

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23249086

研究課題名(和文) 分子疫学研究に基づく予測歯周病学の基盤構築

研究課題名(英文) Development of predictive periodontology based on molecular epidemiological study

研究代表者

村上 伸也 (Murakami, Shinya)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70239490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯周病の感受性・抵抗性に関わる遺伝子の同定ならびに同遺伝子の機能解析を目的として、高齢長寿者・高齢双生児・侵襲性歯周炎患者を対象とした分子疫学研究による分子基盤情報の構築を行い、歯周組織の恒常性維持に関連する遺伝子の抽出とその作用発現機序を解析した。その結果、得られた基盤情報より、歯周病の進行には遺伝的要因が関与していることが示唆され、カテプシンAが侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子の一つである可能性が示唆された。また種々の歯周病関連遺伝子の機能解析から、CD73、PLAP-1、ferritin、periostinが歯周組織の恒常性維持を司る歯根膜細胞の分化を制御していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the genes responsible for progression of periodontal disease based on the information of molecular epidemiological studies of over 70-year-old adult, aged twins and aggressive periodontitis patients. Moreover, we analyzed the expression and function of the various candidate genes. As a result, we confirmed that genetic factor is associated with the progression of periodontal disease and found that cathepsin A might be a responsible gene for aggressive periodontitis as assessed by the epidemiological database. We also revealed that CD73, PLAP-1, ferritin, and periostin are deeply involved in the cytodifferentiation and mineralization of periodontal ligament cells which play crucial roles in periodontal tissue homeostasis.

研究分野：歯周予防学

キーワード：歯周病 侵襲性歯周炎 分子疫学 疾患関連遺伝子 バイオインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

歯周病の発症と進行には直接的原因である細菌性バイオフィルムに加えて様々な要因が複雑に関与しており、そのことが歯周病の病態の理解を複雑なものにしている。依然として高い罹患率を示し、高齢者の「口が支える QOL」を脅かす歯周病への効果的な対策を考えた場合、根拠に基づく個別化された歯周病予防プロトコルの確立、高リスク患者集団への集中的早期医療介入が必要となる。このことを可能にするには、歯周病の感受性・抵抗性に関わる先天因子・後天因子を正確に同定しなくてはならない。

一方、先天因子同定の切り札の一つとして一遺伝子多型 (Single Nucleotide Polymorphism (SNP)) 解析が全世界的に注目され、日本人歯周炎患者を対象とした研究もなされたが、その時に検討された多くの SNP と日本人侵襲性歯周炎患者との間に有意な関連性を見いだせなかった (*J Dent Res*, 88:1137, 2009)。その理由の一つとして、「歯周病患者 vs 非歯周病患者」という比較で関連因子の抽出を試み、多因子性疾患である歯周病を限られた数の先天あるいは後天因子を用いて説明しようという試みがこれまでの中心であったことが挙げられる。このような状況を打破するためには、従来にないユニークな調査対象に焦点を当て、歯周病の発症・進行に関わる先天・後天因子の抽出を分子疫学的に図ること、その結果得られる極めて多くの因子の単独の作用のみならず複数因子間の相互作用をバイオインフォマティクス解析により明らかにすることが、歯周病の正しい理解にとって極めて重要になる。

我々の研究室では、従来より歯周病学分野における網羅的遺伝子解析およびバイオインフォマティクス解析に取り組んでおり、10,000 クローンからなる歯根膜完全長 cDNA ライブラリ (Ful-PerioGen) と新規遺伝子の同定、歯根膜特異的遺伝子 PLAP-1 の発見と機能解析 (*J Biol Chem* 282:23070, 2007) 。

