

令和 6 年 4 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10207

研究課題名(和文) 歯周病罹患組織から全身臓器に情報を伝達するmicroRNAの同定とその制御

研究課題名(英文) Regulation of microRNAs that transmit information from gingival tissue to systemic organs

研究代表者

森田 学 (Morita, Manabu)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・特命教授

研究者番号：40157904

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)：歯周病は様々な全身疾患に影響する。細胞外小胞内にある核酸物質のmicroRNAは、メッセンジャーRNAに結合し、その遺伝子発現を制御する。そこで、歯周病由来の特定のmicroRNAが、血行を介して全身臓器のmRNAの遺伝子発現を制御し、病変を引き起こすという仮説を立て、候補となる血清microRNAを特定した。Wistar ratを用いて、歯周病を人工的に惹起させる群(歯周病群)と何もしない群(対照群)を設定した。その結果、両群間で血清中の発現量に差がみられるいくつかmicroRNAが抽出された。なお、抽出されたmicroRNAが、実際に歯周組織由来であるのかについては現在検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は、世界中で最も蔓延している感染症の一つである。そして、口腔内への影響のみならず、脳、心臓、肝臓、腎臓など全身臓器への影響が指摘されている。しかし、歯周病がどのような機序で全身臓器に影響するのかについては不明な点が多いことから、歯周病を治療しても期待通りに肝臓や腎臓の状態が軽快しないことを幾度も経験する。本研究成果により、「特定のmicroRNAが、確かに歯周組織から血行を介して全身に移行し、様々な悪影響を及ぼしていること」が証明される。将来的には、そのmicroRNAを制御することで、全身臓器への影響を軽減させることが可能となる。

研究成果の概要(英文)：Periodontitis cause systemic diseases such as diabetes, cardiovascular disease, preterm birth, liver disease, and kidney disease through blood circulation. In the circulation, the serum-derived exosomes contain genes (microRNAs and mRNAs), proteins and lipids, which have important roles in these mechanisms. It is possible that serum microRNA profile originated from periodontally-diseased tissue are associated with systemic condition. Wister male rats were divided into two groups: periodontitis group and control group. The periodontitis group showed candidate microRNAs with significant fold change (increase or decrease). Now, the origin of these candidate microRNAs are under investigation.

研究分野：予防歯科学

キーワード：マイクロRNA (microRNA) 歯周病 全身疾患

## 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、歯周組織の炎症性疾患である。また、歯周病は様々な全身疾患に影響することが知られている。そのメカニズムとして、歯周病菌そのもの、あるいはその代謝産物、また歯周組織由来のサイトカインなどが血行を介して全身の臓器に移行するプロセスが確認されている。しかし、歯周病がどのような機序で全身臓器に影響するかについては、遺伝子レベルまでのメカニズムを考えると不明な点が多い。

この点に関して、我々は細胞外小胞（エクソソーム）内にある核酸物質 microRNA に注目している。microRNA は、17~25 塩基対からなる短鎖ノンコーディング RNA であり、互いに部分相補的な遺伝子配列を持つメッセンジャー RNA (mRNA) に結合し、その遺伝子発現を制御する。これまで、胆肝臓がん患者の唾液中では健康成人の唾液中と比較して、特定の microRNA がみられることや、加齢に伴い出現するヒト唾液中 microRNA について成果を発表した。

そこで今回は、歯周病が様々な全身疾患に影響するメカニズムを解明するうえで、そのキーとなる物質として microRNA を想定した。

### 2. 研究の目的

歯周病由来の特定の血清 microRNA が、全身臓器の mRNA の遺伝子発現を制御し、病変を引き起こすという仮説を立て、候補となる血清 microRNA を特定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 【実験 1】

雄性 Wistar rat を用いた。上顎第二大臼歯に絹糸を巻いて歯周病を人工的に惹起させる群（歯周病群、8 匹）と何もしない群（対照群、8 匹）に分け 4 週間飼育した。屠殺後に、肝臓の組織学的な変化を H-E 染色で検討した。血清中、肝臓の RNA を、3D-Gene® RNA extraction kit (Toray, Kanagawa, Japan) TRizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて抽出した。マイクロアレイ分析 (3D-Gene, Toray, Kanagawa, Japan) によって、歯周病群で特異的に発現（特に強く発現/特に弱く発現）した血清中 microRNA と肝臓組織中 mRNA を検討した。さらにバイオインフォーマティクス解析 (TargetScan) により、血清中 microRNA の標的となる mRNA と、肝臓で実際に発現した mRNA との間で、一致している mRNA があるか否か検討した。

