

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20676

研究課題名(和文) GPR141の遺伝子多型による歯周炎の診断・治療システムの構築

研究課題名(英文) Construction of diagnostic and therapeutic system for periodontitis by genetic polymorphism of GPR 141

研究代表者

清水 伸太郎 (shimizu, shintaro)

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：80734235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：GPR141の発現と機能について解明することを目的として以下の実験を行っている。歯周炎患者及び健常者、計113人分の血清コチニン濃度を測定したところ、喫煙者で血清コチニン濃度とSNPの遺伝子型に相関を認めた。THP-1のLPS刺激、非刺激時のGPR141の遺伝子発現量を検討した。また歯肉結合組織を採取し、mRNAを抽出しGPR141の遺伝子発現量を検討したところ、有意な差を認めなかったものの歯周炎部位の方が発現量は高かった。以上からGPR141はニコチンにより発現量が変化する可能性が考えられる。またGPR141は歯周組織において、歯周炎で発現量が上昇する可能性が考えられる。

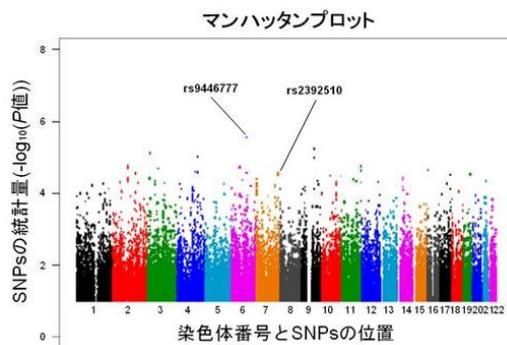
研究成果の概要(英文)：The following experiments are undertaken to elucidate the expression and function of GPR141. When serum cotinine concentrations of 113 people in periodontitis patients and healthy volunteers were measured, serum cotinine concentration correlated with genotype of SNP in smokers. We examined the expression of GPR141 at the time of LPS stimulation and non-stimulation of THP-1. In addition, gingival connective tissue was collected and mRNA was extracted and the gene expression of GPR 141 was examined. As a result, although there was no significant difference, the expression was higher in the periodontitis site. From the above, it is considered that the expression of GPR141 may be changed by nicotine. In GPR 141, the expression level may be increased by periodontitis in periodontal tissues.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯学 遺伝子 歯周病

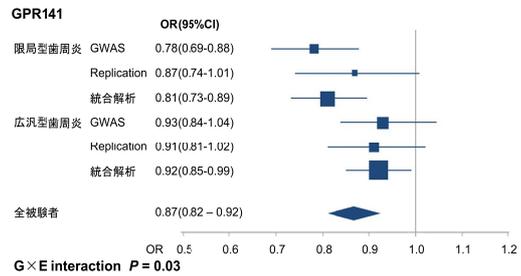
1. 研究開始当初の背景

歯周炎は、成人の歯の喪失の主要な原因として生活の質に重篤な影響を及ぼしている。これまでの歯周炎の遺伝的要因に対する研究は、FcR や炎症性サイトカイン等に焦点当てた候補遺伝子研究が行われてきたが、診断・治療に結びつくまで至っていない (Vaithilingam ら 2014)。このため国内外で疾患と関連する遺伝子を同定するためにゲノム全体を網羅的に調べるゲノムワイド関連解析 (GWAS) が行われるようになり、これまでに糖尿病やがん等の多くの疾患で GWAS により多数の疾患関連遺伝子が同定されている。しかし歯周炎に関してはこれまで欧米以外の地域では全く報告が無く、欧州においても若年者の重度歯周炎に関連する遺伝子 (GLT6D1) が報告されたのみであり、その機能的な意味も明らかになっていない。我々はアジアで初めて**日本人の歯周炎を対象とした GWAS を行い、関連の示唆される遺伝子 (KCNQ5 : rs9446777、GPR141 : rs2392510) を報告した。**



興味深い事に喫煙歴による層別解析の結果、GPR141 と喫煙歴の間に **G-E interaction** を認めたことから、GPR141 は喫煙という環境因子の影響下で歯周炎の発症や進行に関与している事が示唆された (下図 rs2392510)。

