

学 位 論 文

侵襲性歯周炎診断の血液バイオマーカーとしての 細胞外小胞由来マイクロ RNA の探索

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻

病態機構学講座 歯周病態学分野

河本 美奈

Identification of Circulating Extracellular Vesicles-derived microRNA as a Diagnostic Biomarker for Aggressive Periodontitis

Department of Pathophysiology - Periodontal Science,

Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University

KOMOTO Mina

(令和2年12月11日受付)

緒言

歯周病は、口腔内に存在する多様な細菌種が関わる複合感染症であり、これらの細菌バイオフィルムと宿主の免疫反応との相互作用によって歯周組織の破壊が生じる。一連の炎症反応は、様々な環境因子や遺伝因子によって制御を受ける¹⁾。環境因子として、喫煙、糖尿病、肥満、およびストレスなどがあり、遺伝因子として、遺伝子変異、年齢・性別、および人種などがある²⁾。これらの因子が重積することによって歯周組織破壊はさらに進行し、重症化すると歯の喪失と口腔機能障害を引き起こすとともに、全身疾患に悪影響を及ぼす³⁾。

歯周病は、慢性歯周炎（chronic periodontitis : CP）、侵襲性歯周炎（aggressive periodontitis : AgP）、および全身性の遺伝疾患に伴う歯周炎の3つに分類される⁴⁾。慢性歯周炎は、中高年以降に発症、緩徐に進行し、プラークの蓄積量に一致した歯周組織破壊が生じる。一方、AgPは、全身的に健康な思春期以降の若者に発症し、急速に進行する歯周炎である。慢性歯周炎とは異なり、プラークの蓄積量が少ないにも関わらず、重度の歯周組織破壊が生じ、家族内集積が起こる場合がある⁵⁾。さらに、AgPの発症率は、アフリカで高く（1~5%）、ヨーロッパと北米の白人で低い（0.1~0.5%）⁶⁾ことから遺伝因子の関与が疑われる。

これまでに AgP の特殊な発症病態について、様々な研究報告があるが、統一した見解は得られていない⁷⁾。1976 年に Newman らは、AgP (当時の分類名は若年性歯周炎) の発症に *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) が深く関与することを提唱した⁸⁾。しかし、その後数十年の細菌学研究の技術進歩に伴って、CP と AgP の歯肉縁下細菌叢に有意な差異が無く、Aa は CP や健常者の細菌叢からも検出されることが明らかになった⁹⁾。近年でも、若年者の歯周炎と Aa との関与を示す報告がある一方で¹⁰⁻¹²⁾、Aa ではなく、*Porphyromonas gingivalis*¹³⁾や *Tannerella forsythia*¹⁴⁾、¹⁵⁾などが AgP の病態に深く関わっているという報告が相次いでおり、地域や人種、さらには宿主反応の違いによって AgP の細菌叢は様々である。すなわち、AgP の発症および進展は、Aa をはじめとした特異細菌群による感染のみでは説明し得ないのが現状である。

AgP 患者の宿主反応の特徴については、好中球の走化性と機能異常を伴う宿主の免疫防御機構の異常が起こることが提唱されてきた¹⁶⁻¹⁸⁾。そして、好中球やマクロファージなどが産生する macrophage inflammatory proteins 1 α , tumor necrosis factor α , interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, そして IL-17¹⁹⁻²¹⁾, などの炎症性サイトカインの増加と AgP の重症度との関連が報告されてきた。しかし、AgP における免疫細胞の多様な反応性を説明し得る病態特徴について、これまで統一した見解は得られておら

ず、上述の細菌学的特長と同様に AgP におけるサイトカインプロファイルについても様々であり、その根底にあるメカニズムは不明なままである^{22), 23)}。遺伝因子として、IL-6²⁴⁾や glycosyltransferase 6 domain containing 1 (GLT6D1)²⁵⁾などの一塩基多型 (single nucleotide polymorphism) が挙げられる。しかし、歯周炎のような慢性疾患においては、一塩基多型のみで疾患発症に至ることはなく、複数の遺伝子多型に様々な環境因子が加わって初めて発症すると考えられている^{26), 27)}。以上のように、細菌学的、免疫学的、そして遺伝学的いずれからも AgP の病態は明らかにされていない。さらに、後者の二つの異常は全身的な影響を及ぼす可能性が高いことから、全身的に健康であるにも関わらず口腔炎症のみが重症化する AgP 発症のメカニズムを解明するためには、これまでとは異なる新たなアプローチが必要と考えられる。

そこで本研究では、口腔特異的な炎症メディエーターとして、AgP 患者の血液中の細胞外小胞 (Extracellular vesicle : EV) に着目した。EV は、エンドサイトーシスにより細胞外へ放出される直径約 30~150 nm の小胞であるエクソソーム (exosome) と細胞膜から直接出芽される直径 100~1000 nm の小胞であるマイクロベジクル (Microvesicles : MV) に分類される²⁸⁾。EV は、全ての宿主細胞や細菌から放出される脂質二重膜小胞であり、EV 中には、タンパク質、マイクロ RNA (miRNA) ,

メッセンジャーRNA (mRNA) や DNA など多くの機能分子を内包する²⁹⁾。EV は近隣細胞間コミュニケーションだけでなく、血液、唾液、尿と羊水、母乳などの体液を循環して遠隔組織の細胞へと到達し、内包する機能分子を全身に伝達するメッセンジャーとして機能する³⁰⁾。したがって、EV は様々な疾患の病態形成に関与する可能性があることから近年注目されている³¹⁾。

これまで、特に癌の転移に関する研究が盛んに行われている。癌細胞 EV 表面には 50 種以上の細胞外基質と膜貫通蛋白質が存在しており、それらの表面マーカータイプに依存して臓器向性 (臓器トロピズム) が決定すると考えられている³²⁾。癌細胞から放出された EV は、遠隔臓器での前転移ニッチを形成することで癌の転移に関与する。すなわち、炎症の促進、免疫抑制、血管新生と透過性の促進³³⁾、さらには、腫瘍のリンパ播種の最初の経路であるリンパ管の新生、そして代謝、間質の再プログラミングを引き起こすことによって、癌の転移をしやすい環境をつくる³⁴⁾。前転移ニッチは、EV 中の miRNA が標的細胞の遺伝子発現を制御することによって起きる。miRNA は、細胞核内でゲノム DNA から転写され、primary miRNA (pri-miRNA) となる。pri-miRNA のヘアピン構造が切り取られて細胞質へと輸送され、Dicer という酵素によりループ構造がとれて、一本鎖 RNA となり、ほかのタンパク質とともに RISC (RNA-induced silencing complex) を形成し、さらに RISC に含まれ