歯根膜の力学的負荷応答の網羅的遺伝子発現解析 (*J Biol Chem* 285:28286, 2010) などの、先駆的業績を挙げてきた。

2. 研究の目的

そこで今回我々は、100 歳を超える百寿者を含む 70 歳以上の高齢長寿者、高齢双子児に加えて侵襲性歯周炎患者を研究対象とした分子疫学研究を実施し、得られた情報を基にして我々の研究室で蓄積してきた歯周病学的バイオインフォマティクス解析を用いたゲノムワイドアプローチを展開し、歯周病の感受性・抵抗性に関わる先天ならびに後天因子の抽出と、それら因子の交絡関係の検討、および関連分子 (遺伝子) の機能発現機構の解析、さらにはこれら分子疫学研究に

よって得られたデータベースの公開を目指した。

3. 研究の方法

(1) 分子疫学研究の基盤構築

本研究は、倫理審査委員会およびゲノム審査委員会の承認の下、実施される (これらの承認は全て取得済み)。実施する分子疫学研究の対象は以下の ~ とする。

70 歳を超える高齢長寿者 (100 歳以上の百寿者も含む) (百寿者研究)

60~70 歳代を主とした高齢双子児 (一卵性、二卵性を共に含む)

日本歯周病学会の分類に基づく侵襲性歯周炎患者

これらの研究への参加を応諾された被験者に対して、歯周病の罹患実態を中心とした口腔内の情報を詳細に検討すると共に、採血を実施しゲノムを抽出する。また、医学・人間科学研究科の連携研究者と協力し、患者の全身背景・生活習慣・心理社会的要因に関する情報を取得する。このようにして得られた全ての成果をデータベース化し公開することで、その情報を基に患者個々の歯周病に対する疾患感受性・抵抗性を予測し「歯周病予防・管理プロトコル」を提言することを目標とした「予測歯周病学」の情報基盤を創出する。

(2) 歯周病関連遺伝子の機能解析

被験者より得られたゲノムを用いて、歯周病の疾患感受性との関連が既に疑われている遺伝子や、Ful-PerioGen ライブラリにおいて歯周組織に特徴的に高発現する PLAP-1 等の遺伝子の機能解析を展開する。さらにエクソーム解析を用いたゲノムワイドアプローチを展開し、機能未知遺伝子の SNP 探索を実施する。これら SNP 情報と患者の全身背景・生活習慣の情報を統合し、歯周病バイオインフォマティクス解析を実施することにより、歯周病の疾患感受性・抵抗性に関わる先天・後天因子とその相互作用を明らかにする。さらに歯周病との関連性が示唆された遺伝子に関しては、その作用発現機序を、培養細胞を用いた *in vitro* 解析、遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* 解析を通じて明らかにする。

4. 研究成果

(1) 分子疫学研究の基盤構築

百寿者研究

関西在住の 70 歳代以上の被験者を対象として、歯周組織検査・一般採血・頸動脈エコー等を実施した。得られたデータを基に多変量解析等の統計学的処理を行った結果、その結果、特定の 10 歯を対象とした CPI スコアに基づいた平成 23 年度歯科疾患実態調査と比較して、被験者の全歯を 6 点法でプロービ

ングした本研究では、4mm 以上の歯周ポケットを有する被験者の比率が高いことが明らかとなった。さらに、4mm 以上のポケットの割合が30%以上の被験者において、慢性歯周炎で最も多く検出される *Porphyromonas gingivalis* の血漿抗体価が有意に高いこと、ならびに深い歯周ポケットの残存している被験者に高頻度に心疾患がみられることを見出した。

高齢双生児

大阪大学大学院医学系研究科附属ツインリサーチセンターの協力のもとで、高齢双生児レジストリー登録者を対象に148組296名に対して、歯周組織検査、パノラレントゲン撮影等を実施した。その結果、上顎歯列弓幅径長さに関する級内相関係数は遺伝因子による影響が大きい、現在歯数、平均歯槽骨吸収率、平均歯周ポケット深さに関する級内相関係数は環境因子による影響が大きいことを見出した。また、歯周病の進行については、加齢の過程で暴露される環境因子のみならず、遺伝要因による影響もあることが推察された。

