

氏名	杉浦 嘉雄		
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6150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 Serum miRNAs Affecting Liver Apoptosis in a Periodontitis Rat Model (歯周病モデルラットにおける肝臓アポトーシスに影響する血清 miRNA の検出)		
論文審査委員	大原 直也 教授	高柴 正悟 教授	西田 崇 准教授

## 学位論文内容の要旨

### 【諸言】

歯周病は、歯周組織の炎症性疾患である。また、歯周病は、肝疾患を含む様々な全身疾患に影響することが知られている。しかし、歯周病がどのような機序で肝臓に影響するかについては不明な点が多い。

microRNA (miRNA) は、17~25 塩基対からなる短鎖 non-coding RNA であり、他遺伝子の発現を制御する。miRNA は、互いに部分相補的な遺伝子配列を持つ messenger RNA (mRNA) に結合し、その発現を抑制することで、発生や分化、炎症、発癌に関わっている。また、miRNA には、臓器特異的に発現して、安定した状態で血液中に存在して全身循環するものがあり、遠隔臓器における mRNA の発現を制御することが報告されている。そして、肝臓における mRNA の発現が、全身循環する miRNA を介して、遠隔組織に制御されることが知られている。

本研究では、歯周病により発現量が変動した血清中の miRNA が、肝臓における mRNA の発現プロファイルを制御し、肝臓に負の影響を及ぼすという仮説を立て、歯周病モデルラットにおける血清中 miRNA の発現と肝臓における mRNA の発現との関係、および肝臓組織への影響を調べることを目的とした。

### 【方法】

8 週齢の Wistar 系雄性ラット 16 匹を、対照群 8 匹と歯周病群 8 匹に分けた。実験期間は 4 週間とした。歯周病群では、上顎両側第二臼歯に絹糸を結紮して、歯周炎を惹起させた。対照群は、無処置とした。実験期間終了後に、歯周組織、肝臓および血液を採取した。

組織学的評価として、歯周組織について、Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色を行い、歯槽骨頂からセメントエナメル境までの距離を測定し、歯槽骨吸収の程度を調べた。肝臓組織に関しては、H-E 染色で組織学的に観察するとともに、TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色を行い、肝細胞の TUNEL 陽性細胞率、すなわち、アポトーシス肝細胞数の割合を調べた。

遺伝子学的評価として、血清と肝臓から全 RNA を抽出後、Microarray 解析に供した。対照群と比べて、歯周病群で大きく変動した血清 miRNA (発現量比 >1.5、<0.67) と肝臓の mRNA (発現量比 >2.0、<0.5) を探索した。そして、TargetScan を用いて Bioinformatics 解析を行い、それらの血清 miRNA が

標的とする肝臓 mRNA を検索した。さらに、検索された肝臓 mRNA のうち、アポトーシスに関わる作用を有するものに絞り込んだ。群間の比較には、Unpaired *t*-test または Mann-Whitney *U* test を用いた。それぞれ、有意水準は 5%とした。

なお、本実験は岡山大学動物実験委員会の承認（OKU-2014147）を得て行われた。

#### 【結果】

組織学的解析の結果、歯周病群では、H-E 染色の結果、対照群と比較して、歯周組織が破壊された。肝臓組織に関しては、炎症性細胞の浸潤などの炎症所見は著明ではなかったが、TUNEL 染色の結果、肝細胞の TUNEL 陽性細胞率は有意に高かった ( $P < 0.05$ )。

Microarray 解析の結果、対照群と比較して、歯周病群では、大きく変動した血清 miRNA（発現量比  $>1.5$ 、 $<0.67$ ）が 52 種類存在した。一方、肝臓では、大きく変動した mRNA（発現量比  $>2.0$ 、 $<0.5$  かつ  $P < 0.05$ ）が 33 種類存在した。

さらに、Bioinformatics 解析により、これら 33 種類の肝臓 mRNA のうち、12 種類 (*Gpr12*、*Hyou1*、*Rgma*、*Rad51*、*Dusp4*、*Chac1*、*Ier5*、*Ybx3*、*Pard6g*、*Bloc1s3*、*Sephs2*、*Il7*) は、大きく変動した血清 miRNA（発現量比  $>1.5$ 、 $<0.67$ ）の標的遺伝子であることが判明した。そのうち、*Hyou1*、*Chac1*、そして *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 を標的とする血清 miRNA は、miR-3591、miR-181a-2-3p、そして miR-6321 であった。

#### 【考察】

歯周病モデルラットの肝臓において、TUNEL 陽性細胞率が有意に高かった。この結果は過去の研究結果 (Tomofuji et al., J. Periodontol., 2007) と一致し、ラットにおいて、実験的歯周炎が、肝臓組織中のアポトーシスに関わっている可能性があると考えられる。しかし、Tomofuji らの研究と異なり、肝臓組織中の炎症所見は著明でなかった。本研究では、過去の研究より細い絹糸で歯周炎を惹起させたため、歯周炎の程度が弱く、肝臓への影響が小さくなったのかもしれない。