る miRNA は、 mRNA 配列の 3'非翻訳領域に相補的に結合し、 mRNA 翻訳阻害を行うことで遺伝子発現を抑制する³⁵⁾。すなわち、 EV 由来 miRNA は血中を循環し、 様々な臓器における遺伝子発現抑制に関与することから、 血中の EV 由来 miRNA を標的とした体液診断が近年臨床応用されつつある³⁶⁾。

以上のことから、 本研究では、 若年者の血中 EV が何らかの特異表面蛋白を介して口腔に到達し、 内包する miRNA が歯周局所のみ免疫・炎症反応を惹起することによって、 AgP を発症・進行させるという仮説の下、 口腔特異的な炎症メディエーターとなり得る EV 由来 miRNA を同定することを目的に、 AgP 患者血中の EV 由来 miRNA の発現プロファイルを調べ、 診断マーカーとしての有用性を検証した。

材料と方法

1. 研究対象者

2017年5月から2020年1月までの間に岡山大学病院の侵襲性歯周炎センターを受診した患者38名から、疾患群として、日本歯周病学会（JSP）の2006年歯周病分類⁴⁾に基づいてAgPと診断された18歳から39歳で、全身疾患がなく、現在喫煙していない25名を、また対照群として、年齢をマッチングさせた歯周病を有しない健常ボランティア（H）7名を研究対象者とした。さらに、アメリカ歯周病学会（AAP）とヨーロッパ歯周病連盟（EFP）の2018年歯周病新分類³⁷⁾に基づいて、AgP患者を歯周炎の重症度と管理の複雑度によりstage III（AgP-III；13名）、stage IV（AgP-IV；12名）に分類した（図1）。本研究は、岡山大学倫理委員会の承認を得た後に、全ての研究対象者に、研究開始前に十分な説明を行い、書面による同意を得た（岡山大学倫理審査委員会 承認番号 #1706-039）。

2. 臨床検査

研究対象者の当院初診時年齢（Age）、歯周ポケット深さ（periodontal pocket depth：PD）、プロービング時の出血（bleeding on probing：BOP）、歯周炎症表面積（periodontal inflamed surface area：PISA）³⁸⁾、歯槽骨吸収レベル（bone resorption level：BL）、さ

らに AgP スコアを調べた。なお、歯槽骨吸収レベルは、既報に従って Schei のルーラーを用いて測定した³⁹⁾。また、AgP スコアは、JSP が作成した AgP 診断の指針となる臨床指標を数値化したものであり、16 点以上が典型的な AgP と判断される⁴⁰⁾。

3. PCR (polymerase chain reaction) アレイ解析による miRNA のスクリーニング

研究期間の初期に当院を受診した患者のうち、侵襲性歯周炎患者として AgP-III (4 名) と AgP-IV (5 名)、そしてボランティア対象者として H (3 名) を研究対象者として、初診時末梢血中の EV 由来 miRNA 発現を PCR アレイによって調べた。PCR アレイは、炎症反応と自己免疫に関する 84 種類の miRNA がスポットされた miScriptTM miRNA PCR Array Human Inflammatory Response and Autoimmunity (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いた。

- 1) 血漿分離：初診時に 6 mL の末梢血液を採血し、遠心分離 (25 °C, 2330 × g, 10 分) 後、上清をチューブに移し、さらに遠心分離 (25 °C, 1600 × g, 10 分) にてbuffy coat層の 3.0 mL の血漿を抽出した。これらは岡山大学病院バイオバンクにて液体窒素中に 0.5 mL ごとに分注して保管した。これらのうち 2.5 mL を、バイオバンク規定の分譲手続きを行い入手し、解析に用いた。
- 2) EV の単離：血漿 (2.5 mL) から Total Exosome isolation kit from plasma (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて使用説明書にしたがって EV を

単離した。すなわち，プロテイナーゼ K 処理により血漿中のタンパク質を分解，除去し，キット中の Exosome Precipitation Reagent を用いて，水分子を結合することで，サンプル中の小胞の水溶性を低下させ，短時間の低速遠心処理により EV を 20 μ L の RNase-Free Water (QIAGEN) にて抽出した。

3) EV の粒子径測定と形態分析

(a) EV の粒子径測定：単離した EV を RNase-Free Water にて 50 倍希釈した 50 μ L の溶液を BRAND[®] UV キュベットマイクロ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) にいれ，ゼータサイザーナノ (Malvern Panalytical, Malvern, England) にて測定した。つまり，ガスレーザー光をサンプルに照射し，サンプルの散乱光を測定する動的光散乱法を用いて，粒子径を測定した。

(b) EV の電子顕微鏡解析：単離した 5 μ L の EV をグリットに入れて 5 μ L の 2%酢酸ウラニール水溶液にてネガティブ染色した試料を作製した。そして，試料を可視化する透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope: TEM) (Hitachi H-7650, 東京, 日本) を用いて 80 kV, 30000 倍の条件下で撮影した。

4) RNA 抽出：EV が内包する全 RNA を Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて使用説明書にしたがって分離

した。すなわち，EV の脂質二重膜と内包タンパク質をフェノール/クロロホルム溶液で変性，分解し，水層の RNA を抽出した。その後，グラスファイバーのフィルターを使用して RNA を固定化，精製し，全 RNA を 100 μ L の RNase-Free Water にて抽出した。そして，可視分光光度計 NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific) を用いて吸光度比率 (A260/A280, および A260/A230) から RNA の純度を調べた。

- 5) 逆転写反応 : miScript II RT Kit (QIAGEN) 添付の使用説明書にしたがって行った。すなわち，抽出した 12 μ L の RNA を鋳型として，4 μ L の 5 \times miScript HiSpec Buffer, 2 μ L の 10 \times miScript Nucleics Mix, および 2 μ L の miScript Reverse Transcriptase Mix を加えて全量 20 μ L とした。これを 37 °C で 60 分間インキュベートすることで，miRNA を選択的にポリアダニル化し，その後，逆転写酵素と oligo-dT プライマーにより miRNA の逆転写産物である cDNA を合成した。その後，95 °C, 5 分間の加熱で逆転写酵素を不活化した。
- 6) cDNA 長の測定 : ドナー AgP-III, AgP-IV, および H の 1 名ずつから得た EV 由来 cDNA を全自動電気泳動システム Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) にて測定した。つまり 3 μ L の D1000 Sample Buffer と 1 μ L の Laddar または cDNA を混ぜて，ゲル充填済み Screen

