

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18501

研究課題名(和文) 光エネルギーのphotobiomodulation効果による歯周炎の進行抑制

研究課題名(英文) Inhibition of periodontitis progression by photobiomodulation effect of light energy

研究代表者

大杉 勇人(Ohsugi, Yujin)

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・医員

研究者番号：80846791

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)：本研究では、光エネルギー照射による細菌叢の変化、それに伴う炎症および骨吸収抑制効果、歯肉での遺伝子発現の変化を網羅的に解析する。歯周炎患者に対して光エネルギーによるphotobiomodulation効果を応用することにより免疫応答を調節し、歯周炎の進行抑制および予防が出来る可能性を探索する。結紮誘導歯周炎モデルマウスに対してレーザーを照射し、その後マイクロX線CTによる経時的な骨吸収量の測定、16S rRNA遺伝子に基づいた細菌叢の評価、RNA-sequencingを用いた歯肉の遺伝子発現評価を行い、非照射側と比較検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、歯周病モデルマウスに対して半導体レーザーを照射することにより、歯肉の遺伝子発現と細菌ネットワークの変化に伴い、歯槽骨吸収が抑制されることを示した。レーザー照射により細菌叢の有意な変化は認められなかったが、歯周炎に関連するKrebsiella属がcore genusではなくなったことが、歯周炎の抑制に関与した可能性がある。またRNA-seqより歯周炎のリスクに関わるとされる遺伝子が減少していた。半導体レーザー照射によって、宿主および細菌叢の両方を変化させ、歯周炎の進行抑制へと応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the suppressive effect of high-frequency pulsed diode laser irradiation on bone resorption. Ligating ligature around the teeth and/or laser irradiation was performed on the gingival tissue in mice as follows: Co (no ligature and no laser irradiation), Li (ligation without laser irradiation), La (no ligature but with laser irradiation), and LiLa (ligation with laser irradiation). Bone resorption was evaluated using micro-computed tomography. RNA-seq analysis was performed on gingival tissues at 3 days post ligation. The differences in microbial composition between Li and LiLa were evaluated. Bone resorption caused by ligation was significantly suppressed by laser irradiation. RNA-seq in Co and La gingival tissue revealed many differentially expressed genes. The bacterial network structure was altered between the Li and LiLa. Diode laser irradiation showed biological effects and suppressed bone resorption in ligature-induced periodontitis.

研究分野：歯周病学

キーワード：ダイオードレーザー photobiomodulation 結紮誘導歯周炎 RNA Sequencing 細菌叢

1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯の喪失を引き起こし、オーラルフレイルのきっかけとなる疾患といえる。それゆえ高齢者において本疾患の予防や治療は非常に重要であるが、高齢化に伴う多数の基礎疾患や、患者自身でのプラークコントロールが困難になることにより、積極的な歯周治療介入が行えないことも少なくない。それゆえ、簡便で低侵襲な歯周治療法の開発が望まれている。本研究では動物実験および臨床研究において、レーザーを用いた光エネルギー照射による歯周組織での細菌叢の変化、それに伴う炎症および骨吸収抑制効果、歯肉での遺伝子発現の変化を網羅的に解析する。その効果により積極的な歯周治療の介入が行えない患者に対して光エネルギーによる photobiomodulation 効果を応用することにより免疫応答を調節し、歯周炎の進行抑制および予防が出来る可能性を探索する。

2. 研究の目的

本研究では動物実験および臨床研究において、レーザーを用いた光エネルギー照射による歯周組織での細菌叢の変化、それに伴う炎症および骨吸収抑制効果、歯肉での遺伝子発現の変化を網羅的に解析する。現在におけるレーザーの歯周治療への応用は、高出力レーザーのもつ蒸散・止血などの効果を期待し、外科処置で主に用いられている。一方で本研究では、生体組織に自己治癒を促す photobiomodulation という新たな観点から、低出力レーザーを歯周組織の健康維持促進を目的として適用させることを考えている。

本研究では、積極的な歯周治療の介入が行えない患者に対して光エネルギーを用いることにより、細菌や免疫応答を制御し歯周炎の進行抑制および予防が出来る可能性を、動物実験およびヒトを対象とした臨床研究により探索する。

3. 研究の方法

C57BL/6J マウス 9 週齢雄の歯肉組織に対して、以下のように歯周囲の結紮および/またはレーザー照射を行った。Co (結紮なし、レーザー照射なし) Li (結紮あり、レーザー照射なし) La (結紮なし、レーザー照射あり) LiLa (結紮あり、レーザー照射あり)。骨吸収はマイクロ CT を用いて評価した。結紮後 3 日目の 4 群すべての歯肉組織について RNA-seq 解析を行った。Li と LiLa の微生物組成の違いを 16S rRNA 遺伝子配列の数で評価した。

