

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02978

研究課題名(和文) MMD2変異マウスを用いた侵襲性歯周炎の病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathophysiology of aggressive periodontitis using MMD2 mutant mice

研究代表者

水野 智仁 (Mizuno, Noriyoshi)

広島大学・医系科学研究科(歯)・教授

研究者番号：60325181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：monocyte to macrophage associated protein (MMD)2に、A116VおよびR126P変異を有する2家系を見出した。これらの家系の発症者はfMLPに対する好中球走化能が健常者に比べて阻害されていた。これらの変異を有するノックインマウスを作製した。絹糸結紮モデルによって歯周炎を誘発したところ、ワイルドタイプマウスに比べてノックインマウスでは重度の歯周炎が誘発された。またノックインマウスの好中球はワイルドタイプマウスの好中球に比べてfMLPに対する走化能が阻害されていた。HEK細胞を使用した実験から、これらの変異はERKのリン酸化を阻害することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急速で高度な歯周組織破壊を特徴とする侵襲性歯周炎の発症機序の一部が解明されたことによって、現在の対症療法中心である治療とはまったく違った、発症機序にもとづいた治療法の開発の基礎的なデータが得られた。MMD2が遺伝学的のみならず、機能面からも侵襲性歯周炎の原因遺伝子であることが示されたため、侵襲性歯周炎は可能な限り早期の確定診断が求められることから、将来的に罹患する可能性のある本家系内の若年者の血液を採取することによって本疾患を遺伝子診断することおよび孤発例のスクリーニングが可能となり、予防医療にも発展させることができる。

研究成果の概要(英文)：Two families with A116V and R126P mutations were found in monocyte to macrophage associated protein (MMD) 2. Patients in these families had a higher inhibition of neutrophil chemotaxis for fMLP than healthy individuals. Knock-in mice having these mutations were generated. When periodontitis was induced by the silk ligation model, severe periodontitis was induced in knock-in mice as compared with wild-type mice. In addition, neutrophils in knock-in mice had a inhibition of chemotaxis for fMLP as compared with neutrophils in wild-type mice. Experiments with HEK cells have shown that these mutations inhibit ERK phosphorylation.

研究分野：歯周病学

キーワード：侵襲性歯周炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

侵襲性歯周炎は家族内集積がみられることから、遺伝子の関与が強く疑われている。しかしながら、原因遺伝子の同定を含めて侵襲性歯周炎に関する十分な病態解明がなされていないため、若年時に発症し高度な歯周組織破壊を示す侵襲性歯周炎患者の存在は広く認知されているが、その実態は不明な点が多い。したがって、侵襲性歯周炎であっても慢性歯周炎と同様な対症療法中心の治療が行われ、治療しても良好な経過をたどらない患者も存在する。侵襲性歯周炎は宿主側の遺伝的背景因子が大きいことから、本質的な治療には原因遺伝子の同定が必須であると考えられる。

申請者らは広島大学病院に通院し、対症療法中心の歯周治療では経過が不良な侵襲性歯周炎患者およびその家系の方々の協力を得て、Exome 解析と Linkage 解析を行うことによって侵襲性歯周炎の原因遺伝子として第 7 染色体に存在する monocyte to macrophage associated protein (MMD) 2 を同定した。MMD2 はその名のとおり、単球からマクロファージへの分化に関与し、生体の免疫機構に関わることが強く疑われるが、その機能はほとんど解明されていない。そこで申請者らは、MMD2 の KI マウスおよび KO マウスを作成し、MMD2 の機能を解析する準備を整えた。MMD2 変異マウスの大腿骨において骨量が変化することから、MMD2 は免疫機構のみならず骨代謝にも関与していることが示唆される。そこでこれらのマウスを用いて MMD2 の変異を用いて侵襲性歯周炎の発症機序を分子・遺伝子レベルで解明することを目的に本研究を着想した。

2. 研究の目的

侵襲性歯周炎の病態を反映する遺伝子変異マウスを用いる事によって、侵襲性歯周炎の発症機序を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

WT マウス、MMD2 ヘテロ KI マウス、MMD2 ホモ KI マウス、MMD2KO マウス (MMD2 遺伝子変異マウス) における血液細胞解析

造血コロニー形成細胞アッセイ

造血系の生涯維持の要因となる造血幹細胞数の変化の有無を調べる。

FACS用いた骨髓と末梢血における造血細胞数比較

造血幹細胞(CD150+CD48+CD34+KSL)B 細胞(B220)T 細胞(CD3)単核球(Mac1⁺Gr1⁻)

顆粒球 (Mac1⁺Gr1⁺) 未熟ミエロイド細胞 (Mac1⁺Gr1⁺) 巨核球 (CD41)

赤芽球 (Ter119) 等

マクロファージ機能検査

Phagocytosis assay・・・蛍光標識したウサギ IgG でコートされたラテックスビーズをマクロファージ培養培地に添加し、食作用によって取り込まれた蛍光ビーズを蛍光顕微鏡で検出する。

