# 学位申請論文

# 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

# 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

## 森 彩乃

Proinflammatory Mechanism Regulated by Circulating Extracellular Vesicles-derived microRNAs: Potential Diagnostic Biomarkers for Aggressive Periodontitis

Department of Pathophysiology – Periodontal Science, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University

MORI Ayano

(令和3年12月10日受付)

## 緒言

歯周炎は、口腔常在細菌叢のバランスの乱れによって起きる慢性炎症性疾患である。 すなわち、歯肉溝部に形成されたバイオフィルムの成熟とともに歯周病原細菌が増加 することによって宿主免疫の恒常性が破綻し、歯肉上皮細胞や歯肉線維芽細胞が産生 する interleukin (IL) -8, IL-6, そして IL-1β など様々な炎症性サイトカインによって、 好中球などの免疫細胞が活性化され、この免疫・炎症反応の遷延化の結果、歯周組織 破壊が深部にまで波及し、歯槽骨吸収が進行する<sup>1)</sup>。中高年以降に発症する慢性歯周 炎においては、バイオフィルム(プラーク)の蓄積量に一致した歯周組織破壊が緩徐 に進行するが<sup>2)</sup>、プラーク以外にも、環境因子や遺伝因子などの多因子が関与してバ イオフィルムの病原性が増加することによって歯周炎が重症化する<sup>3,4</sup>。

一方で,侵襲性歯周炎(AgP)は慢性歯周炎とは異なり,プラークの蓄積量が少ないにもかかわらず全身的に健康な10-30歳代の歯周組織に急速な炎症性破壊を起こす特異な歯周炎である<sup>2)</sup>。家族内集積が生じることが多く,AgPの罹患率は本邦において0.47%,一方でアフリカにおいては1-5%と地域差が報じられているが<sup>5)</sup>,AgP診断の基準は曖昧で統一されていないことから,正確な発症実態は不明である<sup>6,7)</sup>。また,AgPの発症に関与する因子として,*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*の高検

出<sup>8</sup>, 好中球などの免疫細胞の機能異常<sup>9</sup>, そして, 好中球や マクロファージ (Mø) による IL-1β や tumor necrosis factor (TNF) -α などの過剰な炎症性サイトカイン産生 <sup>10</sup>が示されている。さらに, *IL-6 や glycosyltransferase 6 domain containing 1 (GLT6D1)* などの一塩基多型が関与する報告がある<sup>11,12)</sup>。しかしながら, これらの推定病態は, 限定された家族内や小規模の疫学研究の結果のみに基づいたものであり, 病態形成に ついて一致した見解は得られておらず, AgP 診断に繋がるバイオマーカーの確立には 至っていない。とりわけ, AgP 患者の大きな特徴である, 全身的に健康に関わらず口 腔炎症のみが悪化するメカニズムを説明し得る報告は皆無であることから, AgP の病 態解明の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、口腔特異的な炎症制御因子として、AgP 患者の血液中の細胞外 小胞(Extracellular vesicle: EV) に着目した。EV は、生体を構成する殆ど全ての細胞 から放出される脂質二重膜小胞であり<sup>13</sup>、蛋白質やマイクロ RNA (miRNA) をはじ めとする核酸などの様々な生体機能分子が内包する。また、EV 表層蛋白の特異性が EV の臓器向性 (organotropism)を規定していると考えられている<sup>14</sup>。すなわち、EV は近隣細胞間との情報伝達だけでなく、血液、唾液、尿、および母乳などの全身の体 液循環を介して遠隔組織の細胞へと到達し、内包する機能分子のメディエーターとし

ても機能すると考えられている<sup>15,16)</sup>。近年, 癌や関節リウマチなどの様々な疾患の病 態研究によって、血中を循環する EV 中の miRNA の発現プロファイルが疾患の早期 発見および診断マーカーとして応用されつつある<sup>17,18)</sup>。miRNA は約22 ヌクレオチド からなる機能性 RNA であるが<sup>19)</sup>, EV 由来の miRNA は EV の脂質二重膜に守られて いるため、組織中の miRNA のように RNase により分解されずに安定した状態で遠隔 組織に到達すると考えられ<sup>20)</sup>,標的遺伝子の転写産物への直接的な結合による分解 や転写阻害を介して遺伝子発現を制御することで、細胞機能の調節と全身の生理的・ 病理的変化に深く関与している<sup>13)</sup>。そして,全身循環する miRNA は免疫細胞の増殖・ 分化,そして細菌の lipopolysaccharide (LPS) による炎症反応や, 臓器特異的な免疫 寛容などに関与することが明らかになっている<sup>21-24)</sup>。このような背景から,AgP 患者 の血中 EV 由来 miRNA が歯周組織細胞の遺伝子発現に特異な変化を起こすことによ って、AgPの口腔特異的な炎症メディエーターとなる可能性があると考えた。

当研究室でこれまでに、25 名の AgP 患者を対象としたパイロット研究で、血中 EV 由来 miRNA の遺伝子発現量を PCR アレイで検証した結果、中等度 AgP 患者で高発 現し、重度 AgP 患者で発現量が減少する *hsa-miR-181b-5p* (*miR-181b-5p*) を同定した <sup>25)</sup>。さらに、標的遺伝子のデータベース解析から、*miR-181b-5p* は IL-6 シグナル抑制 分子である suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS 3) の転写阻害  $^{26)}$ を介して, AgP の 炎症憎悪に関与する可能性が示された。歯周炎は多因子疾患であることを鑑みると, miR-181b-5p に加えて複数の miRNA が AgP の炎症病態に関与していると推察される。 したがって本研究では、この仮説を検証するため、AgP 患者に高発現する miRNA を 網羅的に調べ、検出した miRNA と miR-181b-5p を遺伝子導入によって過剰発現させ た in vitro と in vivo モデルで、炎症に関わる変化を調べる戦略を立てた。

## 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侵襲性歯周炎センターを受診 した 38 名の患者のうち,2006 年の日本歯周病学会の歯周病分類 <sup>2)</sup>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 名を抽出し た。そして,アメリカ歯周病学会(AAP)・ヨーロッパ歯周病連盟(EFP)の 2018 年 歯周病新分類 <sup>27)</sup>の歯周炎の重症度(ステージ)と進行リスク(グレード)に基づいて, ステージIII/グレード C と診断した AgP 患者 3 名 (AgP-III) とステージ IV/グレー ド C と診断した患者 3 名 (AgP-IV)と同年代の健常ボランティア 3 名を対象に研究 を行った(**表**1)。本研究は岡山大学倫理委員会の承認を得た後に,研究開始前に十 分な説明を行い,全ての研究対象者の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

研究対象者の初診時に、カラーコードプローブ<sup>®</sup>(CP11:Hu-Friedy、東京、日本)を用いた歯周組織検査と全顎デンタルエックス線写真検査を行い、periodontal inflamed surface area<sup>28</sup>(歯周炎症表面積)と歯槽骨吸収レベルを算出した。歯周炎症 表面積は歯周ポケット深さ(mm)とプロービング時の出血(%)の値から計算した。歯槽骨吸収レベル(%)はScheiの定規を用いて計測した<sup>29</sup>。

## 3. RNA シーケンスによる miRNA のスクリーニング

研究対象者の末梢血中の EV 由来 miRNA を抽出し, AgP 患者に高発現する miRNA の網羅的解析(同定と発現量)を行った。なお,この解析は株式会社 DNA 研究所(東京,日本)に委託した。

- 血清分離:初診時に 3.0 mLの末梢血液を採血し、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) EV 中の全 RNA の抽出:保管血清を融解し、血清(300 µL)から exoRNesay

Serum/Plasma Midi kit (QIAGEN, Hilden, Germany)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 を含む上清を回収し,こ れを 5PRIME Phase Lock Gel<sup>TM</sup>-Heavy (Quanta Biosciences, Beverly, MA, USA) に加え,遠心分離によって RNA を精製した。その後, RNeasy MinElute spin column に結合させ, EV 由来 RNA を 14  $\mu$ L の RNase-free Water (NFW) にて溶出させ た。

