



Title	日本人侵襲性歯周炎疾患関連候補遺伝子KCNK4のヒト歯根膜細胞における機能解析
Author(s)	平岡, 康弘
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/105350
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (平岡 康弘)

論文題名 日本人侵襲性歯周炎疾患関連候補遺伝子 *KCNK4* のヒト歯根膜細胞における機能解析

論文内容の要旨

【研究目的】

侵襲性歯周炎 (AgP) は、全身的に健康であるが急速な歯周組織の破壊を示すことを特徴とする疾患である。また、家族内集積を認めることがあるという特徴から、AgPの病態形成には遺伝的要因の関与が示唆されている。これまでにAgP疾患関連遺伝子の一塩基多型 (SNP) の探索が行われてきたが、未だ疾患との明確な関連を見出すには至っていない。この理由として、従来のAgP疾患関連遺伝子の探索は、特定の骨代謝や炎症に関連する遺伝子を対象としたものがほとんどであったことがあげられる。その解決策として近年ではゲノムワイドアプローチが用いられるようになってきた。ゲノムワイドアプローチとは網羅的に遺伝子解析を行う手法であり、これにより疾患との関連が指摘されていなかった遺伝子の探索が可能となった。また、これまでにゲノムワイドアプローチにより報告されてきた疾患関連遺伝子の約85%がエクソン領域に存在することが明らかとなっている。そこで本研究では、エクソン領域に焦点を絞ったエクソームシーケンズ解析を実施することで、日本人AgP疾患関連遺伝子の探索を行った。その解析の結果同定された日本人AgPの疾患関連候補遺伝子について、歯周組織における機能を解析することで、当該遺伝子が日本人AgPの疾患関連遺伝子であることを検証することを目的とした。

【材料および方法】

(1) ゲノムワイドアプローチを用いた日本人におけるAgPの疾患関連候補遺伝子SNPの探索

2015年から2022年までに、大阪大学歯学部附属病院を含む12校の歯科大学附属病院および協力医療機関を受診し、日本歯周病学会の定義に従いAgPと診断された患者の中から、本研究への参加に応諾した127名を被験者とした (疾患群) (大阪大学ヒトゲノム研究承認番号 624-6)。非歯周病患者74名 (非歯周病群) をコントロールとした。疾患群および非歯周病群より採血を行い、末梢血よりゲノムDNAを抽出し、エクソームシーケンズ解析を行った。

(2) 歯周組織構成細胞における *KCNK4* の発現の検討

歯周組織構成細胞であるヒト歯肉上皮細胞 (HGE)、ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) およびヒト歯根膜細胞 (HPDL) におけるPotassium Two Pore Domain Channel Subfamily K Member 4 (*KCNK4*) のmRNAおよびタンパクの発現をリアルタイムPCR法およびウエスタンブロット法を用いて評価した。次に、HPDLを β -グリセロリン酸 (5 mM) とアスコルビン酸 (50 μ g/ml) を含む α MEM培地 (石灰化誘導培地) にて21日間培養した際の、経時的な *KCNK4* のmRNA発現の変化をリアルタイムPCR法にて検討した。

(3) *KCNK4* を遺伝子導入したHPDLの作製およびカリウムチャネル活性の測定

レンチウイルスベクターを用いて *KCNK4* を遺伝子導入したHPDLを作製した。コントロールにはempty vector (EV) 導入HPDLを用いた。遺伝子導入後、ピューロマイシンを用いて薬剤耐性セクションを行った。リアルタイムPCR法およびウエスタンブロット法を用いて遺伝子導入したHPDLにおける *KCNK4* のmRNA発現およびタンパクの発現を確認した。遺伝子導入したHPDLのカリウムチャネル活性をタリウムフラックスアッセイを用いて測定した。

(4) HPDLの硬組織形成細胞への分化過程における *KCNK4* の機能解析

遺伝子導入したHPDLを石灰化誘導培地にて21日間培養した。HPDLの硬組織形成細胞への分化過程において、石灰化関連遺伝子 (*RUNX Family Transcription Factor 2 (RUNX2)*、*Alkaline Phosphatase (ALPL)*、*Type I Collagen (COL1A1)*) のmRNA発現の経時的な変化を、リアルタイムPCR法を用いて検討した。さらに、HPDLの硬組織形成細胞への分化過程において、アルカリフォスファターゼ活性の経時的な変化を測定した。加えて、アリザリンレッド染色により、35日目における石灰化ノジュールの形成について検討した。

