

令和元年9月9日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02579

研究課題名(和文)ゲノムワイドアプローチによる歯周病疾患関連遺伝子探索の新展開

研究課題名(英文) Identification of genetic risk factors of aggressive periodontitis by genome wide approach

研究代表者

村上 伸也 (Murakami, Shinya)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：70239490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、ゲノムワイドアプローチを用いて、侵襲性歯周炎の発症・進行に係る候補遺伝子を抽出すること、さらに、同遺伝子の発現ならびに機能解析をin vitro細胞培養系を用いて解明することを目的として行った。本研究への参加に応諾された侵襲性歯周炎患者44名より得られたゲノムDNAを用いて、エクソームシーケンシング解析を行い、得られたデータベースを使用した。この結果を基に、侵襲性歯周炎患者のデータベースと日本人リファレンスライブラリーデータベースと比較した結果、8個の疾患関連遺伝子を同定し、そのうちの4つの遺伝子の機能を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

侵襲性歯周炎は、その特徴に「家族内集積」が挙げられ、遺伝要因が原因でおこる歯周病と考えられている。本研究では、これまでの単一遺伝子に焦点を当てた疾患関連遺伝子を同定する手法とは異なり、ゲノムワイドアプローチによる網羅的バイオインフォマティクス解析手法を用いて、歯周病疾患関連遺伝子の同定を行った。その結果、8個の疾患関連遺伝子を同定し、そのうちの4つの遺伝子の機能を解明した。本研究結果により、日本人の侵襲性歯周炎大規模データベースの構築が創出された。この情報は、侵襲性歯周炎の病態を多面的に理解するために役立つのみならず、成果を利用することで、その治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we used genome-wide approach to identify genetic risk factors associated with the onset and progression of aggressive periodontitis (AgP), and further elucidated the expression and functional analysis of the identified genes using in vitro. Using genomic DNA obtained from 44 patients suffered from aggressive periodontitis who admitted to participate in this study, exome sequencing was performed, and the result was compared with the database contains the genomic information from healthy people. Based on this result, eight AgP-disease-associated genes were identified and the functions of four of them in periodontal ligament cells were elucidated in vitro.

研究分野：歯周病学

キーワード：侵襲性歯周炎 ゲノムワイドアプローチ PON1 歯根膜細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

多くの生活習慣病は、宿主因子と環境因子が複雑に関連し合って発症に至ると考えられており、これら疾患の宿主感受性を決定している疾患関連遺伝子の存在も数多く報告されている。歯周病の直接的原因は、デンタルプラーク（細菌バイオフィーム）であるが、その発症・進行に関しては、いわゆる生活習慣病と同様に、複数の遺伝因子を含む宿主因子と環境因子が深く関わっていると考えられている。しかしながら、これまでの研究成果では、発症前診断に活用できるような明確な疾患感受性との関連を見いだすまでには至っていない。そこで本研究では、とりわけ、遺伝的要因の強い侵襲性歯周炎に着目し、同疾患患者にゲノムワイドアプローチを用いて歯周病の発症・進行に関わる疾患関連遺伝子を抽出し、日本人における侵襲性歯周炎患者のデータベースを構築することを目的とした。それと同時に、環境要因が強く影響する慢性歯周炎の発症や進行に、全身的な健康がどのように影響するのかを検討するために、大阪大学健康長寿研究の高齢長寿者の方々の口と全身のデータベースの拡充を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究課題は、ゲノムワイドアプローチを用いて歯周病の発症・進行に関わる疾患関連遺伝子を抽出し、日本人侵襲性歯周炎データベースを構築することを目的とした。

さらに、大阪大学健康長寿研究に協力いただいている高齢長寿者の方々の口と全身のデータベースの拡充を目的とした。

3. 研究の方法

①侵襲性歯周炎患者のエクソームシーケンス解析

本研究への参加に承諾された侵襲性歯周炎患者 44 名程度より採血を行い、ゲノム DNA を抽出後にエクソームシーケンス解析を行った。得られたデータを基に作成された侵襲性歯周炎患者のデータベースと日本人リファレンスライブラリーデータベースを用いて、バイオインフォマティクス手法を駆使した統計学的解析を行った。また、これらの患者さんの歯周組織検査及びエクソーム線写真撮影を実施した。