	Intra-class correlation (CI)	
	Monozygotic	Dizygotic
Total number of remaining teeth	0.64 (0.52, 0.73)	0.77 (0.46, 0.91)
Occult blood test	0.31 (0.16, 0.45)	0.12 (-0.28, 0.48)
Maximum probing depth	0.10 (-0.12, 0.30)	0.11 (-0.49, 0.65)
Score of bone resorption	0.63 (0.48, 0.74)	0.68 (0.28, 0.88)
Percentage of decayed filled and missing teeth	0.52 (0.38, 0.66)	0.48 (0.34, 0.62)
Occlusal force	0.45 (0.29, 0.59)	0.23 (0.15, 0.30)
Masticatory performance	0.54 (0.38, 0.67)	0.27 (0.20, 0.34)
Stimulated salivary flow rate	0.49 (0.33, 0.62)	0.24 (0.17, 0.31)
Width of upper dental arch	0.28 (0.02, 0.50)	0.14 (0.02, 0.26)
Width of lower dental arch	0.24 (0.02, 0.44)	0.12 (0.01, 0.23)

CI, 95% Confidence Interval.

図1、高齢双生児における各指数の級内相関係数

侵襲性歯周炎患者

大阪大学歯学部附属病院 口腔治療・歯周科にて侵襲性歯周炎と診断された58名の被験者に対し、歯周組織検査・デンタルX線検査に加え、エクソーム解析を実施した。新規疾患関連候補遺伝子探索のために、1000ゲノムデータベースでの遺伝子多型発現頻度が0.05以下のnon-synonymousなSNPを持つ遺伝子を抽出したところ、カテプシンAが疾患関連候補遺伝子である可能性が示唆された。

(2) 歯周病関連遺伝子の機能解析

歯を支持する歯槽骨の代謝に関与する分子機構は、歯周組織の恒常性維持を考える上

でも極めて重要である。そこで、歯槽骨ならびに歯根膜において特徴的に発現が認められる遺伝子等に関して *in vitro* ならびに *in vivo* にて機能解析を行った。

CD73

生体内に広域に発現するCD73分子が、同分子内のecto-5'-nucleotidase活性により細胞外アデノシンを産生し、アデノシン A2B受容体を介したシグナルにより、骨芽細胞の分化を促進する機構を明らかにした。

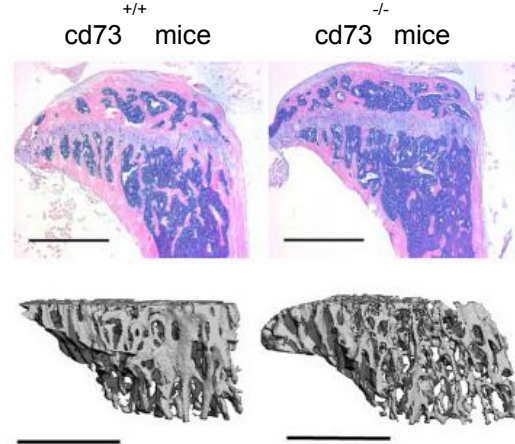


図2、野生型とCD73ノックアウトマウスのHE染色像(上段)とμCT像(下段)

Ferritin

アポフェリチンを歯根膜細胞に添加し、ferritinの歯根膜細胞の分化ならびに石灰化物形成能に対する効果を検討したところ、ferritinは歯根膜細胞の分化を促進することが明らかとなった。

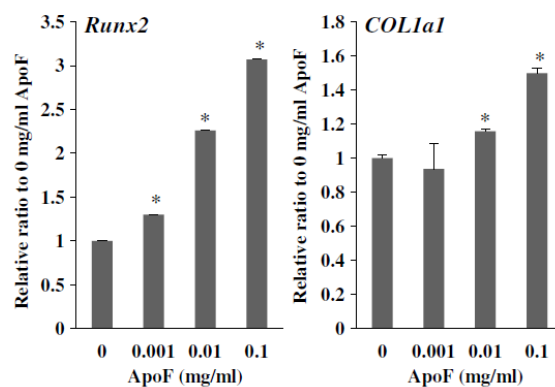


図3、Ferritinによる歯根膜細胞の分化促進

PLAP-1

PLAP-1/aspargin のN末端に位置するアスパラギン酸(D)の連続配列数には少なくともD12型からD19型まで存在し、日本人において最も発現頻度の高いD13型PLAP-1(約60%)と比較して、日本人において約7.5%存在するD14型PLAP-1は、BMP-2シグナルを制御することにより歯根膜細胞の石灰化を抑制することを見出した。