Tape である D1000 / High Sensitivity D1000 (Agilent Technologies) に加えて電気泳動を行い，分子量マーカーとして用いた D1000 Ladder と比較することによって cDNA の塩基長を測定した。

- 7) PCR アレイ解析 : 84 種類の炎症反応と自己免疫に関する miRNA のフォワードプライマーがスポットされた 96 well のプレートである miScript™ miRNA PCR Array Human Inflammatory Response & Autoimmunity (QIAGEN) を用いて，添付の使用説明書にしたがって行った。すなわち，25 μ L の鋳型 cDNA，Oligo dT プライマーの 3' 末端に付加された塩基配列を認識するプライマーである 10 \times miScript Universal Primer を 275 μ L，1,375 μ L の 2 \times QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix，そして 1,075 μ L の RNase-free Water を混合し，各 well に 25 μ L ずつ混合溶液を入れ，DNA ポリメラーゼの活性化 (95 $^{\circ}$ C, 15 分)，熱変性 (94 $^{\circ}$ C, 15 秒)，アニーリング (55 $^{\circ}$ C, 30 秒)，および伸長反応，(70 $^{\circ}$ C, 30 秒) のステップを CFX Connect Real-Time System (BIO RAD, Hercules, CA, USA) を用いて，40 サイクル行った。miRNA の発現量を，内在性リファレンス RNA として汎用される核小体低分子 RNA⁴¹⁾ の 1 種である Small Nucleolar RNA, C/D Box 61 (SNORD61) を内部コントロールとして補正して， $2^{-\Delta\Delta CT}$ 値で示した。これを使用して，Gene Globe Data Analysis Center

(QIAGEN) (<https://geneglobe.qiagen.com/jp/analyze/>) にてプロファイル解析を行った。具体的には、まず解析対象とする miRNA 量を Ct 値が 40 未満のものとし、さらに、比較する群間でどちらか一方の群で miRNA 量が Ct 値 > 30 であり、他方の群では Ct 値 < 30 であった miRNA を解析対象とした。

- 8) リアルタイム RT (reverse transcription) -PCR 法 : miScript SYBR[®] Green PCR Kit (QIAGEN) を用いて添付説明書にしたがって行った。つまり、2 μ L の 10 倍希釈した cDNA 合成反応液、解析対象の miRNA に特異的なフォワードプライマーである 10 \times miScript Primer Assay を 2.5 μ L、リバープライマーである前述の 10 \times miScript Universal Primer を 2.5 μ L、12.5 μ L の 2 \times QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix、および 5.5 μ L の RNase-free Water を混合し、上述の 3.7)と同様の PCR プログラムで、50 サイクル行った。そして、miRNA 発現量を上述の 3.7)で記載した内部コントロール SNORD61 にて補正し、 $\Delta\Delta$ Ct 法にて解析を行った。

4. RT-PCR によるアレイ解析結果の検証

初期スクリーニング時のドナーに、さらにドナー数を増やして、上記で同定した miRNA の発現解析をリアルタイム RT-PCR 法にて調べた (AgP-III, 13 名 ; AgP-IV,

12名；H, 7名)。研究対象患者の疾病の診断・治療に必要な、歯周病原細菌に対する血清抗体価検査のために初診来院時に採取した末梢血の余剰血清（歯周病態学分野の研究室で保管）を使用する。

- 1) 血清分離：血液（3.0 mL）を遠心分離（4 °C, 3,000 × g, 10 分）にて血清を抽出し、-30 °Cにて保管した。
- 2) 全RNAの抽出：保管血清を融解し、血清（300 μL）から exoRNesay Serum/Plasma Midi kit（QIAGEN）を用いて、使用説明書にしたがって全RNA抽出した。つまり、フェノールとチオシアン酸グアニジンを含む QIAzol Lysis Reagent とクロロホルムを用いて RNA を含む上清の水層を回収し、これを 5PRIME Phase Lock Gel™ - Heavy（Quanta Biosciences, Beverly, MA, USA）に加え、遠心分離によって高純度の RNA を精製した。その後、RNeasy MinElute spin column に結合させ、EV 由来 RNA を 14 μL RNase-free Water にて抽出した。
- 3) 逆転写反応：上述の 3.5)と同様に miScript II RT Kit（QIAGEN）を用いて、20 μL の cDNA を合成した。
- 4) リアルタイム RT-PCR 法：上述の 3.8)と同様に miScript SYBR® Green PCR Kit を用いて、リアルタイム RT-PCR を行った。miRNA 発現量を内部コントロー

ルとして血清中に安定的に発現する hsa-miR-484⁴²⁾と外部コントロールとして線虫由来の *Caenorhabditis elegans* miR-39 (Cel-miR-39) にて補正し、 $\Delta\Delta Ct$ 法にて解析を行った。

5. Receiver operating characteristic (ROC) 解析

AgP-III (13名), AgP-IV (12名), そしてH (7名) に対して, 同定した miRNA の発現量について, GraphPad Prism8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて ROC 解析を行った。ROC 曲線の曲線下面積 (Area Under the Curve : AUC) とカットオフ値を 3 群間で比較した。カットオフ値の決定には, Youden index⁴³⁾を用いた。

6. *In silico* 解析

研究対象である細胞種や組織種に特異的な miRNA の標的遺伝子の解析ができるアルゴリズムである miTALOS 2.0 (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/mitalos/#/search>) を用いた⁴⁴⁾。本研究では, 歯周組織の炎症・免疫を制御する白血球を対象とし, miRNA の標的遺伝子を予測する 3 種のデータベース (TargetScan, Miranda/mirSVR, StarBase2) を用いて解析を行った。

7. 統計処理

全てのデータは、独立した 3 回以上の実験にて得た。各データの統計処理は、GraphPad Prism8 (GraphPad Software) を用いて、one-way analysis variance (one-way ANOVA) と Tukey/Kramer test にて検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

研究対象者の臨床データ解析

研究対象者である AgP-III (13 名) , AgP-IV (12 名) , および H (7 名) の 3 群間における臨床データを統計学的に解析した結果 (表 1) , 年齢以外の PD, BOP, PISA, および BL について有意差があった ($p < 0.001$) 。すなわち, AgP-III 群と AgP-IV 群の重症度には有意差があることが示された。さらに, AgP スコアは, AgP-III 群で 15.92 ± 1.44 , AgP-IV 群で 15.92 ± 1.38 で ($p < 0.99$) となり, 両群ともにほぼ AgP スコア基準値の 16 点であり, AgP-III, AgP-IV は AgP と診断した。

