

氏名	河本 美奈		
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6364号		
学位授与の日付	令和3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		
論文審査委員	岡元 邦彰 教授	森田 学 教授	伊原木 聰一郎 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

侵襲性歯周炎（Aggressive Periodontitis : AgP）は10～30歳代の若年層に発症する特殊な歯周炎である。中高年層に発症し緩徐に進行する慢性歯周炎とは異なり、AgP患者は、全身的に健康であるにも関わらず、無症状にかつ急速な歯周組織破壊を受け、重症化して初めて発見される場合が多い。そこで、AgPの早期診断バイオマーカーを同定し、発症と進展を予防することが非常に重要である。これまでにAgPの特殊な病態について、免疫防御機構の異常、特異細菌種の関与、ゲノム突然変異など、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。とりわけ、AgPにおいて口腔炎症のみが重症化するメカニズムは、未だ不明なままである。

近年、様々な疾患の病態形成への細胞外小胞（Extracellular vesicle : EV）の関与が注目されている。EVは患者の血液中を循環して遠隔組織の細胞へと到達し、内包するマイクロRNA（miRNA）による臓器特異的な遺伝子発現を制御する。癌細胞のEVは、この臓器向性によって癌の発症や転移を制御することから、癌の早期診断ツールとして臨床応用されつつある。

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患者の血中のEV由来miRNAに着目した。すなわち、歯周組織に到達したEV由来miRNAによる遺伝子発現制御が、AgPの発症と進展に関与するという仮説の下、EV由来miRNAの発現プロファイルを調べ、AgP患者に特異的なmiRNAの同定と、そのmiRNAの診断バイオマーカーとしての有用性を検証することを目的に研究を行った。

【材料と方法】

- 1. 研究対象者**：岡山大学病院の侵襲性歯周炎センターを受診した18歳から39歳のAgP患者（2006年JSP分類）25名と、同年代の歯周炎を有さ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、AgP患者を歯周炎の重症度（2018年AAP/EFP分類）によってStage III（AgP-III；13名）、Stage IV（AgP-IV；12名）に分類した。なお、本研究は、岡山大学倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号 #1706-039）。
- 2. 臨床検査**：当院初診時年齢、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）、歯槽骨吸収レベル（bone resorption level : BL）、そしてAgPスコア（JSP基準16以上）を調べた。
- 3. PCRアレイ解析によるmiRNAのスクリーニング**：AgP-III（4名）、AgP-IV（5名）、そしてH（3名）の初診時血漿から、Total Exosome Isolation Kit from plasma（Thermo Fisher Scientific）を用いてEVを単離し、内包する全RNAからmiScript II RT Kit（QIAGEN）を用いてEV由来miRNAを得た。その後、miScript miRNA PCR Array（QIAGEN）を用いて炎症反応と自己免疫に関連するmiRNAの発現プロファイル解析を行った。

4. RT-PCRによるアレイ解析結果の検証：さらに対象者数を増やして（最終：AgP-III, 13名；AgP-IV, 12名；H, 7名），exoRNesay Serum/Plasma Midi Kit（QIAGEN）を用いて初診時血清からEV由来miRNAを抽出し，PCRアレイで同定したmiRNAの発現量を定量RT-PCRにて検証した。
5. 診断バイオマーカーとしての精度評価：バイオマーカー候補のmiRNAの発現量について，receiver operating characteristic（ROC）解析によって，曲線下面積（area under the curve：AUC）とYouden indexでカットオフ値を決定した。
6. 標的遺伝子の*in silico*解析：バイオマーカー候補のmiRNAの標的遺伝子を，歯周組織の炎症と免疫を制御する白血球を対象とし，miTALOS 2.0を用いて解析を行った。
7. 統計処理：GraphPad Prism8（GraphPad Software）を用いて，One-way ANOVAとTukey/Kramer testにて検定を行い， $p < 0.05$ を有意差ありと判断した。

【結果】

1. 年齢以外の臨床データ（PD, BOP, PISA, BL）は3群間で有意差があり（ $p < 0.001$ ），AgP-IIIとAgP-IVの群間には重症度に明らかな違いがあった。また，AgPスコアは，AgP-IIIで 15.92 ± 1.44 ，AgP-IVで 15.92 ± 1.38 であった（ $p = 0.99$ ）。
2. 初期スクリーニングによって，AgP群に特異的に発現する3種類のmiRNA（hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-29a-3p）を同定した。これらのうちmiR-181b-5pは，AgP-IIIにおいてAgP-IVよりも高発現していた（ $p < 0.05$ ）。
3. 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結果，AgP-IIIにおいてAgP-IVとHより有意に高発現してい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）。
4. ROC解析におけるAUCは，0.9560（H vs. AgP-III）と0.9259（AgP-III vs. AgP-IV）で，高値を示した。カットオフ値は，それぞれ1.660と2.080であった。
5. IL-6シグナルに関与する18種類の遺伝子を，miR-181b-5pの標的遺伝子として同定した。それらのうちsuppressor of cytokine signaling 3（SOCS 3）のみに，IL-6シグナルを抑制する作用があった。