GPR141 は我々の報告を除いてほとんど報告されておらず、分子進化から



みて G タンパク結合受容体のロドプシンファミリーに属していること以外、その機能も明らかになっていない。GPR141 と疾患に関する唯一の報告では、末梢動脈疾患患者のマクロファージで発現する遺伝子群を網羅的に検索したところ、患者群で低下する遺伝子に GPR141 が含まれていた (Masud ら 2012)。我々のグループでは歯周病原細菌に対する単球・マクロファージの炎症性サイトカイン産生が歯周炎と末梢動脈疾患の悪化に関与する事を明らかにしており (Chen ら 2008)、単球・マクロファージにおける GPR141 の発現は炎症性サイトカイン産生と関与していることが示唆される。これらを踏まえ、**GPR141 の発現と機能、および喫煙との G-E interaction を調べる事で GPR141 の遺伝子多型による歯周炎の診断・治療システムを構築する事ができるのではないかという発想に至った。**

2. 研究の目的

GPR141 の遺伝子多型による歯周炎の診断・治療システムを構築するために、研究期間内に以下の2点を明らかにする。

歯周炎患者と健常者(歯周組織及び全身的に健康)を被験者として、GPR141 の遺伝子多型と喫煙が歯周炎の重症度を与える影響を検討する。血液を採取して GPR141 上の SNP (rs2392510) の遺伝子型を同定し、血清コチニン濃度を測定する。遺伝子型とコチニン濃度、歯周組織検査結果での層別解析を行い、SNP の遺伝子型

でのリスクを検定する。

GPR141 の遺伝子発現と機能を明らかにするために単球・マクロファージ系細胞を用いて歯周病原細菌およびニコチン刺激による炎症性サイトカイン産生に与える GPR141 遺伝子の影響について検討する。THP-1 (単球細胞株) に LPS 刺激を加えた場合の GPR141 および炎症性サイトカイン遺伝子発現を Real Time RT-PCR を用いて検討する。また ELISA で炎症性サイトカイン産生を検討する。si-RNA で GPR141 遺伝子をノックダウンして同様の実験を行い、歯周病原細菌およびニコチン刺激による炎症性サイトカイン産生に与える GPR141 遺伝子の影響について検討する。

以上から本研究で GPR141 やその遺伝子領域と歯周炎との関連を研究することで、歯周炎の新たなメカニズムの一端を明らかにする可能性が期待される。

3. 研究の方法

歯周炎患者と、健常者を収集し GPR141 上の SNP (rs2392510) の遺伝子型を同定、血清コチニン濃度を測定し、GPR141 の歯周炎についての遺伝的リスクの検討と、喫煙との関連を検討する。

H27 年現在、歯周炎患者 114 人収集済みであり、内 113 人は rs2392510 遺伝子型同定済みである。歯周炎患者 130 人、健常者 46 人を目標とする (Genetic Power Calculator にて目標人数を計算)。

被験者：

- ✓ 北海道医療大学大学病院、または北海道医療大学歯科クリニック、歯科及び内科を受診された臨床情報を有する患者の

うち、文書によるインフォームドコンセントを得られた歯周炎患者を使用する。

- ✓ 北海道医療大学大学病院、または北海道医療大学歯科クリニック、歯科を受診された臨床情報を有する患者のうち、文書によるインフォームドコンセントを得られた健常者 (歯周組織及び全身的に健康) を使用する。
- ✓ 被験者は全て成人であり小児は含まない。
- ✓ 本研究は北海道医療大学の倫理審査委員会にて承認されている。

歯科及び内科検査項目：

- ✓ 口腔内臨床情報としてプロービングデプス、アタッチメントレベル、プロービング時の出血、歯の動揺度、齲蝕の状態 (DMFT)、咬合の状態 (Angle の分類、咬合接触状態) などを検査する。
- ✓ 歯周炎の診断は日本歯周病学会の診断項目に基づき診断する。
- ✓ 内科の検査項目として血液検査より、HbA1c、総コレステロール、コレステロール、総蛋白、高感度 CRP などを検査する。
- ✓ 臨床情報として年齢、性別、喫煙歴、飲酒、血圧、全身疾患、服用薬剤などを調べる。
- ✓ 被験者からは唾液を採取し、歯周病原微生物 4 菌種 (*P.gingivalis*, *A.actinomycescomitans*, *T.denticola*, *T.forsythia*) を PCR 法を用いて解析する。
- ✓ 健常者は歯周組織及び全身的に健康なものとする。

