

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

学位論文

# 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

## 大阪大学大学院歯学研究科 口腔科学専攻

口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学

# 宮内 静香

(指導教員:村上 伸也 教授)

侵襲性歯周炎は、「全身的には健康ではあるが、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<sup>(1)</sup>。 また、一般的には細菌性プラーク付着量は少なく、患者は10~30歳代が多く、 日本における罹患率は0.05~0.1%と言われている<sup>(2)</sup>。「家族内集積を認める」と いう特徴から、従来よりその発症には遺伝的要因の関与が高いと考えられ、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 やカテプシン)等の一塩基多型(SNP:Single Nucleotide Polymorphism)が、侵襲性歯周炎の発症・進行と関連することを示唆する報告 がなされている<sup>(3,4)</sup>。一方、日本人を対象とした近年の報告では、319名の歯周 炎患者(慢性歯周炎147名、侵襲性歯周炎172名)と303名からなる対照群を 比較し、過去に歯周炎との関連が報告されている 35 の SNP の出現頻度 (MAF: minor allele frequency) を詳細に検討しているが、疾患群と対照群における MAF に有意差を認める SNP の同定には至らなかった<sup>(5)</sup>。このように、これま での研究成果では、発症前診断において侵襲性歯周炎の疾患感受性が高いと明 確に診断できるような疾患関連遺伝子の同定がなされていないのが現状である。 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絞った研究が進めら 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 んだ解析は全くされていないのが実情である。

一方で、遺伝子解析技術は日進月歩で進化し、とりわけ、次世代シークエンサ ーの技術革新は目覚ましい発展を遂げ、遺伝子解析技術の発展の一翼を担って いる。2003年に「ヒトゲノム計画」が完了した際、13年という期間と3千億円 (30億ドル)の費用を費やしたのに対し、2007年には、2カ月という期間と1 億2千万円(100万ドル)の費用しかからなかった。その背景には、2005年に アメリカのベンチャー企業により開発された次世代シークエンサーの登場があ るとされている<sup>(6)</sup>。次世代シークエンサーを用いた解析技術は、その後さらに発 展し、現在では個人ゲノムの配列解読にかかる費用は10万円(1,000ドル)を 下回る<sup>(7)</sup>。その結果、あらゆる疾患に対して、そ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ゲノムワイドアプローチ(GWAS: Genome-Wide Association Study)によって網羅的になされるというのが、現在の医学界での 世界的傾向となっている。例えば、日本人における II 型糖尿病の疾患関連遺伝 子同定を目的として、患者 15,463 名と 26,183 名の対照群より採取した DNA サ ンプルを用いた GWAS を行ったところ、これまで疾患との関連性が全く報告さ れていなかった7つの遺伝子が、疾患関連遺伝子として同定された(®)。歯科の分 野に目を転じると、口唇裂・口蓋裂の疾患関連遺伝子探索を目的として、ヨーロ ッパ人 1,908 家系を用いた GWAS を行ったところ、MAFB と ABCA4 が疾患関 連遺伝子として同定されている<sup>(9)</sup>。また、GWAS を用いた歯周炎の疾患関連遺 伝子探索も盛んに行われている。慢性歯周炎に関しては、白人の患者 604 名と 416 名の対照群に対して GWAS を行った結果、13 個の遺伝子を疾患関連遺伝子 として抽出した研究が報告されている(10)。アジア人に目を向けると、日本人の 患者 2,760 名と 15,158 名の対照群に対して GWAS を行った結果、KCNQ5 と GPR141-NME8 が疾患関連遺伝子として同定されている<sup>(11)</sup>。さらに、韓国人の 患者 414 名と 263 名の対照群に対して GWAS を行い、TENM2 と LDLRAD4 が疾患関連遺伝子として同定されており<sup>(12)</sup>、アジア人における GWAS を用いた 慢性歯周炎の疾患関連遺伝子探索も盛んに行われている。一方、侵襲性歯周炎で は、ドイツ人・オランダ人の患者 438 名と 1,320 名の対照群に対して GWAS を 行い、GLT6D1 遺伝子が疾患関連遺伝子として同定されている<sup>(13)</sup>。また、欧米 人を対象とした GWAS も盛んに行われており、COX-2<sup>(14)</sup>、DEFB1<sup>(15)</sup>、IL-10<sup>(16)</sup> 等が侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子として同定されている。このように、侵襲性 歯周炎の疾患関連遺伝子探索に関しては、欧米人を対象とした研究は数多く報 告されているが、日本人を含むアジア人を対象とした GWAS を用いた探索は行 われておらず、疾患関連遺伝子の同定には至っていないのが現状である。

GWAS には、ヒトの全ゲノム配列を網羅的に解析するホールゲノムシークエンス、全ゲノム上の既存の SNP を網羅的に解析する SNP アレイ、エクソン領域の配列を網羅的に解析するエクソームシークエンス等が、その解析手法として用いられている。これまでに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<sup>(17)</sup>、*in vitro* での当該遺伝子の発現・機能の解析にまで 焦点を当てた研究を行うことを考慮すると、エクソームシークエンスを用いた 網羅的な疾患関連遺伝子探索が、本研究の遂行に関しては適切と考えられた。そこで我々は、GWAS としてエクソームシークエンスを用いて、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。

#### 材料および方法

#### 1. 試薬

nSMase 阻害剤 GW4869(SIGMA-Aldrich、St. Louis、MO、USA)、マウス 抗・ヒトβ-actin 抗体 (SIGMA-Aldrich)、HRP 標識マウス抗-Flag 抗体 (SIGMA-Aldrich)、マウス抗・ヒト SMPD3 抗体 (R&D systems、Minneapolis、MA、 USA)、HRP標識ヒツジ抗・マウス IgG 抗体 (GE Healthcare、Buckinghamshire、 UK)を実験に供した。

#### 2. 細胞培養

初代培養ヒト歯根膜細胞 (ScienCell Research Laboratories、Carlsbad、CA、 USA または Lonza、Walkersville、MD、USA、以下 HPDL と略す)を実験に 供した。培養には 10% ウシ胎仔血清 (Equitech-BiO、Inc. Kervill、TX、USA、 以下 FBS と略す)、60 µg/ml カナマイシン (和光純薬工業、大阪、日本)を加 えた  $\alpha$  変法イーグル最小必須培地 (和光純薬工業、以下 MEM  $\alpha$ と略す)を用い た。骨芽細胞への分化誘導には、10% FBS、5 mM  $\beta$ -グリセロリン酸 (和光純薬 工業、以下 $\beta$ -GP と略す)、50 µg/ml アスコルビン酸 (和光純薬工業)を加えた MEM  $\alpha$ を用い、2 または 3 日ごとに培地交換することにより行った。

