

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H01069

研究課題名（和文）統合オミクス解析に基づく侵襲性歯周炎の病態理解

研究課題名（英文）Understanding of pathogenesis of aggressive periodontitis by omics data

研究代表者

村上 伸也（Shinya, Murakami）

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：70239490

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 35,800,000円

研究成果の概要（和文）：これまでに、我々は、日本人における侵襲性歯周炎（AgP）患者の疾患関連遺伝子を同定するためにゲノムワイド関連研究（GWAS）を実施してきた。しかしながら、AgPのゲノムサンプル数が少ないため、統計学的に有意な差を認める疾患関連遺伝子を抽出することが困難であった。この問題を解決するために、本研究では、日本人AgP患者のゲノムサンプルを拡充し、より大きな日本人AgPゲノムデータベースを構築することを目的とした。さらに、日本人AgPのゲノムデータベースを用いてGWASを行い、PON-1やLIPAなどの日本人AgP関連候補遺伝子を特定し、これらの疾患関連候補遺伝子のAgPへの関与を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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、疾患関連遺伝子を同定するためには、多くの検体数が必要となる。本研究では、多施設共同研究を推進することで、日本中の歯科大学において、侵襲性歯周炎（AgP）患者のリクルートを実施し、検体数の拡充を実施した。そして本研究成果により、日本人の侵襲性歯周炎大規模データベースを構築した。この情報は、AgPの病態を多面的に理解するために役立つのみならず、今後、この成果を利用することでAgPの治療法の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：Aggressive periodontitis (AgP) is characterized by general health and rapid destruction of periodontal tissue. The familial aggregation of this disease highlights the involvement of genetic factors in its pathogeny. Previously, we conducted a genome-wide association study (GWAS) to identify AgP-related genes in a Japanese population; however, the small genome sample size remains unsolved issue. Thus, in this study, we aimed to expand the genome samples of Japanese AgP patients and establish a bigger Japanese AgP genome database. In addition, using the AgP database, we conducted a GWAS and identified Japanese AgP-related candidate genes such as PON-1 and LIPA. Furthermore, we confirmed the involvement of these disease-related candidate genes in AgP by the functional analyses.

研究分野：歯学

キーワード：侵襲性歯周炎 エクソームシーケンス解析 GWAS SNP 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

侵襲性歯周炎 (AgP) は遺伝的要因の関与が大きい歯周炎として知られている。我々はこれまでの研究において、日本人における AgP 患者のデータベースの構築を推進し、AgP 疾患関連遺伝子を同定するために、ゲノムワイドアプローチ解析 (GWAS) を実施してきた。しかしながら、精度の高い GWAS 解析の実施には多くの検体数が必要であり、日本人 AgP データベースの検体数の拡充が課題として残されていた。

2. 研究の目的

- (1) 日本人侵襲性歯周炎患者のゲノムデータベースの拡充を行い、新たに構築されたデータベースを公的に活用する基盤を構築すること。
- (2) 構築したデータベースを用いて、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) を遂行することにより、AgP の発症・進行にかかわる疾患関連遺伝子を同定すること。

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

日本の歯科大学及び歯科医院 14 施設の協力を得て、多施設共同研究を実施した。本研究への参加に応諾された侵襲性歯周炎患者より採血を実施し、ゲノム DNA を抽出後、エクソームシーケンス解析を実施した。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の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実施した。さらに、被験者に対して問診、歯周組織検査及びレントゲン撮影を実施し、被験者の臨床検査データを蓄積した。

(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を行い、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、当該遺伝子が歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を制御する分子メカニズムを検討した。

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

本研究への参加に応諾された侵襲性歯周炎患者 112 名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。得られた結果を、a. 1000 ゲノムデータベースで minor allele frequency (MAF) が 5% 以下であること、b. 深度が 10 以上であること、c. 5 検体以上で検出された single nucleotide polymorphisms (SNP) であること、d. SNP 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、の基準をもとに疾患関連候補遺伝子の抽出を行った。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、日本人 AgP 疾患関連候補遺伝子として同定した。

(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

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 はアルカリフォスファターゼ (ALPL) ならびに I 型コラーゲン (COL1A1) の発現を上昇させた。

