（ 様式D－２ ）
（ 別　　紙 ）

令和　5　年度　海外派遣研究員研究報告書

令和　5　年　10　月　10　日

日本大学理事長　　殿
日本大学学長　　殿

所　　属　松戸歯　学部（口腔科学研究所）
資格・氏名　専任講師・吉田（バワール）ウジャール
■本報告書の内容を公表することは了承しております。
（公表可の場合，チェック■すること）

令和　5　年度海外派遣研究員（区分 短期　A）の研究実績を，下記のとおり報告いたします。

記

1　区　　分　短期　A
2　研究課題

Dec1 及び microRNA-21-5p を指標とした心不全と歯周病増悪に関する研究

3　派遣期間　令和 5 年 7 月 28 日　～　令和 5 年 9 月 3 日
4　派　遣　先　中国
5　研究目的

本研究は *Dec1* (Differentiated embryonic chondrocyte gene 1) 遺伝子欠失や microRNA-21-5p 欠失が、心不全と歯周病増悪のメカニズムにどのような影響を及ぼすかをマイクロアレイなどを用いて遺伝子相互作用を網羅的に解析し、それらをモデルマウスに応用させて、新たな治療への展開を目指す。具体的な目標は、*Dec1*KO マウスや microRNA-21-5p KO マウスを用いて、心不全と歯周病増悪に関わる共通の分子を追求することである。本研究で心不全や歯周病増悪の指標として注目した血液 (血漿) は、その血漿中の microRNA プロファイリングが生体の恒常性維持の働きを持つと言われている。加齢、糖尿病、口腔乾燥症、メタボリック症候群などにより、歯周組織機能は減弱していることが想像されるが、これまで、心不全と歯周病との関連を共通分子に着目し、さらに *Dec1* 遺伝子や microRNA-21-5p を用いて検討した研究は皆無であり、極めて独創的である。また、マイクロアレイにより、心不全と歯周病増悪に関わる共通分子が見出せれば、それらの治療薬として、1 つの薬剤で双方を軽減させることに結びつく可能性が強い。本研究は超高齢社会において、健康寿命を延ばすための一助になる可能性を秘めており、学術的にも極めて有意義である断言できる。

６　研　究　概　要

現在、歯周病が全身疾患もしくは、全身疾患が歯周病に及ぼす影響については十分に研究されていない状況です。骨リモデリングのプロセスでは、OPG/RANKL/RANK 軸が中心的な制御因子です [1]。 したがって、さまざまな年齢や全身状態下での OPG/RANKL/RANK 軸の変化パターンを詳細に研究することが、歯周病の増悪に関連するメカニズムを解明する鍵となります。 miRNA は小さなクラスの非コーディング RNA であり、細胞の増殖、分化、代謝、アポトーシスの制御において重要な役割を果たすだけでなく、宿主免疫の制御や骨の恒常性の維持においても重要な役割を果たします。 現時点では、miRNA が OPG/RANKL/RANK 軸の制御にどのように関与しているかは不明であり、それが歯周病の増悪に関与しているかどうかは報告されていません。Sugatani ら [2] は、RANKL によって誘導される骨髄細胞の破骨細胞への分化の miRNA 発現プロファイルを研究し、33 個の miRNA が downregulate され、38 個の miRNA が上方制御されていることを発見しました。miRNA21 は、細胞の分化、発生、心血管疾患、がんにおいて重要な役割を果たす内因性の一本鎖ノンコーディング RNA 分子です。 miRNA21 は免疫応答において非常に重要な役割を果たしており、骨代謝と骨芽細胞の分化において初期に発現する遺伝子です。 最近の研究では、miRNA21 が、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) の細胞外制御プロテインキナーゼ (ERK-MAPK) シグナル伝達経路を介して、間葉系幹細胞の骨形成分化に関与していることが判明しました [3]。miRNA21 の発現は MSC の骨形成分化の 4 時間で増加し始め、骨形成分化の後期段階では発現が減少することが示されており、miRNA21 が骨形成分化の開始因子である可能性があると推測されています[4]。歯周病における miRNA21 の発現は石灰化誘導後 3 日から増加し始め、7 日以内に上昇傾向を示しましたが、これは骨形成マーカー RUNX2 の傾向と一致しています。 miRNA21 が歯根膜細胞の初期の骨形成分化に関与していることが確認されました。ERK-MAPK シグナル伝達経路の活性は歯根膜細胞の骨形成分化に関与しています。

miRNA21 が免疫制御において中心的な役割を果たし、骨芽細胞および破骨細胞が成熟するにつれて upregulate される miRNA であることが示されており、miRNA21 が骨リモデリングにおける重要な制御因子であることが示唆されています。 申請者は、miRNA21 ノックアウトマウスの骨芽細胞・破骨細胞の機能と血清 OPG/RANKL/RANK レベルの解析により、歯周病における歯周炎進行速度が野生型マウスに比べて有意に遅延することを発見しました。マウス歯周炎モデルを使用して、野生型マウスと miRNA21 ノックアウトマウスの間の歯周炎パターンの違いを比較し、OPG/RANKL/RANK に対する miRNA21 の影響を研究することを目的とし、この研究結果は、歯周病における歯周炎が全身性に影響を与えることを解明し、miRNA21 の重要性について明らかにすることであります。将来的には骨代謝関連疾患の治療ターゲットを目指します。

1. Barbato et al. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* 2015; 12(2): 174-1771.
2. Sugatani et al. *Blood* 2011; 117(13): 3648-3657.
3. Walsh et al. Frontiers in Immunology 2014; 10(5): 511.
4. Pitari et al. *Oncotarget* 2015; 6(29): 27343-27358.