3) miRNA シーケンス: 5 µL の EV 由来 RNA から QIAseq<sup>™</sup> miRNA Library Kit と QIAseq<sup>™</sup> miRNA NGS 96 Index IL (ともに QIAGEN) を用いて miRNA ライブラ リを添付プロトコルに従って作製した。すなわち, 3'と 5'にアデニル化アダプタ ーと RNA アダプターを RNA リガーゼによって miRNA に結合し、ランダムな 12 塩基の組み合わせ分子バーコード UMI (unique molecular indices) を含むプラ イマーである the QIAseq<sup>™</sup> miRNA NGS RT Primer と QIAseq<sup>™</sup> miRNA NGS RT Enzyme を用いて、50 °C で 60 分間静置することで cDNA を合成した。

その後,70°C,15分間の加熱で逆転写酵素を不活化した。そして,得た cDNA ライブラリを6塩基のユニークインデックスを含むプライマーを用いて,95°C で 15 分間の 2 本鎖 cDNA の変性後, 95 °C で 15 秒の熱変性, 60 °C で 30 秒のア ニーリングと 72 °C で 15 秒伸長反応のステップを 22 サイクル行った。さらに, サイズ選択と磁気ビーズである QIAseq<sup>TM</sup> miRNA NGS Beads を用いたシーケン スライブラリのクリーンアップ後, Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA)を用いて RNA シーケンシングライブラリのサイズ分布 解析, 定量, 品質評価を行った。そして, NextSeq<sup>TM</sup> 500/550 v2 フローセル (Illumina, San Diego, CA, USA) で 75 bp のシングルリードと 6 bp のインデックスリードで miRNA の塩基配列を決定した。

4) miRNA 発現解析: The University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser Database (Genome Browser. https://genome.ucsc.edu)の Homo sapiens (human) genome assembly hg19 (GRCh37, GenBank accession No. GCA\_000001405.1)をリ ファレンスゲノム配列として, GeneGlobe: Data Analysis Center (QIAGEN)用い て miRNA データベース miRBase Release 21 (https://www.mirbase.org/)の塩基配 列を参照して miRNA 種を決定した。また, miRNA 発現量は, UMI による PCR 重複リードの除去した上で, Trimmed mean of M-value (TMM) 正規化<sup>30)</sup>によ って,測定された遺伝子のうち発現値の高いもしくは低いものを取り除いた後 にサンプル間の平均値を合わせた。さらに, Trimming 操作の後, 変動していな い遺伝子でサンプルとリファレンスの比を計算し,正規化リード数としてサン プルデータの補正値を算出した。miRNA 発現量の群間比較についての統計処理 は,unpaired Moderated *t*-test,もしくは Oneway ANOVA test,さらに Storey with Curve Fitting による多重検定補正を行った。そして,マーカー候補の miRNA の 標的遺伝子の *in silico* 解析は,miRWalk (http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de)を 用いて TargetScan, miRDB,さらに miRTarBase の3種のデータベースに対して 行い,インターロイキンやケモカインなどの炎症や,骨代謝に関与する代表的 な遺伝子を抽出した。

### 4. 不死化歯肉線維芽細胞の培養

不死化歯肉線維芽細胞は、岡山大学大学院口腔微生物学分野の中山真彰博士の協力 の下で樹立した。インフォームドコンセントの下、健康な歯周組織を有するボランテ ィアから採取した歯肉組織からヒト歯肉線維芽細胞を分離・培養した。歯肉線維芽細 胞は、100-mm Dishes (Corning, Corning, NY, USA)中で、10% fetal bovine serum (Biowest SAS, Nuaille, France), 1% Penicillin-Streptomycin Antibiotic Mixture (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), そして High Glucose と L-glutamine を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (Thermo Fisher)を用い、37℃、5% CO<sub>2</sub>、100%湿 度下で細胞培養した。細胞の継代には最終濃度が 0.05 % Trypsin と 0.5 mM ethylendiaminetetra-acetic acid (共に Thermo Fisher Scientific) になるように調整された 混合溶液を用いた。4 継代した細胞を上述の Penicillin-Streptomycin Antibiotic Mixture を含まない培地で 8.5 × 10<sup>4</sup> 個/well で 12-well マルチプレート (Corning) に細胞播種 し,24時間経過時にマルチプレート底面に細胞接着を確認した。そして,pcDNA3ベ クター(Thermo Fisher Scientific)のみと, simian virus 40 large T 抗原(SV40LT)遺伝 子 (Genbank Accession No. 001669) を搭載したベクターを, Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 (Thermo Fisher Scientific)を用いたリポフェクション法にてそれぞれ導入した。歯肉線維芽細 胞の不死化の判断は、遺伝子導入後に約20継代以上の継代培養を行い、線維芽細胞 の紡錘状形態の消失と増殖・分裂の停止がベクターのみを導入した細胞では観察され、 かつ SV40LT 遺伝子導入細胞ではこうした事項を観察できずに線維芽細胞様の紡錘形 を保ったまま増殖・分裂を繰り返すことを確認して、不死化歯肉線維芽細胞の樹立と した(岡山大学組換え DNA 実験承認 No.19026)。樹立後の細胞をさらに 3-9 継代した ものを研究に用いた。

## 5. miRNA 過剰発現細胞の作製

1) miRNA mimic の遺伝子導入: 解析対象の miRNA の塩基配列 (miRbase データベ ースを参照)を模倣した2本鎖 RNA 合成分子の,パッセンジャー鎖の5'末端に FAM (Fluorescin) 標識した miRNA mimic (Ajinomoto Bio-Pharma, San Diego, CA, USA)を用いた。また, 陰性対照としてランダムな配列を有する miRVana<sup>™</sup> miRNA mimic Negative Control #1 (Random mimic : Thermo Fisher Scientific), お よび陽性対照として Twinfilin Actin Binding Protein 1 (TWF-1) を特異的に阻害す る報告<sup>31)</sup>がある miR-1 の塩基配列を模倣した miRVana<sup>™</sup> miRNA mimic Positive Control (miR-1 mimic: Thermo Fisher Scientific)を使用した。不死化歯肉線維芽 細胞を Penicillin-Streptomycin Antibiotic Mixture を含まない培地で 12-well マルチ プレート (Corning) に細胞播種し (8.5×10<sup>4</sup> 個/well), 24 時間経過時にマルチ プレート底面に細胞接着を確認した後に、これらの miRNA mimic を Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagend (Thermo Fisher Scientific) の添付文 書に従ったリポフェクション法で遺伝子導入した。miRNA mimic は濃度設定の 予備実験結果(データ未表示)に従って,50 nM になるよう無血清培地である Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) にて希釈して使用した。また、細胞刺激因 子として,代表的な歯周病原細菌である Porphyromonas gingivalis 由来の LPS (ナ

カライテスク,京都,日本)を用いた。LPS 刺激は,遺伝子導入後 24 時間培養 した後に行った。

2) 遺伝子導入後の細胞のタイムラプス撮影:タイムラプス撮影は、ライブセルイ メージングが可能な IncuCyte<sup>®</sup> Zoom (エッセンバイオサイエンス株式会社、東 京、日本)を用いて使用説明書にしたがって行った。すなわち、付属の 10 倍の 対物レンズを用いて上記 1)の記載に従って 12-wel プレートに培養した miRNA mimic 導入歯肉線維芽細胞(8.5×10<sup>4</sup> 個/well)を、明視野と 480 nm の励起光の 暗視野で遺伝子導入の直後から 48 時間後まで連続撮影した。

## 6. 細胞活性試験

歯肉線維芽細胞の細胞障害性を Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所, 熊本, 日本) を用いて調べた。すなわち, 上記 1)で記載した方法で対数増殖期にある不死化歯肉細 胞芽細胞を 96-well マルチプレート (Corning) に 5.0×10<sup>4</sup> 個/well 細胞播種し, 24 時 間後に 0 ng/mL から 2,000 ng/mL の濃度範囲で LPS 刺激を行い, さらに 24 時間後に, 発色基質としてホルマザンを生成するテトラゾリウム塩化合物である WST-8 を含む Cell counting 溶液を滴下し, 2 時間後に吸光度をマイクロプレートリーダー (SH-1000 Lab: コロナ電気株式会社, 茨城, 日本)を用いて 450 nm の波長で測定した。