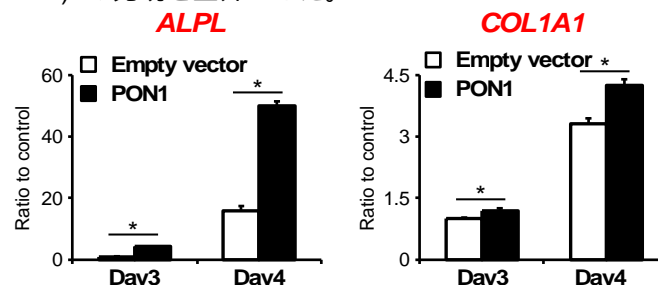


図1 PON1 WT 導入 HPDL における ALPL と COL1A1 の mRNA 発現

LIPA 機能解析

抽出された疾患関連遺伝子のうち、リパーゼ A (LIPA) の SNP rs143793106 は、疾患群では P 値は 3.7×10^{-2} 、オッズ比は 2.82、95%信頼区間は 1.02 - 7.81 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 (WT) LIPA あるいは変異型 (mut) LIPA を遺伝子導入し、石灰化誘導培地で培養したところ、変異型 LIPA は野生型 LIPA と比較して RUNX2、ALPL、COL1A1、オステオカルシン (BGLAP) の発現を低下させた。

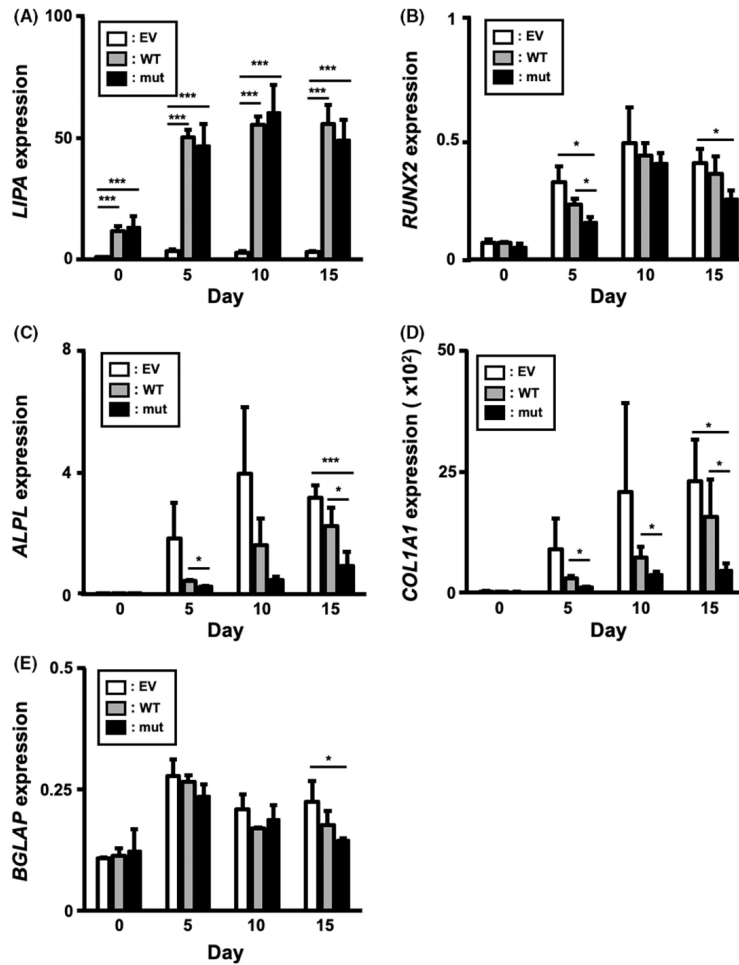


図 2 LIPA WT, mut 導入 HPDL における石灰化関連遺伝子の mRNA 発現

(3) LIPA が歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を促進するメカニズムに関する検討

LIPA 特異的阻害薬 Lalistat-2 存在下あるいは非存在下に、HPDL を硬組織形成細胞へと分化誘導した。そして、分化誘導の過程における細胞からのアデノシン三リン酸 (ATP) の産生率を測定した。その結果、HPDL は硬組織形成細胞への分化過程において ATP の産生率が上昇することを見出した。一方、Lalistat-2 存在下では、酸化的リン酸化 (OXPHOS) を介した ATP の産生率が減少することを見出した。すなわち、歯根膜細胞は、脂質を代謝し、OXPHOS を駆動することにより、ATP を産生して分化に必要なエネルギーを獲得することが明らかとなった。