血漿から単離した EV の粒子径測定と形態解析

3 名のドナー H の血漿から単離した EV の粒子径分布のうち, 2 名の EV は 105 nm 付近で, 1 名の EV は 40 nm 付近で最大値を示した。また, 少量ではあるが, 5,000 nm 付近にも分布があった (図 2 a) 。また, 同じドナー 3 名から単離した EV の TEM 画像解析を行ったところ, 様々な直径の脂質二重膜様の構造が明瞭なコントラストで観察された。直径約 100 nm の小胞体が主に観察されたが, 20-100 nm の小胞も散在し, これらの小さな小胞が多く観察される視野もあった (図 2 b) 。これらより, エクソソームを多く含むことがわかった。

血中 EV が内包する miRNA の塩基長の測定

ドナーAgP-III, AgP-IV, およびHの1名ずつから得たEVが内包するmiRNAからcDNAを合成し、電気泳動にて塩基長を測定した。3名のドナーのcDNAは約50–100 pg/ μ lの濃度であり、数本のラダーの泳動像として観察された。塩基長のピークは約25 bpであった(図2c)。よって、miRNAが選択的に逆転写されたことがわかった。

AgP患者血中EVに高発現するmiRNAの同定

初期スクリーニングとして、ドナーAgP-III(4名), AgP-IV(5名), およびH(3名)の初診時血漿から抽出したEV由来miRNAを用いて、PCRアレイ解析を行った。SNORD61によって補正したCt値が40未満のmiRNAは、アレイにスポットされた84種のうち34種あった。これらのうち、全12名のドナーで発現が確認され、プロファイル解析ソフトを用いた解析で発現量の差が顕著な(群間でCt値 > 30 とCt値 < 30 の差がある)miRNAは、hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-16-5p, そしてhsa-miR-29a-3pの3種類であった。miR-181b-5pとmiR-16-5pは、AgP-IV, Hと比較してAgP-IIIで発現量が2倍以上増加した。AgP-IVでは、Hと比較して3種全てのmiRNAの発現量が2倍以上減少した。AgP全体(AgP-III+IV)では、Hと比較してmiR-16-5pの発現量が2倍以上減少した(図3a)。さらに、これら3種のmiRNA発現について、同じドナー12名の血漿を用いたリアルタイムRT-PCR解析

によってアレイ解析結果の検証を行ったところ、miR-16-5p と miR-29a-3p の発現量は、3 群間で有意差がなかった。一方、miR-181b-5p の発現量は、AgP-IIIにおいて AgP-IVより有意に高発現した ($p < 0.05$) (図 3 b)。

miR-181b-5p は AgP-IIIの血中 EV に有意に高発現する

初期スクリーニングで得た miR-181b-5p の発現について、さらにサンプルサイズを増やして検証を行った。すなわち、AgP-III (13 名)、AgP-IV (12 名)、および H (7 名) の血清を用いてリアルタイム RT-PCR 解析を行った結果、miR-181b-5p の発現量は、AgP-IIIにおいて AgP-IVと H より有意に高発現することが明らかになった ($p < 0.05$, 5.2 倍 vs. AgP-IV, 5.6 倍 vs. H) (図 4)。

miR-181b-5p 発現は AgP-III の診断バイオマーカーとして有用である

各ドナーにおける miR-181b-5p の発現量について ROC 曲線を用いて診断バイオマーカーとしての精度評価および有意性を調べた。H vs. AgP-III と AgP-IV vs. AgP-III の AUC は、それぞれ 0.9560, 0.9259 と高値を示した。一方、H vs. AgP-IV の AUC は 0.6845 であった。また、カットオフ値は、H vs. AgP-III で 1.660, AgP-IV vs. AgP-III で 2.080, そして H vs. AgP-IV で 1.050 となった (図 5)。以上より、miR-181b-5p は、AgP-IIIの診断バイオマーカーになる可能性がある。

白血球を対象とした miR-181b-5p の標的遺伝子解析

同定した hsa-miR-181b-5p の機能解析を行うために、炎症・免疫と関係する白血球における hsa-miR-181b-5p の標的遺伝子をアルゴリズム解析によって調べた（表 2, 3）。dorso-ventral axis formation, microRNAs in cancer, activating transcription factor (ATF) 6-alpha activates chaperones, interactome of polycomb repressive complex 2, serotonin Receptor 4-6-7 and nuclear receptor family (NR) 3C signaling, および interleukin-6 (IL-6) signaling pathway の 6 つのシグナルが抽出された。その中で、歯周組織での発現が確認されている炎症サイトカインである IL-6 signaling pathway には 18 種類の標的遺伝子が含まれていた。18 種類の中 17 種類は、炎症サイトカインである IL-6 の作用を促進するが、suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS 3) のみが IL-6 を抑制する作用があった⁴⁵⁾。

考察

AgP は、中高年層に発症する CP とは異なり、顕著な症状なく、急速に組織破壊が進行するため、重症化して初めて市中の開業歯科医で発見される場合が多い。さらに、明確な診断マーカーが無いことが AgP の発見を遅くする要因となっている。本邦における AgP の罹患率は 0.05～0.1 %とされているが⁴⁶⁾、その罹患実態の把握すら十分ではなく、潜在的な患者は更に多いと考えられる。AgP の発症病態は未だ殆ど不明であるため、2018 年の AAP と EFP による歯周病新分類において、更なる客観的かつ科学的エビデンスが蓄積されるまで、AgP の診断名が削除されることが決定された³⁷⁾。しかし、JSP では、これまでに長年蓄積されてきた臨床上および研究上の貴重な資産を継続的に活用するために、新たなバイオテクノロジーを駆使することによって AgP の病態を明らかにすることを目指している。そして JSP では、AgP、CP の病名はそのまま残すとともに新分類も加えることを推奨している。

そこで本研究では、AgP をさらに新分類の重症度 (stage) の違いにより AgP-III と AgP-IV に分類し、AgP の病態に関与する miRNA の発現プロファイルを調べた。臨床データと AgP スコアの結果から、AgP-III と AgP-IV の群間には有意な重症度の違いがあり、2 群ともに AgP スコア基準値以上であったことから、AgP 研究の対象として適切な疾患群であると判断した。重症度が低い AgP-III は発症初期の患者と捉え