## 7. miRNA および mRNA の発現解析

- 不死化歯肉線維芽細胞からの全 mRNA 抽出:遺伝子導入後 24 時間培養し, さらに LPS 刺激した 12 時間培養後に全 RNA を回収した。すなわち,シリカ膜への吸着を利用した RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN)を用いて細胞から RNA 抽出し、その過程で gDNA Eliminator スピンカラム (QIAGEN)を使用して混入したDNA を除去した。RNA の濃度と純度は、Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific)を用いて 260 nm と 280 nm の波長での吸光度とその比を測定し、全ての RNA の純度が A260/A280 値が 1.8~2.2 の間であることを確認した。
- 2) miRNA のリアルタイム RT-PCR:抽出した全 RNA から miRCURY LNA RT Kit (QIAGEN)を用いて miRNA 特異的な逆転写を行った。すなわち,最終濃度が 5 ng/mL になるように調整した 2 µL の RNA を鋳型として, 2 µL の 5×miRCURY RT Reaction Buffer, 1 µL の 10×miRCURY RT Enzyme Mix, 0.5 µL の Synthetic RNA spike-in,そして 4.5 µL の NFW を加えて,全量 10 µL とした。これを 42 °C で 60 分間反応させることで,miRNA を選択的にポリアデニル化し,miRNA の 逆転写産物である cDNA を合成した。その後,逆転写酵素を不活化するために 95 °C で 5 分間の加熱をした。さらに、リアルタイム RT-PCR 法については

miRCURY LNA SYBR Geen PCR Kits (QIAGEN) を用いて行った。つまり,3 $\mu$ L の 60 倍希釈した cDNA 合成反応液,解析対象の miRNA に特異的なプライマー である PCR primer mix を 1  $\mu$ L,常温では不活化している QuantiNova DNA Polymerase を含む 2 × miRCURY SYBR Green PCR Master Mix を 5  $\mu$ L,および 1  $\mu$ L の NFW を混合し,各 well に 10  $\mu$ L ずつ混合溶液を入れた。その後,非特異 的な PCR 産物やプライマーダイマーの生成と伸長を防ぐため、95 °C で 2 分間 の加熱をした。そして、95 °C で 10 秒間の熱変性と 56 °C で 1 分間のアニーリ ングおよび伸長反応の 2 つのステップを CFX Connect Real-Time System (BIO RAD, Hercules, CA, USA)を用いて、40 サイクル行った。miRNA の発現量は 外部コントロールとして線虫 (*Caenorhabditis elegans*) 由来の miR-39-3p (cel-miR-39-3p : QIAGEN)を用いて、ΔΔCT 法にて定量した。

3) mRNA のリアルタイム RT-PCR: 抽出した全 RNA から SuperScript<sup>™</sup> IV VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて逆転写を行った。すなわち, RNA 濃度を調整した溶液 16 µL と, VILO Master Mix を 4 µL を混合し, 全量 20 µL とした。これを 25 °C で 10 分間熱処理し, オリゴ dT プライマーをアニーリン グした。そして, 42 °C で 60 分間熱処理し, mRNA の逆転写産物である cDNA を合成した。その後, 85 °C で 5 分間の加熱で逆転写酵素を不活化した。さらに,

リアルタイム RT-PCR 法については, cDNA 合成反応液を10 倍希釈した溶液を, 上記で作成したとセンスならびにアンチセンス PCR プライマー(10 µM), 2× Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), および NFW と混 合し, 95 °C で 10 分間の 2 本鎖 DNA の変性後, 95 °C で 15 秒間の熱変性と 60 ℃で1分間のアニーリングおよび伸長反応の2ステップを40サイクル行った。 この反応は 7300 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて 行い, その際の PCR 産物が発する蛍光量を SDS v1.X with RQ software (Thermo Fisher Scientific) にて測定した。なお, 解析対象の mRNA 発現量は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内部コントロールとして、 $\Delta\Delta$ Ct 法にて 定量した。PCR プライマー (表 3) は Primer3 (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/)を用いて、増幅サイズ 150~200 bp、プライマーサイズ 20 塩基、 GC 含有量 45~55%, Tm 値 57~58℃の条件で設計して合成し, 理論上の特異 的な増幅を NCBI primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) を用いて確認した。

4) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による蛋白定量解析:遺伝子導入後
 24 時間培養し,さらに LPS 刺激後 24 時間培養した上清を回収し, ELISA MAX<sup>™</sup>
 Deluxe Set Human (BioLegend, SanDiego, CA, USA) を用いて上清中の蛋白濃

度を定量した。96-well マイクロプレート(BioLegend)上の各 well に、特異的 な補足抗体を、2°C、16時間反応させた。リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphatebuffered saline: PBS, pH 7.2, Thermo Fisher Scientific) に Tween 20 (和光純薬, 大阪,日本)を添加した PBS with Tween 20 (PBS-T) にて4回洗浄後,非特異的 反応を防ぐためにブロッキングバッファーを加え,室温で1時間ブロッキング を行った。PBS-Tで4回洗浄後、10倍希釈した培養上清と、段階希釈したスタ ンダードを各 well に添加して 2 時間室温で反応させた。そして、PBS-T で 4 回 洗浄後、ビチオン標識された検出抗体を1時間反応させた。さらに、シグナル の増幅のため, PBS-T で4回洗浄後, ストレプトビアジンを 30 分間反応させた。 そして、PBS-T で 5 回洗浄後,発色基質を室温で 20 分間遮光して反応させた。 反応を停止させるため、2Nの硫酸を各 well に 100 μL 添加し、吸光度はマイク ロプレートリーダー (SH-1000 Lab) を用いて 450 nm の波長で迅速に測定した。

#### 8. マウス歯周炎モデルの作製と miRNA の過剰発現

8 週齢の C57BL/6 野生型雄性マウス(日本クレア株式会社,東京,日本)に,PBS で希釈した塩酸ケタミン 100 mg/kg と塩酸キシラジン 10 mg/kg を腹腔内注射して全 身麻酔を行い,手術台上に固定・開口維持した状態として,Abe ら<sup>32)</sup>の方法に基づい て上顎左側第二大臼歯歯頸部に 6-0 絹糸を結紮した。(図 1, -1 日目)

歯周炎マウス歯肉への遺伝子導入は、ポリエチレンイミン含有の遺伝子導入試薬 (in vivo-jetPEI® : Polyplus-transfection, Rue Marguerite Perey, Illkirch-Graffenstaden, France)を用いて添付プロトコルにしたがって行った。まず, in vivo-jetPEI®と miRNA mimic 複合体の混和比率(Nitrogen/Phosphorus mass ratio: N/P 比)が7になるように 調整した。すなわち,マウス1個体あたり, in vivo-jetPEI®と miRNA mimic 複合体が カチオン性になるように、0.084  $\mu$ Lの in vivo-jetPEI と 0.05 nmol (0.6  $\mu$ g)の miRNA mimic をそれぞれ 4 µL になるよう 10% グルコースと NFW で希釈調整・混合し, 15 分 間室温で反応させた。絹糸の結紮1日後に(図1,0日目),全身麻酔下でマイクロシ リンジ(ジーエルサイエンス株式会社、東京、日本)を用いて in vivo-jetPEI®/miRNA mimic 複合体 8 µL を上顎左側第二大臼歯部の口蓋側歯肉に注入して遺伝子導入した (miRNA mimic 導入群)。陰性対照としては, in vivo-jetPEI®と Random mimic 複合体 を遺伝子導入したもの(Random 群)を、さらに、絹糸を結紮して後は無処置のもの (歯周炎群)を用いた。マウスへの遺伝子導入実験は、図1のタイムスケジュールで 行い,遺伝子導入後3日目と5日目にCO2ガスで安楽死させ,PBSで灌流してから歯 肉組織と顎骨を回収・解析した。なお、5日目に解析するマウスに対しては、3日目 に2回目の遺伝子導入を行った。全ての実験動物は岡山大学動物実験委員会承認の下

で実施し(OKU-20211327), SPF (Specific pathogen free)環境下で飼育を行い,実験 期間中にマウスが死亡した場合は実験結果から除外した。