Bio-Plex マルチプレックスアッセイ・・・LPS を作用させたマウスマクロファージ培養上清中の複数のサイトカインおよびケモカインの測定

好中球機能検査

貪食能, 殺菌能, 遊走能, 活性酸素産生能, 接着分子発現能

実験的歯周炎モデルを用いた歯周組織における MMD2 の発現解析

ワイルドタイプマウスおよび MMD2 遺伝子変異マウスを用いて上顎第 2 臼歯に絹糸を巻いた後、(3 hr, 6 hr, 12 hr, 1 day, 3 day, 5 day, 7 day and 14 day) 経過後に切片を作

成し抗 MMD2 抗体を用いた免疫染色を行い、歯周組織における MMD2 の発現細胞およびその数を比較する。

MMD2 変異が骨代謝に及ぼす影響（骨形成と骨吸収の観点から）

microCTを用いた骨量解析

非脱灰骨標本を用いた骨形態計測・・・骨芽細胞数、破骨細胞数、骨形成速度、骨吸収速度、骨石灰化速度、類骨量、類骨成熟時間等。

骨芽細胞および破骨細胞の分化に及ぼす影響

MMD2 と相互作用を示すタンパク質の同定

変異導入プラスミドDNAの作成

MMD2 の挿入された Vector と変異導入プライマーを用いて部位特異的変異導入

HEK293細胞にover expression

免疫沈降・・・ペプチドタグを用いたタンパク質複合体の分離

SDS-PAGEによるタンパク質の分離およびnanoLC-MS/MSによる タンパク質同定

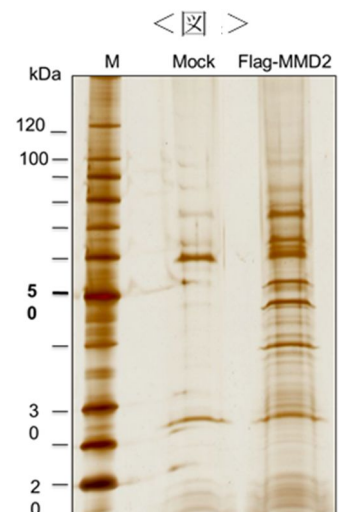
4. 研究成果

患者骨髄に異常は認められなかったが、患者末梢血には CD34 positive 細胞が多く存在することが分かった。MMD2 は単球ではなく好中球に多く発現することが示された。また、患者の血液幹細胞から好中球の分化には異常がないことがわかった。さらに、患者好中球の貪食能、殺菌能、活性酸素産生能、接着分子発現能には異常が認められなかったが、遊走能は健常者の 60%から 70%に阻害されていることが示された。患者の変異を持つノックインマウスでも、患者同様、貪食能、殺菌能、活性酸素産生能、接着分子発現能には異常が認められなかったが、遊走能はワイルドタイプマウスの 60%から 70%に阻害されていることが示された。しかし、マクロファージ機能には異常は認められなかった。また、絹糸結紮モデルによって歯周炎を誘発したところ、ワイルドタイプマウスに比べてノックインマウスにおいて高度の歯周組織破壊が認められた。microCT を用いた骨量解析および非脱灰骨標本を用いた骨形態計測によって、ノックインマウスでは骨代謝異常が認められなかったことから、MMD2 変異は骨代謝に影響を及ぼさないことが示された。

HEK293 細胞に MMD2 および患者で認められた変異を持つベクターを過剰発現させたところ、患者で認められた変異を過剰発現した細胞では、fMLP 刺激後の ERK のリン酸化が抑制されることが示された。

MMD2 の機能解析において、MMD2 と相互作用する可能性のあるタンパク質を知るために、MMD2 を過剰発現させ免疫沈降法によって細胞内結合タンパク質を取り出し、電気泳動後、質量分析によって MMD2 と結合するタンパク質の同定を行った。<図> MMD2 に結合するタンパク質は複数存在するが、同定された RASGRP1, MYO, CTSG をコードする遺伝子の全エクソンに対してサンガーシーケンスを行ったところ 2 つの家系で RASGRP1 に機能欠失変異であるミスセンスヘテロ変異が見つかった。RASGRP1 は B 細胞および T 細胞の分化に関係することが報告されており、免疫機構に関与することが強く示唆される。

以上、侵襲性歯周炎患者約 100 名の解析から、MMD2 に変異を有する患者 6 名（2 家系）を見出し、ERK のリン酸化が阻害されることによって、fMLP に対する好中球走化能が抑制されることが、歯周炎の早期発症につながることを強く示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mizuno N, Kume K, Nagatani Y, et.al.	4. 巻 65(10)
2. 論文標題 Aggressive periodontitis and NOD2 variants.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Hum Genet.	6. 最初と最後の頁 841-846
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-020-0777-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水野智仁
2. 発表標題 侵襲性歯周炎の家族内発症を考える
3. 学会等名 日本歯周病学会第5回近畿地区臨床研修会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	加治屋 幹人 (Kajiya Mikihiro) (00633041)	広島大学・医系科学研究科(歯)・助教 (15401)	
研究分担者	岩田 倫幸 (Iwata Tomoyuki) (30418793)	広島大学・病院(歯)・助教 (15401)	
研究分担者	川上 秀史 (Kawakami Hideshi) (70253060)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授 (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	栗原 英見 (Kurihara Hidemi) (40161765)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関