

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
印	研究の総括・総合的指導
印	
印	

## 学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野	予防歯科学分野	身分	大学院生	氏名	杉浦 嘉雄
論 文 題 名	<b>Detection of Serum miRNAs Affecting Liver Apoptosis in a Periodontitis Rat Model</b> (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)				
<p><b>【緒言】</b></p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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 &gt;1.5、&lt;0.67) と肝臓のmRNA (発現量比 &gt;2.0、&lt;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。</p>					

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*、*Chac1*、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。