氏名	森 彩乃
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6600号
学位授与の日付	令和4年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	侵襲性歯周炎の血液診断マーカー候補となる細胞外小胞由来マイクロRNAとその炎症誘導機構について
論文審査委員	森田 学 教授 宮脇 卓也 教授 稲葉 裕明 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

侵襲性歯周炎 (Aggressive periodontitis: AgP) は、全身的に健康な若年者であるにも関わらず、口腔炎症のみが重症化する特異な歯周炎である。しかし、その発症機序の詳細は未だ不明である。近年、癌や関節リウマチなど、様々な疾患への臓器特異的な病態形成に関与する細胞外小胞 (extracellular vesicle: EV) が注目されている。これまでのパイロット研究において、AgP 患者の血中 EV 由来のマイクロRNA (miRNA) 発現プロファイルを調べた結果、中等症の AgP 患者において高発現する miR-181b-5p を見出した。AgP 発症および重症化の分子メカニズムの解明、ひいては AgP 診断マーカーを確立するためには、AgP 特異的に発現変動する miRNA をさらに網羅的に調べる必要がある。したがって本研究では、AgP 診断に応用し得るマーカーmiRNA の探索とそれらによる炎症誘導機構を調べることを目的に研究を行った。

【材料と方法】

1. RNA シーケンス解析：岡山大学病院侵襲性歯周炎センターを受診した AgP 患者 6 名 (平均年齢 26.5 歳) を、重症度によって stage-III (AgP-III, 3 名) と stage-IV (AgP-IV, 3 名) に分類した (2018 年アメリカ歯周病学会/ヨーロッパ歯周病連盟分類)。同年代の歯周病を有さない健常者 (3 名) を加えた 9 名を対象として、初診時血清から exoRNeasy Serum/Plasma Midi kit (QIAGEN) を用いて血中 EV 由来の miRNA ライブラリを作製した。これらの RNA シーケンスのリード数に基づく発現量解析と主成分分析によって、AgP-III, AgP-IV, および健常者の 3 群間で miRNA 発現プロファイルを比較した (岡山大学倫理委員会承認番号 #1706-039)。
2. miRNA mimic 導入によるヒト歯肉線維芽細胞の炎症性変化の解析：Simian Virus 40 不死化ヒト歯肉線維芽細胞 (岡山大学組換え DNA 実験承認 No.19026) に、マーカー候補の miRNA mimic をリポフェクション法で遺伝子導入し、24 時間培養後に歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* 由来の lipopolysaccharide (LPS) で刺激し、さらに 12-24 時間培養後に炎症性サイトカインの発現変動をリアルタイム PCR 法および enzyme-linked immunosorbent assay 法によって調べた。

3. miRNA mimic 導入によるマウス歯周組織の炎症性変化の解析：C57BL/6J マウスの第二大臼歯に絹糸結紮による軽度の歯肉炎症を惹起し、24 時間後にマーカー候補の miRNA mimic をポリエチレンイミン含有試薬 (*in vivo*-jetPEI®, Polyplus-transfection) にて歯肉に遺伝子導入し、3 日後と 5 日後に歯肉組織と顎骨を回収した。炎症性サイトカインの発現変動と歯槽骨吸収量をリアルタイム PCR 法とマイクロ CT によって調べ、さらに、フローサイトメトリーによって、CD45⁺細胞 (全免疫細胞)、CD45⁺F4/80⁺IFN- γ ⁺細胞 (M1 マクロファージ)、CD45⁺CD4⁺IFN- γ ⁺細胞 (Th1 細胞)、そして、CD45⁺CD4⁺IL-17⁺細胞 (Th17 細胞) の割合を調べた。
4. 統計処理：One-way ANOVA/Tukey-Kramer test を用いて有意性を調べた。

【結果】

1. 健常者との比較によって、AgP-III で発現量が 2 倍以上増加した 558 種と減少した 90 種の miRNA を、そして AgP-IV でそれぞれ 526 種と 57 種の miRNA を同定した。さらに、主成分分析で特異性を示す AgP 患者において 10 倍以上発現が変動した miRNA を 5 種類抽出した。
2. 上記 miRNA と miR-181b-5p の 6 種の miRNA それぞれをヒト歯肉線維芽細胞に導入すると、LPS 無刺激の条件下においても、5 種によって interleukin-6 (IL-6) と IL-1 β の産生が 5~10 倍に増加した ($p<0.05$)。
3. マウス歯肉組織への miR-181b-5p の導入によって、歯肉組織中の IL-6 と IL-1 β の発現量が 2~5 倍、歯槽骨吸収量が約 1.2 倍に増加した ($p<0.05$)。さらに、全免疫細胞、M1 マクロファージ、Th1 細胞、そして Th17 細胞の割合も有意に増加した ($p<0.05$)。一方で、miR-181b-5p の標的遺伝子で、IL-6 のオートクリン機構の抑制分子である suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) の産生は有意に減少した。