## 9. マウス歯周組織の炎症性変化の解析

- 次症性サイトカインの遺伝子発現解析:上顎第二大臼歯の口蓋側歯肉を切除回 収し,RNAを安定化するために,迅速にRNAlater (QIAGEN)に浸漬した。そ の後,1日以内に上記 7-3)と同様の方法で,全RNAを抽出してリアルタイム RT-PCR を行った。
- 2) マイクロ computed tomography (マイクロ CT) による画像解析:マウス顎骨を既 報<sup>33</sup>)に基づいて動物用マイクロ CT 装置 (Skyscan: Bruker, Kontich, Belgium) を用いて 4.5 µm のスライス幅で撮影し,付属の再構成ソフト (NRecon: Bruker) を用いて画像を再構成して骨吸収の有無を確認した後,Data viewer (Bruker)を 用いて以下のように解析した。すなわち,マウス歯槽骨の水平断面において第 一大臼歯および第二大臼歯の口蓋根が直線上を通る位置を基準とし,その前頭 断面において,セメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を計測し,歯槽骨 吸収量を定量化した。

3) フローサイトメトリー法による免疫細胞の表面マーカー解析:口蓋側歯肉(上 顎第一大臼歯近心から第三大臼歯遠心までの幅1mm)を採取し, BioMasher®II (ニッピ,東京,日本)を用いて歯肉を細断した。コラゲナーゼタイプ IV (Thermo Fisher Scientific) 含有 Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI 1640 培 地, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 溶液に浸漬し, 100 rpm, 37 °C で1時 間振盪した。その後, RPMI 1640 培地を 4 mL で懸濁し, 70 μm のセルストレイ ナー(Corning)に通して細胞懸濁液を濾過した。細胞懸濁液を350×g,4°Cで 5 分間遠心し, 上清を吸引除去した。そこに, 抗 CD16/32 抗体 (Clone: 93, Biolegend) をウシ血清アルブミン (Sigma-Aldrich) 含有 PBS で 100 倍希釈して 添加し、4℃で10分間反応させた。その後、細胞表面マーカーを染色するため に、ウシ血清アルブミン含有 PBS で 1/100 の濃度に希釈した抗体を添加して、 4 ℃, 暗所で 60 分間反応させた。抗体は, APC 標識抗マウス CD4 抗体 (0.5 mg/mL, Clone: RM4-5, Pacific Blue<sup>™</sup>標識抗マウス CD45 抗体 (0.5 mg/mL, Clone: 30-F11, Biolegend), FITC 標識抗マウス F4/80 抗体 (0.5 mg/mL, Clone: BM8, Biolegend)を用いた。PBS を1mL 添加して撹拌後, 350×g, 4°C で5分 間遠心し, 上清を吸引除去した。その後, Cyto Fast Fix/Perm Buffer Set (BioLegend) を150 µL 添加し, 暗所条件下, 室温で20分間反応させ, 細胞の固定と細胞膜 の穿孔を行った。PBS1mL添加し, 撹拌後, 350×g, 4°Cで5分間遠心し上清 を吸引除去した。さらに, 細胞内マーカーを染色するために, 1× Cyto Fast Perm/Wash Solution で 1/100の濃度に希釈した抗体を添加して, 4°C, 暗所で 60 分間反応させた。抗体は, PE/Cyanine 7 標識抗マウス IFN-γ 抗体 (0.5 mg/mL, Clone: XMG12, Biolegend), PerCP 標識抗マウス II-17 抗体 (0.5 mg/mL, Clone: TC11-18H10.1, Biolegend) を用いた。上記手順で染色した細胞を, 最終的な細 胞溶液が 100 µL になるように PBS で希釈し, MAQSquant Analyzer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)を用いてフローサイトメトリー法で解析し た。本研究では, CD45<sup>+</sup>細胞を全免疫細胞<sup>34)</sup>, CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup>細胞を M1 マ クロファージ (Mø) <sup>35)</sup>, CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup>細胞を Th1 細胞<sup>36)</sup>, そして, CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>II-17<sup>+</sup>細胞を Th17 細胞<sup>37)</sup>と定義した。

## 10.統計処理

データは全て平均値±標準偏差で算出し,実測値をグラフ描出のドットで,標準偏差をエラーバーにて示した。統計処理は,3 群間以上の差の検定には one-way analysis variance (one-way ANOVA) を用い,さらに多重比較検定を Tukey-Kramer test で行った。2 群間の差の検定には,Student's *t*-test を用いた。各々の統計処理には,統計解析 ソフトである GraphPad Prism8 (Graphpad Software Inc, SanDiego, CA, USA) を用い て検定を行い, p < 0.05 を有意差ありと判定した。

## 結果

#### 1. AgP 患者に高発現する miRNA の網羅的解析

研究対象者である AgP-III (3 名), AgP-IV (3 名), および健常者(3 名)間にお ける臨床データを統計学的に解析した(表 1)。AgP-IVの歯周炎症表面積は,健常者 と AgP-IIIの歯周炎症表面積と比較して有意に高値を示した。また, AgP-IVの平均歯 槽骨吸収レベルについても約 30%と高値を示したことから,本研究対象患者の群分け は, AAP・EFP の歯周炎分類に合致することが分かった。

#### 1) ベン図比較

RNA シーケンスの解析結果から、各サンプルの総リード数は全て 1,000 万以上 で、そのうち約 2~4 %が miRNA であることが分かった(データ未表示)。シーク エンス結果を miRNA 配列のデータベース (miRbase) と照合した結果、2,731 種の miRNA が同定された。これらのうち、健常者と比較して、AgP-IIIおいて 2 倍以上 増加した遺伝子は 558 種、同様に AgP-IVおいては 526 種あり、AgP-IIIと AgP-IVに 共通していた遺伝子は 396 種であった。一方で、健常者と比較して、AgP-IIIと AgP-IVに 2 倍以上減少した遺伝子は 90 種、同様に AgP-IVおいては 57 種あり、AgP-IIIと AgP-IVに共通していた遺伝子は 32 種であった(図 2 a)。しかし、これらの miRNA の 3 群間での発現量について、リード数が 30 未満の非常に低発現の miRNA を除外して 多重検定補正を行ったところ、有意差を示す miRNA は無かった。

#### 2) 主成分分析(PCA)分析

研究対象者全員の miRNA 発現パターンの傾向について主成分解析によって比較 した結果(図2b),殆どのサンプルが集中してまとまっており,各群間に明確な違 いは無く,全体の発現傾向が似通っていることが明らかになった。

## 3) 個体間比較

ー方で,各サンプルの個体間比較において,AgP-IIIの患者 P1 と AgP-IVの患者 P1,および P3 は異なった傾向を示したことから,これらの患者に着目し,miRNA の発現パターンを調べた。その結果,健常群(3人)の平均値と比較して,AgP-IV の患者 P1 の発現量は *miR-5090* で約 33 倍,*miR-4515* で約 8 倍,そして,*miR-4313* で約 28 倍多かった。また,AgP-IVの患者 P3 は *miR-1206* で約 60 倍,そして AgP-IIIの患者 P1 は *miR-4532* で約 38 倍多かった(図 2 c)。

### 4) AgP 患者に高発現する miRNA のデータベース解析

検出した上記 3 の 5 種類の miRNA と先行研究<sup>24)</sup>で AgP-III患者に高発現してい た miR-181b-5p の機能解析を行うため、標的遺伝子を in silico 解析によって調べた 結果,炎症に関与する IL, TNF, motif chemokine (CCL),そして motif chemokine ligand CXCL や, 骨代謝に関与する Bone morphogenetic protein (BMP) などの標的 遺伝子が抽出された (**表 2**)。

#### 2. 検出した miRNA を導入したヒト歯肉線維芽細胞の反応

## 1) miR-181b-5p mimic の細胞への導入効率の確認

miR-1 mimic を導入すると, TWF-1 の発現量は, Random 群と比較して約 50%減 少した (図 3 a)。また, miR-181b-5p mimic を導入すると, miR-181b-5p の発現量は, Random 群と比較して約 150 倍増加した (図 3 b)。さらに蛍光顕微鏡で観察すると, 遺伝子導入後, 6~12 時間で導入された mimic の蛍光標識である FAM が細胞質内 に取り込まれており (図 3 c), FAM 陽性細胞率は遺伝子導入後 12 時間で 70%以上 であった (図 3 d)。

