

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670809

研究課題名(和文)難治性根尖性歯周炎に対する遺伝子診断への新たなる展開

研究課題名(英文)The evolution of genetical assessment for persistent apical periodontitis.

## 研究代表者

伊藤 祥作 (Itoh, Shousaku)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：90360495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、IL-1B遺伝子のイントロンに存在するSNPであるSNPID:rs1143643について解析したところ、健常群と発症群との間に有意差は認められなかった。過去の報告は、白色人種(Caucasoid)が対象であったのに対し、本研究は日本人(Mongoloid)を研究対象にしている。すなわち、同部位のSNPにおいても白色人種と日本人で発症に差異が生じることが解析の結果、明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate the relationship between persistent apical periodontitis and SNP of inflammatory cytokine, IL-1B. We investigated the relationship of the SNP in the intron of IL-1B, SNPID:rs1143643. Though the previous reports, from Caucasoid, showed the relationship between the SNP in the intron of IL-1B and persistent apical periodontitis, our study, from Mongoloid, showed no relationship. We concluded that the efficacy of SNP were different among the racial difference, such as Mongoloid and Caucasoid.

研究分野：医歯薬学

キーワード：根尖性歯周炎 IL-1B SNP

1. 研究開始当初の背景

日常臨床において、根管治療によっても治癒しない難治性根尖性歯周炎にしばしば遭遇する。その難治性根尖性歯周炎の原因を探るべく研究がすすめられた結果、根尖孔外に形成されるバイオフィルムが主たる原因であることが明らかとなってきた。一方で、ごく稀にはあるが臨床において根尖病巣がきわめて急速に拡大し、通常の歯内療法では対応に苦慮する症例に遭遇する場合がある。このような極端な症例と遭遇していくうちに、バクテリア側の要因のみならず、宿主側の要因についても目を向ける必要性があるのではないかと申請者は考えはじめた。そこで、申請者は、難治性根尖性歯周炎罹患歯を有する患者のゲノムDNAを調整し、炎症性サイトカインであるIL-1Bに対してSNP解析を行い、根尖性歯周炎を難治化させる原因遺伝子について検索するという着想に至った。

2. 研究の目的

ヒトゲノムプロジェクトが終了し、我々の染色体の塩基配列が明らかとなった。そして今、われわれはその暗号の解読作業に入っている。その課程で、1塩基多型(SNP: Single Nucleotide Polymorphism)が発見され、様々な疾病(癌や糖尿病など)に関係していることがわかってきている。近年では、歯科領域の慢性疾患とSNPとの関連性についての研究も行われはじめているが、難治性根尖性歯周炎とSNPの関連性についてはほとんど研究されていないのが現状である。本研究課題は、難治性根尖性歯周炎と1塩基多型との関連性について、おもに炎症性サイトカイン遺伝子群に対してSNP解析し、根尖性歯周炎を難治化させる遺伝子を研究期間内に明らかにすることを目標としている。

3. 研究の方法

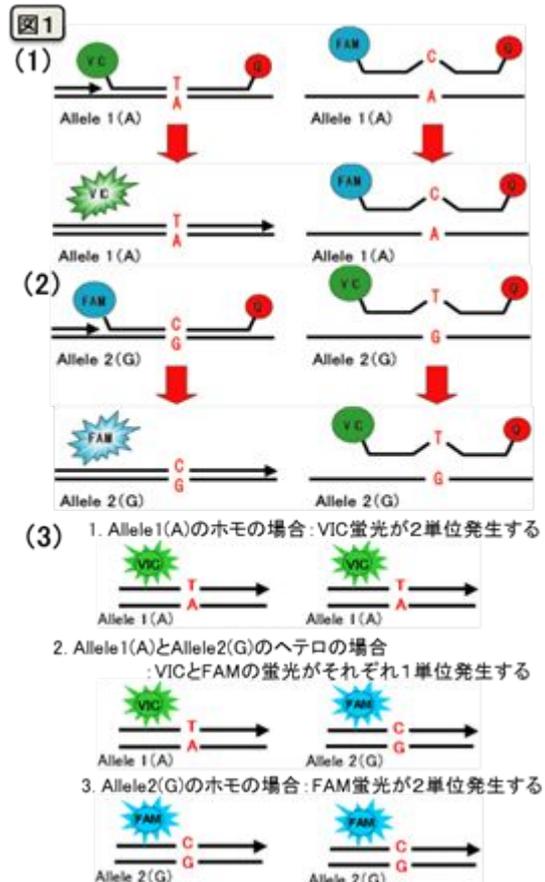
(1) 難治性根尖性歯周炎患者からのサンプルの調整

難治性根尖性歯周炎罹患患者の選択: 難治性根尖性歯周炎罹患歯とは、大阪大学歯学部附属病院保存科を受診し根尖病巣を伴う慢性根尖性歯周炎罹患歯を有し、根管治療中および治療終了後の経過を基にした術者の総合的判断により、難治性根尖性歯周炎と診断され、外科的歯内療法あるいは抜歯が選択されたものである。健常者および難治性根尖性歯周炎罹患患者から非侵襲的に細胞を採取する。具体的には、頬粘膜を綿棒にて軽くこすることによって口腔粘膜細胞を採取する。口腔粘膜細胞を細胞溶解液し、エタノール沈殿を行い、ゲノムDNAを調整する。調整したゲノムDNAをTris-EDTA溶液に溶かし、-20 で保存する。