#### 【実験 2】

雄性 Wistar rat を用いた。図 1 に示すように、上顎第一、第二臼歯の歯間部の歯周組織に内毒素 (*Porphyromonas gingivalis* の LPS) を塗布する歯周病群 (8 匹) と何もしない対照群 (8 匹) を設定し、1 週間飼育した。屠殺後に、歯周組織の破壊の程度をセメント-エナメル境の距離を測定することで確認した (ImageJ, NIH) (図 2)。血清中 RNA を RNA Purification Kits (Norgen Biotek Corp., Thorold, Canada)を用いて抽出した。マイクロアレイ分析で、歯周病群で特異的に発現（特に強く発現/特に弱く発現）した血清中 microRNA を特定した。特定された microRNA が、歯肉でも 2 群間で発現に差があるか検討した。有意差の検定は、Mann-Whitney *U* test を用い、有意水準は  $p < 0.05$  とした。



図 1 LPS を塗布した部位

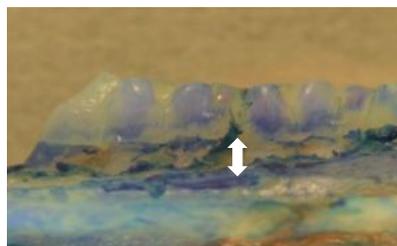


図 2 骨吸収の計測部位

### 4. 研究成果

#### 【実験 1】

肝臓に注目したところ、歯周病群でアポトーシスが認められた。歯周病が肝臓組織中のアポトーシスを誘発した可能性が示された。2 群間で、血清中の発現量が著しく異なる microRNA 52 種類と肝臓で発現量が著しく異なる mRNA 33 種類がスクリーニングされた。バイオインフォーマティクス解析の結果、肝臓 mRNA のうち、12 種類 (Gpr12、Hyou1、Rgma、Rad51、Dusp4、Chac1、Ier5、Ybx3、Pard6g、Bloc1s3、Seps2、Il7) は、変動した血清中 microRNA (発現量比  $> 1.5$ 、 $< 0.67$ ) の標的遺伝子と一致していることが判明した。そのうち、Hyou1、Chac1、Bloc1s3 は、アポトーシスに関わる作用を有しており、これら 3 種類の肝臓 mRNA の上流に存在する血清 microRNA は、miR-3591、miR-181a-2-3p、miR-6321 であった。以上のことから、歯周病モデルラットにおいて、miR-3591、miR-181a-2-3p、miR-6321 は、肝臓 mRNA である Hyou1、Chac1、Bloc1s3 の遺伝子発現を制御し、肝細胞のアポトーシスを引き起こした可能性が示唆された。しかし、実

際に歯周病群の歯周組織中に miR-3591、miR-181a-2-3p、miR-6321 が特異的に発現しているかは不明であった。

【実験 2】

LPS を塗布した歯周病群では、対照群と比較して有意に骨吸収量が多かった (図 3)。マイクロアレイ分析で、歯周病群で強く発現、あるいは弱く発現する microRNA がスクリーニングされた (図 4)。その一覧を表に示す。