4. 研究成果

(1) 結紮により誘発された第二大臼歯周囲の歯槽骨吸収

マイクロ CT 画像では、結紮前の右第二大臼歯は全群で骨量減少が認められなかった。結紮とレーザー照射は骨吸収に影響を与えた。また、レーザー照射と結紮の間に相互作用の傾向が見られた。Co 群と La 群の間では、骨吸収に有意差は認められなかった。重要なことは、結紮後 8 日目において、LiLa 群の結紮部位は Li 群に比べ有意に骨量減少が少なく、レーザー照射が結紮誘発歯周炎モデルの骨量減少を抑制することが示されたことである。

(2) 健常歯肉組織に対するレーザー照射の効果

まず、レーザー照射が無傷の歯肉組織に及ぼす直接的な影響を明らかにするために、Co 群と La 群の遺伝子発現プロファイルを比較した。レーザー照射した歯肉組織での発現パターンは、非照射の歯肉組織での発現パターンと明らかに異なっていた。その結果、1186 の遺伝子が $|\text{foldchange}| > 2$, $\text{FDR} < 0.1$ であることがわかった。KEGG パスウェイ解析の結果、La 群では Co 群に比べ、cytokine-cytokine receptor interaction および chemokine signaling パスウェイの発現が有意に増加していた。

G0 term 上の生物学的プロセスでは、レーザー照射により、Keratinocyte differentiation, immune response, keratinization, cellular response to interferon-gamma terms に対する細胞応答がアップレギュレートされた。また、chemokine activity, cytokine activity, and IgG binding の各項目は G0 の分子機能の観点からレーザー照射により発現が増加した。レーザー照射した歯肉組織と非照射の歯肉組織で、特定の機能における遺伝子発現レベルの違いを比較するために、Hallmark 遺伝子群を用いて Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を行った。特に、mTORC1 signaling, DNA repair, E2F target の遺伝子群は、レーザー照射歯肉組織で有意に亢進していた。さらに、レーザー照射した歯肉組織では、IL6/JAK/STAT3 signaling と inflammatory response の遺伝子群が亢進していた。

(3) 結紮系による歯周炎におけるレーザー照射の歯肉組織への影響

Li と LiLa の結紮部位を比較した歯肉組織の遺伝子発現パターンは明確な差はなかったが (図 3A) 90 の遺伝子が $|\text{foldchange}| > 2$, $\text{FDR} < 0.1$ であった。KEGG パスウェイ解析の結果、LiLa 群では Li 群と比較して、アップレギュレートおよびダウンレギュレートされた DEG に関連したパスウェイは存在しなかった。また、Li 群と LiLa 群の間でア

アップレギュレートおよびダウンレギュレートされた DEG から統計的な有意性を示した GO タームはなかった。続いて、Li 群と LiLa 群との間で GSEA を実施した。Co 群と La 群間の GSEA の結果と同様に、レーザー照射した歯肉組織では、mTORC1 シグナルと E2F 標的遺伝子セットが有意に亢進していた。さらに、IL6/JAK/STAT3 シグナル、炎症反応、PI3K-Akt-mTOR シグナル遺伝子群は、レーザー照射した歯肉組織で亢進していた。

3 日後の歯周組織破壊に関連する Li 群と LiLa 群の DEG に着目し、RNA-seq データから Transcripts Per Million (TPM) に基づき遺伝子発現量を確認した。LiLa 群の結紮部位では、歯周炎に関連する遺伝子である *Nos1*、*Ablim2* の発現が Li 群に比べ有意に低下した。意外にも、炎症の抑制に関連する *Adm2* は、LiLa で有意に増加した。興味深いことに、肥満に関連する *Amy1* は、Li 群と比較して LiLa 群で有意に減少していた。しかし、3 日目のサンプルからの DEG に関する mRNA 発現では、8 日目の Co と La 群、Li と LiLa 群の間に有意差は認められなかったが、二元配置分散分析により、結紮自体が *Albim2* と *Adam2* の発現に有意な影響を与えることが示された。さらに、8 日目の *Albim2* 発現において、結紮群とレーザー照射群の間に有意な相互作用が示された。

(4) 結紮系中の 16S rRNA 配列に基づくマイクロバイオーム組成の評価

配列の抽出 DNA 量は、LiLa 群の方が Li 群より有意に少なかった。Li と LiLa の結紮部位の間には、Shannon 指数および ASV の数に有意差は見られなかった。主座標分析 (PCoA) により、ANOSIM で求めた Li 群と LiLa 群のマイクロバイオーム組成に有意差は認められなかった ($R = -0.0031$ の相関)。Li と LiLa の結紮部位のマイクロバイオーム組成に有意差はなかったが、LiLa 群では *Klebsiella* 属が増加する傾向があった。さらに、共起する 2 つの属をノードとエッジで示したネットワーク構造を構築し、各属の 16S rRNA 遺伝子プロファイルの共起関係を解析した。クラスタリング係数の値は、Li と LiLa でそれぞれ 0.812 と 0.300 であった。主要なネットワークに着目すると、Li と LiLa の結紮部にそれぞれ 29 個と 16 個のノードが観測された。他の属と 4 つ以上の共起があり、主ネットワークに 1 つ以上の有意な共起がある属は、相互作用コア属に分類された。レーザー照射後、9 属から 3 属に減少しており、相互作用するコア属が変化していた。*Klebsiella* はレーザー照射後のネットワークに存在しなくなった。