【考察】

本研究では，AgPの病態に関与する可能性がある血中のEV由来miRNAとしてhsa-miR-181b-5pを同定した。このmiRNAは，重症度の低いAgP-IIIで高発現し，ROC解析におけるAUCが高値であったことから，AgP発症初期の診断に有効と考えられる。また，重症度の高いAgP-IVとHで発現が減少したことから，このmiRNAは発症初期の短期間に高発現し，その後，他のmiRNAが疾患のさらなる進行を制御する可能性がある。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，miR-181b-5pは主に炎症抑制に働く一方で，促進作用も報告されている。本研究で注目したIL-6シグナルを負に制御するSOCS3のmiR-181b-5pによる転写阻害は，AgP患者における過剰な炎症反応に関与する可能性がある。

今後，miR-181b-5pによる炎症制御メカニズムの解明と，*in vivo*過剰発現系における表現型解析が必要である。さらに，AgPの発症および進展に関連するその他のmiRNAを集積することによって，一連のmiRNAsが制御するAgPの病態の詳細が明らかになると考えられる。

【結論】

AgP発症初期で発現量が増加し，発症後期で減少するEV由来のmiR-181b-5pを同定した。これは，AgPの発症を予測する血液診断バイオマーカーとして有用である可能性がある。

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者に急速な歯周組織破壊を起こす歯周炎で、口腔炎症のみが重症化する病態は未だ不明である。近年様々な疾患の病態形成に関して、細胞外小胞 (Extracellular vesicle : EV) の関与が注目されている。特に癌細胞中の EV は血液中を循環し、内包するマイクロ RNA (miRNA) が臓器特異的に遺伝子発現を制御することから、癌の早期診断ツールとして臨床応用されつつある。本研究では、EV 由来 miRNA の発現プロファイルを調べ、AgP 患者に特異的な miRNA の同定と、その miRNA の診断バイオマーカーとしての有用性を検証することを目的とした。

【方法】

1. 研究対象者：18歳から39歳のAgP患者25名と健常者(H;7名)を対象とした。AgP患者は、重症度によって、Stage III (AgP-III;13名)、Stage IV (AgP-IV;12名)、健常者(H;7名)に分類した。(岡山大学倫理審査委員会 承認番号 #1706-039)。
2. 臨床検査：初診時年齢、歯周ポケット深さ (Periodontal pocket depth : PD)、プロービング時出血 (Bleeding on probing : BOP)、歯周炎症表面積 (Periodontal inflamed surface area : PISA)、歯槽骨吸収レベル (Bone resorption level : BL)、そしてAgPスコアを調べた。
3. PCRアレイ解析によるmiRNAのスクリーニング：AgP-III (4名)、AgP-IV (5名)、そしてH (3名)の初診時血漿から、炎症反応と自己免疫に関連するmiRNAの発現プロファイル解析を行った。
4. RT-PCRによるアレイ解析結果の検証：対象者数を増やして (AgP-III, 13名; AgP-IV, 12名; H, 7名)、初診時血清からPCRアレイで同定したmiRNAの発現量を定量RT-PCRにて検証した。
5. 診断バイオマーカーとしての精度評価：バイオマーカー候補のmiRNAの発現量について、receiver operating characteristic (ROC) 解析によって、曲線下面積 (Area under the curve : AUC) を調べた。
6. 標的遺伝子の *in silico* 解析：バイオマーカー候補のmiRNAの標的遺伝子を、歯周組織の炎症と免疫を制御する白血球を対象とし、miTALOS 2.0 を用いて解析を行った。

【結果】

- 1) 臨床データ (PD, BOP, PISA, BL) は3群間で有意差があった ($p < 0.001$)。また、AgPスコアは、AgP-IIIで 15.92 ± 1.44 、AgP-IVで 15.92 ± 1.38 であった ($p = 0.99$)。
- 2) 初期スクリーニングによって、AgP群に特異的に発現する3種類のmiRNA (hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-29a-3p) を同定した。miR-181b-5pは、AgP-IIIにおいてAgP-IVよりも高発現していた ($p < 0.05$)。
- 3) サンプルサイズを増やしてmiR-181b-5pの発現を検証した結果、AgP-IIIにおいてAgP-IVとHより有意に高発現した ($p < 0.05$: 5.2倍, vs. AgP-IV; 5.6倍, vs. H)
- 4) ROC解析におけるAUCは、0.9560 (H vs. AgP-III) と 0.9259 (AgP-III vs. AgP-IV) であった。
- 5) miR-181b-5pの標的遺伝子であるIL-6シグナルに関与する18種類の遺伝子を同定し、それらのうち suppressor of cytokine signaling 3 のみに、IL-6シグナルを抑制する作用があった。

以上のことから、AgP発症初期で発現量が増加し、発症後期で減少するEV由来のmiR-181b-5pを同定した。この成果は、AgPの発症を予測する血液診断バイオマーカーとして有用である可能性を示唆するものであり、今後AgPの特異的な病態解明が期待される。よって本審査委員会は、本申請論文に博士(歯学)の学位論文としての価値を認める。