## 2) miRNA mimic の導入歯肉線維芽細胞の IL-6 と IL-1β の発現

まずは LPS の細胞毒性試験を行い,歯肉線維芽細胞に対する至適濃度を検討した(図4)。LPS 無刺激群と比較して,LPS 刺激 100 ng/mL および 1,000 ng/mL では吸光度に有意差はない一方で,LPS 刺激 2,000 ng/mL では吸光度が有意に減少し細胞毒性を示したため,以降の実験では 1,000 ng/mL の LPS で歯肉線維芽細胞を刺激した。

この条件で,miR-181b-5pmimicを導入すると,*IL-6と IL-1β*の発現量は,Random 群と比較して,LPS 刺激の有無に関わらず増加傾向があった。なお,導入そのもの によって増加したが,ばらつきが大きかった(図5,LPS 無しの結果)。*IL-6*の発現 量の増加は 100 倍以上であったが,統計学的な有意差はなかった。*IL-1β*の発現量 は同様の結果であったが,特にLPS 無刺激の条件では有意に増加した(図5)。

さらに,検出した全ての miRNA の mimic を導入して IL-6 と IL-1β の産生を調 べた。その結果,IL-6 は (図 6 A),LPS 無刺激でも,miR-181b-5p,miR-1206, miR-4313,さらに miR-5090 導入群では 5-10 倍に,miR-4515 導入群では LPS 刺激 の有無に関わらず 2-10 倍に,有意に増加した。一方で,miR-4532 導入によって変 化はなかった。同様に,IL-1β は (図 6 B),LPS 刺激で,miR-4313 導入群では約 2 倍に,miR-181b-5p,miR-1206,miR-5090,さらに,miR-4515 導入群では LPS の有無に関わらず 2-6 倍に,有意に増加した。一方で,miR-4532 によって変化は なかった。

## 3. 検出した miRNA を導入した歯周炎モデルマウスの反応

1) miR-181b-5p mimic の歯肉への導入効率の確認

25

miR-1 mimic を導入すると, *Twf-1*の発現量は Random 群と比較して 40 % 有意に 減少した(図 7)。したがって, この条件でマウス遺伝子導入を行った。

## 2) miRNA mimic の導入による歯槽骨吸収(図8)

再構築した画像で上顎左側大臼歯部の口蓋根部の骨吸収を確認できた(図 8a) ので,前頭断面でセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を計測した(図 8b)。 導入した 5 種類の遺伝子の内,miR-181b-5p mimic を導入した場合は,遺伝子導 入後の日数に関わらず,Random 群と比較して,歯槽骨吸収が有意に13%増加した。 一方で,その他 4 種類の miRNA mimic を導入した場合には,変化しなかった(図 8c)。

### 3) miRNA mimic 導入歯肉の *II-6 と II-1 β*の発現(図 9)

上記 2 で得た in vitro の結果から, II-6 と II-1βの発現の変動があった 5 種類の miRNA mimic をマウスの歯肉にインジェクションした。そのうち, miR-181b-5p mimic では, *II-6 と II-1β*の発現量は, Random 群と比較して, 遺伝子導入後の経過 日数につれて増加する傾向があった。なお, 結果にはばらつきが大きかったが, *II-*6 の発現量の増加は約 2 倍であった。また, *II-1β*の発現量は遺伝子導入後 3 日目で 変化しなかったが, 5 日目で 3 倍に増加した。一方で, その他 4 種類の miRNA mimic を導入した場合には、Il-6とIl-1βの発現量は、変化しなかった。

## 4) miR-181b-5p 導入による歯肉組織の炎症性変化の解析

miR-181b-5pによる IL-6 シグナル制御メカニズムを調べるために、歯肉組織中の Socs3 発現量を調べた。miR-181b-5p mimic を導入すると、Socs3 の発現量は、
導入後の経過日数につれて減少傾向があった(図10)。特に、遺伝子導入後5日目では有意に 56%減少した。

さらに, miR-181b-5p による免疫細胞のプロファイルの変化を調べるために, フ ローサトメトリー解析を行った。miR-181b-5p mimic の導入によって免疫細胞の割 合は, Random 群と比較して, 有意に増加した(図 11)。CD45 陽性細胞率は 30%, M1 Mø 陽性細胞は 26%, および, Th1 および Th17 陽性細胞率は 11-28%, 有意に 増加した。

## 考察

本研究によって, AgP 患者の血清 EV 由来 miRNA が, 歯周組織の炎症病態に関与 する可能性が初めて示された。これまで AgP に関する多くの研究があるにも関わら ず, その発症病態が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<sup>26)</sup>。しかし, 日本歯周病学会では, 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, エクソームシ ークエンス <sup>38)</sup>などの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<sup>7,38,39)</sup>。このような状況において, 本研究の意義 は非常に大きいと考えられる。

AgP 患者の血中 EV に発現する miRNA を RNA シーケンスによって網羅的に調べ た結果,健常者と比較して AgP 患者で増加する遺伝子が,減少する遺伝子よりも顕著 に多いことが明らかになった。研究対象者が全身的に健康な若年者であることを鑑み ると,500 以上もの EV 由来 miRNA が AgP の口腔炎症に関与して増加するという結 果は過去に例のない報告であり,さらに,歯周病が多くの全身疾患のリスクを高める という概念である「ペリオドンタルメディシン」<sup>40</sup>の観点から本研究を捉えると,医 学上の意義も高い結果であると考えられる。そのため、本研究で着目した6種類以外のmiRNAの機能についても、今後検証する必要があると考える。

近年, 歯周炎に関わる miRNA の研究が活発化しており<sup>41-43</sup>, 歯周病と歯周組織内 の免疫応答に miRNA が関与していることを示す総説<sup>44)</sup>も発表されている。しかし、 両者の関連性を疫学的に調べる研究が主となり,病因の解析・追求には至っていない。 これらの研究は歯周組織や歯肉溝浸出液,そして唾液中の miRNA をターゲットとし ているが、複雑に発現変動しやすい上、EV に内包されていない体液中の miRNA は、 組織中で分解を受けやすく,標的細胞へ安定して到達できない<sup>19)</sup>ことから,AgPの病 態マーカーを明らかにするためには、組織中で安定している EV 中の miRNA を調べ る必要があると考えられる。これまでに歯周病患者の EV 由来の miRNA にターゲッ トを絞った報告はわずか2編のみ<sup>45,40</sup>であり, AgP 患者の血中の EV 由来の miRNA に関する報告は本研究が初めてである。したがって、今後、AgPの歯周組織の炎症シ グナル制御において果たす役割についてさらなる検証が必要である。すなわち, AgP の発症初期と重症化の時期などの検体採取時期,さらには, AgP の重症度の違いを考 慮して、患者間のみならずに同一患者内で変動する miRNA を網羅的に検索すること が必要であると考える。

29

また、PCA の結果(図 2b)から、AgP の中には異なる表現型が存在する可能性が 示唆された。すなわち、各 AgP 患者 3 人の miRNA 発現量を比較すると、AgP-IVの患 者 1 は、健常者と比較して miR-1206 を除いた 4 種の miRNA が高発現している一方 で、AgP-IVの患者 3 は、miR-1206 を除いて、健常者とほとんど変化がなかった。同 じ AgP 分類でもこのように miRNA の発現パターンは異なっていた。発現している miRNA によって AgP が重症化することもあれば、miRNA 以外のその他の因子によっ て重症化するということが当然考えられる。これまで、歯周病患者の病型のサブタイ プに関する報告<sup>47-49</sup>はいくつかあるものの、統一した見解は未だ得られていないこと は、こうした因子の組合せや重複時期が関与しているためと考える。そこで、本研究 のように miRNA の発現パターンを考慮した病型分類を検討すると、将来の新たな研 究に発展すると考える。

