OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒト SNP 解析による根尖性歯周炎関連遺伝子の同定およびその機能解析
Author(s)	成瀬, 陽菜
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69503
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　（　成瀬　陽菜　）	
論文題名	ヒト SNP 解析による根尖性歯周炎関連遺伝子の同定およびその機能解析

論文内容の要旨

【研究目的】

根管内からバクテリアなどが根尖孔外に侵入すると，抗原提示細胞により貪食され T 細胞を活性化する．活性化した T 細胞は様々な液性因子を分泌して抗体産生を誘導し，バクテリアなどの侵入を阻止する．また，分泌された液性因子は，骨芽細胞や破骨細胞前駆体などにも作用し，破骨細胞の分化を促進する結果，根尖周囲歯槽骨の吸収が生じる．このように，宿主側の免疫応答，そして免疫応答によって引き起こされる骨恒常性の破綻により根尖性歯周炎が生じる．骨恒常性の維持および免疫応答には様々なシグナル伝達経路が関与することが知られており，その中でも Wnt/β-catenin シグナル経路は大きく関与していることがわかってきている．そこで，Wnt/β-cateninシグナル経路と根尖性歯周炎発症との関連性を明らかとするために *in vivo* の実験系にて解析した．さらに，日本人根尖性歯周炎患者とWnt/β-cateninシグナル経路の関連について探索を目的として，日本人骨粗鬆症と関連があり，Wnt/β-catenin シグナル経路に属する *LRP5* の SNP と根尖性歯周炎との関連性について SNP 解析を行った．

【材料と方法】

1. Wnt/β-catenin シグナル経路と根尖性歯周炎発症との関連性についての *in vivo* 検証実験

1) Wnt/β-catenin シグナルの抑制が根尖病変形成に及ぼす影響についての *in vivo* 実験

Wnt/β-catenin シグナル伝達経路阻害薬 IWR-1 投与群と非投与群における根尖病変を比較した．動物実験は，大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認のもと，大阪大学動物実験規定に則って，実施した（承認番号：動歯-26-011-0）．

(1) 8 週齢の C57BL/6J マウスをドミトール（0.3 mg/kg），ドルミカム（4 mg/kg），ベトルファール（5 mg/kg）の 3 種混合麻酔薬を腹腔内注射にて全身麻酔を行った．下顎左側第一大臼歯を 1/4 ラウンドバーを用いて天蓋除去を行った後，#8 K ファイル用いて根尖の破壊を行った．露髄当日から 1 日 1 回，尾静脈から① IWR-1投与群: DMSO に IWR-1 を溶解したものを PBS にて希釈した溶液（IWR-1: 2.5 μmol/kg），② IWR-1 非投与群: DMSO を PBS にて希釈した溶液を連続投与した．

(2) 根尖病変体積の測定: 露髄後，経時的にマイクロ CT（理学メカトロニクス，R_mCT2）撮影を行った．根尖病変体積は骨形態計測ソフト（RATOC, TRI 3D-BON）を用いて算出し，3 次元的評価を行った．病変体積の統計学的有意差の検定は Student’s *t* 検定（α=0.05）を用いた．

(3) 組織学的検索 : 上記実験に供したマウスを 10% パラホルムアルデヒトにて還流固定した後，下顎骨を採取し，10% EDTA 溶液による脱灰，パラフィンへの包埋を行った．そして，厚さ 9 μm の薄切切片を作製し，Hematoxylin - Eosin 染色法，TRAP 染色，免疫染色法および *in situ* ハイブリダイゼーション法を行い，根尖周囲組織を光学顕微鏡にて観察した．

2) Wnt/β-catenin シグナルの活性化が根尖病変形成に及ぼす影響についての *in vivo* 実験

Wnt/β-catenin シグナル伝達経路を活性化する LiCl（GSKβを抑制）根管貼薬群と非貼薬群の根尖病変を比較した．

(1) 8 週齢の C57BL/6J マウスを全身麻酔下にて，下顎左側第一大臼歯を 1/4 ラウンドバーを用いて天蓋除去を行った後，#8 K ファイルを用いて根尖の破壊を行った．露髄 4 週後，#10 K ファイルを用いて根管拡大を行い，① LiCl 根管貼薬群，②非貼薬群にコンポジットレジンにて仮封を行った．