②侵襲性疾患関連遺伝子の歯根膜細胞における機能解析

侵襲性歯周炎疾患関連遺伝子と同定された遺伝子をヒト歯根膜細胞への導入実験または抑制実験を行うことで、抽出した遺伝子の歯根膜細胞硬組織形成細胞への分化能への影響を *in vitro* で検討した。さらに、マウスの歯に歯周病を誘導した際に、これらの遺伝子発現がどのように変化するのかを歯肉組織の RNA シーケンス解析を用いて検討した。

③長寿者の全身的な健康と歯周病に関する検討

大阪大学健康長寿研究に協力頂いている高齢長寿者（60 代～90 代）の口腔内診査と一般採血を行い、歯周病の有無と血液検査項目の生化学的結果に関連性がないか否かを検討した。

4. 研究成果

①侵襲性歯周炎患者のエクソームシーケンス解析

本研究への参加に承諾された侵襲性歯周炎患者 44 名（限局型：3 名、後半型：41 名）（男性：15 名、女性：29 名）の平均年齢は 32-35 歳、平均ポケット値は 4.18mm、PISA は 1302.96mm² で、歯槽骨の平均吸収度は 37.47% であった。侵襲性歯周炎患者より採取した末梢血より抽出したゲノム DNA を用いてエクソームシーケンス解析を行った結果、平均深度は 133.25、深度 10 以上のリードは 97.75% であった。得られたエクソームシーケンスデータは、国立遺伝学研究所内の DNA Data Bank of Japan に登録されている（JGAS00000000024 ならびに 40）。得られた結果を、①1000 ゲノムデータベースで MAF が 5% 以下であること、②深度が 10 以上であること、③5 検体以上で検出された SNP であること、④SNP により生じるアミノ酸配列の変異がタンパクの機能・構造に変異を引き起こすと推測された SNP であること、の基準をもとに解析を行った。解析のコントロールには、日本人遺伝子リファレンスデータベース（HGVD: Human Genetic Variation Database）を用いた。SNP の発現頻度に統計学的有意差を認める遺伝子を抽出したところ、8 個の SNP を疾患関連候補遺伝子として同定した。さらに、これらの遺伝子が、歯周病誘導過程でどのように発現変化するのかをマウス歯肉組織の RNA シーケンス解析を用いて検討したところ、これらの遺伝子の下流に存在する遺伝子の発現が歯周病の進行と共に上昇することが明らかとなった。マウスの歯周病進行は歯槽骨の μ CT 撮影で確認した。

②侵襲性疾患関連遺伝子の歯根膜細胞における機能解析

(1) GPR126 機能解析

抽出された疾患関連遺伝子のうち、Gタンパク質共役受容体 (GPR126) の SNP rs536714306 は、疾患群では MAF 2.44% に対して、対照群では 0.27%、P 値は 2.20×10^{-3} 、オッズ比は 9.09、95%信頼区間は 1.64—50.36 となり、SNP の出現頻度に統計学的有意差が認められた。ヒト歯根膜細胞 (HPDL) に野生型または同 SNP を含む変異型 GPR126 を遺伝子導入し、石灰化誘導培地で培養したところ、野生型 GPR126 は BSP ならびにオステオポンチンの発現を上昇させた。一方、変異型 GPR126 HPDL ではこれらの遺伝子の発現上昇を認めなかった。