検体収集：

- ✓ 本研究に同意された被験者から同意書取得後、末梢静脈血 10ml 及び、安静時唾液 5ml を採取する。

- ✓ 採血は北海道医療大学大学病院、または北海道医療大学歯科クリニック医師、歯科医師、看護師が行う。
- ✓ 血液はEDTA入りバキュテイナ®採血管で4℃で保存する。
- ✓ 唾液は遠沈管で-80℃で保存する。
- ✓ 唾液からのDNA精製はQIAamp DNA Mini Kit®を使用する。
- ✓ 唾液中コチニン定量はELISA及びコチニン定量キットを用いて行う。
- ✓ 血液検査は北海道医療大学病院、臨床検査部に依頼する。
- ✓ 検体は連結可能匿名化を行う。
- ✓ 血液2mlはDNAの抽出業務を外部機関である**ピー・エム・エル(株)**に依頼する。
- ✓ 採取したDNAは-80℃にて冷凍保存する。
- ✓ 使用の際DNAはNano Drop®にて濃度を測定し、全て10 ng/μlとなるよう分注する。

SNPの遺伝子型の同定とクオリティコントロール：

- ✓ Applied Biosystems 7500HT Fast Real-Time PCR System、及びTaqMan®を使用し検体のSNPの遺伝子型を同定する。
- ✓ 遺伝子型同定の成功条件は i) 患者群と対照群で共にSNPのCall rate 99%、ii) 対照群のハーディワインベルグ平衡が $P > 0.05$ 、iii) 患者と対象者で共に Minor Allele Frequency 0.05 とする。

GPR141は我々のGWASで、歯周炎の感受性遺伝子として報告している。また、喫煙歴による層別解析の結果、喫煙歴との間に相互作用を認めており、GPR141は喫煙に対する感受性への関連を示唆している。本研究では血中コチニン濃度とGPR141の関連より、喫煙を介した歯周炎へのリスクとなる遺伝子型を同定すること

ができる可能性がある。

THP-1を用いてGPR141のLPS刺激時及び無刺激時の、遺伝子発現をRT-PCRを用いて定量的に検討する。また、si-RNAでGPR141をノックダウンしたTHP-1についてLPS刺激時及び無刺激時の、炎症性サイトカインの定量をELISA及び、RT-PCRを用いて検討する。

GPR141の遺伝子発現の検討：

- ✓ 北海道医療大学に保管中のTHP-1をRPMI 1640にて培養し使用する。
- ✓ LPS刺激時及び無刺激のTHP-1から、ISOGEN®を用いてmRNAを抽出し、Applied Biosystems 7500HT Fast Real-Time PCR System、SYBR Green®、特異的Primerを使用しGPR141の発現を定量的に測定する。
- ✓ 高感度ルミノメーターを使用し、ルシフェラーゼアッセイを行い、GPR141の転写調節因子の影響を調査する。
- ✓ GPR141をノックダウンした、THP-1についてLPS刺激時及び無刺激時の、IL-1、IL-6、IL-8、TNF- α 等の炎症性サイトカインの定量を、ELISA及び、RT-PCRを用いて行う。

以上からGPR141の炎症下での遺伝子発現の変化、他の炎症性サイトカインに対する影響を確認し、歯周炎発症への経路を検討することで、歯周炎発症の機序の一端を説明できる可能性がある。

4. 研究成果

GPR141の発現と機能について解明することを目的として以下の実験を行っている。歯周炎患者及び健常者、計113人分の血清コチニン濃度を測定したところ、喫煙者で血清コ

チニン濃度と SNP の遺伝子型に相関を認めた。THP-1 の LPS 刺激、非刺激時の GPR141 の遺伝子発現量を検討した。また歯肉結合組織を採取し、mRNA を抽出し GPR141 の遺伝子発現量を検討したところ、有意な差を認めなかったものの歯周炎部位の方が発現量は高かった。以上から GPR141 はニコチンにより発現量が増加する可能性が考えられる。また GPR141 は歯周組織において、歯周炎で発現量が増加する可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 伸太郎 (Shimizu, Shintaro)
北海道医療大学 歯学部 助教
研究者番号：80734235

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()