スクリーニングによって得た6種のマーカー候補の miRNA を *in vitro* および *in vivo* で遺伝子導入を行ったところ, *in vitro* では5種の miRNA によって歯周炎症進展の主 要サイトカインである IL-6と IL-1βの発現が誘導されたが(図6), *in vivo* では miR-181b-5p よってのみ歯槽骨吸収と歯肉局所の炎症性サイトカイン産生が誘導される結 果となった(図8,9)。特に, *in vitro* で炎症性サイトカインの発現が変化した miRNA であっても *in vivo* では骨吸収やサイトカイン産生などの表現型に影響を検出できな 30 かったことは、注目に値する。本研究の限界はいくつかあるが、複数の miRNA の組 合せを考慮して経時的な変化を追い切れていないことが最大の限界である。しかし、 本研究ではこうした限界を軽減するために、単独種の細胞培養系を用いた *in vitro* の 結果を理解しようとして、*in vivo* では免疫系の複数種の細胞の変動を捉えようとした (図 11)。また、表現系である 2 種の炎症性サイトカインの発現に関与する細胞内シ グナル伝達系への影響も調べた(図 10)。しかし、炎症性サイトカインと抗炎症サイ トカインは相互反応のネットワークを形成することによって歯周組織の恒常性維持 を担っていることを鑑みると<sup>50)</sup>、今後は、対象遺伝子を広げてこれら残る 4 種の miRNA の影響を調べる必要がある。さらに、*in vivo* 解析を miRNA mimic 導入の 3 日 後と 5 日のみしか行っていないので、さらに詳細に経時的な解析を行って miRNA が 制御するサイトカイン群を明らかにする必要がある。

先行研究<sup>25)</sup>で最も有力な AgP 診断マーカー候補となった miR-181b-5p による炎症 制御については様々な報告があるが, NF-kB シグナル伝達経路の活性を阻害すること による炎症抑制が主な作用と考えられている<sup>51)</sup>。しかし,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く<sup>52)</sup>,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<sup>44)</sup>もあることから,炎症歯周組織を想定して miRNA のメカニズムを再考する必要があると考えられる。そこで miR-181b-5p の標 的遺伝子について in silico データベース解析を行ったところ, IL-6 を抑制する作用 がある SOCS 3 が抽出された<sup>25)</sup>。SOCS3 は,炎症反応による一連の Janus kinase-signal transducer and activator of transcription 経路の誘導を負に調節する因子であり、炎症性 サイトカインである IL-6, IL-17, の産生を抑制し, さらに抗炎症サイトカイン IL-10 による作用を促進する<sup>26,53)</sup>。これまでに,SOCS3 ノックアウトマウスでは破骨細胞 が増加することによって有意に歯槽骨吸収が増加することが分かっており 54,55), miR-181b-5p による SOCS3 の転写阻害は, AgP 患者の歯周組織に過剰な炎症反応を引き起 こす可能性がある。そして、フローサトメトリーの結果から、組織中の miR-181b-5p が誘導する免疫細胞が集積することによって, 過剰な免疫応答を引き起こす可能性が あることが分かった。免疫系は Møや樹状細胞などの抗原提示細胞が主体となる自然 免疫と、獲得免疫がある。獲得免疫は T 細胞が主体となる細胞性免疫と B 細胞から 産生される抗体が主体となる体液性免疫に分けられる 5%。歯周組織においては歯肉線 維芽細胞が免疫機構に関与<sup>57)</sup>しており、細菌感染により、IL-1β、IL-6、TNF-αを産生 するが、CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞(helper T cells: Th細胞)はこれらのサイトカインの種 類によって分化が異なる。すなわち, Th 細胞は IL-1β によって Th1 細胞と Th2 細胞 に, IL-6 によって Th17 細胞に分化する。Th1 細胞は,炎症反応に関与する M1 Møの 活性化因子として働き<sup>58)</sup>, Th17 細胞は Receptor activator of NF-kB ligand 発現を刺激

することで破骨細胞を活性化させる<sup>59)</sup>。すなわち,AgP 患者の歯周組織において,軽 微な細菌感染が生じると,M1 Mø や歯肉線維芽細胞から IL-6 などの炎症性サイトカ インが産生されるが,IL-6 を抑制するための SOCS3 が miR-181b-5p によって転写阻 害されるため IL-6 が過剰になり,Th 細胞から分化した Th17 細胞<sup>60)</sup>によって歯槽骨 吸収が誘導<sup>54)</sup>されて,歯周炎症が重症化すると推測される。今後,歯周炎症組織中で の各免疫細胞の局在と炎症分子の発現を調べることによって,miR-181b-5p による歯 周炎症誘導機構が明らかになると考えられる。

AgPでは歯周組織の破壊が無症状にかつ急速に進行するため、若年者の口腔機能と 審美性を著しく阻害し、長期に渡る治療が必須である。患者の精神的・経済的負担軽 減と QOL 向上のためにも、早期診断のバイオマーカー同定と早期治療による重症化 予防が重要である。今後、miR-181b-5p 以外の miRNA の機能解析と標的遺伝子のネッ トワークの解明と、EV が口腔局所に誘導されるメカニズムの検証に加えて、研究対 象者を増やした疫学調査を行うことによって、AgP の診断マーカーの確立、さらには、 原因分子をターゲットとした新規治療法への発展に繋げたい。

# 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。

## 参考文献

- 1) Hajishengallis G, Chavakis T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. *Nat Rev Immunol* **21**: 426-440, 2021.
- 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.
- Zhang S, Yu N, Arce RM. Periodontal inflammation: Integrating genes and dysbiosis. *Periodontol 2000* 82: 129-142, 2020.
- 4) 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.
- 5) Susin C, Haas AN, Albandar JM. Epidemiology and demographics of aggressive periodontitis. *Periodontol 2000* 65: 27-45, 2014.
- 6) Albandar JM, Tinoco EM. Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. *Periodontol 2000* **29**: 153-76, 2002.
- Fine DH, Patil AG, Loos BG. Classification and diagnosis of aggressive periodontitis. J Periodontol 89: S103-S119, 2018.
- 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.
- Kulkarni C, Kinane DF. Host response in aggressive periodontitis. *Periodontol 2000* 65: 79-91, 2014.
- 10) Loos BG, Van Dyke TE. The role of inflammation and genetics in periodontal disease. *Periodontol 2000* 83: 26-39, 2020.
- 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.
- 12) 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.
- 13) Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colás E, Cordeiro-da Silva A, Fais S, Falcon-Perez JM, Ghobrial IM, Giebel B, Gimona M, Graner M, Gursel I, Gursel M, Heegaard NH, Hendrix A, Kierulf P, Kokubun K, Kosanovic M, Kralj-Iglic V, Krämer-Albers EM,

Laitinen S, Lässer C, Lener T, Ligeti E, Linē A, Lipps G, Llorente A, Lötvall J, Manček-Keber M, Marcilla A, Mittelbrunn M, Nazarenko I, Nolte-'t Hoen EN, Nyman TA, O'Driscoll L, Olivan M, Oliveira C, Pállinger É, Del Portillo HA, Reventós J, Rigau M, Rohde E, Sammar M, Sánchez-Madrid F, Santarém N, Schallmoser K, Ostenfeld MS, Stoorvogel W, Stukelj R, Van der Grein SG, Vasconcelos MH, Wauben MH, De Wever O. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 4: 27066, 2015.

- 14) Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S, Singh S, Williams C, Soplop N, Uryu K, Pharmer L, King T, Bojmar L, Davies AE, Ararso Y, Zhang T, Zhang H, Hernandez J, Weiss JM, Dumont-Cole VD, Kramer K, Wexler LH, Narendran A, Schwartz GK, Healey JH, Sandstrom P, Labori KJ, Kure EH, Grandgenett PM, Hollingsworth MA, de Sousa M, Kaur S, Jain M, Mallya K, Batra SK, Jarnagin WR, Brady MS, Fodstad O, Muller V, Pantel K, Minn AJ, Bissell MJ, Garcia BA, Kang Y, Rajasekhar VK, Ghajar CM, Matei I, Peinado H, Bromberg J, Lyden D. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527: 329-35, 2015.
- 15) 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.
- 16) Henrich SE, McMahon KM, Plebanek MP, Calvert AE, Feliciano TJ, Parrish S, Tavora F, Mega A, De Souza A, Carneiro BA, Thaxton CS. Prostate cancer extracellular vesicles mediate intercellular communication with bone marrow cells and promote metastasis in a cholesterol-dependent manner. *J Extracell Vesicles* 10: e12042, 2020.
- 17) Yokoi A, Matsuzaki J, Yamamoto Y, Yoneoka Y, Takahashi K, Shimizu H, Uehara T, Ishikawa M, Ikeda SI, Sonoda T, Kawauchi J, Takizawa S, Aoki Y, Niida S, Sakamoto H, Kato K, Kato T, Ochiya T. Integrated extracellular microRNA profiling for ovarian cancer screening. *Nat Commun* 9: 4319, 2018.
- Schioppo T, Ubiali T, Ingegnoli F, Bollati V, Caporali R. The role of extracellular vesicles in rheumatoid arthritis: a systematic review. *Clin Rheumatol* 40: 3481-3497, 2021.
- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215-33, 2009.
- 20) Matsuzaki J, Ochiya T. Circulating microRNAs and extracellular vesicles as potential cancer biomarkers: a systematic review. *Int J Clin Oncol* **22**: 413-420, 2017.
- Lindsay MA. microRNAs and the immune response. *Trends Immunol* 29: 343-351, 2008.
- O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D. microRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* 30: 295-312, 2012.