ることができるため、血中の EV 由来 miR-181b-5p は、AgP-III、すなわち発症初期で高発現し、AgP-IV、すなわち発症後期と健常者で発現が少ないことが分かった。この結果から、miR-181b-5p は発症初期の短期間に高発現し、その後、AgP の進行とともに miRNA の発現が変化し、他の miRNA が疾患病態を制御する可能性が考えられる。同様な疾患の進行の有無による miRNA 発現の違いは、口腔前癌病変の白板症でも報告されている⁴⁷⁾。

CP および AgP 患者における miRNA 発現プロファイルに関する報告は近年増えているものの、これらは歯周組織、歯肉溝浸出液中、そして唾液中の miRNA をターゲットとしており⁴⁸⁻⁵³⁾、同定された miRNA は多様で診断マーカーとして有用な miRNA は未だ確立されていない。その理由として、組織中の miRNA 発現は炎症反応によって複雑に変動するために、歯周病発症の診断マーカーとしての応用が難しいこと、また唾液中の歯周病関連マーカーの発現は微量であるため特異性が低く、検体採取時期や方法によって大きく変化することが挙げられる⁵⁴⁾。本研究対象である歯周病患者血中の EV 由来 miRNA 発現については過去に報告がなく、病態との関連は未だ不明であり、今後さらなる検証が必要である。しかし、ROC 解析での miR-181b-5p の AUC が H vs. AgP-III と AgP-IV vs. AgP-III でそれぞれ 0.9560, 0.9259 となり、1 に近似していることから、ドナー数は少ないものの診断バイオマーカーとし

での精度が高いことがわかった⁵⁵⁾。加えて、カットオフ値は H vs. AgP-III で 1.660, AgP-IV vs. AgP-III で 2.080 となることから、このカットオフ $2^{-\Delta\Delta CT}$ 値を基準として AgP-III と H および AgP-IV との判別ができる可能性がある。

miR-181b は、importin- $\alpha 3$ - NF- κ B シグナル伝達経路の活性を阻害することによって、炎症を抑制することが報告されている⁵⁶⁾。また、慢性炎症の一種である肥満では、肥満組織の内皮細胞を減少し、グルコースの恒常性とインスリン感受性が改善することによって炎症を抑制して肥満を改善するという報告もある⁵⁷⁾。このように miR-181b は主に炎症抑制に働くが、歯周炎歯肉で発現量が増加するという炎症促進に関連する報告もある⁵⁸⁾。一般に、miRNA の機能は標的となる組織・細胞によって異なる場合が多いことから^{44), 59), 60)}、炎症歯周組織を想定して miRNA のメカニズムを調べる必要があると考えられる。そこで AgP の病態に関連する miR-181b-5p に対して、炎症・免疫と関連する白血球を対象として標的遺伝子解析を行った。その結果、歯周組織での発現が確認されている炎症サイトカインである IL-6 シグナルが抽出された。IL-6 は、受容体サブユニット gp130 を介してケモカイン産生と白血球アポトーシスの調整を行うことで炎症を促進する¹⁹⁾。この炎症促進に関与する IL-6 を miR-181b が抑制することによって炎症を抑制するという報告がある⁶¹⁾。一方、本研究では、IL-6 シグナルに関連する標的遺伝子として、IL-6 を抑制す

る作用がある suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS 3) が抽出された。SOCS3 は、炎症性サイトカインである IL-6, IL17, の産生抑制をし、抗炎症サイトカイン IL-10 による作用を促進する⁴⁵⁾。よって、miR-181b-5p による SOCS3 の転写阻害は、AgP 患者において過剰な炎症反応を引き起こす可能性がある。これまでの研究から、miR-181b-5p 発現は、CP 患者の歯肉溝浸出液中や AgP 患者の唾液中では減少することが報告されている。miR-181b-5p の作用については、病状との関連や miRNA の採取源による発現パターンの違いなど様々な点から、今後さらに検証する必要がある。

以上の結果から、AgP の発症初期の炎症進行期に miR-181b-5p が高発現することが明らかになった。しかし、miR-181b-5p が標的 IL-6 シグナルを制御するメカニズムや SOCS3 が IL-6 の産生抑制をする作用と AgP の病態との関連は不明である。まだバイオマーカー候補の miRNA を 1 種類同定したのみに過ぎず、AgP の進行とともに発症が変化すると考えられるその他の miRNA はわかっていない。今後まずは、*in vitro* および *in vivo* での miR-181b-5p の過剰発現による炎症メカニズム解明と表現型解析を行う。加えて、AgP に関連するその他の miRNA を探索することによって、一連の miRNAs が制御する AgP の病態の詳細が明らかになる。また、AgP 患者血中の EV がどの細胞から放出され、どのように口腔に特異的に移動するか不明

である。今後、AgP に特異的な miRNA を内包する EV の表面マーカーを調べることで、EV の臓器特異的な輸送メカニズムを解明することが重要である。これまでに AgP 患者血中の EV 由来 miRNA による病態制御にターゲットを絞った報告は皆無である。今後のさらなる研究によって AgP の特異な病態を明らかにすることができれば、この疾患の発症・進行予防や効率的な治療の発見に繋がる可能性があると考えられる。

結論

AgP 発症初期で高発現し，発症後期で発現量が減少する血液診断バイオマーカー候補である EV 由来の miR-181b-5p を同定した。

謝辞

稿を終えるにあたり，終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野の高柴正悟教授に深甚なる謝意を表します。そして，様々な面にわたり，終始御指導賜り，貴重な御助言と御協力を下さいました歯周病態学分野の山本直史准教授，岡山大学病院歯周科の河村麻理先生ならびに歯周病態学分野の諸先生方に厚く御礼申し上げます。また，細胞外小胞に関して技術的な御助言を賜った岡山大学大学院医歯薬学研究科歯科薬理学分野の十川千春准教授と江口傑徳助教に深く感謝申し上げます。

表題脚注

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座 歯周病

態学分野

(指導：高柴正悟教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

- 第 61 回日本歯周病学会秋季学術大会 (2018 年 10 月, 大阪)
- The 1st international symposium for intercellular communication and extracellular vesicles

(2019 年 11 月, 岡山)

- 第 41 回岡山歯学会・学術大会 (2020 年 10 月, 岡山)

