The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	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
Author(s)	宮内, 静香
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61649
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　宮内　静香　）	
論文題名	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

論文内容の要旨

【研究目的】

侵襲性歯周炎は、「全身的には健康であるが、急速な歯周組織破壊（歯槽骨吸収、付着の喪失）、家族内集積を認めることを特徴とする歯周炎」である。「家族内集積を認める」という特徴から、その発症には遺伝的要因の関与が高いと考えられており、現在までに、炎症性サイトカイン（TNF-αやIL-1）、Fc受容体、マトリックス分解酵素（MMP）等の一塩基多型（SNP: Single Nucleotide Polymorphism）が、侵襲性歯周炎の発症・進行と関連する可能性が示唆されている。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。その理由の一つとして、単一遺伝子の遺伝子多型に焦点を当てた研究が進められてきた背景がある。また、炎症や骨代謝に関連した機能既知の遺伝子を対象に行われた研究がほとんどであるため、全ゲノム上に存在する未知領域に踏み込んだゲノムワイドアプローチ（GWAS）による網羅的解析が全くなされていないのが実情である。

一方で、遺伝子解析技術は目覚ましい発展を遂げており、あらゆる疾患の疾患関連遺伝子の同定が、次世代シークエンサーを用いたGWASによって網羅的になされるというのが、現在の医学界の世界的傾向となっている。侵襲性歯周炎については、ドイツ人・オランダ人を対象としたGWASによって、GLT6D1 が疾患関連遺伝子として同定されるなど、欧米人を対象とした研究は数多くなされている。しかし、日本人を含むアジア人を対象としたGWASの報告はされておらず、疾患関連遺伝子同定には至っていない。そこで本研究において我々は、エクソームシークエンス（ヒトゲノムのエクソン領域のみを網羅的に解析する手法）によるGWASを駆使し、日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索を行った。さらに、本解析によって得られた疾患関連候補遺伝子の機能解析を目的とした*in vitro*細胞培養実験を行い、当該遺伝子のヒト歯根膜細胞における役割を、分子生物学的手法を用いて検討した。

【方法および結果】

大阪大学歯学部附属病院口腔治療・歯周科を受診し、日本歯周病学会の定義に従い侵襲性歯周炎と診断された患者の中から、本研究への参加を応諾した者を対象としてゲノムDNA採取を目的とした採血を行った（大阪大学ヒトゲノム研究承認番号 629）。侵襲性歯周炎患者の平均年齢は32.55歳、平均ポケット値は4.18mm、歯周組織の平均炎症面積は1302.96mm^2、Scheiのルーラーを用いた歯槽骨の平均吸収率は37.47％であった。

研究開始当初より同意が得られていた13名の血液よりDNAを採取し、エクソームシークエンスを実施したところ、1名につき約78,000個のSNPのデータベースが得られた。本データベースを用いた疾患関連候補遺伝子の抽出に際し、以下の①～④を選定基準とした。① 1000ゲノムデータベースでSNPの出現頻度（MAF: minor allele frequency）が5%以下であること。② 深度が10以上であること。③ 13名中5名以上で検出されたSNPであること（13名の疾患群におけるMAFが約20%以上であること）。④　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ること。以上①～④の選定基準をもとに、得られたデータベースの解析を行ったところ、48個のSNPが抽出された。さらに、先述した13名に新たに本研究への参加に同意を得られた31名を加えた44名を侵襲性歯周炎疾患群とし、抽出された48個のSNPのMAFを同定した。本研究の対照群としては、京都大学が一般公開している日本人遺伝子多型データベースを用いた。これらの解析結果を基にして、対照群と疾患群を比較検討し、SNPの発現頻度に統計学的有意差（$p < 0.05$）を認める遺伝子を抽出したところ、8個のSNPが疾患関連候補遺伝子として抽出された。

抽出された8個のSNPの詳細を検討し、生体膜リン脂質の主要構成成分であるスフィンゴ脂質を分解する酵素、中性スフィンゴミエリナーゼ2（nSMase2: neutral sphingomyelinase 2）をコードする遺伝子sphingomyelin phosphodiesterase 3（SMPD3）のSNP rs145616324（c.412C>T, p.Leu138Phe）に焦点を当て、その機能解析を実施することとした。その理由としては、①　SMPD3ノックアウトマウスにおいて骨格形成が遅延していること。②　骨形成不全症モデルマウス*fro/fro*マウスにおいてSMPD3遺伝子が一部欠失していることが報告されており、SMPD3の硬組織形成への関与が示唆されていること。③　*fro/fro*マウスにおいて歯槽骨ならびに象牙質形成が抑制されていることが報告されており、SMPD3が歯周組織の恒常性維持に深く関与している可能性が示唆されていることが挙げられる。

侵襲性歯周炎疾患群におけるSNP rs145616324のMAFが10.23％であるのに対し、対照群でのMAFは4.55％であり、*p*値は1.42×10^{-2}、オッズ比は2.39、95％信頼区間は1.17～4.89であった。

そこで、歯根膜細胞の骨芽細胞への分化におけるSMPD3の効果を検討した。ヒト歯根膜細胞株（HPDL）を石灰化誘導培地（10% FCS、5 mM β-グリセロリン酸、50 μg/ml アスコルビン酸含有α-MEM）を用いて長期培養した後、RNAを回収し*SMPD3*の発現をリアルタイムPCR法にて検討した。その結果、HPDLの骨芽細胞への分化に伴い、*SMPD3*の発現が上昇したことから、SMPD3がHPDLの骨芽細胞への分化に関与している可能性が推測された。次に、HPDLにnSMase阻害剤GW4869を1 μM添加し、石灰化誘導培地にて長期培養した。RNA回収後、リアルタイムPCR法にて石灰化関連因子であるアルカリホスファターゼ（ALP: alkaline phosphatase）、Ⅰ型コラーゲン（*COL1A1*）、*Osteocalcin*（*OC*）の発現を、また細胞粉砕回収後、ALP活性を解析した。その結果、対照群と比較してGW4869添加群では、*ALP*、*COL1A1*、*OC*の発現ならびにALP活性が有意に低下していることを見出した。このことから、SMPD3がHPDLの骨芽細胞への分化を促進していることが示唆された。

