

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17074

研究課題名(和文) GPR141の機能と歯周病への遺伝的リスクの解析

研究課題名(英文) Analysis of function and genetic risk of GPR 141 in periodontal disease

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：GPR141の機能解明することを目的として以下の実験を行っている。まずTHP1に、P.g LPS刺激を加えたところ、GPR141発現量の低下を認めた。LPSの濃度を振り分けた結果、GPR141の発現はLPS1.0μg/mlでの刺激時に最も発現が低下した。またGPR141の発現は、LPS刺激後12時間で最も低下した。SiRNAを使用してGPR141をノックダウンした。LPS刺激を加えたTHP1細胞、GPR141をノックダウンし、LPS刺激を加えたTHP1細胞、コントロールを用いて、マイクロアレイにて網羅的遺伝子解析を行った。現在結果を統計解析中であり、ここまでの結果を論文化することを考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周炎のGPR141遺伝子の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。ヒト単球細胞にLPS刺激を加えたところ、GPR141発現量の低下を認めた。THP1は、1.0μg/mlでの刺激時に最も発現が低下した。またTHP1をLPS1.0μg/mlで刺激後12時間で最も低下した。GPR141の遺伝子発現と他の遺伝子への影響を調べることを目的として、GPR141をノックダウンして、様々な条件下で遺伝子の発現を網羅的に測定した。GPR141をSiRNAを用いてノックダウンして機能解析をした報告は無く、今後は解析結果を論文化することを目標にしている。

研究成果の概要(英文)：The following experiments are undertaken to elucidate the function of GPR141. Result of adding P.g LPS stimulation to THP1, GPR141 expression was decreased. Result of allocating the concentration of LPS, the expression of GPR141 was the lowest when stimulated with LPS 1.0 μg/ml. The expression of GPR141 was most reduced 12 hours after LPS stimulation. GPR141 was knocked down using SiRNA. LPS stimulated THP1 cells, GPR141 were knocked down and LPS stimulated THP1 cells, and controls were used to perform comprehensive gene analysis using a microarray. We are currently analyzing the results statistically, and we are thinking of making a paper of the results so far.

研究分野：歯周病

キーワード：歯周病 遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

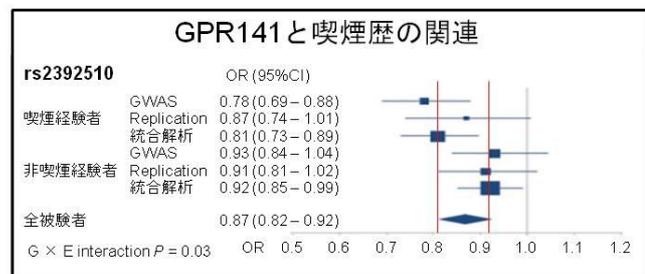
歯周炎の遺伝的要因に対する研究は、炎症性サイトカイン等に焦点を当てた候補遺伝子研究が行われてきたが、診断・治療に結びつくまでに至っていない (Vaithilingam ら 2014)。このため歯周炎の疾患関連遺伝子を同定するためにゲノム全体を網羅的に調べるゲノムワイド関連解析 (GWAS) が行われるようになり、いくつかの疾患関連遺伝子が同定されている。これまで欧米では病型は異なるが有意水準を満たす遺伝子として、GLT6D1 (Schaefer ら 2010)、GPR126 (Murakami ら 2016)、TSNAX-DISC1 (Sanders ら 2017)、SIGLEC5、DEFA1A3 (Munz ら 2017)、ASIC2 (Zhang ら 2016) が報告されているが、その歯周炎に対する機能は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と SNP (KCNQ5: rs9446777、GPR141: rs2392510) を報告した (Shimizu ら 2015)。後に GPR141 は韓国人を対象とした GWAS で、比較的強いシグナルを示したことから、アジア人特有の疾患関連遺伝子である可能性が強く示唆された (Hong ら 2015)。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。未報告だが追加実験で血清コチニン濃度を測定し、GPR141 との関連を調べたところ、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。以上から、GPR141 はニコチンの作用により歯周炎の発症や進行に関与している事が示唆された。

GPR141 は分子進化からみて G タンパク質共役受容体のロドプシンファミリーに属していることが報告されていたが、その機能は明らかになっていない (Yan-hua ら 2010)。GPR141 に関する報告では、GPR141 は GATA-3 による転写調整により Th2 細胞において発現が低下することが報告されている (Yagi ら 2014)。GATA-3 は Th2 細胞の分化に必須の転写調整因子であり、以上から GPR141 は Th2 細胞に発現し、GATA-3 による転写調整を受け Th2 サイトカイン産生能を制御することで、歯周炎の感受性に関連している可能性が考えられる。GPR141 は末梢動脈疾患患者のマクロファージの遺伝子発現を網羅的に解析したところ、患者群で有意に低下する遺伝子として挙がっていることから (Masud ら 2012)、予備実験として THP-1 (単球細胞株) に LPS 刺激、非刺激時の GPR141 の遺伝子発現量を RT-PCR を用いて検討した。以上の結果は有意な差を認めなかったが、GPR141 の遺伝子発現量が解析可能であることが実証できた。

また自閉症の GWAS で疾患関連遺

伝子として GPR141 が報告されており、自閉症患者で GPR141 の mRNA の発現がダウンレギュレーションを受けることが報告されている。その報告の中で GPR141 は系統的に鎮痛作用を示すとされる N-アラキドニルグリシン (NAGly) をリガンドに有する可能性があることが報告されている。