【結果】

(1) ゲノムワイドアプローチを用いた日本人におけるAgPの疾患関連候補遺伝子SNPの探索

ゲノムワイドアプローチを用いたエクソームシーケンス解析の結果、全エクソン領域中1検体当たり約266,000個のSNPを検出した。①1000ゲノムデータベースで東南アジアにおけるマイナー対立遺伝子頻度 (MAF) が1%未満、②深度が5以上、③dbSNP build 156でCOMMONの変異を除外、④タンパクに異常を引き起こすと推測されるSNP、⑤5検体以上で認められるSNP、という条件でフィルタリングを行った結果、475個のSNPを抽出した。その後、疾患群と健常群 (日本人ゲノムデータベース: Human Genetic Variation Database (HGVD)) におけるMAFを比較した結果、MAFに統計学的有意差 ($p < 0.05$) を認めた86個のSNPを抽出した。さらに、疾患群と非歯周病群のMAFを比較し、MAFに統計学的有意差 ($p < 0.05$) を認めるSNPを抽出し、最終的に7個の疾患関連候補遺伝子SNPを同定した。抽出された7個のAgP疾患関連候補遺伝子SNPの一つである、*KCNK4* のSNP rs146535799 (c. 686C>A, p. Pro229Gln) に着目した。疾患群における*KCNK4* のSNP rs146535799のMAFは2.76%であったのに対し、健常群でのMAFは0.71%、非歯周病群でのMAFは0%であった。疾患群と健常群を比較した際の p 値は 1.07×10^{-3} 、オッズ比は3.96、95%信頼区間は1.63-9.65であった。また、疾患群と非歯周病群を比較した際の p 値は 4.16×10^{-2} であった。カリウムチャネルファミリーに属する*KCNK4* 遺伝子は、顔面異形成および歯肉増殖を特徴とする、Facial Dysmorphism, Hypertrichosis, Epilepsy, Intellectual / Developmental Delay, and Gingival Overgrowth (FHEIG) 症候群との関連が報告されている。しかしながら、歯周組織構成細胞における*KCNK4*の発現および機能についての報告はこれまでにない。そこで、*KCNK4* に焦点を当て、詳細な検討を進めていくことにした。

(2) 歯周組織構成細胞における*KCNK4*の発現の検討

リアルタイムPCR法およびウエスタンブロット法の結果、*KCNK4*の発現は、HGEおよびHGFと比較して、HPDLにおいて有意に高いことが明らかとなった。また、リアルタイムPCR法の結果、HPDLの硬組織形成細胞への分化過程において、*KCNK4* のmRNA発現が有意に上昇することが明らかとなった。

(3) *KCNK4* を遺伝子導入したHPDLの作製およびカリウムチャネル活性の測定

リアルタイムPCR法およびウエスタンブロット法の結果、EV導入HPDLと比較して、*KCNK4* を導入したHPDLは、有意に高い*KCNK4* mRNA発現および*KCNK4*タンパク発現を示した。これにより、遺伝子導入が正常に行われたことを確認した。タリウムフラックスアッセイの結果、EV導入HPDLと比較して、*KCNK4* を導入したHPDLにおいて、有意に高いカリウムチャネル活性を認めた。

(4) HPDLの硬組織形成細胞への分化過程における*KCNK4*の機能解析

硬組織形成細胞への分化過程において、EV導入HPDLと比較して、*KCNK4* を導入したHPDLでは、有意に高い*RUNX2*、*ALPL*、および*COL1A1* mRNAの発現を示すことが明らかとなった。同様に、EV導入HPDLと比較して、*KCNK4* を導入したHPDLは、有意に高いアルカリフォスファターゼ活性および石灰化ノジュールの形成を示すことが明らかとなった。

【結論および考察】

ゲノムワイドアプローチを用いたエクソームシーケンス解析の結果より、*KCNK4* のSNP rs146535799を日本人における新規のAgP疾患関連候補遺伝子SNPとして同定した。HPDLにおける*KCNK4*の機能解析の結果、*KCNK4*は、HPDLの硬組織形成細胞への分化を促進することで、歯周組織の恒常性維持に関与することが示唆された。これらの知見から、*KCNK4* のSNP rs146535799は、歯周組織の恒常性を破綻させることでAgPの病態形成に関与することが推察される。本研究により同定された*KCNK4* のSNP rs146535799を、AgPのリスク診断マーカーとして使用することで、将来的には、AgPの早期診断や予防的介入が可能となる。これにより、AgPの前診断による発症予防に貢献することができ、臨床的にも大きな意義を持つことが期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (平 岡 康 弘)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	竹立 匡秀
	副 査	教授	川端 重忠
	副 査	准教授	早田 敦子
	副 査	講師	竹内 洋輝
論文審査の結果の要旨			
本研究は、エクソームシーケンスを用いたゲノムワイドアプローチにより、日本人侵襲性歯周炎 (AgP) の疾患関連遺伝子を探索したものである。 その結果、<i>Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K Member 4 (KCNK4)</i> の SNP rs146535799 を含む 7 個の遺伝子を日本人 AgP の疾患関連候補遺伝子 SNP として同定した。さらに、ヒト歯根膜細胞 (HPDL) における KCNK4 の機能解析の結果、KCNK4 は、石灰化関連遺伝子の mRNA 発現、アルカリフォスファターゼ活性、および石灰化ノジュールの形成を上昇させることが明らかとなった。 以上の結果から、本研究は、KCNK4 が HPDL の硬組織形成細胞への分化を促進し、歯周組織の恒常性維持に寄与する可能性を示すとともに、日本人 AgP における疾患関連候補遺伝子として KCNK4 の関与を示したものと評価できる。これらの研究成果は、日本人 AgP 患者の遺伝的背景の理解を深める上で有用な知見を提供するものと認められる。 よって、博士 (歯学) の学位論文として価値のあるものと認める。			