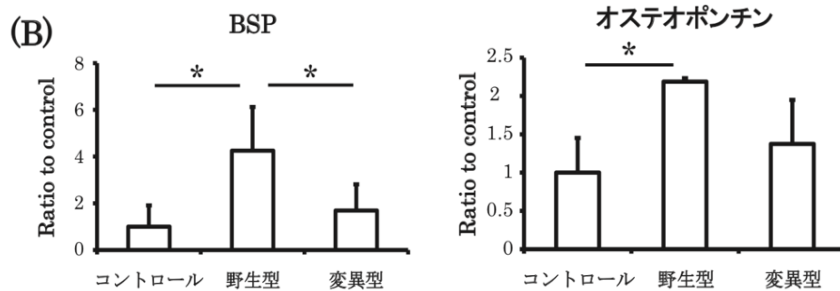


図1 GPR126 WT 及び Mt 導入 HPDL における BSP とオステオポンチンの mRNA 発現

(2) SMPD3 機能解析

抽出された疾患関連遺伝子のうち、スフィンゴミエリナーゼ 2 をコードする遺伝子 (SMPD3) の SNP rs145616324 は、疾患群では MAF 10.23% に対して、対照群では 4.55%、P 値は 1.42×10^{-2} 、オッズ比は 2.39、95%信頼区間は 1.17—4.89 となり、SNP の出現頻度に統計学的有意差が認められた。ヒト歯根膜細胞 (HPDL) に野生型または同 SNP を含む変異型 SMPD3 を遺伝子導入し、石灰化誘導培地で培養したところ、野生型 SMPD3 は ALP ならびに I 型コラーゲンの発現を上昇させた。一方、変異型 SMPD3 HPDL では、これらの遺伝子の発現上昇を認めなかった。

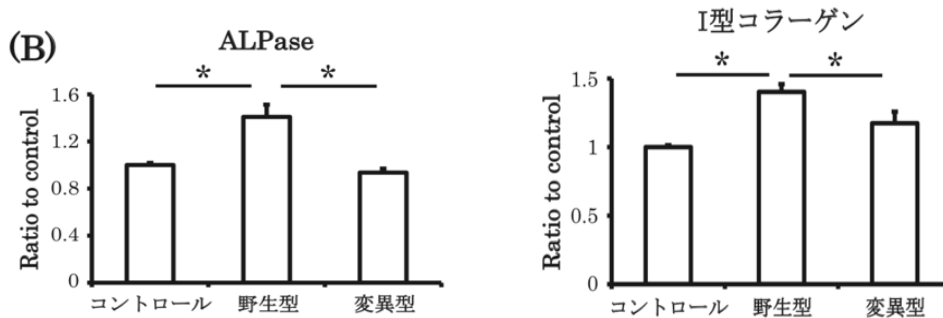


図2 SMPD3 WT 及び Mt 導入 HPDL における ALP と I 型コラーゲンの mRNA 発現

(3) PON1 機能解析

抽出された疾患関連遺伝子のうち、パラオキシナーゼ 1 (PON1) の SNP rs854560 は、疾患群では P 値は 1.90×10^{-2} 、オッズ比は 2.09、95%信頼区間は 1.11—3.91 となり、SNP の出現頻度に統計学的有意差が認められた。ヒト歯根膜細胞 (HPDL) に野生型 PON1 を遺伝子導入し、石灰化誘導培地で培養したところ、野生型 PON1 は ALP ならびに I 型コラーゲンの発現を上昇させた。また、PON1 阻害剤 2-HQ を異なる濃度で添加し、HPDL を石灰化誘導培地で培養すると、培養 19 日目に PON1 阻害剤 2-HQ 添加群では濃度依存的に石灰化物の形成が抑制された。