## 3. ウェスタンブロット法

培養細胞を 4℃のダルベッコ・リン酸緩衝生理食塩水(和光純薬工業、以下 D-PBS と略す)で1回洗浄した後にプロテアーゼインヒビターカクテル錠(Roche Diagnostics、Indianapolis、IN、USA)、10 mM フッ化ナトリウム(和光純薬 工業)、10 mM β-GP、1 mM オルトバナジン酸ナトリウム(SIGMA-Aldrich) を加えた RIPA Lysis Buffer (Millipore、Billerica、MA、USA)を加え、4℃で 20 分間処理し、細胞画分を溶解した。回収した全細胞溶解液を遠心(12,000rpm、 4℃、20分)し、上清をタンパク質溶解画分に精製した。次に、2-メルカプトエ タノール(和光純薬工業)含有 Laemmli の 5x サンプルバッファーを用いてサ ンプルを調整し、8%ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE にて電気泳 動を行った。その後、PVDF トランスファーメンブレン(Millipore)に、ブロ ッティング装置(BioRad Laboratories、Hercules、CA、USA)を用いて転写し た (4°C、100V、1.5 時間)。メンブレンは 5%スキムミルク (雪印、東京、日本)、 0.1%TritonX-100 (和光純薬工業)を含むトリス緩衝生理食塩水【50 mM トリ ス (SIGMA-Aldrich) -塩酸 (和光純薬工業)緩衝溶液 (以下 Tris-HCl と略す) (pH 7.5)、150 mM 塩化ナトリウム (和光純薬工業、以下 NaCl と略す)、以 下 TBS と略す】にてブロッキングを行った (室温、1 時間)。一次抗体にはマウ ス抗-ヒトβ-actin 抗体、HRP 標識マウス抗-Flag 抗体、マウス抗-ヒト SMPD3 抗体を用い、二次抗体に HRP 標識ヒツジ抗-マウス IgG 抗体を反応させ、メン ブレンを 0.1%Tween20 含有 TBS で洗浄後、基質として SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific、Waltham、 MA、USA)を加えて発光シグナルを増幅し、ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare)を用いてバンドを検出した。

#### 4. トリパンブルー色素排除試験

細胞の生存率の測定は、トリパンブルー染色法を用いた。すなわち、細胞培養 上清を含む細胞懸濁液と同量のトリパンブルー染色液(和光純薬工業)を1分 間混和し、位相差顕微鏡(ニコン、東京、日本)を用いて、生細胞数と死細胞数 を測定した。

## 5. アルカリホスファターゼ(以下 ALP と略す)ならびにスフィンゴミエリナ ーゼの活性測定

ALP 活性の測定は、Bessey らの方法<sup>(18)</sup>に準じて行った。すなわち、細胞の培養上清を除去した後、細胞層を D-PBS にて 2 回洗浄し、0.01 M Tris-HCl (pH 7.4) を添加後、Handy Sonic model UR-20P (トミー、東京、日本) にて超音波破砕したのちに細胞破砕液を回収し、遠心 (12,000rpm、4°C、5分)後に得られた上清を測定に供した。上清 1 ml 中に 500 µl の 1 M Tris-HCl (pH 9.0)、100 µl の 5 mM 塩化マグネシウム (MgCl<sub>2</sub>)、100 µl の 50 mM パラ-ニトロフェニル-2-リン酸ナトリウム (和光純薬工業、以下 pNPP と略す)を添加した。pNPP 添加後、室温にて 20 分間反応させた後、250 µl の 1 N 水酸化ナトリウム (和光純薬工業) 水溶液を添加することにより反応を停止させた。同溶液の波長 405 nm における吸光度を Bio-Rad Model 550 Microplate Reader (BioRad Laboratories) にて測定し、水解された pNPP 量を求めた。標準曲線の作成に

はウシ腸管粘膜由来 ALP(SIGMA-Aldrich)を用い、室温にて毎分 1 µmol の pNPP を加水分解する ALP 活性を 1 U とし、総 DNA 量 1 mg 当たりのユニッ ト値で示した。

スフィンゴミエリナーゼ活性の測定は、細胞の培養上清を除去した後、細胞層 を D-PBS にて 1 回洗浄し、lysis buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、1%Triton X-100) にて回収後、sphingomyelinase assay kit (K-1800)

(Echelon Biosciences、Salt Lake City、UT、USA)を用いて行った。

#### 6. 全 RNA の抽出および相補鎖 DNA (以下 cDNA と略す)の作製

培養細胞からの全 RNA 抽出には、核酸抽出試薬 RNA-Bee (TEL-TEST、 Friendwood、TX、USA)を用いた。抽出・精製した全 RNA を鋳型として、High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems、Foster City、CA、USA) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。一部の RNA については、DNase I (タカラバイオ、滋賀、日本)を用いて DNase 処理を行った。すなわち、37℃ にて 30 分間 DNase I 処理後、80℃にて 2 分間 EDTA (0.5 mM) 処理により DNase I を不活化させ、エタノール沈殿法を用いて RNA を抽出した。

#### 7. Real-time PCR 法による遺伝子発現解析

Real-time PCR 法による解析は、cDNA を鋳型として、表1に示す各遺伝子 特異的な real-time PCR 用プライマー (タカラバイオまたは Gene design、大 阪、日本)を用いて発現を検討した。PCR 反応は Fast SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用い、Step One Plus Real-time PCR System (Applied Biosystems) にて行った。なお、各遺伝子の発現量は、ハウスキーピ ング遺伝子の一つである hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) を 内在性コントロール遺伝子として同遺伝子の発現量に対する相対量として算出 した。

Gene		Primer sequence
Osteocalcin(OC)	F	5'-AGCAGCTTGGCCCAGACCTA-3'
	R	5'-AGCGCCGGAGTCTGTTCACTA-3'
SMPD3	F	5'-AGAATCGCGGGTACATCGC-3'
	R	5'-GAAATCAGCCAGCCAGGTCCT-3'
alkaline phosphatase(ALP)	F	5'-GGACCATTCCCACGTCTTCAC-3'
	R	5'-CCTTGTAGCCAGGCCCATTG-3'
COLIAI	F	5'-CCCGGGTTTCAGAGACAACTTC-3'
	R	5'-TCCACATGCTTTATTCCAGCAATC-3'
HPRT	F	5'-GGCAGTATAATCCAAAGATGGTCAA-3'
	R	5'-GTCAAGGGCATATCCTACAACAAAC-3'
Osteopontin(OPN)	F	5'-GATGAATCTGATGAACTGGTCACTG-3'
	R	5'-GGTGATGTCCTCGTCTGTAGCA-3'
Osterix(OSX)	F	5'-TCTCCATCTGCCTGGCTCCT-3'
	R	5'-CTGCTTTGCCCAGAGTTGTTGA-3'
RUNX2	F	5'-CACTGGCGCTGCAACAAGA-3'
	R	5'-CATTCCGGAGCTCAGCAGAATAA-3'

表1 本研究で使用した real-time PCR 用プライマーの一覧

#### 8. rs145616324 を含む SMPD3 変異体の樹立と遺伝子導入

Flag 標識ヒト SMPD3 遺伝子発現ベクター(Sino Biological Inc.、Beijing、 China)の変異型の作製には、PrimeSTAR mutagenesis basal kit(タカラバイ オ)を用いた。すなわち、PrimeSTAR Max DNA polymerase(タカラバイオ) と、rs145616324 を含んだプライマー(SMPD3 for mutagenesis : 表 2)を用 いて PCR Thermal Cycler Dice(タカラバイオ)にて PCR 反応を行い、変異型 を樹立した。12 穴プレートに細胞を播種し、24 時間後に Lipofectamine3000 (Life Technologies、Carlsbad、CA、USA)を用いて Flag 標識ヒト SMPD3 遺伝子発現ベクター(1 µg)と、作製した Flag 標識ヒト SMPD3 変異型遺伝子 発現ベクター(1 µg)を遺伝子導入した。10 時間後に 12 穴プレート上の培地を 交換し、2 日間培養した。