参考文献

- 1) Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000* **14**: 216-248, 1997.
- 2) Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol 2000* **62**: 59-94, 2013.
- 3) Beck JD, Offenbacher S. Systemic effects of periodontitis: epidemiology of periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol* **76 (11 Suppl)**: 2089–2100, 2005.
- 4) 五味一博, 栗原英見, 吉江弘正, 河口浩之, 菅野直之, 吉野敏明, 坂上竜資, 児玉利朗, 若林健史, 荒木久生, 内田剛也. 歯周治療の指針 2015, 第 1 版. 東京: 医歯薬出版, 9, 2015.
- 5) Albandar JM. Aggressive periodontitis: case definition and diagnostic criteria. *Periodontol 2000* **65**: 13-26, 2014.
- 6) Susin C, Haas AN, Albandar JM. Epidemiology and demographics of aggressive periodontitis. *Periodontol 2000* **65**: 27-45, 2014.
- 7) Fine DH, Patil AG, Loos BG. Classification and diagnosis of aggressive periodontitis. *J Periodontol* **89 (Suppl 1)**: S103-S119, 2018.
- 8) Newman MG, Socransky SS, Savitt ED, Propas DA, Crawford A. Studies of the microbiology of periodontosis. *J Periodontol* **47**:373-379, 1976.
- 9) Mombelli A, Casagni F, Madianos PN. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol* **29 Suppl 3**: 10–21, 2002.
- 10) Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Vaeth M, Poulsen S, Kilian M. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet* **371**: 237–242, 2008.

- 11) Shaddox LM, Huang H, Lin T, Hou W, Harrison PL, Aukhil I, Walker CB, Klepac-Ceraj V, Paster BJ. Microbiological characterization in children with aggressive periodontitis. *J Dent Res* **91**: 927-933, 2012.
- 12) Delatola C, Loos BG, Levin E, Laine ML. At least three phenotypes exist among periodontitis patients. *J Clin Periodontol* **44**:1068–1076, 2017.
- 13) Li Y, Feng X, Xu L, Zhang L, Lu R, Shi D, Wang X, Chen F, Li J, Meng H. Oral microbiome in chinese patients with aggressive periodontitis and their family members. *J Clin Periodontol* **42**: 1015-1023, 2015.
- 14) Takeuchi Y, Umeda M, Ishizuka M, Huang Y, Ishikawa I. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. *J Periodontol* **74**:1460–1469, 2003.
- 15) Faveri M, Figueiredo LC, Duarte PM, Mestnik MJ, Mayer MP, Feres M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* **36**: 739-749,2009.
- 16) Cainciola LJ, Genco RJ, Patters MR, McKenna J, van Oss CJ. Defective polymorphonuclear leukocyte function in a human periodontal disease. *Nature* **265**:445-447, 1977.
- 17) Genco RJ, Van Dyke TE, Levine MJ, Nelson RD, Wilson ME. 1985 Kreshover lecture. Molecular factors influencing neutrophil defects in periodontal disease. *J Dent Res* **65**:1379-1391, 1986.
- 18) Engel D. Lymphocyte function in early-onset periodontitis. *J Periodontol* **67**: 332-336, 1996.
- 19) Nibali L, Griffiths GS, Donos N, Parkar M, D'Aiuto F, Tonetti MS, Brett PM. Association between interleukin-6 promoter haplotypes and aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* **35**: 193-198, 2008.
- 20) Shaddox LM, Wiedey J, Calderon NL, Magnusson I, Bimstein E, Bidwell JA, Zapert EF, Aukhil I, Wallet SM. Local inflammatory markers and systemic endotoxin in aggressive periodontitis. *J Dent Res* **90**: 1140–1144, 2011.

- 21) Fine DH, Markowitz K, Fairlie K, Tischio-Bereski D, Ferrandiz J, Godbole D, Furgang D, Gunsolley J, Best A. Macrophage inflammatory protein-1 α shows predictive value as a risk marker for subjects and sites vulnerable to bone loss in a longitudinal model of aggressive periodontitis. *PLoS One* **9**: e98541, 2014.
- 22) Takahashi K, Ohyama H, Kitanaka M, Sawa T, Mineshiba J, Nishimura F, Arai H, Takashiba S, Murayama Y. Heterogeneity of host immunological risk factors in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontol* **72**: 425-437, 2001.
- 23) Duarte PM, Bastos MF, Fermiano D, Rabelo CC, Perez-Chaparro PJ, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Do subjects with aggressive and chronic periodontitis exhibit a different cytokine/chemokine profile in the gingival crevicular fluid? A systematic review. *J Periodontal Res* **50**: 18-27, 2015.
- 24) Nibali L, D'Aiuto F, Donos N, Griffiths GS, Parkar M, Tonetti MS, Humphries SE, Brett PM. Association between periodontitis and common variants in the promoter of the interleukin-6 gene. *Cytokine* **45**: 50–54, 2009.
- 25) Schaefer AS, Richter GM, Nothnagel M, Manke T, Dommisch H, Jacobs G, Arlt A, Rosenstiel P, Noack B, Groessner-Schreiber B, Jepsen S, Loos BG, Schreiber S. A genome-wide association study identifies GLT6D1 as a susceptibility locus for periodontitis. *Hum Mol Genet* **19**: 553-562, 2010.
- 26) Scapoli C, Mamolini E, Carrieri A, Guarnelli ME, Annunziata M, Guida L, Romano F, Aimetti M, Trombelli L. Gene–gene interaction among cytokine polymorphisms influence susceptibility to aggressive periodontitis. *Genes Immun* **12**: 473-480, 2011.
- 27) Rappaport SM. Genetic factors are not the major causes of chronic diseases. *PLoS One* **11**: e0154387, 2016.
- 28) Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol* **113**, 1-11, 2013.
- 29) Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci* **9**: 19, 2019.