７　研究結果・成果

予備的なインビボ研究では、マウスモデルにおいて、miRNA21 ノックアウトマウスの歯槽骨吸収が正常マウスのそれよりも有意に低いことを発見しました。さらに、miRNA21 の欠如が骨芽細胞の骨形成分化機能を大幅に低下させることが示されており、M-CSF および RANKL 誘導骨髄細胞では、酒石酸染色陽性の破骨細胞の数も大幅に減少しており、miRNA21 が欠如していることが示唆されます。miRNA21 が欠乏すると、骨芽細胞の骨形成分化機能が著しく低下し、骨芽細胞や破骨細胞の機能にも影響を及ぼします。パラフィン切片では、破骨細胞の数が大幅に減少し、miRNA21 ノックアウトマウスの正常な機能は、主に破骨細胞の機能不全によるものであると推測されます。miRNA21 欠失によって引き起こされる破骨細胞の機能不全は、2 つの要因に関連している可能性があります。一方で、miRNA21 欠失は、関連遺伝子またはタンパク質の発現の変化を引き起こし、破骨細胞の分化に直接影響します。Sugatani ら [2] は、RANKL による骨髄細胞の破骨細胞への分化を研究する際に、c-Fos と PU.1 が miRNA21 の生成を誘導できることを発見し、ChIP により c-Fos が miRNA21 プロモーターに結合できることが確認されました。通常 miRNA21 を発現する細胞ではプログラム細胞死 4 (PDCD4) のタンパク質発現はありませんが、mRNA の発現はありますが、形質導入されたアンチセンス miRNA21 を持つ細胞では PDCD4 タンパク質の発現があり、miRNA21 が c-Fos を通過する能力があることを示唆しています。 miRNA21/PDCD4 は、骨髄由来単核マクロファージ細胞株の破骨細胞への分化の制御において重要な役割を果たします。 もう一つの考えられる理由は、miRNA21 の欠失により、破骨細胞の分化と成熟を誘導する関連因子の欠損が生じ、それによって破骨細胞の機能に影響を与えることです。 OPG/RANKL のバランスが最も重要な要素です。申請者は、野生型マウスと miRNA21 ノックアウトマウスの前後における予備実験として、OPG/RANKL/RANK 軸の変化パターンを検証したところ、野生型マウスに比べて miRNA21 の血清中の RANKL 値が上昇していることが判明しました。ノックアウトマウスは有意に低く、OPG と RANK に大きな変化はありませんでした。 これらの予備研究結果は、miRNA21 ノックアウトマウスの破骨細胞の機能が著しく低下していることを証明しており、miRNA21 の破骨細胞に対する直接的な影響に加えて、miRNA21 によって引き起こされる全身性 RANKL の分泌不足も重要な原因であり、その結果、病態が増悪すると考えられます。

本研究は、RANKL 分泌に影響を与える miRNA21 の分子機構、およびエフェクター細胞が OPG / RANKL / RANK を介して病態にどのように影響するか、解明することを目的としています。

〔７　研究結果・成果（つづき）〕

今後の見通し

歯周病による炎症には、複数の要因が組み合わさって起こります。骨再建においては、OPG /RANKL/RANK と miRNA の両方が非常に重要な役割を果たしますが、低分子 RNA が歯周病に関与するかどうかについては、現時点では報告されていませんが、今後の検討課題です。歯周病に対する小分子 RNA の影響を明らかにすることは、歯周病のメカニズムとその調節因子を理解する上で重要な役割を果たすと考えます。申請者は、長年、歯周病における間葉系幹細胞と破骨細胞の機能に関する研究に取り組み、マウスおよびラットにおける歯周病モデルの確立に成功し、実験的に関連した miRNA21 ノックアウトマウスを購入し、大規模な実験を行ってきました。膨大な量の予備調査により重要な発見がもたらされ、さらなる研究発展のための強固な基盤が築かれました。本申請において、申請者の目的はマウス歯周病モデルを使用して、歯周病増悪に関与するさまざまな炎症因子の変化パターンを解析することです。また、miRNA21 が体内の RANKL の減少を引き起こす関連する分子機構を解明することです。 miRNA を介して、ホスト免疫の原理と歯周病に関与するさまざまな炎症因子を探索し、歯科臨床への展開を目指します。基礎～臨床への展開のために、小分子 RNA の介入を通じて歯周病速度を制御する方法を探索します。

以　　上