Gene		Primer sequence		
SMPD3 for mutagenesis F		5'-CGACTCATTCGCCAGGGTCAACAACC-3'		
	R	5'-CTGGCGAATGAGTCGGGCAGGAGGCA-3'		

表 2 rs145616324 挿入のためのプライマー

\*太字 (**T**) が SNP rs145616324

#### 9. 侵襲性歯周炎の定義と臨床検査

大阪大学歯学部附属病院口腔治療・歯周科を受診し、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 炎の診断は、歯周治療の指針 2015(日本歯周病学会)の定義に従った。すなわ ち、侵襲性歯周炎は「全身的に健康ではあるが、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。表 3 に侵襲性歯周炎と慢性歯周炎の比較を示す。また、6 点法によるポケット測定を 含む歯周組織検査、レントゲン撮影を実施し、歯周組織の炎症面積(PISA: periodontal inflamed surface area)<sup>(19)</sup>ならびに、Scheiのルーラーを用いた歯 槽骨吸収率の解析<sup>(20)</sup>を行った。

	侵襲性歯周炎	慢性歯周炎	
罹患年齢	主に 10~30 歳代	主に 35 歳以降	
進行	早い	遅い	
細菌性プラークや歯石	比較的少ない	多い	
罹患部位	第一大臼歯と切歯が主	様々	
家族内集積	一部あり	なし	

表3 侵襲性歯周炎と慢性歯周炎の比較

#### 10. エクソームシークエンス

エクソームシークエンスには、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 を供した(Fujifilm、Tokyo、Japan)。エクソーム濃縮、ラ イブラリー作製、エクソームシークエンスは、BGI Tech.(Shenzhen、China) に委託した。すなわち、E220 Focused-ultrasonicator (Covaris、Woburn、MA、 USA) を用いてゲノム DNA を 150bp 程度に断片化し、DNA 断片とビオチン化 ロングオリゴ RNA をハイブリダイズさせることにより、サンプル中のエクソン 領域を含む断片のみをハイブリダイズさせた。その後ストレプロアビジン磁気 ビーズを添加し、磁気によるビーズキャプチャーを行った。そしてキャプチャー された DNA 断片を濃縮することでエクソーム濃縮を行った。濃縮には Agilent SureSelect Human All Exon V4 または V5 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA、USA)を用いた。さらに濃縮された断片の PCR 反応を実施し、精製する ことでライブラリー作製を行った。エクソームシークエンスには、HiSeq 2000 または HiSeq 4000(Illumina、San Diego、CA、USA)が用いられ、ペアエン ドシークエンス解析が実施された(平均リード数 1.64×10<sup>8</sup>、平均 bp 数 1.47× 10<sup>10</sup>)。エクソームシークエンスにより得られたリードを、Burrows-Wheeler Aligner (BWA) を用いてヒトゲノム参照配列 (hg19 または hg18) にマッピン グした後に、Picard ならびに Genome Analysis tool kit (GATK) を用いてアラ インメントした。アラインメントにより得られた VCF ファイルと SnpEff tool を用いて、dbSNP データベースならびに 1000 ゲノムデータベースへのアノテ ーションを行った。得られたエクソームシークエンスデータは、国立遺伝学研究 所内の DNA Data Bank of Japan に登録した(JGAS0000000024 と JGAS0000000040).

## 11. サンガーシークエンス

サンガーシークエンスは、下記プライマー (表 4: SMPD3 for sanger sequence) と PrimeSTAR Max DNA polymerase を用いて PCR Thermal Cycler Dice に て PCR 反応を行い、得られた PCR 産物を解析に供した。

Gene		Primer sequence		
SMPD3 for Sanger sequence F		5'-CTACATCTATTCACGGCTGGAAGAC-3'		
	R	5'-TACAGGATGTACTCGAAGTAGCCG-3'		

表4 サンガーシークエンスのためのプライマー

#### 12. 統計学的解析

In vitroの実験データは平均値±標準誤差で示し、有意差検定は、Student's-t

検定を用いた。エクソーム解析の有意差検定には、カイ二乗検定またはフィッシャーの正確確立検定を用いた。有意水準を5%に設定し、*p*値が有意水準を下回る場合に有意差ありと判断した。

#### 結果

#### 1. 侵襲性歯周炎患者の臨床データ

侵襲性歯周炎患者 44 名の臨床データを表 5 に示す。平成 23 年度歯科疾患実 態調査において、30~34 歳における 4 mm 以上の歯周ポケットを有する者の割 合は 20.3%と報告されている。一方で、44 名の侵襲性歯周炎患者すべてが、4 mm 以上の歯周ポケットを有していることから、平均年齢に対して、侵襲性歯周炎患 者において、歯周炎が著しく進行していることが確認された。

臨床データ	侵襲性歯周炎疾患群(n=44)		
平均年齢	$32.55\pm6.77$		
男女比(男/女)	15/29		
平均残存歯数	$27.91 \pm 1.85$		
平均ポケット深さ (mm)	$4.18 \pm 1.23$		
平均 PISA* (mm <sup>2</sup> )	$1302.96 \pm 1065.29$		
平均歯槽骨吸収率(%)	$37.47 \pm 15.43$		

\* PISA : periodontal inflamed surface area

解析結果は平均値±標準誤差で示した。

表5 侵襲性歯周炎患者の臨床データ

#### 2. 侵襲性歯周炎患者のエクソームシークエンスと遺伝子多型解析

研究開始当初より同意が得られていた13名のエクソームシークエンスを実施 したところ、平均深度は144.3 であった。エクソームシークエンスの精度の指 標である平均深度の値が100以上であれば、シークエンスの精度としては十分 と判断されることから、本研究でのエクソームシークエンスは適切に行われて いると判断した。深度10以上のカバー率は98.3%であった。エクソームシーク エンスデータを用いた遺伝子多型解析の結果、1名につき約78,000 個の SNP 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 際しては、以下の①~④を選定基準とした(図1)。



図1 遺伝子多型解析の流れ

すなわち、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た SNP であること。以上の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対してインフォ ームドコンセントの得られた 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(Human Genetic Variation Database : HGVD)を用いた<sup>(21, 22)</sup>。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(表 6A)。

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 に焦点を当て、その発現・ 機能の解析を実施することとした。SNP rs145616324 (c.412C>T, p.Leu138Phe) は、412 番目の塩基が C から T に置換することで、アミノ酸がロイシンからフ ェニルアラニンに置換する SNP である。SMPD3 に着目した理由としては、 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<sup>(23)</sup>、骨形成 不全症Ⅲ型モデルマウス *fro/fro* マウス<sup>(24)</sup>において、SMPD3 遺伝子が一部欠失 していること<sup>(25)</sup>、さらには fro/froマウスと I 型コラーゲンをプロモーターとし た SMPD3 のトランスジェニックマウスを交配させると、fro/fro マウスの骨格 異常の症状が改善したことが報告されており<sup>(26)</sup>、SMPD3の硬組織形成への関 与が示唆されていることが挙げられる。さらに、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<sup>(27, 28)</sup>、SMPD3 が 歯周組織の恒常性維持に関与していることが示唆されている。以上の点から、本 研究では侵襲性歯周炎の疾患関連候補遺伝子として SMPD3 に焦点を当てるこ ととした。

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<sup>-2</sup>、オッズ比は 2.39、
95%信頼区間は 1.17~4.89 であった(表 6B)。また、疾患群における Reference、
Hetero、Homo の各グループ間での侵襲性歯周炎の骨吸収率および歯肉の炎症
所見等に基づく重篤度に差は認めなかった。

A.

