

氏名	藤森 浩平
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第6174号
学位授与の日付	令和2年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Detection of Salivary miRNAs Reflecting Chronic Periodontitis: A Pilot Study (慢性歯周炎の病態を反映する唾液中 miRNA の探索:パイロット研究)
論文審査委員	高柴 正悟 教授 仲野 道代 教授 川邊 紀章 准教授

学位論文内容の要旨

【目的】

歯周病は歯周組織の破壊を主とする慢性的な炎症性疾患である。近年では唾液中の炎症メディエーターを調べることは歯周状態の診断に有用であることが明らかになってきた。microRNA (miRNA) は唾液などの体液中に存在することや、歯周炎の状態に応じて歯周組織におけるmiRNAの発現が変化することが明らかになっている。しかし、唾液中のmiRNAと歯周病との関連については明らかではない。本研究では、慢性歯周炎患者における歯周状態を反映する唾液中miRNAの探索を行うことを目的とした。

【方法】

2016年6月から10月に岡山大学病院予防歯科を受診した慢性歯周炎患者のうち、3ヶ月以内に急性の歯周炎が生じた者を除外した120名（男性38名・女性82名）を対象とした。安静時唾液は吐唾法にて採取した。歯周精密検査を行い、probing pocket depth (PPD)、clinical attachment level (CAL)、bleeding on probing (BOP) およびO'LearyのPlaque Control Record (PCR) を評価した。その他の評価項目として、年齢、性別、残存歯数、喫煙の有無、body mass index (BMI)、糖尿病の有無、一日のブラッシング回数を調べた。対象者の歯周状態をCenter for Disease Control and PreventionとAmerican Association of Periodontologyの定義(2012年修正版)に基づいて、重症度別に4群に分類した(no, mild, moderate, severe)。評価項目について一元配置分散分析、カイ二乗検定分析を行った。

Total Exosome Isolation Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて唾液サンプルからエクソソーム濃縮液を精製し、Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit (Invitrogen) を用いてtotal RNAを抽出した。重度歯周炎 (severe) と軽度歯周炎 (no, mild) に分類された2群において、miScript miRNAs PCR Array (SA Biosciences, Frederick, MD) を使用し、炎症と免疫応答に関わる84種類のmiRNAのマイクロアレイ解析を行った。2群間の比較にはt検定を用いた。発現量に有意差があるとスクリーニングされたmiRNAについて、TaqMan miRNA assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, US) を使用し、全サンプルで逆転写リアルタイムPCRを行いmiRNA発現量を測定した。そして、その発現量と相関のある歯周状態の評価項目を調べた。分析にはPearsonの相関係数および重回帰分析(ステップワイズ法)を用いた。なお、有意水準は5%とし、解析ソフトにはSPSS version 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) を用いた。その後、

バイオインフォマティック解析をTargetScan, miRandaおよびmiRWalkを用いて行った。

【結果】

120名の慢性歯周炎患者のうち、重度歯周炎 (severe)、中等度歯周炎 (moderate)、軽度歯周炎 (no, mild) に分類された者はそれぞれ36名 (男性14名・女性22名、平均年齢71.7歳)、58名 (男性18名・女性40名、平均年齢68.6歳)、26名 (男性6名・女性20名、平均年齢63.3歳) であった。また、年齢、平均PPD、平均CAL、BOP、残存歯数を除いたその他の項目で群間に有意差は認めなかった。マイクロアレイの結果、重度歯周炎群におけるhsa-miR-381-3pの発現量は軽度歯周炎群よりも3.63倍有意に高かった (P=0.01)。

その後、全サンプルについて逆転写リアルタイムPCRを行った結果、hsa-miR-381-3pの発現量と平均PPDとの間に正の相関関係を認めた (Pearsonの相関係数=0.181、P=0.047)。従属変数をhsa-miR-381-3pの発現量とし、独立変数を年齢、性別、現在歯数、BOPとして重回帰分析を行ったところ、hsa-miR-381-3pの発現量と平均PPDとの間に有意な相関を認めた (標準化回帰係数=0.166、P=0.049)。また、バイオインフォマティック解析の結果、hsa-miR-381-3pは接着班やMAPKシグナル、Wntシグナルなどに関連を認めた。

【考察】

唾液中のhsa-miR-381-3pの発現量は、重度慢性歯周炎患者において増加していた。また、hsa-miR-381-3pの発現量は平均PPDと正の相関を認めた。過去の研究では、血清中のhsa-miR-381-3pは歯周炎と関連があることが報告されており、これを支持する結果であった。