また、歯周病群において変動のあった血清 miRNA（発現量比  $>1.5$ 、 $<0.67$ ）が標的とする肝臓 mRNA（発現量比  $>2.0$ 、 $<0.5$  かつ  $P < 0.05$ ）は 12 種類存在し、そのうち、*Hyou1*、*Chac1*、そして *Bloc1s3* は、アポトーシスと関連していた。そして、アポトーシスを抑制する *Hyou1* が減少し、アポトーシスを促進する *Chac1* が増加した。また、過剰な小胞体ストレスがアポトーシスを引き起こすことが報告されており、*Hyou1* と *Chac1* が小胞体ストレスと関連していることが知られている。以上から、*Hyou1* と *Chac1* が、小胞体ストレスを介して、肝細胞のアポトーシスを引き起こした可能性が考えられる。*Bloc1s3* は、ナチュラルキラー (natural killer: NK) 細胞を活性化する作用をもつことが知られている。NK 細胞は、免疫応答細胞として、アポトーシスを誘導する。*Bloc1s3* が、NK 細胞の活性化を介して、わずかに変性した肝細胞のアポトーシスを誘導した可能性が考えられる。

Bioinformatics 解析の結果から、これらの 3 種類の肝臓 mRNA を標的とする血清 miRNA には、miR-3591、miR-181a-2-3p、そして miR-6321 が存在することが判明した。以上から、歯周病モデルラットにおいて、miR-3591、miR-181a-2-3p、そして miR-6321 が、*Hyou1*、*Chac1*、そして *Bloc1s3* を制御することで、アポトーシスを促進する方向に変動させた可能性が考えられた。

#### 【結論】

歯周病モデルラットにおいて、血清 miRNA と肝臓 mRNA の発現量比が大きく変動した。大きく変動した血清 miRNA と肝臓 mRNA のうち、miR-3591、miR-181a-2-3p、そして miR-6321 は、アポトー

シスに関わる *Hyou1*、*Cha1*、そして *Bloc1s3* を標的としていた。また、肝臓組織において、アポトーシスが促進された。

## 論文審査結果の要旨

歯周病は、肝疾患を含む様々な全身疾患に影響する。しかし、歯周病が肝臓に影響する機序には不明な点が多い。microRNA (miRNA) は、短鎖 non-coding RNA であり、特定の messenger RNA (mRNA) の発現を抑制する。そして、一部の miRNA は、血液中を全身循環し、遠隔臓器における mRNA の発現を制御する。そこで、歯周病により発現量に変動した血清中の miRNA が、肝臓における mRNA の発現プロファイルを制御し、肝臓に負の影響を及ぼすという仮説を立て、歯周病モデルラットにおける血清中 miRNA の発現と肝臓における mRNA の発現との関係、および肝臓組織への影響を調べることを目的とした。

8 週齢 Wistar 系雄性ラット 16 匹を対照群と歯周病群に分けた。歯周病群は上顎両側第二臼歯に絹糸を結紮して歯周病を惹起させ、対照群は無処置とした。4 週後に歯周組織、肝臓および血液を採取した。歯周組織では、歯周病の有無を確認するため、Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色により、歯槽骨頂からセメントエナメル境までの距離を測定した。肝臓組織では、H-E 染色による組織学的観察および TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色による TUNEL 陽性肝細胞率の算出を行った。また、血清と肝臓から全 RNA を抽出し、Microarray 解析に供した。対照群と比べて、歯周病群で大きく変動した血清 miRNA (発現量比 >1.5, <0.67) と肝臓の mRNA (発現量比 >2.0, <0.5) を探索した。そして、Bioinformatics 解析では、それらの血清 miRNA が標的とする肝臓 mRNA を、TargetScan を用いて検索した。検索された肝臓 mRNA を、アポトーシスに関わる作用を有するものに絞り込んだ。

歯周病群では、対照群と比べて、歯槽骨が有意に吸収していた。肝臓組織の炎症所見は著明でなかったが、TUNEL 陽性肝細胞率は、対照群と比べて、有意に高かった。Microarray 解析の結果、歯周病群で大きく変動した血清 miRNA が 52 種類と肝臓の mRNA が 33 種類存在した。Bioinformatics 解析の結果、miR-3591, miR-181a-2-3p, そして miR-6321 が、アポトーシスに関わる肝臓 mRNA である *Hyou1*, *Cha1*, そして *Bloc1s3* をそれぞれ標的としていることが判明した。

歯周病モデルラットにおいて、miR-3591, miR-181a-2-3p, そして miR-6321 が、*Hyou1*, *Cha1*, そして *Bloc1s3* を制御することで、アポトーシスを促進する方向に変動させた可能性が考えられた。

本論文は、歯周病が血液中の miRNA を介して、肝細胞をアポトーシスに誘導する可能性を見出し、歯周病の肝臓への影響を分子レベルで理解する上で重要な知見を提供している。なお、本論文はすでに In Vivo に受理 (掲載) 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。