遺伝子名	dbSNP ID	p值(HGVD vs 疾患群)
ENPP5	rs16874326	1.6×10 <sup>-3</sup>
CCPG1	rs34958422	5.0×10 <sup>-3</sup>
BCL2L14	rs61739220	5.0×10 <sup>-3</sup>
SMPD3	rs145616324	1.4×10 <sup>-2</sup>
CDK3	rs34670267	2.1×10 <sup>-2</sup>
PON1	rs854560	2.8×10 <sup>-2</sup>
KAZALD1	rs11547671	3.7×10 <sup>-2</sup>
GRTP1	rs150462856	4.9×10 <sup>-2</sup>

-	
~	
J	٠

	Reference	Hetero	Homo	合計	MAF (%)
HGVD 対照群	1031	97	3	1131	4.55
疾患群	37	5	2	44	10.23

#### 表6 遺伝子多型解析の結果

A:遺伝子多型解析の結果、抽出された8つの疾患関連候補遺伝子を示す。

B: HGVD 対照群と疾患群における、SNP rs145616324の MAF と Reference (C/C)、 Hetero (C/T)、Homo (T/T)の各検体数を示す。

#### 3. 疾患群と in-house 対照群における rs145616324 の MAF の比較

しかしながら、HGVD における検体の年齢・性別は明らかではなく、歯周組 織検査も実施されていないため、本研究での対照群として適切でない点がいく つか存在する。そこで、in-house の対照群を用いて、SNP rs145616324 の MAF を検討した。はじめに、in-house 対照群の臨床データを表 7A に示す。歯周組織 検査の結果から、平均ポケット深さは 2.06 mm、平均 PISA は 191.11 mm<sup>2</sup>で、 歯周炎に罹患していないことが確認された。次にサンガーシークエンス法を用 いて、in-house 対照群における rs145616324 の MAF を解析したところ、inhouse 対照群での 28 名すべてが reference 配列を有していた (表 7B)。MAF は 0.00%で、疾患群の MAF と比較したところ、p 値は 5.43 × 10<sup>-2</sup> となった。 rs145616324 の MAF に有意差は認めないものの、in-house 対照群と疾患群との比較においても、HGVD 対照群と疾患群間で認められた有意差と同様の傾向を認めることが明らかとなった。

A.

臨床データ	in-house 対照群 (n=28)		
平均年齢	$30.42 \pm 4.43$		
男女比(男/女)	13/15		
平均残存歯数	$28.07 \pm 1.68$		
平均ポケット深さ (mm)	$2.06\pm0.18$		
平均 PISA (mm <sup>2</sup> )	$191.11 \pm 123.96$		

**B.** 

	Reference	Hetero	Homo	合計	MAF (%)
in-house 対照群	28	0	0	28	0.00
侵襲性歯周炎患者	37	5	2	44	10.23

#### 表7 in-house 対照群の臨床データとサンガーシークエンス結果

A: in-house 対照群 28 名の臨床データを示す。PISA: periodontal inflamed surface area、 解析結果は平均値±標準誤差で示した。

B: in-house 対照群と疾患群における、SNP rs145616324の MAF と Reference (C/C)、 Hetero (C/T)、Homo (T/T)の各検体数を示す。

#### 4. HPDL の骨芽細胞への分化過程における SMPD3 の発現

侵襲性歯周炎の病態の1つとして急速な歯周組織破壊が挙げられる。一方で、 歯根膜に含まれる未分化間葉系幹細胞は、骨芽細胞やセメント芽細胞といった 硬組織形成細胞に分化する能力を有しており、歯周組織の再生や<sup>(29)</sup>、恒常性維 持に重要な役割を演じていることが明らかとなっている。そこで、歯根膜細胞の 骨芽細胞への分化制御における SMPD3 の役割を *in vitro* 細胞培養系を用いて 検討することとした。

初めに HPDL の骨芽細胞への分化過程における SMPD3 の発現を検討するた

めに、HPDL を石灰化誘導培地にて培養後、*Osteocalcin (OC)* と *SMPD3* の mRNA の発現を real-time PCR 法にて解析した。その結果、HPDL の培養に伴 い、*OC*の mRNA の発現上昇が確認されたことから、HPDL が骨芽細胞へと分 化していることが確認された (図 2A)。さらに、HPDL の骨芽細胞への分化に 伴い、*SMPD3* の mRNA 発現が上昇することが明らかとなった (図 2B)。以上 のことから、SMPD3 は HPDL の骨芽細胞への分化過程において何らかの影響 を及ぼしている可能性が示唆された。



図 2 HPDLの骨芽細胞への分化過程における OCならびに SMPD3の mRNA 発現
HPDLを石灰化誘導培地にて培養し、分化誘導 0、6、11、15 日目における OC(A)、SMPD3
(B)の mRNA 発現を real-time PCR 法にて解析した。解析結果は、4 群の平均値±標準
誤差で示した。\*: p<0.05、\*\*: p<0.01</li>

#### 5. HPDL の骨芽細胞への分化過程における GW4869 の効果

次に、HPDL の骨芽細胞への分化過程にける SMPD3 の作用を検討した。 本実験には、nSMase2 を阻害する nSMase 阻害剤である GW4869 を供した<sup>(30)</sup>。 HPDL に 0.3%DMSO または 0.3%DMSO に溶解した 1 μM の GW4869 を添 加し、石灰化誘導培地にて培養し、ALP 活性の測定、ならびに I 型コラーゲン *(COL1A1)、ALP、OC*の mRNA 発現を経時的に検討した。初めに、GW4869 の細胞毒性を確認することを目的として、HPDL に GW4869 を添加後、5、9、 18 日目における HPDL の細胞生存率をトリパンブルー染色法により検討した。 その結果、DMSO 添加群と GW4869 添加群とを比較して、細胞生存率に差は認 められなかった(図 3A)。次に、ALP 活性測定を行ったところ、GW4869 添加 群では、DMSO 添加群と比較して ALP 活性が減少していることが明らかとな った(図 3B)。さらに、real-time PCR 法を用いて石灰化関連因子の mRNA の 発現を検討した結果、GW4869 添加群では、DMSO 添加群と比較して *COL1A1*、 *ALP、OC*の mRNA 発現が著明に減少していることが示された(図 3C)。以上 のことから、nSMase2 は HPDL の骨芽細胞への分化を促進することが示唆さ れた。