本研究は、結紮誘導歯周炎に対して半導体レーザーを照射することにより、歯肉の遺伝子発現と細菌ネットワークの変化に伴い、歯槽骨吸収が抑制されることを示した。レーザー照射により細菌叢の有意な変化は認められなかったが、歯周炎に関連する *Klebsiella* が core genus ではなくなったことが、歯周炎の抑制に関与した可能性がある。また RNA-seq より歯周炎のリスクに関わるとされる遺伝子が減少していた。半導体レーザー照射によって、宿主および細菌叢の両方を変化させ、歯周炎進行抑制へと応用できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shimohira Tsuyoshi, Katagiri Sayaka, Ohsugi Yujin, Hirota Tomomitsu, Hatasa Masahiro, Mizutani Koji, Watanabe Kazuki, Niimi Hiromi, Iwata Takanori, Aoki Akira	4. 巻 39
2. 論文標題 Comprehensive and Sequential Gene Expression Analysis of Bone Healing Process Following Er:YAG Laser Ablation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery	6. 最初と最後の頁 100 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/photob.2020.4833	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohsugi Yujin, Niimi Hiromi, Shimohira Tsuyoshi, Hatasa Masahiro, Katagiri Sayaka, Aoki Akira, Iwata Takanori	4. 巻 21
2. 論文標題 In Vitro Cytological Responses against Laser Photobiomodulation for Periodontal Regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9002 ~ 9002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21239002	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 -
1. 著者名 Ohsugi Yujin, Katagiri Sayaka, Hirota Tomomitsu, Niimi Hiromi, Hatasa Masahiro, Watanabe Kazuki, Shimohira Tsuyoshi, Mizutani Koji, Kitazawa Moe, Matsuzawa Ayumi, Kadokura Hiroshi, Yokose Satoshi, Iwata Takanori, Aoki Akira	4. 巻 34
2. 論文標題 Laser irradiation decreases sclerostin expression in bone and osteogenic cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 12877 ~ 12893
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202001032R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Niimi Hiromi, Ohsugi Yujin, Katagiri Sayaka, Watanabe Kazuki, Hatasa Masahiro, Shimohira Tsuyoshi, Tsuchiya Yosuke, Maekawa Shogo, Hirota Tomomitsu, Kadokura Hiroshi, Yokose Satoshi, Iwata Takanori, Aoki Akira	4. 巻 8
2. 論文標題 Effects of Low-Level Er:YAG Laser Irradiation on Proliferation and Calcification of Primary Osteoblast-Like Cells Isolated From Rat Calvaria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.00459	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 新見 ひろみ, 大杉 勇人, 片桐 さやか, 土谷 洋輔, 畑佐 将宏, 下平 剛, 門倉 弘志, 横瀬 敏志, 岩田 隆紀, 青木 章
2. 発表標題 Er:YAGレーザーによるラット頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞様細胞の増殖と石灰化に対する効果
3. 学会等名 第32回日本レーザー歯学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新見 ひろみ, 大杉 勇人, 片桐 さやか, 渡辺 数基, 畑佐 将宏, 下平 剛, 土谷 洋輔, 前川 祥吾, 廣田 朝光, 門倉 弘志, 横瀬 敏志, 岩田 隆紀, 青木 章
2. 発表標題 ラット頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞様細胞の増殖と石灰化に対するEr:YAGレーザーの効果
3. 学会等名 第63回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yujin Ohsugi, Sayaka Katagiri, Tomomitsu Hirota, Hiromi Niimi, Masahiro Hatasa, Kazuki Watanabe, Tsuyoshi Shimohira, Koji Mizutani, Moe Kitazawa, Ayumi Matsuzawa, Hiroshi Kadokura, Satoshi Yokose, Takanori Iwata, Akira Aoki
2. 発表標題 Laser irradiation decreases Sost expression in bone and osteogenic cells
3. 学会等名 The 106th Annual meeting American Academy of Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiromi Niimi, Yujin Ohsugi, Sayaka Katagiri, Kazuki Watanabe, Masahiro Hatasa, Tsuyoshi Shimohira, Yosuke Tsuchiya, Shogo Maekawa, Tomomitsu Hirota, Hiroshi Kadokura, Satoshi Yokose, Takanori Iwata, Akira Aoki
2. 発表標題 The effects of Er:YAG laser irradiation on primary osteoblast-like cells. The 106th Annual meeting American Academy of Periodontology
3. 学会等名 The 106th Annual meeting American Academy of Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsuyoshi Shimohira, Yujin Ohsugi, Sayaka Katagiri, Tomomitsu Hirota, Koji Mizutani, Kazuki Watanabe, Hiromi Niimi, Masahiro Hatasa, Takanori Iwata, Akira Aoki
2. 発表標題 Comprehensive and sequential gene expression analysis of bone healing process following Er:YAG laser ablation
3. 学会等名 第63回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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