- 30) Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* **56**: 1733-1741, 2010.
- 31) Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, Mi S: Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **13**: 17-24, 2015.
- 32) Hoshino A, Kim HS, Bojmar L, Gyan KE, Cioffi M, Hernandez J, Zambirinis CP, Rodrigues G, Molina H, Heissel S, Mark MT, Steiner L, Benito-Martin A, Lucotti S, Di Giannatale A, Offer K, Nakajima M, Williams C, Nogués L, Pelissier Vatter FA, Hashimoto A, Davies AE, Freitas D, Kenific CM, Ararso Y, Buehring W, Lauritzen P, Ogitani Y, Sugiura K, Takahashi N, Alečković M, Bailey KA, Jolissant JS, Wang H, Harris A, Schaeffer LM, García-Santos G, Posner Z, Balachandran VP, Khakoo Y, Raju GP, Scherz A, Sagi I, Scherz-Shouval R, Yarden Y, Oren M, Malladi M, Petriccione M, De Braganca KC, Donzelli M, Fischer C, Vitolano S, Wright GP, Ganshaw L, Marrano M, Ahmed A, DeStefano J, Danzer E, Roehrl MHA, Lacayo NJ, Vincent TC, Weiser MR, Brady MS, Meyers PA, Wexler LH, Ambati SR, Chou AJ, Slotkin EK, Modak S, Roberts SS, Basu EM, Diolaiti D, Krantz BA, Cardoso F, Simpson AL, Berger M, Rudin CM, Simeone DM, Jain M, Ghajar CM, Batra SK, Stanger BZ, Bui J, Brown KA, Rajasekhar VK, Healey JH, de Sousa M, Kramer K, Sheth S, Baisch J, Pascual V, Heaton TE, La Quaglia MP, Pisapia DJ, Schwartz R, Zhang H, Liu Y, Shukla A, Blavier L, DeClerck YA, LaBarge M, Bissell MJ, Caffrey TC, Grandgenett PM, Hollingsworth MA, Bromberg J, Costa-Silva B, Peinado H, Kang Y, Garcia BA, O'Reilly EM, Kelsen D, Trippett TM, Jones DR, Matei IR, Jarnagin WR, Lyden D. Extracellular vesicle and particle biomarkers define multiple human cancers. *Cell* **182**: 1044-1061.e18, 2020.
- 33) Zeng Z, Li Y, Pan Y, Lan X, Song F, Sun J, Zhou K, Liu X, Ren X, Wang F, Hu J, Zhu X, Yang W, Liao W, Li G, Ding Y, Liang L. Cancer derived exosomal miR-25-3p promotes premetastatic niche formation by inducing vascular permeability and angiogenesis. *Nat Commun* **9**: 5395, 2018.
- 34) Yang L, Xuetao C. Characteristics and significance of the pre-metastatic niche. *Cancer Cell* **30**: 668-681, 2016.
- 35) Sanuki R, Onishi A, Koike C, Muramatsu R, Watanabe S, Muranishi Y, Irie S, Uneo S, Koyasu T, Matsui R, Chérasse Y, Urade Y, Watanabe D, Kondo M, Yamashita T,

- Furukawa T. miR-124a is required for hippocampal axogenesis and retinal cone survival through Lhx2 suppression. *Nat Neurosci* **14**: 1125-1134, 2011.
- 36) Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci* **101**: 2087-2092, 2010.
- 37) Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol* **89**: S159-S172, 2018.
- 38) Nesse W, Abbas F, van der Ploeg I, Spijkervet FK, Dijkstra PU, Vissink A. Periodontal inflamed surface area: quantifying inflammatory burden. *J Clin Periodontol* **35**: 668-673, 2008.
- 39) Schei O, Waerhaug J, Lovdal A, Arno A. Alveolar bone loss as related to oral hygiene and age. *J. Periodontol* **30**: 7-16, 1959.
- 40) 日本歯周病学会 . 侵襲性歯周炎データベースについて .
<http://www.perio.jp/member/news/organization/organization/medical/6485.shtml>
(accessed 2020.11.30)
- 41) Hombach S, Kretz M. Non-coding RNAs: Classification, biology and functioning. *Adv Exp Med Biol* **937**: 3-17, 2016.
- 42) Marabita F, de Candia P, Torri A, Tegnér J, Abrignani S, Rossi RL. Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. *Brief Bioinform* **17**: 204-212, 2016.
- 43) Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer* **3**: 32-35, 1950.
- 44) Preusse M, Theis FJ, Mueller NS. miTALOS v2: Analyzing tissue specific microRNA function. *PLoS One* **11**: e0151771, 2016.
- 45) Luckey MA, Kim TH, Prakhar P, Keller HR, Crossman A, Choi S, Love PE, Walsh STR, Park JH. SOCS3 is a suppressor of γ c cytokine signaling and constrains generation of murine Foxp3⁺ regulatory T cells. *Eur J Immunol* **50**: 986-999, 2020.
- 46) 難病情報センター . 早期発症型侵襲性歯周炎 (平成 24 年度) .
<https://www.nanbyou.or.jp/entry/3216> (accessed 2020.11.30)

- 47) Yang Y, Li YX, Yang X, Jiang L, Zhou ZJ, Zhu YQ. Progress risk assessment of oral premalignant lesions with saliva miRNA analysis. *BMC Cancer* **13**: 129, 2013.
- 48) Saito A, Horie M, Ejiri K, Aoki A, Katagiri S, Maekawa S, Suzuki S, Kong S, Yamauchi T, Yamaguchi Y, Izumi Y, Ohshima M. MicroRNA profiling in gingival crevicular fluid of periodontitis—a pilot study. *FEBS Open Bio* **7**: 981-994,2017.
- 49) Radović N, Nikolić Jakoba N, Petrović N, Milosavljević A, Brković B, Roganović J. MicroRNA-146a and microRNA-155 as novel crevicular fluid biomarkers for periodontitis in non-diabetic and type 2 diabetic patients. *J Clin Periodontol* **45**: 663-671, 2018.
- 50) Han P, Bartold PM, Salomon C, Ivanovski S. Salivary small extracellular vesicles associated miRNAs in periodontal status—A pilot study. *Int J Mol Sci* **21**: 2809, 2020.
- 51) Amaral SA, Pereira TSF, Brito JAR, Cortelli SC, Cortelli JR, Gomez RS, Costa FO, Miranda Cota LO. Comparison of miRNA expression profiles in individuals with chronic or aggressive periodontitis. *Oral Dis* **25**: 561-568, 2019.
- 52) Nisha KJ, Janam P, Harshakumar K. Identification of a novel salivary biomarker miR-143-3p for periodontal diagnosis: A proof of concept study. *J Periodontol* **90**: 1149-1159, 2019.
- 53) Lee NH, Lee E, Kim YS, Kim WK, Lee YK, Kim SH. Differential expression of microRNAs in the saliva of patients with aggressive periodontitis: a pilot study of potential biomarkers for aggressive periodontitis. *J Periodontal Implant Sci* **50**: 281-290, 2020.
- 54) Taylor JJ. Protein biomarkers of periodontitis in saliva. *ISRN Inflamm* 2014: 593151, 2014.
- 55) Marzban C. The ROC curve and the area under it as performance measures. *Weather Forecast* **19**: 1106–1114, 2004.
- 56) Sun X, Icli B, Wara AK, Belkin N, He S, Kobzik L, Hunninghake GM, Vera MP, Registry MICU, Blackwell TS, Baron RM, Feinberg MW. MicroRNA-181b regulates NF-κB-mediated vascular inflammation. *J Clin Invest* **122**: 1973-1990, 2012.