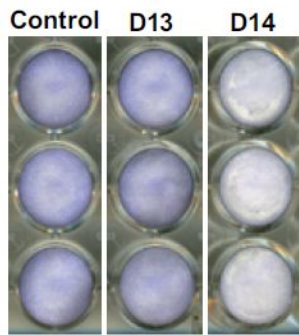


図4、D14型 PLAP-1 による歯根膜細胞の分化抑制

Periostin

歯根膜細胞特異的に発現する periostin アイソフォーム PDL-POSTN が、 $\alpha\beta3$ インテグリンシグナルを介して歯根膜細胞の分化を促進させることを見出した。

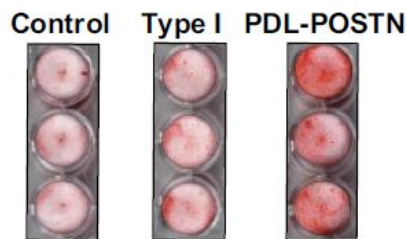


図5、PDL-POSTN による歯根膜細胞の分化促進

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11件)

北村正博、村上伸也

生活習慣病における骨と歯

1. 歯周病の病態と成因 The pathogenesis of periodontal diseases

The BONE 25:61-66, 2011

<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ai1bonee/2011/002504/010&name=0409-0414j&UserID=133.1.212.78>

M Takedachi, H Oohara, BJ Smith, M Iyama, M Kobashi, K Maeda, CL Long, MB Humphrey, BJ Stoecker, S Toyosawa, LF Thompson, S Murakami

CD73-generated adenosine promotes osteoblast differentiation

J. Cell. Physiol. 227: 2622-2631, 2012.

10.1002/jcp.23001.

T Iwayama, M Yanagita, K Mori, K Sawada, M Ozasa, M Kubota, K Miki, Y Kojima, M Takedachi, M Kitamura, Y Shimabukuro, T Hashikawa, S Murakami

Adiponectin regulates functions of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells

J Periodont Res 47: 563-571, 2012

doi: 10.1111/j.1600-0765.2012.01467.x.

JX Hou, S Yamada, T Kajikawa, N Ozaki, T Awata, S Yamaba, S Murakami

Role of ferritin in the cytodifferentiation of periodontal ligament cells

Biochem Biophys Res Commun 426: 643-648, 2012.

doi: 10.1016/j.bbrc.2012.09.008.

JX Hou, S Yamada, T Kajikawa, N Ozaki, T Awata, C Fujihara, S Murakami

Iron plays a key role in the cytodifferentiation of human periodontal ligament cells.

J Periodont Res 49:260-7, 2013.

doi: 10.1111/jpre.12103.

山羽聡子、北村正博、宮里幸祐、栗原暁子、島美和子、久保田実木子、西村誠、山本温、吉岡恵利、松本航、伊山舜吉、東山弥生、松井美樹、山口泰司、尾崎巨弘、兒嶋由子、大原廣之、梶川哲宏、小笹匡雄、柏木陽一郎、三木康史、田内拓史、竹立匡秀、北垣次郎太、山下元三、柳田学、野崎剛徳、山田聡、島袋善夫、村上伸也

歯の保存に対する Supportive Periodontal Therapy の長期的効果

保存学会誌 56(1)40-47, 2013

http://www.hozon.or.jp/member/pdf/vol56_no1/40.pdf

北垣次郎太、宮内静香、橋野恵衣、河合伸治、道上郁美、村上伸也

「オーダーマード医療」の現状と課題

歯界月報 749:54-57, 2013

<http://jglobal.jst.go.jp/public/20090422/201402271174820142>

T Kajikawa, S Yamada, T Tauchi, T Awata, S Yamaba, C Fujihara, S Murakami

Inhibitory effects of PLAP-1/asporin on periodontal ligament cells.