過去の研究によると、LPS処理を行った上皮系の培養細胞中でhsa-miR-381-3pの発現量は増加する。LPSは歯周組織の炎症を引き起こす因子のひとつであり、hsa-miR-381-3pの発現は炎症と関連している可能性がある。

hsa-miR-381-3pの発現量は平均CALと関連していなかった。歯槽骨吸収のような炎症の経過よりも、歯肉の腫脹のような現在の炎症状態をより強く反映している可能性が考えられる。

過去の研究では、歯周炎の悪化とともに歯周組織において特定のmiRNAの発現量が増減することが報告されている。歯周炎が歯周組織中のmiRNAの発現量を変化させ、唾液中にも反映される可能性がある。

バイオインフォマティック解析では、hsa-miR-381-3pは歯周炎と関連があると報告されているMAPKシグナルとの関連を認めた。唾液中のhsa-miR-381-3pの発現は歯周炎の病態を反映するだけでなく、歯周炎の増悪に影響を与えている可能性もある。

唾液を用いたその他の研究として、舌扁平上皮癌や扁平苔癬のマーカーとして有用なmiRNAの存在が報告されている。今回の結果からも、唾液中のmiRNAは口腔疾患のバイオマーカーとして有用であることが示唆された。

これまで、歯周状態はレントゲンや各種臨床評価項目を用いて評価されていた。しかし、これらの方法は疼痛を伴うことや歯科医師が必要であることなどの欠点があった。その一方で唾液は最も簡単に採取できる体液である。唾液を用いて歯周状態を把握する方法が確立されることで、歯周炎のスクリーニング・診断に貢献できる可能性がある。

今回の研究は横断研究であったため、今後は縦断研究を行い、詳細を明らかにしていく必要がある。

【結論】

唾液中のhsa-miR-381-3pの発現は、慢性歯周炎の病態と関連があった。唾液中のhsa-miR-381-3pを測定することは、歯周病の新しいバイオマーカーとして有用な方法であることが示唆された。

論文審査結果の要旨

歯周病は歯周組織の破壊を主とする炎症性疾患である。近年では唾液中の炎症メディエーターを調べることは歯周状態の診断に有用であることが明らかになってきた。歯周炎の状態に応じて歯周組織中の microRNA (miRNA) の発現が変化することが報告されているが、唾液中の miRNA との関連については不明である。本研究では、慢性歯周炎患者における歯周状態を反映する唾液中 miRNA の探索を行うことを目的とした。

2016 年 6 月から 10 月に岡山大学病院予防歯科を受診した慢性歯周炎患者のうち、3 ヶ月以内に急性の歯周炎が生じた者を除外した 120 名を対象とし、安静時唾液を吐唾法にて採取した。歯周精密検査を行い、probing pocket depth (PPD)、clinical attachment level (CAL)、bleeding on probing (BOP) および O' Leary の Plaque Control Record (PCR) を評価した。その他の評価項目として、年齢、性別、現在歯数、喫煙の有無、body mass index (BMI)、糖尿病の有無、一日のブラッシング回数を調べた。Center for Disease Control and Prevention と American Association of Periodontology の定義に基づいて歯周状態を重症度別に分類し、評価項目について一元配置分散分析、カイ二乗検定分析を行った。唾液サンプル中のエクソソームから全 RNA を抽出し、重度歯周炎と軽度歯周炎の 2 群において発現量比の異なる miRNA について、マイクロアレイ解析を行い、Student の *t* 検定を用いて分析した。発現量が有意に異なった miRNA について、全対象者で定量化逆転写リアルタイム PCR を行い、miRNA の発現量比と関連のある評価項目について、Pearson の相関係数および重回帰分析を用いて分析した。

対象者 120 名のうち、重度歯周炎、中等度歯周炎、そして軽度歯周炎に分類された者は、それぞれ 36 名 (男性 14 名・女性 22 名)、58 名 (男性 18 名・女性 40 名)、そして 26 名 (男性 6 名・女性 20 名) であった。年齢、平均 PPD、平均 CAL、BOP、現在歯数を除いたその他の項目で群間に有意差はなかった。マイクロアレイによる hsa-miR-381-3p の発現量解析の結果、重度歯周炎群では軽度歯周炎群よりも 3.63 倍有意に高く ($P=0.01$)、定量化逆転写リアルタイム PCR による全対象者における検証の結果、発現量と平均 PPD との間に正の相関関係を認めた (Pearson の相関係数=0.181、 $P=0.047$)。従属変数を hsa-miR-381-3p の発現量とし、独立変数を年齢、性別、現在歯数、BOP として重回帰分析を行ったところ、平均 PPD との間に有意な相関を認めた (標準化回帰係数=0.166、 $P=0.049$)。以上のことから、唾液中の hsa-miR-381-3p の発現量は重度慢性歯周炎患者の PPD と関連があることが示唆された。

本論文は、すでに学術誌「Molecules」に受理されており、国際的にも評価されている。よって、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。