GPR141 (rs2392510) と喫煙歴の層別解析

	全被験者		喫煙者		非喫煙者	
	相関係数	P	相関係数	P	相関係数	P
年齢	-0.049	0.575	-0.266	0.112	0.048	0.639
性別	0.137	0.112	0.132	0.436	0.164	0.106
血清コチニン濃度	-0.143	0.144	-0.395	0.025	0.017	0.887
歯数	0.064	0.462	0.328	0.047	-0.024	0.814
BOP(%)	0.11	0.204	0.221	0.189	0.062	0.54
≥4mm(%)	-0.021	0.807	-0.144	0.395	0.017	0.868
平均PDP	0.121	0.161	0.027	0.872	0.153	0.13
唾液中P.g(log)	-0.105	0.288	-0.133	0.492	-0.92	0.428

これらを踏まえ、GPR141のTh2細胞におけるGATA-3の結合による転写活性、ニコチンやNAGlyを始めとしたリガンドの探索を行うことで、GPR141の機能を解析することで、歯周炎の遺伝的リスクや関連を明らかにすること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は、予備研究として我々のGWASの結果と韓国人GWASの結果でメタ解析を行ったところ、 $P=6.72 \times 10^{-8}$ 、 $OR=0.86(0.81-0.91)$ を示し、GWAS有意水準に近付いたことから、GPR141はアジア人特有の疾患関連遺伝子である可能性が強く示唆された。興味深いのはGWASの特色として全ゲノムを網羅的に解析しているため、これまで歯周炎の遺伝子研究では報告のなかったGPR141が疾患関連遺伝子として挙がっていることである。本研究でGPR141と歯周炎との関連を研究することで、日本人の慢性歯周炎GWASで報告された唯一の遺伝子の機能的な意味を明らかにすることができる可能性がある。

また歯周外科時の歯肉結合組織を採取し、mRNAを抽出しGPR141の遺伝子発現量をRT-PCRを用いて検討したところ、歯周炎部位と健常部位で有意な差を認

遺伝子	SNPs	研究	人種	病型	歯周炎患者	対象者	P値	OR(95%CI)
GPR141	rs2392510	我々の報告	日本人	Periodontitis	2,757	15,128	4.17×10^{-8}	0.87(0.82-0.92)
		既報GWAS(Divaris) メタ解析*	米人	Severe CP	761	1,823	0.08 5.03×10^{-7}	0.89(0.77-1.01) 0.87(0.82-0.93)
		既報GWAS(Divaris) メタ解析*	米人	Moderate CP	1,920	1,823	0.38 7.09×10^{-8}	0.96(0.87-1.05) 0.89(0.85-0.94)
		既報GWAS(Hong) メタ解析*	韓国人	CP	414	263	6.80×10^{-4} 6.72×10^{-8}	0.68(0.53-0.84) 0.86(0.81-0.91)

*: 我々のGWASの結果と既報GWASとのメタ解析

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は歯周組織で発現しており、歯周炎で発現量が上昇する可能性が考えられる。

3. 研究の方法

本研究ではGPR141のTh2細胞におけるGATA-3の結合による転写活性の確認と、炎症性サイトカインの変化について調べることで遺伝子の機能解析を行う。リガンドについては、候補であるニコチンやNAGlyの解析と、その他リガンドの同定を行い。遺伝子発現と、炎症性サイトカインの変化について調べることで遺伝子の機能解析を行う。研究期間内に以下のことを行う。

GPR141上のSNP(rs2392510)の遺伝子型の異なる被験者3名から採血しCD294(CRTH2)MicroBead Kitを使用してTh2細胞を分離・培養し、GATA-3がGPR141に結合することをゲルシフトアッセイ(EMSA)で検討する。

GPR141がGATA-3によって転写活性を受けるか、SimpleChIP® Plus Enzymatic Chromatin IPキットを使用し、クロマチン免疫沈降(ChIP)法にて発現量を解析する。

Th2細胞を用いてGPR141へのGATA-3結合時の炎症性サイトカインへの影響を(株)ジェネティックラボに依頼し、マイクロアレイを用いて網羅的に解析する。

GPR141へのニコチンおよびNAGlyの結合を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にて解析する。

Th2細胞を分離・培養し、Si-RNAを用いてGPR141をノックダウンしたTh2についてLPS刺激、ニコチン刺激、NAGly刺激を加え、炎症性サイトカインへの

影響をマイクロアレイを用いて網羅的に解析する。

4 . 研究成果

歯周炎のGPR141のリガンドや転写因子を調べることで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。

まずTHP1に、P.g LPS、ニコチン刺激を加えたところ、GPR141発現量の低下を認めた。THP1に対しLPS、ニコチン共に0.001、0.01、0.1、1.0 μ g/mlで濃度を振り分け刺激を加えたところ、1.0 μ g/mlでの刺激時に最も発現が低下した。またTHP1をLPS、ニコチン共に1.0 μ g/mlで刺激後、1、4、12、24、48、72、96時間、1週間で発現を確認した。結果としてGPR141の発現量は、刺激後12時間で最も低下した。同様の条件でIL1 及びTNF では発現量の上昇を確認している。

GPR141の遺伝子発現と炎症性サイトカインへの影響について調べ、遺伝子の機能を検討することを目的として、SiRNAを使用してGPR141をノックダウンした。

GPR141をSiRNAを用いてノックダウンした報告は無く、SiRNAの最適な濃度や時間、条件を検討した。GPR141をノックダウンしたTHP1のmRNAを抽出したところ、

GPR141の発現量が少なくとも7割程度は減少していることを確認した。

以上から、IPS刺激を加えたTHP1細胞、GPR141をノックダウンし、LPS刺激を加えたTHP1細胞、コントロールを用いて、マイクロアレイにて網羅的遺伝子解析を行った。現在結果を統計解析中であり、ここまでの結果を論文化することを考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----