- 23) Alexander M, Hu R, Runtsch MC, et al. Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin. *Nat Commun* 6: 7321, 2015.
- 24) Nahid MA, Satoh M, Chan EK. MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance. *Cell Mol Immunol* 8: 388-403, 2011.
- 25) 河本美奈. 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. 岡山歯学会雑誌 39:学位論文, 2020.
- 26) Carow B, Rottenberg ME. SOCS3, a major regulator of infection and inflammation. *Front Immunol* 5:58, 2014.
- 27) 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.
- Nesse W, Abbas F, van der Ploeg I, Spijkervet FKL, Dijkstra PU, Vissink A. Periodontal inflamed surface area: quantifying inflammatory burden. *J Clin Periodontol* 35: 668– 673, 2008.
- 29) Schei O, Waerhaug J, Lovdal A, Arno A. Alveolar bone loss as related to oral hygiene and age. *J. Periodontol* **30**: 7-16, 1959.
- 30) Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol* 11: R25, 2010.
- Leroux AC, Bartels E, Winter L, Mann M, Otte K, Zehe C. Transferability of miRNAtechnology to bioprocessing: Influence of cultivation mode and media. *Biotechnol Prog* 37: e3107, 2021.
- 32) Abe, T, Hajishengallis, G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods* **394**: 49-54, 2013.
- 33) Park CH, Abramson ZR, Taba M Jr, et al. Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. *J Periodontol* 78: 273-281, 2007.
- 34) Altin JG, Sloan EK. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol Cell Biol* 75: 430-445, 1997.
- 35) Dungan LS, McGuinness NC, Boon L, Lynch MA, Mills KH. Innate IFN-γ promotes development of experimental autoimmune encephalomyelitis: a role for NK cells and M1 macrophages. *Eur J Immunol* 44: 2903-2917, 2014.
- 36) Prussin C. Cytokine flow cytometry: understanding cytokine biology at the single-cell level. *J Clin Immunol* 17: 195-204, 1997.
- 37) Bittner-Eddy PD, Fischer LA, Kaplan DH, Thieu K, Costalonga M. Mucosal Langerhans Cells Promote Differentiation of Th17 Cells in a Murine Model of Periodontitis but Are

Not Required for Porphyromonas gingivalis-Driven Alveolar Bone Destruction. J Immunol 197: 1435-1446, 2016.

- 38) Masumoto R, Kitagaki J, Fujihara C, Matsumoto M, Miyauchi S, Asano Y, Imai A, Kobayashi K, Nakaya A, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S. Identification of genetic risk factors of aggressive periodontitis using genome wide association studies in association with those of chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 54: 199-206, 2019.
- 39) 日本歯周病学会. 歯周病新分類への対応.
   http://www.perio.jp/file/news/info 191220.pdf(最終アクセス2021年11月30日)
- 40) Beck JD, Papapanou PN, Philips KH, Offenbacher S. Periodontal medicine: 100 years of progress. *J Dent Res* 98: 1053-1062, 2019.
- 41) 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.
- 42) 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.
- 43) 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.
- 44) 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.
- 45) 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.
- 46) Nik Mohamed Kamal NNS, Awang RAR, Mohamad S, Shahidan WNS. Plasma- and saliva exosome profile reveals a distinct microRNA signature in chronic periodontitis. *Front Physiol* 11: 587381, 2020.
- 47) Diehl SR, Wu T, Burmeister JA, Califano JV, Brooks CN, Tew JG, Schenkein HA. Evidence of a substantial genetic basis for IgG2 levels in families with aggressive periodontitis. *J Dent Res* 82: 708-712, 2003.
- 48) Kebschull M, Guarnieri P, Demmer RT, Boulesteix AL, Pavlidis P, Papapanou PN. Molecular differences between chronic and aggressive periodontitis. *J Dent Res* 92: 1081-1088, 2013.
- 49) Offenbacher S, Divaris K, Barros SP, Moss KL, Marchesan JT, Morelli T, Zhang S, Kim S, Sun L, Beck JD, Laudes M, Munz M, Schaefer AS, North KE. Genome-wide association study of biologically informed periodontal complex traits offers novel

insights into the genetic basis of periodontal disease. *Hum Mol Genet* **25**: 2113-2129, 2016.

- 50) Pan W, Wang Q, Chen Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *Int J Oral Sci* 11: 30, 2019.
- 51) Tahamtan A, Teymoori-Rad M, Nakstad B, Salimi V. Anti-inflammatory microRNAs and their potential for inflammatory diseases treatment. *Front Immunol* **9**: 1377, 2018.
- 52) 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.
- 53) Santos MRG, Queiroz-Junior CM, Madeira MFM, Machado FS. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in inflammatory bone disorders. *Bone* 140: 115538, 2020.
- 54) Papathanasiou E, Kantarci A, Konstantinidis A, Gao H, Van Dyke TE. SOCS-3 regulates alveolar bone loss in experimental periodontitis. *J Dent Res* **95**: 1018-1025, 2016.
- 55) Ohishi M, Matsumura Y, Aki D, Mashima R, Taniguchi K, Kobayashi T, Kukita T, Iwamoto Y, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling-1 and -3 regulate osteoclastogenesis in the presence of inflammatory cytokines. *J Immunol* 174: 3024-3031, 2015.
- 56) Kaufmann SHE. Immunology's coming of age. Front Immunol 10: 684, 2019.
- 57) Palmqvist P, Lundberg P, Lundgren I, Hänström L, Lerner UH. IL-1β and TNF-α regulate il-6-type cytokines in gingival fibroblasts. *J Dent Res* 87: 558-563, 2008.
- 58) Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. Eur J Pharmacol 877: 173090, 2020.
- 59) Nanke Y, Kobashigawa T, Yago T, Kawamoto M, Yamanaka H, Kotake S. RANK expression and osteoclastogenesis in human monocytes in peripheral blood from rheumatoid arthritis patients. *Biomed Res Int* **2016**: 4874195, 2016.
- Qin H, Holdbrooks AT, Liu Y, Reynolds SL, Yanagisawa LL, Benveniste EN. SOCS3 deficiency promotes M1 macrophage polarization and inflammation. *J Immunol* 189: 3439-3448, 2012.

## 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 授に心から感謝いたします。そして,様々な面にわた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,井手口英隆助教,河村麻理博士な 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,細胞培養に関し て協力して下さった,岡山大学大学院医歯薬学研究科口腔微生物学分野の中山真彰 助教,そして,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江口傑徳講師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42回日本炎症・再生医学会(2021年7月)

## 図の説明

#### 図 1. miRNA 過剰発現歯周炎モデルマウスの作製

歯周炎群は、マウス上顎第二大臼歯に絹糸結紮して作製し(-1日目),3日目と 5日目に歯肉組織と顎骨を回収し、解析した。Random 導入群および5種のmiRNA (miR-181b-5p,-4515,-4313,-1206,-5090) mimic 導入群は歯周炎群と同様に絹糸 結紮し、0日目と3日目にマウス歯肉組織に遺伝子導入して作製し、それぞれ3日 目と5日目に歯肉組織と顎骨を回収し、解析した。