(2) SNP解析: 炎症性サイトカインIL-1BについてSNP解析を行う。SNP解析は、TaqMan® SNP Genotyping Assays (Thermo Fisher Scientific社)を用いて行う。ゲノム上でSNPを含む領域を増幅できるPCRプライマーを1セットとゲノムDNAの一塩基変異に対応するTaqMan®プローブを2種類用意する。それぞれのTaqMan®プローブは、Allele1(A)とAllele2(G)に相補的な配列を有しており、VICとFAMの蛍光色素でラベルされている。これらのプライマーとTaqMan®プローブ、ゲノムDNAを混合し、PCRを行うと

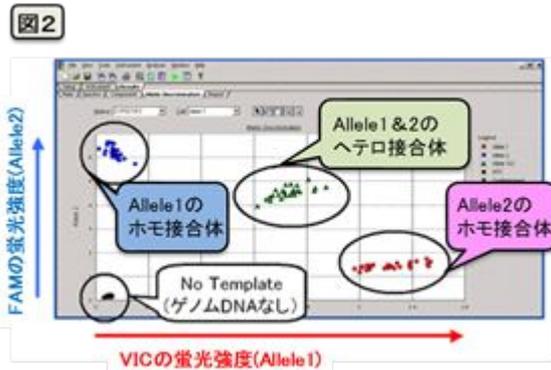
Allele1(A)の配列を持つDNAにはVICプローブはハイブリできるが、FAMプローブはミスマッチを生じてハイブリできない。ハイブリしたVICプローブは分解され、VICの蛍光(緑色)が検出され、一方、ハイブリしなかったFAMプローブは分解されずFAMの蛍光(青色)は検出されない(図1(1))。

Allele2(G)の配列を持つDNAに対しては、FAMプローブはハイブリできるが、VICプローブはミスマッチを生じてハイブリできない。したがって、ハイブリしたFAMプローブは分解され、FAMの蛍光(青色)が検出され、ハイブリしなかったVICプローブは分解されずVICの蛍光(緑色)は検出されない(図1(2))。



各サンプルの蛍光パターンは、図1(3)

に示すように3種類に大きく分類される。各サンプルの蛍光量を図2のようにグラフにプロットしてタイピングを行う。SNP解析から得られたデータについて、SNPと難治性根尖性歯周炎との統計的意義についてFisherの正確確率検定を行う。



#### 4. 研究成果

本研究では、難治性根尖性歯周炎の発症に関連すると報告されているIL-1B遺伝子のイントロンに存在するSNP、SNPID:rs1143643について健常者20人および難治性根尖性歯周炎罹患患者19人から調整したゲノムDNAに対して解析した。このSNPにはCとTのタイプが存在することがわかっており、それぞれのSNPの発現頻度について解析したところ、表1に示すようにについて計算したところ、根尖性歯周炎罹患患者(Case)ではC:18人、T:20人であった。また、健常者(Control)ではC:17人、T:23人であった。

表1

	C	T	合計
Case	18	20	38
Control	17	21	38
合計	35	41	76

検定をおこなったところ、表2に示すように、Case群とControl群間にCおよびTの発現頻度に偏りは認められなかった。

表2

	Allele Frequency (case)	Allele Frequency (control)	P-value
C	0.47	0.45	NS
T	0.53	0.55	NS

表3

	C/C	C/T	T/T	合計
Case	4	10	5	19
Control	5	7	8	20
合計	9	17	13	39

次に、AlleleにおけるSNPの組み合わせに

ついて解析したところ、表3に示すように難治性根尖性歯周炎罹患患者(Case)ではC/C:4人、C/T:10人、T/T:5人という結果になった。また、健常者(Control)ではC/C:5人、C/T:7人、T/T:8人という分布となった。

表4

	Genotype Frequency (case)	Genotype Frequency (control)	P-value
C/C	0.21	0.24	NS
C/T	0.53	0.33	NS
T/T	0.26	0.43	NS

検定をおこなったところ、表4に示すようにCase群およびControl群の間で、C/CおよびC/TそしてT/Tの表現型間に偏りは認められなかった。以上の結果から、同部位のSNPにおいても白色人種(Caucasoid)と日本人(Mongoloid)で発症に差異が生じることが解析の結果、明らかとなった。

研究目標に対して十分な研究成果が得られたと考えている。

#### 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6件)

Ikeda S, Itoh S, Yamamoto Y, Yamauchi Y, Matsushita K, Naruse H, Hayashi M:

Developmental stage-dependent effects of leukemia inhibitory factor on adipocyte differentiation of murine bone marrow stromal cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 74:11-17, 2016. 査読有 doi: 10.1007/s12013-015-0703-8.