(2) 1) と同様に根尖病変体積の測定と組織学的検索を行った．

2. 根尖性歯周炎関連遺伝子の SNP 解析

大阪大学歯学部附属病院保存科を受診し永久歯の根尖性歯周炎と診断された患者のうち，本研究への資料提供の同意が得られたものを対象とした．過去に根管治療の既往があり，デンタルエックス線写真にて根尖部透過像の長径が 3 mm 以上認めるものを病変有群（n=50），根尖病変を認めないものを病変無群（n=30）とした．SNP 解析は，大阪大学歯学部附属病院倫理審査委員会で承認されたプロトコール（承認番号 H25-E22）にて実施した．

1) 被験者の頬粘膜から滅菌綿棒にて非侵襲的に細胞を採取し，綿棒の先を Lysis Buffer に浸漬させ，55℃にて 24 時間反応させて，ゲノム DNA を抽出した．そこにイソプロパノール沈殿およびエタノール沈殿を行った後，100 μl TE 溶液を加えて，マイクロチップで懸濁させ－80℃にて保存した．

2) ゲノム DNA に対して TaqMan® GTXpressTM Master Mix および TaqMan® SNP Genotyping Assays にて *IL-1β*（rs1143643）および *LRP5*（rs3736228）について SNP 解析を行った．群間の比較は Fisher's exact test（α=0.05）にて検定した．

【結果および考察】

1. 露髄後 2，4 週目において，IWR-1 投与群の方が統計学的有意差をもって根尖病変体積の増加が認められた（$p<0.05$）．また，H-E 染色法においても IWR-1 投与群の方が根尖病変の拡大および炎症の進展が認められた．*in situ* ハイブリダイゼーション法では IWR-1 投与群において *Axin2*，*Col1a1* および *Runx2* の発現の低下が認められた．TRAP 染色より破骨細胞数については両群間に差は認められなかった．これらの結果より，Wnt/β-catenin シグナルの抑制により骨芽細胞の分化が抑制され，その結果として骨吸収が促進したため，根尖病変の拡大が起こったと考えられる．
2. 貼薬 4 週後において，LiCl 根管貼薬群に統計学的有意差をもって，根尖病変体積の減少が認められた（$p<0.05$）．また，H-E 染色においても LiCl 根管貼薬群の方が根尖病変の縮小を認めた．LiCl 根管貼薬群は貼薬後 24 時間後において，β-catenin の細胞質内での蓄積を認めた．貼薬後 4 週後では *in situ* ハイブリダイゼーション法では，LiCl 根管貼薬群において *Col1a1* および *RUNX2* の発現促進を認めた．免疫染色では，CD3 および F4/80 陽性細胞については，非貼薬群と LiCl 貼薬群の間で差は認めなかったが，CD45R については LiCl 貼薬群において非貼薬群と比較して多数の陽性細胞を認めた．LiCl による Wnt/β-catenin シグナル伝達経路の活性化を起点として骨芽細胞の分化と免疫が誘導され，根尖病変の治癒を促進したと考えられる．
3. *IL-1β* の SNP に関連性は認められなかった．一方，Wnt/β-catenin シグナル経路に属する *LRP5* の SNP において根尖性歯周炎の発症と関連性が認められた．

【結論】

Wnt/β-catenin シグナル伝達経路の阻害は，骨芽細胞の分化を抑制し，その結果，根尖病変の拡大を生じさせた．また，Wnt/β-catenin シグナル伝達経路の活性化は骨芽細胞の分化を誘導し，根尖病変の治癒を促進することがわかった．さらに，*LRP5* が日本人における根尖性歯周炎の疾患関連遺伝子であることが明らかとなった．

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　成瀬　陽菜　）	
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主 査　教授　林　美加子	
	副 査　教授　川端　重忠	
	副 査　准教授　波多　賢二	
	副 査　講師　山下　元三	

論文審査の結果の要旨

本研究は，Wnt/β-catenin シグナル経路と根尖性歯周炎発症との関連性を明らかにすることを目的に，*in vivo* にてシグナル経路を抑制あるいは活性化した場合の根尖病変形成についての解析と，日本人根尖性歯周炎患者の SNP 解析を行ったものである．

その結果，Wnt/β-catenin シグナル伝達経路は，根尖病変の制御を行っていることが明らかとなった．さらに，*LRP5* が日本人における根尖性歯周炎の疾患関連遺伝子であることがわかった．

以上の研究成果は，シグナル伝達経路を標的とした新規の根管貼薬剤の開発につながるものであることより，本研究は博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める．