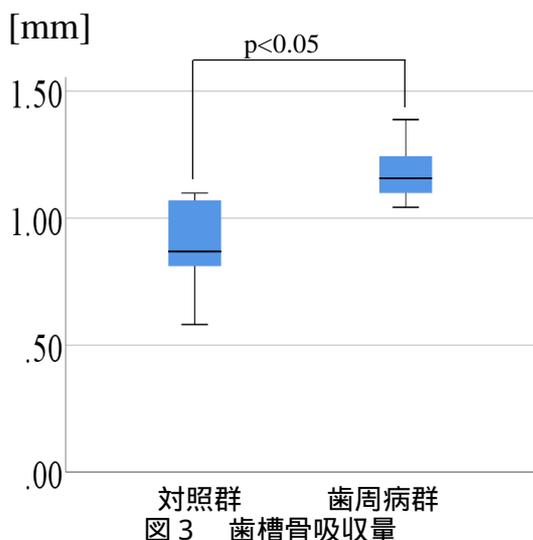


図 3 歯槽骨吸収量

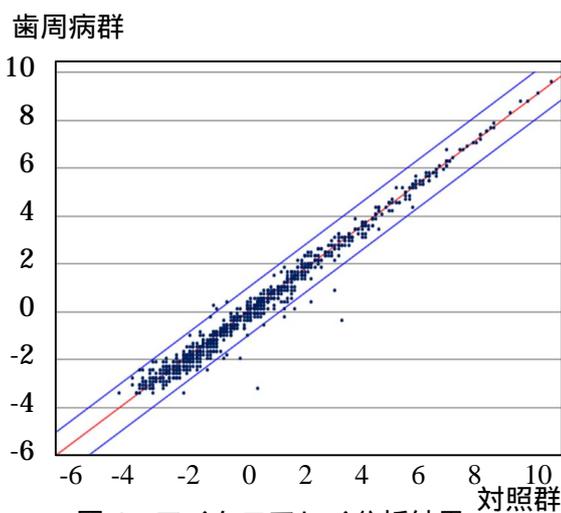


図 4 マイクロアレイ分析結果

表 歯周病群で 2 倍以上変動した血清 microRNA

発現量が高い(FC > 2.0)		発現量が低い(FC < 0.5)	
microRNAs	FC	microRNAs	FC
miR-1901	2.83	miR-6539	0.09
miR-142a-3p	2.26	miR-7014-5p	0.11
miR-128-3p	2.17	miR-296-3p	0.30
miR-7012-5p	2.13	miR-6966-3p	0.30
miR-101c	2.05	miR-5129-5p	0.37
		miR-7079-5p	0.41
		miR-1981-5p	0.42
		miR-6994-5p	0.43
		miR-7000-5p	0.45
		miR-3078-3p	0.46
		miR-1946b	0.47

FC (fold change): 対照群と比較した歯周病群の microRNA 量

現在、表に示された個々の microRNA について、内部標準に対する相対的な発現比を調べている。そのなかで、miR-128 は、2 群間で有意な差がみとめられた (図 6)。過去の報告では、LPS 刺激で miR-128 が発現することが確かめられている。そこでまず、本実験試料の歯肉でこの miRNA-128 発現を検討したが 2 群間で差はみられなかった。歯肉以外の組織などで、どの細胞由来の microRNA かを検討する必要がある。

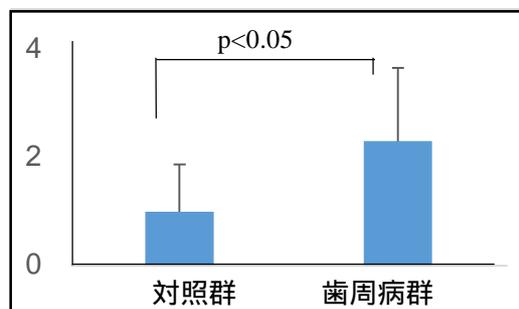


図 6 miRNA-128 の内部標準に対する相対的な発現比

なお、実験 2 で抽出された microRNA は、実験 1 で抽出された microRNA とは異なるものであった。実験 1 は絹糸を巻くことで起こした歯周炎で 4 週後の結果、実験 2 は LPS を歯肉に打ち込んだモデルで 1 週間後の結果であることが影響していると考えられる。

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 Mohammad N, Zhang Y, Nakahara M, Fukuhara D, Maruyama T, Ekuni D
2. 発表標題 MicroRNA Profiles of Serum-derived Exosomes in a Periodontal Disease Model
3. 学会等名 近畿・中国・四国口腔衛生学会令和5年度第34回総会
4. 発表年 2023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	丸山 貴之 (Maruyama Takayuki) (30580253)	岡山大学・医歯薬学域・准教授  (15301)	
研究分担者	江國 大輔 (Ekuni Daisuke) (70346443)	岡山大学・医歯薬学域・教授  (15301)	
研究分担者	友藤 孝明 (Tomofuji Takaaki) (80335629)	朝日大学・歯学部・教授  (33703)	
研究分担者	片岡 広太 (Kataoka Kouta) (80744185)	岡山大学・歯学部・客員研究員  (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
---------	---------