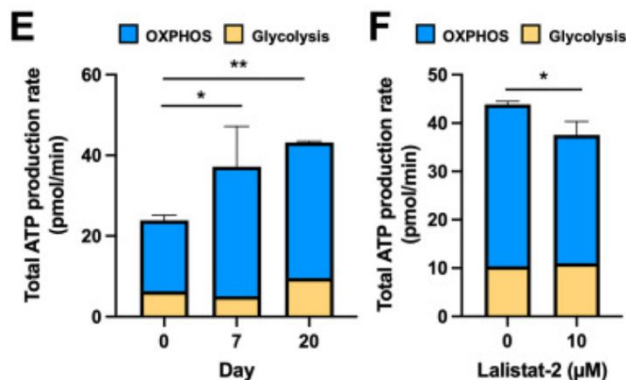


図 3 歯根膜細胞の分化過程における OXPHOS と解糖系由来の ATP 産生率

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3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 C Fujihara, T Nantakeeratipat, S Murakami	4. 巻 3
2. 論文標題 Energy metabolism in osteogenic differentiation and reprogramming: A strategy for periodontal regeneration.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Dent Med	6. 最初と最後の頁 815140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fdmed.2022.815140	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 -
1. 著者名 村上伸也、藤原千春、岩山智明	4. 巻 39(2)
2. 論文標題 歯周病新分類の解釈とその応用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本臨床歯周病学会誌39(2)	6. 最初と最後の頁 20-26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masahiro Kitamura, Motozo Yamashita, Chiharu Fujihara, Yoichiro Kashiwagi, Tomoaki Iwayama,, Shinya Murakami et.al.	4. 巻 109(2)
2. 論文標題 Association of periodontal disease with atherosclerosis in 70-year-old Japanese older adults.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 506-513
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10266-020-00567-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 藤原千春、北垣次郎太、榎本梨沙、松本昌大、山本 優、村上伸也	4. 巻 40
2. 論文標題 歯の早期喪失と老後のQOL、認知機能、生命予後等の関連性を縦断的に追跡調査可能とするための新たな診断法の開発と罹患率のパイロット調査	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本歯科医学会誌	6. 最初と最後の頁 49-54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 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	4. 巻 54(5)
2. 論文標題 Response to "Genetics of Periodontitis without Bias".	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 455, 456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.12652	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件(うち招待講演 3件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Teerachate Nantakeeratipat, 藤原 千春、松本 昌大、榎本 梨沙、山本 優、北垣 次郎太、北村 正博、村上 伸也
2. 発表標題 日本人侵襲性炎症疾患関連遺伝子Claspinのヒト歯根膜細胞における機能解析
3. 学会等名 第154回春季日本歯科保存学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本 昌大、藤原 千春、北垣 次郎太、Teerachate Nantakeeratipat、榎本 梨沙、山本 優、村上 伸也
2. 発表標題 日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子LIPA SNP rs14379316のヒト歯根膜細胞における機能解析
3. 学会等名 第155回秋季日本歯科保存学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Teerachate Nantakeeratipat, Chiharu Fujihara, Masahiro Matsumoto, Risa Masumoto, Yu Yamamoto, Jirouta Kitagaki, Shinya Murakami
2. 発表標題 Lipolysis Is Involved in Cytodifferentiation of Human Periodontal Ligament Cells
3. 学会等名 The 2021 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柏木陽一郎、北村正博、村上伸也
2. 発表標題 侵襲性歯周炎患者に対して包括的治療を行なった10年経過症例
3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栞本梨沙, 藤原千春, 松本昌大, 山本優, 北垣次郎太, 北村正博, 村上伸也
2. 発表標題 日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子Paraoxonase-1の機能解析
3. 学会等名 第153回秋季日本歯科保存学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Teerachate Nantakeeratipat, 藤原千春, 松本昌大, 栞本梨沙, 北垣次郎太, 山本優, 木下茉優, 北村正博, 村上伸也
2. 発表標題 Identification of genetic risk factors of aggressive periodontitis in the Japanese population
3. 学会等名 第63回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masumoto R, Fujihara C, Matsumoto M, Kitagaki J, Murakami S
2. 発表標題 Paraoxonase-1, a risk factor of Aggressive Periodontitis
3. 学会等名 The 98th General Session of the International Association of Dental Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上 伸也
2. 発表標題 歯周病の新分類から侵襲性歯周炎を再考する
3. 学会等名 日本歯周病学会 第5回近畿地区(滋賀)臨床研修会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤原 千春
2. 発表標題 遺伝子多型解析から侵襲性歯周炎を再考する
3. 学会等名 日本歯周病学会 第5回近畿地区(滋賀)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	藤原 千春 (FUJIHARA CHIHARU) (00755358)	大阪大学・大学院歯学研究科・助教 (14401)	
研究分担者	柏木 陽一郎 (KASHIWAGI YOICHIRO) (20598396)	大阪大学・大学院歯学研究科・助教 (14401)	
研究分担者	岩山 智明 (IWAYAMA TOMOAKI) (80757865)	大阪大学・大学院歯学研究科・助教 (14401)	

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	山下 元三 (YAMASHITA MOTOZO) (90524984)	大阪大学・歯学部附属病院・講師 (14401)	

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