#### 図 2 RNA シーケンスによるマーカーmiRNA のスクリーニング

- (a)健常者,AgP-III,およびAgP-IV各群において発現変動するEV由来miRNAの 種類数についてベン図解析を行った。健常者と比較して,AgP-IIIとAgP-IVそ れぞれにおいて2倍以上の変動があった遺伝子数を増加遺伝子と減少遺伝子に 分けて示す。白サークルはAgP-III,そして濃グレーサークルはAgP-IV,そし てグレーサークルはAgP-IIIとAgP-IVに共通して変動する遺伝子数を示す。
- (b) 各群における miRNA 発現の PCA を示す。x, y, そして z 軸はそれぞれ第1主成分,第2主成分,および第3主成分を示し、△は AgP-III 患者3名 (P1-P3),
  ○は AgP-IV患者3名 (P1-P3),そして□は健常者 (Healthy) のデータプロットを示す。
- (c) PCA で異なる傾向を示した患者(AgP-III P1, AgP-IV P1)と AgP-IV P3 におい

て高発現した miRNA4種 (miR-5090, 4313, 4515, 4532) と1種 (miR-1206) の発現量を示す。x 軸の AgP-IIIと AgP-IV患者,各3名における各 miRNA の正 規化リード数の相対発現量 (3人の Healthy の平均値を基準)をy 軸に示す (平 均値 ± 標準偏差)。

Healthy: ■; AgP-Ⅲ P1, P2, P3: 🛄, 💽; AgP-Ⅳ P1, P2, P3: 🔽, 🛄, 💟

### 図3 In vitro 遺伝子導入効率の検証

歯肉線維芽細胞への miRNA 導入 24 時間後に全 RNA を回収し、 $\Delta\Delta$ CT 法による リアルタイム RT-PCR 解析を行った (a, b)。また、導入細胞の FAM 蛍光像を 48 時 間後までタイムラプス解析を行った (c, d)。

(a) miR-1 導入細胞における TWF-1 の発現量について, GAPDH を内部コントロー

ルとして補正し、相対発現量(Random 導入群, Random = 1) をy軸に示す。

- (b) miR-181b-5 導入細胞における miR-181b-5p の発現量について, cel-miR-39 を外部コントロールとして補正し,相対発現量(Random 導入群, Random=1)をy
   軸に示す。これらは独立した 3~4 回の実験結果を示す。\*: p <0.05, Student's</li>
- (c) 蛍光顕微鏡 IncuCyte<sup>®</sup> Zoom を用いて, miR-181b-5p mimic 導入細胞のタイムラ
   プス撮影を明視野(上段)と暗視野(下段)とで, それぞれランダムに5視野

撮影した。遺伝子導入後6時間,12時間,および24時間の典型像を示す。緑 色:細胞質内のFAM陽性像,スケールバー:50 µm

(d) FAM 陽性細胞率(FAM 陽性細胞数/全細胞数,%)を y 軸に,遺伝子導入後の経過時間を x 軸に示す。これらは独立した 3-4 回の実験結果を示す。\*:p
 <0.05, Student's *t*-test

## 図4 LPS による細胞毒性の検証

歯肉線維芽細胞の培地に 0, 100, 1,000, そして 2,000 ng/mL の LPS を添加・培養し, 24 時間後の細胞活性を吸光度 450 nm で測定した。独立した 3 回の実験結果を示す。\*: p <0.05, one-way ANOVA/Tukey-Kramer test

## 図 5 miR-181b-5p 過剰発現細胞における炎症性サイトカインの発現変動

歯肉線維芽細胞への miR-181b-5p 遺伝子導入 24 時間後に,0および 1,000 ng/mL の LPS を培地添加・培養し,12 時間後に全 RNA を回収し, $\Delta\Delta$ CT 法によるリアル タイム RT-PCR 解析を行った。*IL-6*(a) と *IL-1* $\beta$ (b)の発現量について,GAPDH を内部コントロールとして補正し,相対発現量(Random 導入群,Random=1)をy 軸に示す。独立した 3 回の実験結果を示す。\*: p <0.05, one-way ANOVA/Tukey-

Kramer test

図 6 miR-181b-5p 過剰発現細胞の培養上清中の炎症性サイトカイン蛋白の変動

歯肉線維芽細胞への6種のmiRNAmimic (miR-181b-5p, -4515, -4313, -1206, -5090, -4532)の遺伝子導入24時間後に,0,および1,000 ng/mLのLPSを培地添 加・培養し,24時間後の培養上清中のIL-6 (図6A)とIL-1β (図6B)の蛋白量を ELISA 法によって解析した。独立した3回の実験結果を示す。\*: p<0.05, one-way ANOVA/Tukey-Kramer test

## 図7 miR-181b-5pmimic 導入効率の確認

マウス歯肉への miR-1 の遺伝子導入 3 日後に歯肉組織中の全 RNA を回収し、  $\Delta\Delta$ CT 法によるリアルタイム RT-PCR 解析を行った。miR-1 導入歯肉における *Twf-*1 の発現量について, *Gapdh* を内部コントロールとして補正した相対発現量 (Random 導入群, RANDOM=1) をy軸に示す。独立した 3 回の実験結果を示す。 \*:p < 0.05, Student's *t*-test

## 図8 miRNA mimic 過剰発現マウスにおける歯槽骨吸収量の検証

歯周炎群 (Perio 群) と同様に絹糸結紮したマウスに, Random あるいは 5 種の miRNA mimic (miR-181b-5p, -5090, -1206, -4515, -4313) を遺伝子導入後, 3 日目 (D3) と 5 日目 (D5) に顎骨を回収し, マイクロ CT 解析を行い (a, b), 歯槽骨 吸収量を定量解析した (c)。

(a) 5 日目の歯周炎群(上段)と miR-181b-5p 導入群(下段)の上顎右側顎骨のマ

イクロ CT 三次元再構築画像の典型例を示す。M1:第一大臼歯, M2:第二大

臼歯, M3: 第三大臼歯

- (b) マイクロ CT の前頭断像を用いて,セメントエナメル境からロ蓋側歯槽骨頭 までの距離(両矢印部)を6点計測した(M1 口蓋根の中央と遠心, M2 口蓋 根の近遠心と中央, M3 近心根の近心:(a)の\*部分)。
- (c) 各群において測定した 6 点の距離の平均値を,歯槽骨吸収量として y 軸に示す。独立した 3 回~6 回の実験結果を示す。\*:p<0.05, one-way ANOVA/Tukey-</p>

Kramer test

## 図 9 miRNA 過剰発現歯肉における炎症性サイトカインの発現変動

歯周炎群 (Perio) と同様に絹糸結紮したマウスに, Random あるいは 5 種の miRNA (miR-181b-5p, -5090, -1206, -4515, -4313)を遺伝子導入後, 3 日目 (D3) と 5 日 目 (D5) に全 RNA を回収し, ΔΔCT 法によるリアルタイム RT-PCR 解析を行った。 *II-6* (a) と *II-1β* (b) の発現量について, GAPDH を内部コントロールとして補正し, 相対発現量 (健常マウス, Healthy = 1)を y 軸に示す。独立した 3 回~6 回の実験 結果を示す。\*: *p* <0.05, one-way ANOVA/Tukey-Kramer test

図 10 miR-181b-5p 過剰発現歯肉における Socs3 の発現変動

歯周炎群(Perio) と同様に絹糸結紮したマウスに, Random および miR-181b-5p を遺伝子導入後,3日目(D3)と5日目(D5)に全RNAを回収し,ΔΔCT法によ るリアルタイム RT-PCR 解析を行った。*Socs3*の発現量について,*Gapdh*を内部コ ントロールとして補正した相対発現量(Random=1)をy軸に示す。独立した3回 の実験結果を示す。\*: p<0.05, one-way ANOVA / Tukey-Kramer test

#### 図 11 miR-181b-5p 過剰発現マウス歯周組織中の免疫細胞の定量解析

歯周炎群(Perio)と同様に絹糸結紮したマウスに, Random および miR-181b-5p を遺伝子導入後,5日目に歯肉組織を回収し,フローサイトメトリー法による免疫 細胞のフェノタイピングを行った。(a)全免疫細胞(CD45<sup>+</sup>),(b)M1Mø(CD4<sup>+</sup>, F4/80<sup>+</sup>, IFN-g<sup>+</sup>),(c)Th1細胞(CD45<sup>+</sup>,CD4<sup>+</sup>,STAT5<sup>+</sup>),そして(d)Th17細 胞(CD45<sup>+</sup>,CD4<sup>+</sup>,IL-17<sup>+</sup>),独立した6回の実験結果を示す。\*:p<0.05,\*\*:p <0.005, one-way ANOVA/Tukey-Kramer test