#### 図3 HPDLの骨芽細胞への分化過程におけるGW4869の効果

HPDL に、0.3%DMSO または 0.3%DMSO に溶解した 1 μM の GW4869 を添加し、石灰 化誘導培地を用いて培養を行った。

A:図に示した期間、HPDLを培養後、トリパンブルー染色を行い、細胞生存率を測定した 結果を示す。

B:培養開始後、9日、18日目に HPDL を細胞粉砕回収し、ALP 活性測定を行った結果を示す。

C:図に示した期間、HPDL を培養後、RNA を回収し、*COL1A1、ALP* ならびに *OC* の mRNA 発現を real-time PCR 法を用いて解析した結果を示す。

解析結果は、4 群の平均値±標準誤差で示した。\*: p<0.05、\*\*: p<0.01

#### 6. SNP rs145616324 の SMPD3 に対する影響

次に、野生型 SMPD3 もしくはrs145616324 を含む SMPD3 (変異型 SMPD3) を HPDL に遺伝子導入し、SNP rs145616324 の SMPD3 に対する影響を検討 した。まず、ウェスタンブロット法と real-time PCR 法を用いて遺伝子導入効 率を確認したところ、図 4A に示すように、野生型ならびに変異型において、 Flag ならびに SMPD3 が強く発現していることが確認された。さらに、*SMPD3* の mRNA の発現を検討した結果、野生型ならびに変異型において、*SMPD3*の 発現が著しく増加していることが確認された(図 4B)。

次に、野生型 SMPD3 ならびに変異型 SMPD3 のスフィンゴミエリナーゼ活 性における効果を検討した。すなわち、HPDL に野生型ならびに変異型 SMPD3 を遺伝子導入し、2 日間培養後、スフィンゴミエリナーゼ活性を測定したところ、 野生型 SMPD3 導入群では、スフィンゴミエリナーゼ活性が上昇したのに対し、 変異型導入群ではその活性上昇が認められず、コントロール群とほぼ同様の活 性を示した(図 4C)。以上のことから、SNP rs145616324 により、SMPD3 の 機能活性が低下していることが示唆された。



#### 図4 SNP rs145616324の SMPD3 に対する効果

HPDL に野生型もしくは変異型 SMPD3 を遺伝子導入し、2 日間培養後、以下の実験を行った。

A:抗 Flag 抗体、抗 SMPD3 抗体、抗β-actin 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った結果を示す。

B: SMPD3の mRNA 発現を real-time PCR 法にて解析した結果を示す。

C:スフィンゴミエリナーゼ活性測定を行った結果を示す。

解析結果は4群の平均値±標準誤差で示した。\*: p<0.01

コントロール:エンプティベクター、野生型:野生型 SMPD3、変異型:rs145616324 を含む変異型 SMPD3

## 7. HPDL の骨芽細胞への分化に対する SMPD3 ならびに SNP rs145616324 の 作用

HPDL の骨芽細胞への分化における、SMPD3 ならびに SNP rs145616324 の 作用を検討した。すなわち、野生型 SMPD3 もしくは変異型 SMPD3 を HPDL に遺伝子導入し、2 日間石灰化誘導培地で培養後、*ALP、COL1A1、Osteopontin* 

(OPN)、Osterix (OSX)、RUNX2のmRNA 発現を real-time PCR 法にて解析した。その結果、野生型 SMPD3 はこれらの石灰化関連因子のmRNAの発現を上昇させた。一方、変異型 SMPD3 導入群では、これらの遺伝子の発現上昇が認められなかった(図 5)。以上の結果より、SMPD3 は HPDL の骨芽細胞への分化を促進させることが明らかとなった。一方、SNP rs145616324 は、SMPD3 の機能活性を抑制することから、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になった。



図 5 HPDL の骨芽細胞への分化に対する SMPD3 ならびに SNP rs145616324 の影響 HPDL に野生型 SMPD3 もしくは変異型 SMPD3 を遺伝子導入し、2 日間石灰化誘導培地 で培養後、*ALP、COL1A1、OPN 、OSX、RUNX2*の mRNA 発現を real-time PCR 法に て解析した結果を示す。解析結果は、4 群の平均値±標準誤差で示した。\*: *p*<0.01 コントロール:エンプティベクター、野生型:野生型 SMPD3、変異型:rs145616324 を含む変異型 SMPD3 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 nSMase 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。

2005 年に次世代シークエンサーが登場して以降、GWAS による疾患関連遺伝 子探索が盛んに行われるようになってきた。侵襲性歯周炎の特徴の一つとして、 急速な歯槽骨破壊が挙げられるが、それと類似した疾患として関節リウマチが 挙げられる。GWAS を用いた関節リウマチの疾患関連遺伝子探索は既に盛んに 行われている。GWAS 以前は、HLA などごく一部の遺伝子が疾患関連遺伝子と して報告されていたに過ぎなかった。しかし、GWAS が比較的容易に行われる ようになって以降、関節リウマチの疾患関連遺伝子探索は、2003年に PADI4 が 発見されたのを皮切りに日進月歩の発展を遂げ(31)、現在では 100 以上の遺伝子 多型が同疾患関連遺伝子として報告されている(32)。興味深いことに、本研究で 明らかとなった 8 個の侵襲性歯周炎の疾患関連候補遺伝子は、関節リウマチの 疾患関連遺伝子としては報告されていなかった。しかしながら、本研究で侵襲性 歯周炎の疾患関連候補遺伝子として明らかにした CDK3(Cyclin dependent kinase 3) と同じサブファミリーである CDK2/4/6 の 3 つの遺伝子が、関節リウ マチの疾患関連遺伝子として報告されている<sup>(33)</sup>。CDK はサイクリン依存性タン パク質キナーゼで、細胞周期の調節を司るサイクリンのリン酸化ならびに分解 を制御する役割を担っている<sup>(34)</sup>。CDK ファミリーが侵襲性歯周炎や関節リウマ チといった硬組織破壊を特徴とする疾患の疾患関連遺伝子であることから、 CDK による細胞周期調節機構が、歯根膜細胞や軟骨細胞の増殖・分化に重要な 役割を担っている可能性が示唆される。

本研究において、侵襲性歯周炎の疾患関連候補遺伝子として 8 個の遺伝子を 同定したが、上記 CDK3 以外にも興味深い遺伝子が存在する。ENPP5 と同じ サブファミリーである ENPP1 遺伝子は、異所性石灰化動物モデル ttw (tip-tow walking) マウスの原因遺伝子として知られており<sup>(35,36)</sup>、ENPP5 も硬組織形成 に関与している可能性が推測される。さらに CCPG1 遺伝子は細胞周期の制御 に関与していること<sup>(37)</sup>、BCL2L14 遺伝子はアポトーシスの制御に関与している ことが報告されており<sup>(38)</sup>、これらの遺伝子上の SNP が細胞の増殖に関与する可 能性が推測される。また PON1 遺伝子は、善玉コレステロールとして知られて いる高密度リポタンパク質(HDL)に存在し、悪玉コレステロールとして知ら れている低密度リポタンパク質(LDL)の酸化を阻害することにより、粥状動脈 硬化を抑制する酵素として知られている<sup>(39)</sup>。興味深いことに、野生型マウスと PON1のトランスジェニックマウスの頭蓋骨より採取したそれぞれの骨芽細胞 に PTH を添加し、ALP 活性を測定したところ、PON1トランスジェニックマ ウスより採取した骨芽細胞で、著明に ALP 活性が上昇すると報告されている。 このことは、PON1が硬組織形成に関与していることを示唆している<sup>(40)</sup>。また PON1の SNP については、他にも多くの研究がなされており、冠動脈疾患や虚 血性脳梗塞といった老化関連疾患に関わっていることが報告されている<sup>(41, 42)</sup>。 しかしながら、PON1の SNP の硬組織形成に関わる役割については不明な点が 多く、現在検討を行っている。