- 57) Sun X, Lin J, Zhang Y, Kang S, Belkin N, Wara AK, Icli B, Hamburg NM, Li D, Feinberg MW. MicroRNA-181b improves glucose homeostasis and insulin sensitivity by regulating endothelial function in white adipose tissue. *Circ Res* **118**: 810–821, 2016.
- 58) Luan X, Zhou X, Naqvi A, Francis M, Foyle D, Nares S, Diekwisch TGH. MicroRNAs and immunity in periodontal health and disease. *Int J Oral Sci* **10**: 24, 2018.
- 59) Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, Vázquez-Fresno R, Sajed T, Johnson D, Li C, Karu N, Sayeeda Z, Lo E, Assempour N, Berjanskii M, Singhal S, Arndt D, Liang Y, Badran H, Grant J, Serra-Cayuela A, Liu Y, Mandal R, Neveu V, Pon A, Knox C, Wilson M, Manach C, Scalbert A. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res* **46**: D608-D617, 2018.
- 60) Sakaue S, Hirata J, Maeda Y, Kawakami E, Nii T, Kishikawa T, Ishigaki K, Terao C, Suzuki K, Akiyama M, Suita N, Masuda T, Ogawa K, Yamamoto K, Saeki Y, Matsushita M, Yoshimura M, Matsuoka H, Ikari K, Taniguchi A, Yamanaka H, Kawaji H, Lassmann T, Itoh M, Yoshitomi H, Ito H, Ohmura K, R Forrester AR, Hayashizaki Y, Carninci P, Kumanogoh A, Kamatani Y, de Hoon M, Yamamoto K, Okada Y. Integration of genetics and miRNA-target gene network identified disease biology implicated in tissue specificity. *Nucleic Acids Res* **46**: 11898-11909, 2018.
- 61) Rottenberg ME, Carow B. SOCS3 and STAT3, major controllers of the outcome of infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Semin Immunol* **26**: 518-532, 2014.

図の説明

図 1. 研究対象患者

2017年5月から2020年1月までの間に岡山大学病院の侵襲性歯周炎センターを受診した患者38名のうち、2006年のJSP歯周病分類に基づいてAgPと診断された18歳から39歳で、全身疾患がなく、現在喫煙していないAgP患者25名と、年齢をマッチングさせた歯周病を有さない健常ボランティア（H）7名を対象に研究を行った。さらに、2018年のAAP/EFP歯周病の重症度分類に基づいて、AgP患者をstage III（AgP-III；13名）、stage IV（AgP-IV；12名）に分類した。

図 2. EVの形態解析と内包するmiRNA長の測定

- (a) 粒子径測定：健常ボランティア（H）の内3名のドナーから単離したEVの粒子径分布を示す。各サンプルの3回の平均測定値をそれぞれ実線、破線、一点鎖線で表した。縦軸は散乱強度（%）、横軸はEV小径（nm）を示す。
- (b) TEMによる形態解析：同じ健常ボランティア（H）の内3名のドナーから単離したEVをTEM装置にて、80 kV、30,000倍で観察し、ランダムに10視野撮影した。この内の典型像を示す。スケールバー：100 nm

(c) cDNA 塩基長の測定 : EV が内包する miRNA から合成した cDNA の塩基長を調べた。ドナーH, AgP-III, そして AgP-IVからそれぞれ 1 サンプルを, 全自動電気泳動システムで電気泳動した。M : 25 bp と 50 bp を示す。

図 3. AgP の血中 EV に高発現する miRNA のスクリーニング

- (a) PCR アレイ解析による各ドナー群間の miRNA 発現量の比較 : H (3 名), AgP-III (4 名), そして AgP-IV (5 名) の血中 EV 由来の miRNA 発現を調べた。4 パターンの群間比較, すなわち AgP-III vs. AgP-IV, AgP-III vs. H, AgP-IV vs. H, および AgP-III + AgP-III vs. H のスキャッタープロットを示す。アレイにスポットされた全ての miRNA の発現量を内部コントロールである SNORD61 にて補正し, Ct 値が 40 未満の miRNA 発現について, ドナー3 群ごとの平均値の Log_{10} (Fold change) 値をプロットした。これらのうち, 発現量の差が顕著な miR-181b-5p, miR-16-5p, そして miR-29a-3p を大きなドットで表示している。上の点線は 2 倍以上の発現量増加, 下の点線は 2 倍以上の発現量減少, 点線の間は発現量変化なしを示す。
- (b) PCR アレイ解析結果の検証 : PCR アレイ解析と同じドナーの血漿を用いて, miR-181b-5p, miR-16-5p, そして miR-29a-3p の発現量を, RT-PCR 解析によって調べた。内部コントロール SNORD61 にて補正した Log_{10} (Fold change)

値を縦軸に示す。H (▲) , AgP-III (◆) , AgP-IV (●) *: $p < 0.05$, one-way

ANOVA / Tukey-Kramer test

図 4. 大きなサンプルサイズでの miR-181b-5p の発現検証

AgP-III (13 名) , AgP-IV (12 名) , H (7 名) とさらにドナーを増やして, miR-181b-5p 発現量をリアルタイム RT-PCR 法にて調べた。内部コントロール hsa-miR-484 と外部コントロール Cel-miR-39 の両者の平均値にて補正し, $\Delta\Delta C_t$ 法を用いた。

H (▲) , AgP-III (◆) , AgP-IV (●) ; なお, 白抜き印は, PCR アレイ解析を行ったサンプルを示す。*: $p < 0.05$, one-way ANOVA / Tukey-Kramer test

図 5. ROC 解析による miR-181b-5p の診断バイオマーカーとしての精度評価

各ドナー群における miR-181b-5p の発現について ROC 解析を行った。内部コントロールの hsa-miR-484 と外部コントロールの Cel-miR-39 の両者の平均値にて補正した $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 値を使用した。3 パターンの群間比較, すなわち (a) H vs. AgP-III (H が対照) , (b) H vs. AgP-IV (H が対照) および (c) AgP-IV vs. AgP-III (AgP-IV が対照) を示す。それぞれのドットは, カットオフ値をそれぞれ変えていったときの感度 (%), 100 (%) -特異度 (%) を示す。大きなドットはカットオフ値を示す。中央にある点線は, AUC 値 0.5 を示す。