Journal of Dental Research, 93:400-5, 2014.

doi: 10.1177/0022034513520549.

C Inomata, K Ikebe, R Kagawa, H Okubo, S Sasaki, T Okada, H Takeshita, S Tada, K Matsuda, Y Kurushima, M Kitamura, S Murakami, Y Gondo, K Kamide, Y Masui, R Takahashi, Y Arai, Y Maeda.

Significance of occlusal force for dietary fiber and vitamin intakes in independently living 70-year-old Japanese: from SONIC (Septuagenarians, Octogenarians, Nonagenarians Investigation with Centenarians) Study

J Dentistry, 42: 556-564, 2014.

doi: 10.1016/j.jdent.2014.02.015.

S Yamada, T Tauchi, T Awata, K Maeda, T Kajikawa, M Yanagita, S Murakami
Characterization of a novel periodontal ligament-specific periostin isoform.
J Dent Res, 93:89-95, 2014.
doi: 10.1177/0022034514543015.

Y Kurushima, K Ikebe, K Matsuda, K Enoki, S Ogata, M Yamashita, S Murakami, K Hayakawa, Y Maeda
Influence of genetic and environmental factors on oral diseases and function in aged twins.
J Oral Rehabil, 41(12):912-9, 2014
doi: 10.1111/joor.12214.

〔学会発表〕(計5件)

J Hou, S Yamada, N Ozaki, T Kajikawa, T Awata, S Murakami
Ferritin expression in human periodontal ligament cells
59th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research
2011/10/8, Hiroshima (Japan)

T Kajikawa, S Yamada, N Ozaki, T Awata, S Yamaba, S Murakami
Inhibitory effects of D14-PLAP-1 on periodontal ligament cell differentiation
90th General Session & Exhibition of the IADR
2012/6/20, Iguacu Falls (Brazil)

S Yamada
Molecular basis of periodontal ligament homeostasis regulated by PLAP-1/aspirin
92th General Session & Exhibition of the IADR
2014/6/28, Cape Town (South Africa)

J Kitagaki, S Miyauchi, M Yamashita, S Yamada, M Kitamura, S Murakami
Identification of the genetic polymorphism on aggressive periodontitis in Japanese
62th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research
2014/12/4, Osaka (Japan)

S Yamamoto, M Takedachi, C Morimoto, T Awata, S Yamaba, S Yamada, S Murakami
Hypoxia Regulates PLAP-1 Expression in Periodontal Ligament Cells
93th General Session & Exhibition of the IADR
2015/3/12, Boston (USA)

〔その他〕

ホームページ等

日本国立遺伝学研究所の作成している日本 DNA データバンク内の Japanese

Phenotype-Genotype Archive (JGA)にて、侵襲性歯周炎患者のエクソーム解析データの一部を公開した (JGA アクセション番号: JGAS0000000024)。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村上 伸也 (MURAKAMI Shinya)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号 : 70239490

(2)研究分担者

北村 正博 (KITAMURA Masahiro)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号 : 10243247

山田 聡 (YAMADA Satoru)
大阪大学・歯学部附属病院・講師
研究者番号 : 40359849

山下 元三 (Yamashita Motozo)
大阪大学・歯学部附属病院・助教
研究者番号 : 90524984

北垣 次郎太 (KITAGAKI Jirouta)
大阪大学・歯学部附属病院・助教
研究者番号 : 90570292

(3)連携研究者

池邊 一典 (IKEBE Kazunori)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号 : 70273696

神出 計 (KAMIDE Kei)
大阪大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号 : 80393239

権藤 恭之 (GONDO Yasuyuki)
大阪大学・大学院人間科学研究科・准教授
研究者番号 : 40250196