samples from participants with and without chronic periodontitis using Microarray and Real-time PCR. Hsa-miR-664a-3p, hsa-miR-501-5p, and hsa-miR-21-3p are candidate serum biomarkers for chronic periodontitis. Bioinformatics study showed that the target genes of miR-664a-3p and miR-21-3p were strongly associated with MAPK signaling pathways, which play a role in the progression of diabetes mellitus.

研究分野：予防歯科学

キーワード：慢性歯周炎 microRNA

## 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、発症予防と早期診断が重要であると認識されている。これまでの研究から、歯周病は炎症性疾患であり、口腔内細菌叢に対する免疫応答が病態や進行に関与することがわかっている (Kinane et al. 2010)。このような中、進行の指標となるバイオマーカーに関する研究が盛んに行われている。

近年、生命科学の進歩によって体液中の microRNA が測定可能となってきた (Machida et al. 2015)。microRNA はバイオマーカーとしての応用が注目されており、細胞間や臓器間におけるコミュニケーションの媒体として、多くの疾患の発症や重症化に関わる遺伝子発現を制御していることが明らかにされている。歯周病においても microRNA による遺伝子制御が行われていることが考えられる。しかし、現在までの研究成果としては、歯周病の病態に歯周組織由来の microRNA が関与している (Kebuschull & Papapanou 2015) といった知見で留まっており、データが不足している。一方、血液中において、microRNA はエキソソームのような小胞に包埋されることで、分解酵素によって分解されずに安定した状態で存在していることが分かっている。以上のことから、血液中 microRNA のプロファイリングによって歯周病の新たなバイオマーカーを発見できるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、慢性歯周炎患者および歯肉健常者について、血液中の microRNA の網羅的な発現分析 (トランスクリプトーム解析) を行い、歯周状態を反映する血液中 microRNA バイオマーカーを探索することである。

### 3. 研究の方法

2019 年 7 月から 2019 年 11 月までに岡山大学病院に来院した下記記載の項目を満たす患者 30 名を対象に横断研究を実施した。カルテから患者情報を収集するとともに、生活習慣・全身の健康に関する質問調査および歯周組織検査 (歯周ポケット深さ、クリニカルアタッチメントレベル、プロービング時出血および歯垢付着指数) を行った後、採血した。採血した血液サンプルから、microRNA を抽出した。

抽出した RNA を外部機関 (東レ) に委託し、マイクロアレイを実施し、血液中 microRNA の発現を網羅的に分析することで、2 群間で血液中の microRNA の種類・発現量について比較検討し、バイオマーカーとしての有用性を検証した。

#### < 選択基準 >

以下の基準を全て満たす者 30 名を対象とした。

- 1) 慢性歯周炎と診断された患者
- 2) 本研究の参加にあたり十分な説明を受けた後、十分な理解の上、患者本人の自由意思による文書同意が得られた者

#### < 除外基準 >

以下のいずれかに抵触する患者は本研究に組み入れないこととした。

- 1) 妊婦
- 2) 40 歳未満の者
- 3) 抗炎症薬の使用者
- 4) 3 か月以内に歯周組織に急性炎症のあった者

コントロール群として更に 30 名の歯肉健常者を年齢、性別、喫煙の有無、糖尿病の有無をマッチさせて選別した。カルテから患者情報を収集するとともに、生活習慣・全身の健康に関する質問調査および歯周組織検査 (歯周ポケット深さ、クリニカルアタッチメントレベル、プロービング時出血および歯垢付着指数) を行った後、採血した。採取した血液サンプルから microRNA を抽出した。抽出した RNA を外部機関 (東レ) に委託し、マイクロアレイを実施し、血液中 microRNA の発現を網羅的に分析した。

マイクロアレイ解析にてコントロール群と歯周病群との間で発現の違いのある (fold-change > 1.5, または fold-change < 0.67) ( $p < 0.05$ ) microRNA について Mx3000P Real-Time PCR System (Agilent technology) を用いて逆転写 Real-time PCR 法を行い歯周病と関連する microRNA を特定した。

上記で特定した microRNA の及ぼす作用について Genecodis3.0 を用いてバイオインフォマティクス解析を行った。

### 4. 研究成果

2019 年度ではマイクロアレイにて血液中 miRNA の発現を網羅的に分析したところ 7 つの miRNA (hsa-miR-555, hsa-miR-130a-5p, hsa-miR-664a-3p, hsa-miR-501-5p, hsa-miR-6770-5p, hsa-miR-4717-5p, hsa-miR-21-3p) が群間で異なる発現を示した (fold-change > 1.5, または fold-change < 0.67) ( $p < 0.05$ )。

2020年度では、マイクロアレイにおいて群間で異なる発現を示した7つの血液中 miRNA について逆転写リアルタイム PCR を行った。その結果、歯周病群における hsa-miR-664a-3p、hsa-miR-501-5p および hsa-miR-21-3p において歯周病群の発現が歯肉健常者群と比べて有意に高くなった。(p<0.05) これらの結果は血液中の miRNA が歯周状態を反映するバイオマーカーとなる可能性を示唆している。

2021年度では、特定された miRNA の及ぼす作用について、バイオインフォマティクス解析を行った。Genecodis3.0にて解析したところ、hsa-miR-664a-3p および hsa-miR-21-3p は糖尿病の進行に関わる MAPK シグナル伝達経路と強く関連していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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