次に、SNP rs145616324のHPDLの骨芽細胞への分化に対する効果を検討することを目的として、野生型SMPD3またはSNP rs145616324を含む変異型SMPD3を挿入したプラスミドをHPDLに遺伝子導入し、2日間石灰化誘導培地で培養した。SNP rs145616324のスフィンゴミエリナーゼ活性を検討したところ、野生型SMPD3は、スフィンゴミエリナーゼ活性を上昇させたのに対し、変異型SMPD3はスフィンゴミエリナーゼ活性を上昇させなかったことから、SNP rs145616324により、nSMase活性が減弱していることが明らかとなった。さらに、リアルタイムPCR法を用いて*ALP*、*COL1A1*、*Osteopontin*（*OPN*）、*Osterix*（*OSX*）、*RUNX2*の発現を検討したところ、野生型SMPD3はこれらの遺伝子の発現を上昇させたのに対し、変異型SMPD3を過剰発現させたHPDLでは、これらの遺伝子の発現上昇は認められなかった。以上のことから、SNP rs145616324により、SMPD3の機能活性が減弱し、野生型SMPD3でみられたHPDLの骨芽細胞への分化能を欠失していることが明らかとなった。

【考察および結論】

本研究において我々は、エクソームシークエンスを用いたGWASを行い、SMPD3のSNP rs145616324を日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子として同定した。また*in vitro*細胞培養実験を行い、SMPD3がヒト歯根膜細胞（HPDL）の骨芽細胞への分化を促進すること、SNP rs145616324によりSMPD3によるスフィンゴミエリナーゼ活性が低下すること、さらにはSNP rs145616324を過剰発現させたHPDLでは、骨芽細胞への分化が認められないことを見出した。

SMPD3は細胞膜のリン脂質の一つであるスフィンゴミエリンをセラミドに加水分解する酵素である。さらにセラミドは、セラミド分解酵素であるセラミダーゼにより、スフィンゴシン1リン酸（S1P）へと分解されることが知られている。S1Pは、骨芽細胞様細胞株C2C12細胞におけるBMP-2誘導性のRunx2ならびにALPの発現を上昇させることにより、骨芽細胞の分化を制御することが報告されている。さらにS1Pのアゴニストである FTY720を用いた研究から、FTY720が、C2C12細胞ならびにマウス長管骨におけるBMP-2誘導性のカルシウムノジュール形成を促進させることや、骨表面の破骨細胞数を減少させることにより骨粗鬆症の進行を制御するといった報告もある。そのため、S1Pが骨芽細胞ならびに破骨細胞の増殖・分化を制御することにより、硬組織形成を調節していると考えられる。一方で、C2C12細胞においてBMP-2がSMPD3の発現上昇を司っているといった報告もある。以上から、BMP-2により誘導されるSMPD3が、セラミドを介してS1Pの発現を上昇させた結果、硬組織形成が誘導されると考えられる。

本研究の結果から、SMPD3の歯根膜細胞の骨芽細胞への分化に対する役割を以下のように考察する。44名の日本人侵襲性歯周炎患者を検体としてGWASを行ったところ、SMPD3を疾患関連遺伝子として同定した。SMPD3は、その下流因子であるセラミドならびにS1Pを介して、ALPならびにRunx2といった石灰化関連因子の発現を上昇させ、硬組織形成の促進や歯根膜細胞の骨芽細胞への分化を誘導していると考えられる。一方で、侵襲性歯周炎患者に多く見られるSNP rs145616324は、SMPD3の活性を低下させ、その結果として上記石灰化関連因子の発現上昇を欠如させると考えられる。そのため、SNP rs145616324により、歯根膜細胞の骨芽細胞への分化誘導能は低下し、歯周組織の恒常性の破綻、ならびに侵襲性歯周炎の発症の一因となると考えられる。今後は、本研究によって得られたSMPD3のSNP rs145616324を指標とした、これまでに例を見ない侵襲性歯周炎の早期診断へと繋げ、早期治療による侵襲性歯周炎の進行予防へと繋げたいと考えている。さらには、近年注目されている、がん治療におけるプレシジョン・メディシンと同様に、ケミカルスクリーニングを行って分子標的薬を作製し、侵襲性歯周炎の治療へと応用したいと考えている。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　宮内　静香　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	村上　伸也
	副 査　教授	野田　健司
	副 査　准教授	波多　賢二
	副 査　講師	伊藤　祥作

論文審査の結果の要旨

本研究は、エクソームシークエ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の疾患関連遺伝子を探索したものである。

その結果、Sphingomyelin Phosphodiesterase3 （SMPD3）遺伝子上の SNP rs145616324 を日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子として同定した。また、*in vitro* 機能解析実験を行い、SMPD3 がヒト歯根膜細胞（HPDL）の骨芽細胞への分化を促進すること、SNP rs145616324 により SMPD3 の活性が低下すること、さらには SNP rs145616324 を過剰発現させた HPDL では、骨芽細胞への分化が認められないことを見出した。これらの研究成果は、SNP rs145616324 により、SMPD3 依存性の歯根膜組織の恒常性に破綻をきたし、侵襲性歯周炎が惹起される可能性を示唆しており、日本人侵襲性歯周炎患者の遺伝要因を解明する上で重要な知見を与えるものである。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。