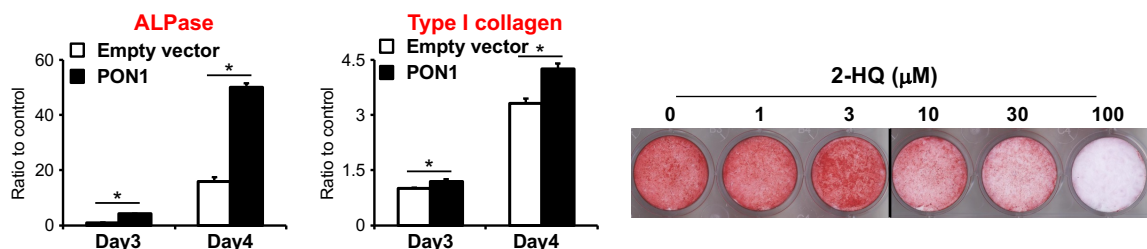


図3 左：PON1 WT 導入 HPDL における ALP と I 型コラーゲンの mRNA 発現
右：PON1 阻害剤 2-HQ 添加した際のアリザリン染色像

③長寿者の全身的な健康と歯周病に関する検討

アテローム性動脈硬化症が認められなかった 182 名のうち、3 年後に実施された再調査で 131 人の参加者 (72.0%) が頸動脈アテローム性動脈硬化症と診断された。多重ロジスティック回帰分析により各因子の影響を調整し解析した結果、4mm 以上の PPD を持つ歯の割合が、アテローム性動脈硬化症の他の危険因子と関係なく、同疾患の発生率と独立して関連していることが明らかになった (オッズ比 (OR) : 1.029、P < 0.022)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Masumoto R, Kitagaki J, Fujihara C, Matsumoto M, Miyauchi S, Asano Y, Imai A, Kobayashi K, Nakaya A, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S, Response to “Identification of genetic risk factors of aggressive periodontitis using genomewide association studies in association with those of chronic periodontitis.”, *J Periodontol Res.*, 2019, jre.12652, In Press (査読なし)
2. Masumoto R, Kitagaki J, Fujihara C, Matsumoto M, Miyauchi S, Asano Y, Imai A, Kobayashi K, Nakaya A, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S, Identification of genetic risk factors of aggressive periodontitis using genomewide association studies in association with those of chronic periodontitis, *J Periodontol Res.*, 2018, jre.12620, In Press (査読あり)
3. Masumoto R, Kitagaki J, Matsumoto M, Miyauchi S, Fujihara C, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S, Effects of paraoxonase 1 on the cytodifferentiation and mineralization of periodontal ligament cells., *J Periodontol Res.*, Apr. 2018, 53(2) 200-209 (査読あり)
4. Miyauchi S, Kitagaki J*, Masumoto R, Imai A, Kobayashi K, Nakaya A, Kawai S, Fujihara C, Asano Y, Yamashita M, Yanagita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S, Sphingomyelin Phosphodiesterase 3 Enhances Cytodifferentiation of Periodontal Ligament Cells, *J Dent Res.* 2017, Mar, 96(3):339-346 (査読あり)
5. Tada S, Ikebe K*, Kamide K, Gondo Y, Inomata C, Takeshita H, Matsuda KI, Kitamura M, Murakami S, Kabayama M, Oguro R, Nakama C, Kawai T, Yamamoto K, Sugimoto K, Shintani A, Ishihara T, Arai Y, Masui Y, Takahashi R, Rakugi H, Maeda Y, Relationship between atherosclerosis and occlusal support of natural teeth with mediating effect of atheroprotective nutrients: From the SONIC study. *PLoS One.* 2017, Aug, 17;12(8):e0182563. (査読あり)
6. Kido JI, Murakami S, Kitamura M, Yanagita M, Tabeta K, Yamazaki K, Yoshie H, Watanabe H, Izumi Y, Suda R, Yamamoto M, Shiba H, Fujita T, Kurihara H, Mizuno M, Mishima A, Kawahara N, Hashimoto K, Naruishi K, Nagata T*. Useful Immunochromatographic Assay of Calprotectin in Gingival Crevicular Fluid for Diagnosis of Diseased Sites in Patients with Periodontal Diseases. *J Periodontol.* 2017, Sep, 6:1-19. (査読あり)
7. 北垣次郎太、榎本梨沙、宮内静香、藤原千春、村上伸也、エクソームシークエンスによる日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索, *日本歯周病学会雑誌* Vol. 59 (2017) No.1, P1-9 (査読なし)
8. Kitagaki J, Miyauchi S, Asano Y, Imai A, Kawai S, Michikami I, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S, A Putative Association of a Single Nucleotide Polymorphism

in GPR126 with Aggressive Periodontitis in a Japanese Population., *PLoS One*. 2016 Aug 10;11(8):e0160765. (査読あり)

9. Yamada S, Ozaki N, Tsushima K, Yamaba S, Fujihara C, Awata T, Sakashita H, Kajikawa T, Kitagaki J, Yamashita M, Yanagita M, Murakami S, Transcriptome reveals cathepsin K in periodontal ligament cells., *J Dent Res*: 95(9):1026-33, 2017 (査読あり)

10. Yamaba S, Yamada S, Kajikawa T, Awata T, Sakashita H, Tsushima K, Fujihara C, Yanagita M, Murakami S, PLAP-1/asporin regulates inflammation through Toll-like receptor 2 and 4, *J Dent Res*: 94: 1706-14, 2015 (査読あり)