【考察】

RNA シーケンスによって、AgP 患者血中を循環する EV には 500 種以上の miRNA が高発現するという結果を得た。研究対象者が全身的に健康であることを鑑みると、これらの miRNA は AgP の口腔特異的な炎症病態に深く関与することを示唆するものである。

特に、AgP 診断マーカー候補の miRNA の一つである miR-181b-5p は、炎症性サイトカイン産生の強力な促進能を有し、歯周組織において骨吸収誘導能を有することが初めて明らかになった。さらに、miR-181b-5p は、IL-6 シグナルの抑制分子である SOCS3 を転写阻害することによって、炎症性細胞のプロファイルを炎症亢進に誘導すると考えられ、本研究によって、AgP の炎症誘導機構の一端が示された可能性がある。

今後は、さらなる診断マーカー miRNA と標的となる炎症制御分子を調べることによって、AgP の病態解明と血液診断システムの確立に繋がると考えられる。

【結論】

AgP 患者の血中 EV にはバイオマーカー候補となる miRNA が多く発現していた。その中の一つである、miR-181b-5p は SOCS3 を抑制し、IL-6 の産生を助長した。この結果を、侵襲性歯周炎における歯周組織内の炎症が遷延化する一因と推察した。

論文審査結果の要旨

侵襲性歯周炎（Aggressive periodontitis : AgP）は、全身的に健康な若年者に急速な顎骨破壊が生じる特異な歯周炎であるが、その発症病態は未だ不明である。これまで申請者らは、AgPの臓器特異的な病態形成に血中細胞外小胞（EV）由来のmiR-181b-5pが関与する可能性を報告した。本研究では、AgP患者に特異的に発現するmiRNAのさらなる探索と炎症誘導機構の解明を目的に研究を行った。

岡山大学病院侵襲性歯周炎センターを受診したAgP患者6名と同年代の健常者3名の初診時血中EVから、AgP患者で高発現するmiRNAをRNAシーケンスにて調べ、マーカー候補となるmiRNAをヒト歯肉線維芽細胞と歯周炎モデルマウスに遺伝子導入した。動物モデル炎症性サイトカインの発現量をリアルタイムPCR法にてmRNAレベルで、ELISA法にてタンパクレベルで測定した。さらに、歯槽骨吸収量をマイクロCTにて、免疫細胞の比率をフローサイトメトリーにて調べた（本研究科倫理委員会承認：#1706-039）。

健常者との比較によって、AgP患者で発現量が2倍以上増加した遺伝子を約500種類同定し、さらに主成分分析でAgP患者に特異的な発現を示したmiRNAを5種類抽出した。これらのmiRNAとmiR-181b-5pをそれぞれヒト不死化歯肉線維芽細胞に遺伝子導入すると、5種によってinterleukin-6（IL-6）とIL-1 β の産生が有意に増加した。マウス歯肉組織へのmiR-181b-5pの導入によって、歯肉組織中のIL-6とIL-1 β の発現量が2~5倍、歯槽骨吸収量が約1.2倍に増加した。さらに、CD45陽性細胞、M1マクロファージ、Th1細胞、そしてTh17細胞の割合も有意に増加した。一方で、miR-181b-5pの標的遺伝子で、IL-6のオートクリン機構の抑制分子である*suppressor of cytokine signaling 3*（SOCS3）の発現量は有意に減少した。

研究対象者が全身的に健康であることを鑑みると、AgP患者に高発現していたmiRNAはAgPの口腔特異的な炎症病態に深く関与することを示唆するものである。とりわけ、miR-181b-5pは、IL-6シグナルの抑制分子であるSOCS3遺伝子の転写を阻害することによって、炎症性細胞のプロファイルを炎症亢進に誘導すると考えられ、炎症性サイトカイン産生の強力な促進能を有し、歯周組織において骨吸収誘導能を有することが明らかになった。

この結果からAgPの炎症誘導機構の一端が示された。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。