一方、本研究で実施した GWAS にはいくつかの課題が指摘されている。本研 究ではエクソームシークエンスを行い、SMPD3 の SNP rs145616324 における 対照群と疾患群との MAF を比較したところ、p 値が 1.42×10<sup>-2</sup> となったことか ら、統計学的な有意差があると判断した。しかしながら、GWAS における「統 計学的な有意差」の数値の基準は、p値が5×10<sup>-8</sup>以下であることが必要とされ ている<sup>(43)</sup>。本研究では検体数が 44 名と少なく、p 値が 5×10-8 以下の SNP が 検出されなかったことから、p値が5×10<sup>-2</sup>以下を「統計学的な有意差」とした。 GWAS における「統計学的な有意差」を示すために、検体数を拡充することが 必要であるが、白人と黒人における侵襲性歯周炎の罹患率がそれぞれ 0.2%と 2.6%と言われているのに対し<sup>(44, 45)</sup>、日本人における侵襲性歯周炎の罹患率は 0.05~0.1%と言われており<sup>(2)</sup>、検体数の拡充が困難な現状がある。現在、日本の 他大学と共同研究を行い、日本人侵襲性歯周炎患者の検体数を拡充する取り組 みが計画されている。次に、本研究で実施した GWAS の追試実験がされていな いことである。この点を補うために我々は、*in vitro* 細胞培養系における SMPD3 および rs145616324 の機能解析を実施した。その結果、SMPD3 は HPDL の骨 芽細胞への分化を促進させること、一方で、SNP rs145616324 は、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を見出し た。

ヒト骨形成不全症Ⅲ型モデルマウスである fro/fro マウスは、トリス(1-アジ

リジニル)ホスフィン・スルフィンにより突然変異をさせたマウスで、骨脆弱症 ならびに骨格の低形成を特徴とする<sup>(24)</sup>。また、歯槽骨や歯牙の脆弱性も確認さ れているが、その発症理由は長年にわたり不明であった。2005年、遺伝子解析 の結果、その原因遺伝子が SMPD3 であると特定され、SMPD3 の intron8 と exon9 の一部欠失が認められ、33 のアミノ酸が異なる 13 のアミノ酸に置き換 えられることにより、骨脆弱症の特徴が現れることが明らかとなった<sup>(25)</sup>。また、 SMPD3 ノックアウトマウスも作成され、*fro/fro*マウスと同様に、骨格の形成不 全が認められたことや<sup>(23)</sup>、*fro/fro*マウスと I 型コラーゲンをプロモーターとし た SMPD3 のトランスジェニックマウスを交配させると、*fro/fro*マウスにおけ る骨格異常所見の改善がみられたことから<sup>(26)</sup>、SMPD3 が硬組織形成に重要な 役割を担っていることが確認された。本研究において、骨芽細胞や象牙芽細胞と 同様に、歯根膜細胞で SMPD3 が発現していること、さらには、SMPD3 が歯根 膜細胞の分化を制御することにより、歯周組織の恒常性維持に関与しているこ とが示唆された。

本研究では、SMPD3の機能変調の結果、歯周組織の恒常性が破綻しやすくな り、歯周組織の破壊を惹起させる可能性があることを報告したが、44名の侵襲 性歯周炎患者において、骨格形成不全等の外見上の異常は認められなかった。 ヒトでは、SMPD3の機能変調の影響が口腔内に限定される一方で、マウスに おいては全身的な骨格形成異常を引き起こす<sup>(23·25)</sup>。SMPDファミリーには、 SMPD3の他にSMPD2、SMPD4、SMPD5などが報告されている<sup>(46·49)</sup>。これ らの遺伝子の硬組織形成への詳細な役割については不明な点が多いが、ヒトに おいて SMPD3 が機能不全となった場合に、SMPD2/4/5 が代償性に SMPD3 の役割を補完する可能性が考えられる。また、SMPD2/4/5 に関して、対照群 と疾患群における MAF に統計学的有意差を認める SNP は検出されなかっ た。

興味深いことに、*fro/fro*マウスにおいて、生後3日で認められていた歯槽骨 や歯牙の脆弱性が生後2週間後から徐々に消失するという報告がある<sup>(26)</sup>。この 報告は、歯や歯槽骨において、SMPD3が骨芽細胞の分化初期に機能している可 能性を示唆している。本研究において結果では示していないが、HPDLをDMSO またはGW4869を添加した石灰化誘導培地で長期培養したのちアリザリンレッ ド染色を行ったところ、両群に大きな差は認めなかった。このことは、SMPD3 が HPDL の骨芽細胞への分化初期に機能し、分化後期にはあまり関与しない可能性を示唆している。今後、HPDL の骨芽細胞への分化過程において SMPD3 が関与する時期についても詳細に検討していきたい。

今回同定した rs145616324 は SMPD3 の exon3 上の SNP であり、*fro/fro*マウスや SMPD3 ノックアウトマウスにおける変異部位とは異なっている。興味深いことに、rs145616324 は SMPD3 のカルシニューリン結合部位の近傍に位置する SNP であることから<sup>(50)</sup>、その結合部位の構造異常を引き起こした結果、SMPD3 とカルシニューリンの結合を阻害することが推測される。今後、SMPD3 のタンパク立体構造の解析や、rs145616324 によるタンパク立体構造の変化の解析が必要である。さらに、カルシニューリンは破骨細胞の分化を制御していることが報告されていることから<sup>(51,52)</sup>、rs145616324 が破骨細胞の分化に何らかの影響を与えていることが予想される。破骨細胞分化に対する SMPD3、rs145616324 の効果についても今後の検討課題である。

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<sup>(53,54)</sup>。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、骨芽細胞の分化を誘導すること が報告されている<sup>(55)</sup>。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<sup>(55)</sup>、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<sup>(56)</sup>。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<sup>(57)</sup>。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。

FTY720 は、絹糸結紮によるラット実験的歯周炎モデルにより誘導された下 顎第 1 臼歯の分岐部における破骨細胞数を減少させることや<sup>(58)</sup>、 *aggregatibacter actinomycetemcomitans* により誘導される骨髄由来マクロフ ァージの破骨細胞への分化能を低下させることが報告されている<sup>(59)</sup>。さらには、 歯周組織再生療法に用いられている PDGF が S1P の発現を上昇させることも 報告されており<sup>(60, 61)</sup>、SMPD3 により誘導される S1P の発現が、硬組織形成の 制御のみならず、歯周組織の恒常性の維持ならびに歯周組織再生に深く関与し ている可能性が考えられる。