11. Awata T, Yamada S, Tsushima K, Sakashita H, Yamaba S, Kajikawa T, Yamashita M, Takedachi M, Yanagita M, Kitamura M, Murakami S, PLAP-1/asporin positively regulates FGF-2 activity, *J Dent Res*: 94 : 1417-24, 2015 (査読あり)

[学会発表] (計 12 件)

1. S Miyauchi, J Kitagaki, R Masumoto, M Yamashita, M Yanagita, S Yamada, M Kitamura, S Murakami, Exome sequencing of aggressive periodontitis in a Japanese population 2017 IADR General Session

2. R Masumoto, J Kitagaki, M Matsumoto, C Fujihara, M Yamashita, S Yamada, M Kitamura, S Murakami, Genetic risk factor for aggressive periodontitis in a Japanese population 第 65 回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会

3. 榎本 梨沙、北垣 次郎太、松本 昌大、宮内 静香、小笹 匡雄、東山 弥生、竹立 匡秀、藤原 千春、山下 元三、山田 聡、北村 正博、村上 伸也、ゲノムワイドアプローチを用いた日本人における侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索, 第 147 回 歯科保存学会秋季学術大会

4. 榎本 梨沙、北垣 次郎太、松本 昌大、宮内 静香、藤原 千春、黒田 智子、田内 拓史、小笹 匡雄、柏木 陽一郎、沢田 啓吾、山下 元三、柳田 学、竹立 匡秀、山田 聡、野崎 剛徳、北村 正博、村上 伸也、日本人における侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索, 第 60 回 秋季日本歯周病学会学術大会

5. S Miyauchi, J Kitagaki, R Masumoto, M Yamashita, M Yanagita, S Yamada, M Kitamura, S Murakami, Exome sequencing of aggressive periodontitis in a Japanese population 2017 IADR GENERAL SESSION

6. 宮内静香、北垣次郎太、山下元三、山田聡、北村正博、村上伸也、ゲノムワイドアプローチによる日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索, 第 144 回日本歯科保存学会 2016 年度春季学術大会

7. 北垣次郎太、宮内静香、村上伸也、日本人侵襲性歯周炎のヒトエクソーム解読と遺伝子多型解析, NGS 現場の会 第 4 回研究会

8. J KITAGAKI, S MIYAUCHI, M YAMASHIYA, S YAMADA, M KITAMURA, S MURAKAMI, Identification of genetic risk factor for Japanese aggressive periodontitis by genome-wide association study, Oral and Craniofacial Development and Diseases

9. 北垣次郎太、宮内静香、今井敦子、朝野仁裕、河合伸治、道上郁美、山下元三、山田聡、北村正博、村上伸也、ゲノムワイドアプローチによる日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索, 第 38 回日本分子生物学会年会

10. 北垣次郎太、宮内静香、山下元三、山田聡、北村正博、村上伸也、日本人侵襲性歯周炎のヒトエクソーム解読と遺伝子多型, 第 143 回秋季保存学術大会

11. 北垣次郎太、宮内静香、村上伸也、日本人侵襲性歯周炎患者のヒトエクソーム解読と遺伝子多型解析, NGS 現場の会 第 4 回研究会

[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:

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：
国内外の別：

〔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 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(JGA00000000024 と 40)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：北村 正博

ローマ字氏名：KITAMURA Masahiro

所属研究機関名：大阪大学

部局名：大学院歯学研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：10243247

研究分担者氏名：山田 聡

ローマ字氏名：YAMADA Satoru

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学院歯学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：40359849

研究分担者氏名：山下 元三

ローマ字氏名：YAMASHITA Motozo

所属研究機関名：大阪大学

部局名：歯学部附属病院

職名：講師

研究者番号（8桁）：90524984

研究分担者氏名：竹立 匡秀

ローマ字氏名：TAKEDACHI Masahide

所属研究機関名：大阪大学

部局名：歯学部附属病院

職名：講師

研究者番号（8桁）：60452447

研究分担者氏名：池邊 一典

ローマ字氏名：IKEBE Kazunori

所属研究機関名：大阪大学

部局名：大学院歯学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：70273696

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。