Yamamoto Y, Itoh S, Yamauchi Y, Matsushita K, Ikeda S, Naruse H, Hayashi M: Density Gradient Centrifugation for the Isolation of Cells of Multiple Lineages. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116(12):2709-2714, 2015. 査読有 doi: 10.1002/jcb.25270.

Matsushita K, Itoh S, Ikeda S, Yamamoto Y, Yamauchi Y, Hayashi M: LIF/STAT3/SOCS3 Signaling Pathway in Murine Bone Marrow Stromal Cells Suppresses Osteoblast Differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 108:1262-1268, 2014. 査読有 doi: 10.1002/jcb.24777.

Chen F, Guo R, **Itoh S**, Moreno L, Rosenthal E, Zappitelli T, Zirngibl RA, Flenniken A, Cole W, Grynepas M, Osborne LR, Voge W, Adamson L, Rossant J, Aubin JE: First mouse model for combined osteogenesis imperfecta and ehlers-danlos syndrome. Journal of Bone and Mineral Research, 29(6): 1412-1423, 2014. 査読有 doi: 10.1002/jbmr.2177.

Fujikawa J, Tanaka M, **Itoh S**, Fukushi T, Kurisu K, Takeuchi Y, Morisaki I, Wakisaka S, Abe M: Kruppel-like factor 4 expression in osteoblasts represses osteoblast-dependent osteoclast maturation. Cell Tissue Research, 358:177-187, 2014. 査読有 doi: 10.1007/s00441-014-1931-8. Epub 2014 Jun 15.

呉本勝隆, 前園葉月, 北川蘭奈, 竹田かほる, 新野侑子, 松下健太, **伊藤祥作**, 野村由一郎, 林美加子: 歯根の肥大および湾曲を伴う上顎大白歯の自家移植症例.

日本歯科保存学雑誌, 57(6):589-596, 2014. 査読有

**伊藤祥作**, 岩見行晃, 山田朋美, 松下真美, 山口幹代, 北川晴朗, 池田峻, 古谷優, 前園葉月, 藪根敏晃, 山本洋子, 林 美加子: 修復処置におけるう蝕象牙質除去の客観性についての臨床的評価.

日本歯科保存学雑誌, 56(5):441-453, 2013. 査読有

〔学会発表〕(計9件)

**伊藤祥作**, 山内裕香子, 山本由美子, 成瀬陽菜, 伊藤勇紀, 林美加子: マウス骨髄由来新規間葉系幹細胞集団における神経分化能の解析

第143回日本歯科保存学会秋季学術大会  
平成27年11月13日、東京

板東秀典, 熱海 徹, 小椋英樹, 村上正晃, **伊藤祥作**, 林 美加子: 炎症誘導における新規核内制御因子 NAF1 の解析  
第141回日本歯科保存学会秋季学術大会  
平成26年10月30日、山形

山本由美子, 伊藤祥作, 松下健太, 池田峻, 山内裕香子, 林 美加子: 骨芽細胞の細胞表面マーカー解析法の開発  
第140回日本歯科保存学会春季学術大会  
平成26年6月19日、滋賀

Yamamoto Y, **Itoh S**, Matsushita K, Ikeda S, Yamauchi Y, Hayashi M: A novel method for surface marker analysis of mature osteoblasts

IBMS:2014 Herbert Fleisch Workshop  
平成26年3月16-18日, Brugge (Belgium)

板東秀典, 小椋英樹, 村上正晃, **伊藤祥作**, 林美加子: 炎症惹起における NAF1 の分子機構解析

第138回日本歯科保存学会春季学術大会  
平成25年6月28日、福岡

松下健太, **伊藤祥作**, 池田峻, 山本由美子, 山内裕香子, 林 美加子: SOCS3 は Wnt シグナル伝達経路を阻害することにより骨芽細胞への分化を抑制する

第138回日本歯科保存学会春季学術大会  
平成25年6月27日、福岡

池田 峻, **伊藤祥作**, 松下健太, 山本由美子, 山内由香子, 林 美加子: 脂肪細胞への分化を LIF は促進する

第137回日本歯科保存学会秋季学術大会  
平成25年11月23日、広島

松下健太, **伊藤祥作**, 池田 峻, 山本由美子, 山内裕香子, 林 美加子, 恵比須繁之: LIF-STAT3-SOCS3 シグナル伝達経路は骨芽細胞分化を抑制する

第137回日本歯科保存学会秋季学術大会  
平成25年11月23日、広島

〔図書〕(計1件)

**伊藤祥作**, 林 美加子: DNA 配列を読み解くことが難治性根尖性歯周炎の診断へ繋がる?

DENTAL DIAMOND, 38(550):87, 2013

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 細胞表面マーカーをフローサイトメトリーで分析可能な骨芽細胞又は骨芽細胞に分化し得る細胞を得る方法

発明者: 伊藤祥作, 山本由美子, 林 美加子  
権利者: 大阪大学

種類: 特許

番号: 2013-239313

出願年月日: 2013年11月19日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤祥作 (ITO SHOUSAKU)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号: 90360495