最後に、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、侵襲性歯周炎の発症前 から予防および介入を行うことにより、デンタルプラークの少ない口腔内環境 を維持させることで侵襲性歯周炎の発症・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。

27



図 6 HPDL の骨芽細胞への分化に対する SMPD3 ならびに SNP rs145616324 の効果 SMPD3 は、nSMase2 活性を上昇させることにより、*ALP や COL1A1* などの石灰化関連 因子の発現上昇を誘導する。その結果、HPDL の骨芽細胞への分化が誘導されることによ り、歯周組織の恒常性が維持されていると考えられる(図 6A)。一方、rs145616324 をも つ SMPD3 では、 rs145616324 により SMPD3 の機能が低下することから、nSMase2 の 活性上昇、それに伴う石灰化関連因子の発現上昇が認められない。そのため、HPDL の骨 芽細胞への分化が認められず、歯周組織の恒常性に破綻をきたし、侵襲性歯周炎の発症の一 因となっていると考えられる(図 6)。

#### 結論

本研究結果より以下の結論を得た。

1. 日本人侵襲性歯周炎患者のエクソームシークエンスの結果、SMPD3 の SNP rs145616324 において、対照群と疾患群における MAF に統計学的有意差 を認めた。

2. HPDL の骨芽細胞への分化に伴い、SMPD3 の発現上昇を認めた。

3. nSMase2の活性を阻害することにより、HPDLの骨芽細胞への分化は抑制 された。

4. SMPD3 は、HPDL の骨芽細胞への分化を促進した。

5. rs145616324 を含む SMPD3 は、SMPD3 の機能を低下させ、SMPD3 に よる HPDL の骨芽細胞への分化を抑制した。

以上のことから、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が示唆された。

#### 謝辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました大阪大学 大 学院歯学研究科 ロ腔分子免疫制御学講座 村上伸也教授に深甚なる謝意を表 します。また、本研究の進行にあたり直接御指導ならびに御助言を頂きました北 垣次郎太助教に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行に対して様々な御協力を頂きました大阪大学大学院歯 学研究科ロ腔分子免疫制御学講座(ロ腔治療学教室)の教室員の皆様に厚く御礼 申し上げます。

29

#### 文献

1. 特定非営利活動法人 日本歯周病学会 編, 歯周治療の指針 2015, 医歯薬出版, 東京

 2. 難病情報センター,難病性疾患研究班情報,早期発症型侵襲性歯周炎:平成24年度. (http://www.nanbyou.or.jp/entry/3216)

- Diehl SR, Wang Y, Brooks CN, Burmeister JA, Califano JV, Wang S, et al. Linkage disequilibrium of interleukin-1 genetic polymorphisms with early-onset periodontitis. *J Periodontol.* 1999;70(4):418-30.
- 4. Laine ML, Crielaard W, and Loos BG. Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontol 2000.* 2012;58(1):37-68.
- Kobayashi T, Nagata T, Murakami S, Takashiba S, Kurihara H, Izumi Y, et al. Genetic risk factors for periodontitis in a Japanese population. *J Dent Res.* 2009;88(12):1137-41.
- Wadman M. James Watson's genome sequenced at high speed. Nature. 2008;452(7189):788.
- 7. Hayden EC. The \$1000 genome. Nature. England; 2014:294-5.
- Imamura M, Takahashi A, Yamauchi T, Hara K, Yasuda K, Grarup N, et al. Genome-wide association studies in the Japanese population identify seven novel loci for type 2 diabetes. *Nat Commun.* 2016;7:10531.
- Beaty TH, Murray JC, Marazita ML, Munger RG, Ruczinski I, Hetmanski JB, et al. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat Genet.* 2010;42(6):525-9.
- Divaris K, Monda KL, North KE, Olshan AF, Lange EM, Moss K, et al. Genomewide association study of periodontal pathogen colonization. *J Dent Res.* 2012;91(7 Suppl):21s-8s.
- Shimizu S, Momozawa Y, Takahashi A, Nagasawa T, Ashikawa K, Terada Y, et al. A genome-wide association study of periodontitis in a Japanese population. *J Dent Res.* 2015;94(4):555-61.
- Hong KW, Shin MS, Ahn YB, Lee HJ, and Kim HD. Genomewide association study on chronic periodontitis in Korean population: results from the Yangpyeong health cohort. *J Clin Periodontol.* 2015.
- Schaefer AS, Richter GM, Nothnagel M, Manke T, Dommisch H, Jacobs G, et al. A genome-wide association study identifies GLT6D1 as a susceptibility locus for periodontitis. *Hum Mol Genet.* 2010;19(3):553-62.
- 14. Schaefer AS, Richter GM, Nothnagel M, Laine ML, Noack B, Glas J, et al. COX-2 is associated with periodontitis in Europeans. *J Dent Res.* 2010;89(4):384-8.

- Schaefer AS, Richter GM, Nothnagel M, Laine ML, Ruhling A, Schafer C, et al. A 3' UTR transition within DEFB1 is associated with chronic and aggressive periodontitis. *Genes Immun.* 2010;11(1):45-54.
- Schaefer AS, Bochenek G, Manke T, Nothnagel M, Graetz C, Thien A, et al. Validation of reported genetic risk factors for periodontitis in a large-scale replication study. *J Clin Periodontol.* 2013;40(6):563-72.
- Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U* SA. 2009;106(45):19096-101.
- Bessey OA, Lowry OH, and Brock MJ. A method for the rapid determination of alkaline phosphates with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem.* 1946;164:321-9.
- Nesse W, Abbas F, van der Ploeg I, Spijkervet FK, Dijkstra PU, and Vissink A. Periodontal inflamed surface area: quantifying inflammatory burden. J Clin Periodontol. 2008;35(8):668-73.
- 20. Schei O, Waerhaug J, Lovdal A, Arno A. Alveolar bone loss as related to oral hygiene and age. *J Periodontol.* 1959;30:7-16.
- 21. Narahara M, Higasa K, Nakamura S, Tabara Y, Kawaguchi T, Ishii M, et al. Largescale East-Asian eQTL mapping reveals novel candidate genes for LD mapping and the genomic landscape of transcriptional effects of sequence variants. *PLoS One.* 2014;9(6):e100924.
- 22. Higasa K, Miyake N, Yoshimura J, Okamura K, Niihori T, Saitsu H, et al. Human genetic variation database, a reference database of genetic variations in the Japanese population. *J Hum Genet.* 2016;61(6):547-53.
- Stoffel W, Jenke B, Block B, Zumbansen M, and Koebke J. Neutral sphingomyelinase 2 (smpd3) in the control of postnatal growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(12):4554-9.
- Muriel MP, Bonaventure J, Stanescu R, Maroteaux P, Guenet JL, and Stanescu V. Morphological and biochemical studies of a mouse mutant (fro/fro) with bone fragility. *Bone.* 1991;12(4):241-8.
- 25. Aubin I, Adams CP, Opsahl S, Septier D, Bishop CE, Auge N, et al. A deletion in the gene encoding sphingomyelin phosphodiesterase 3 (Smpd3) results in osteogenesis and dentinogenesis imperfecta in the mouse. *Nat Genet.* 2005;37(8):803-5.
- Khavandgar Z, Poirier C, Clarke CJ, Li J, Wang N, McKee MD, et al. A cellautonomous requirement for neutral sphingomyelinase 2 in bone mineralization. J Cell Biol. 2011;194(2):277-89.

- Khavandgar Z, Alebrahim S, Eimar H, Tamimi F, McKee MD, and Murshed M.
   Local regulation of tooth mineralization by sphingomyelin phosphodiesterase 3. J Dent Res. 2013;92(4):358-64.
- 28. Goldberg M, Opsahl S, Aubin I, Septier D, Chaussain-Miller C, Boskey A, et al. Sphingomyelin degradation is a key factor in dentin and bone mineralization: lessons from the fro/fro mouse. The chemistry and histochemistry of dentin lipids. J Dent Res. 2008;87(1):9-13.
- Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004;364(9429):149-55.
- 30. Luberto C, Hassler DF, Signorelli P, Okamoto Y, Sawai H, Boros E, et al. Inhibition of tumor necrosis factor-induced cell death in MCF7 by a novel inhibitor of neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem.* 2002;277(43):41128-39.
- 31. Worthington J, and John S. Association of PADI4 and rheumatoid arthritis: a successful multidisciplinary approach. *Trends Mol Med.* 2003;9(10):405-7.
- Ikari K. [Genetic risk factors for rheumatoid arthritis]. Nihon Rinsho. 2016;74(6):897-901.
- 33. Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature*. 2014;506(7488):376-81.
- 34. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature*. 1995;374(6518):131-4.
- 35. Koshizuka Y, Ikegawa S, Sano M, Nakamura K, and Nakamura Y. Isolation of novel mouse genes associated with ectopic ossification by differential display method using ttw, a mouse model for ectopic ossification. *Cytogenet Cell Genet.* 2001;94(3-4):163-8.
- 36. Nakamura I, Ikegawa S, Okawa A, Okuda S, Koshizuka Y, Kawaguchi H, et al. Association of the human NPPS gene with ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine (OPLL). *Hum Genet.* 1999;104(6):492-7.
- 37. Kostenko EV, Olabisi OO, Sahay S, Rodriguez PL, and Whitehead IP. Ccpg1, a novel scaffold protein that regulates the activity of the Rho guanine nucleotide exchange factor Dbs. *Mol Cell Biol.* 2006;26(23):8964-75.
- 38. Lin ML, Park JH, Nishidate T, Nakamura Y, and Katagiri T. Involvement of maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) in mammary carcinogenesis through interaction with Bcl-G, a pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. *Breast Cancer Res.* 2007;9(1):R17.
- 39. Mackness MI, Arrol S, Abbott C, and Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated

paraoxonase. Atherosclerosis. 1993;104(1-2):129-35.

- Lu J, Cheng H, Atti E, Shih DM, Demer LL, and Tintut Y. Role of paraoxonase-1 in bone anabolic effects of parathyroid hormone in hyperlipidemic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;431(1):19-24.
- 41. Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, and Reddy ST. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* 2005;38(2):153-63.
- Miura Y, Sato Y, Arai Y, Abe Y, Takayama M, Toda T, et al. Proteomic analysis of plasma proteins in Japanese semisuper centenarians. *Exp Gerontol.* 2011;46(1):81-5.
- Clarke GM, Anderson CA, Pettersson FH, Cardon LR, Morris AP, and Zondervan KT. Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nat Protoc.* 2011;6(2):121-33.
- 44. Nibali L, Farias BC, Vajgel A, Tu YK, and Donos N. Tooth loss in aggressive periodontitis: a systematic review. *J Dent Res.* 2013;92(10):868-75.
- Loe H, and Brown LJ. Early onset periodontitis in the United States of America. J Periodontol. 1991;62(10):608-16.
- 46. Hofmann K, Tomiuk S, Wolff G, and Stoffel W. Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg2+-dependent neutral sphingomyelinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(11):5895-900.
- 47. Krut O, Wiegmann K, Kashkar H, Yazdanpanah B, and Kronke M. Novel tumor necrosis factor-responsive mammalian neutral sphingomyelinase-3 is a C-tailanchored protein. *J Biol Chem.* 2006;281(19):13784-93.
- Yabu T, Shimuzu A, and Yamashita M. A novel mitochondrial sphingomyelinase in zebrafish cells. *J Biol Chem.* 2009;284(30):20349-63.
- Clarke CJ, Wu BX, and Hannun YA. The neutral sphingomyelinase family: identifying biochemical connections. *Adv Enzyme Regul.* 2011;51(1):51-8.
- Shamseddine AA, Airola MV, and Hannun YA. Roles and regulation of neutral sphingomyelinase-2 in cellular and pathological processes. *Adv Biol Regul.* 2015;57:24-41.
- Takayanagi H. The role of NFAT in osteoclast formation. Ann NYAcad Sci. 2007;1116:227-37.
- 52. Sun L, Peng Y, Zaidi N, Zhu LL, Iqbal J, Yamoah K, et al. Evidence that calcineurin is required for the genesis of bone-resorbing osteoclasts. Am J Physiol Renal Physiol. 2007;292(1):F285-91.
- 53. Saddoughi SA, and Ogretmen B. Diverse functions of ceramide in cancer cell death and proliferation. *Adv Cancer Res.* 2013;117:37-58.

- 54. Proia RL, and Hla T. Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy. *J Clin Invest.* 2015;125(4):1379-87.
- 55. Sato C, Iwasaki T, Kitano S, Tsunemi S, and Sano H. Sphingosine 1-phosphate receptor activation enhances BMP-2-induced osteoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;423(1):200-5.
- 56. Ishii M, Egen JG, Klauschen F, Meier-Schellersheim M, Saeki Y, Vacher J, et al. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature.* 2009;458(7237):524-8.
- 57. Chae YM, Heo SH, Kim JY, Lee JM, Ryoo HM, and Cho JY. Upregulation of smpd3 via BMP2 stimulation and Runx2. *BMB Rep.* 2009;42(2):86-90.
- 58. Lee DE, Kim JH, Choi SH, Cha JH, Bak EJ, and Yoo YJ. The sphingosine-1phosphate receptor 1 binding molecule FTY720 inhibits osteoclast formation in rats with ligature-induced periodontitis. *J Periodontal Res.* 2016.
- 59. Yu H, Herbert BA, Valerio M, Yarborough L, Hsu LC, and Argraves KM. FTY720 inhibited proinflammatory cytokine release and osteoclastogenesis induced by Aggregatibacter actinomycetemcomitans. *Lipids Health Dis.* 2015;14:66.
- Javed F, Al-Askar M, Al-Rasheed A, and Al-Hezaimi K. Significance of the plateletderived growth factor in periodontal tissue regeneration. *Arch Oral Biol.* 2011;56(12):1476-84.
- 61. Olivera A, and Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature.* 1993;365(6446):557-60.