OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	日本人侵襲性歯周炎疾患関連遺伝子Paraoxonase-1のヒト歯根膜細胞における機能解析
Author(s)	枡本, 梨沙
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/76301
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　（　枡本　梨沙　）	
論文題名	日本人侵襲性歯周炎疾患関連遺伝子Paraoxonase-1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と言われていることから、本疾患の発症には遺伝的要因の関与が示唆されている。これまでに、本疾患の疾患関連因子として炎症性サイトカイン（*TNF-α*や*IL-1*）等の一塩基多型（SNP：Single Nucleotide Polymorphism）が報告されているが、未だ疾患との明確な関連を見出すには至っていない。その理由として、これまで我が国においては、既知の遺伝子の有無を調べるのみの単一遺伝子解析が行われてきた背景がある。そのため、従来の侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子に関する研究は、骨や炎症に関連することが知られている遺伝子に限られたものがほとんどであり、未知の領域にまで踏み込んだ網羅的な解析は行われていないのが現状であった。そこで、本研究ではゲノムワイドアプローチの1つであるエクソームシークエンス解析を導入し、侵襲性歯周炎患者のエクソン領域を網羅的に解析し、日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子を探索した。その結果、疾患関連遺伝子の１つとして*Paraoxonase-1*（*PON-1*）を同定した。PON-1は、肝臓で合成されるカルシウム依存性のエステラーゼであり、有機リン脂質の加水分解酵素として知られている。血中においてはHDLコレステロールに結合して存在し、抗酸化作用を与えることから、近年、PON-1の抗アテローム性動脈硬化等の役割が話題となっている。これまでに、*PON-1*のSNPが骨密度の減少に関わることや、PON-1活性の低下と慢性歯周炎が関連することが報告されているが、PON-1と侵襲性歯周炎との関連性や、歯周組織構成細胞におけるPON-1の発現および機能に関しては未だ明らかではない。そこで、我々は、ヒト歯根膜細胞（HPDL）におけるPON-1の発現および機能を明らかにするための*in vitro*解析をも遂行することとした。

【方法】

（1）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44名を被験者とした（大阪大学ヒトゲノム研究承認番号 629-2）。被験者より採血（7 ml）を行い、DNA全血キットを用いて末梢血よりDNAを抽出した。エクソームシークエンスは、BGI Tech社に委託した。まず、ゲノムDNAを超音波破砕機を用いて200～300bp程度に断片化し、アダプター配列を付与して増幅した。エクソームキャプチャーを行い、HiSeq 2000またはHiSeq 4000によるエクソームシークエンスを行った。エクソームシークエンスにより得られたリード情報を、ヒトゲノム参照配列にマッピングした。重複したゲノム配列の除去ならびにアラインメントを行い、dbSNPデータベースならびに1000ゲノムデータベース（26の民族、2504人のゲノムデータが蓄積されている世界的なゲノムデータベース）へのアノテーションの付与を行った。エクソームシークエンスより検出されたSNPを、4つの条件（① 1000ゲノムデータベースにおいてMAFが5%以下であること、② 深度が10以上であること、③ 13名の侵襲性歯周炎患者のうち、5名以上で検出されたSNPであること｛疾患群におけるMAFが約20%以上であること｝、④ SNPの挿入によりタンパク質の構造や機能に変異を引き起こすと推測されたSNPであること）でフィルタリングし、抽出されたSNPを侵襲性歯周炎の疾患関連候補遺伝子として同定した。さらに、抽出された疾患関連候補遺伝子のマイナー対立遺伝子頻度（MAF）を計測し、対照群（日本人健常群ゲノムデータベース：Human Genetic Variation Database）との比較を行い、MAFに統計学的有意差（$p < 0.05$）を認める遺伝子を抽出した。

（2）HPDLを石灰化誘導培地（10% FCS、10 mM β-glycerophosphate、50 μg/ml ascorbic acid含有α-MEM）にて3日ごとに培地を交換し、20日間長期培養を行った。4日ごとにRNAを回収して、*PON-1*および石灰化関連因子アルカリホスファターゼ（*ALP*）ならびにⅠ型コラーゲン（*COL-1*）のmRNA発現をリアルタイムPCR法にて検討した。

（3）PON-1プラスミドまたはコントロールプラスミドをHPDLに遺伝子導入した。これらのHPDLを石灰化誘導培地に

て2日ごとに培地交換を行い、4日間培養した。2日目に遺伝子導入を確認するため、ウエスタンブロット法とリアルタイムPCR法を用いてPON-1タンパクおよびmRNA発現を検討した。次に、4日目にRNAを回収し、リアルタイムPCR法を用いて*ALP*および*COL-1*のmRNA発現解析を行った。さらに、4日目に細胞を粉砕回収して、HPDLにおけるALP活性を測定した。

(4) PON-1特異的阻害剤2-hydroxyquinoline (2-HQ) を0～100 μMの濃度で添加した石灰化誘導培地にて、HPDLを3日ごとに培地を交換し、HPDLを16日間長期培養した。4日ごとにトリパンブルー染色にて細胞生存率の計測、およびRNAを回収して、リアルタイムPCR法にて*ALP*と*COL-1*のmRNA発現を検討した。同様に4日ごとに、HPDLのALP活性を測定した。さらに、培養17日に、アリザリンレッド染色を行い、デンシトメトリック解析にて染色部の密度を数値化した。

【結果】

(1) 本研究に参加した侵襲性歯周炎患者44名（男性15名、女性29名）の臨床データは、平均年齢は32.55歳、平均ポケット値は4.2mm、Scheiのルーラーを用いて測定した平均歯槽骨吸収率は37.5%であった。エクソームシークエンスより、1人あたり約78,000個のSNPを検出した。先述の条件にて疾患関連候補遺伝子の絞り込みを行い、*PON-1*のSNP rs854560 (c.163T>A, p.Leu55Met) を含む8個の疾患関連候補遺伝子を得た。侵襲性歯周炎疾患群44名における*PON-1* SNP rs854560のMAFは13.6%であるのに対し、日本人対照群におけるMAFは7.0%であり、*p*値は1.90 × 10^{-2}、オッズ比は2.09、95%信頼区間は1.11～3.91であった。また、疾患群44名の臨床データを*PON-1*の遺伝子型別に分類したところ、ポケット深さ4～6mmの割合、すなわち中等度の歯周炎に分類される割合が、リファレンス配列を持つ患者と比較して、*PON-1* SNP rs854560を保有する患者では有意に高いことが明らかとなった。

(2) リアルタイムPCR解析の結果、HPDLの硬組織形成細胞への分化とともに*ALP*や*COL-1*のmRNA発現上昇および、*PON-1* mRNA発現の上昇を認めた。

(3) リアルタイムPCR解析およびウエスタンブロット解析の結果より、*PON-1*プラスミドを遺伝子導入したHPDLにおいて、*PON-1*のmRNA発現およびタンパク発現が、コントロールHPDLと比較して上昇することを確認した。リアルタイムPCR解析の結果、*PON-1*プラスミドを導入したHPDLにおいて、コントロールHPDLと比較して、*ALP*および*COL-1*のmRNA発現の上昇を認めた。ALP活性測定の結果、PON-1プラスミド導入HPDLでは、コントロールと比較してALP活性の上昇を認めた。

(4) トリパンブルー染色の結果、0～100 μMの2-HQは細胞生存率に影響を及ぼさなかった。リアルタイムPCR解析の結果、2-HQは濃度依存的に*ALP*および*COL-1*のmRNA発現を低下させることが明らかとなった。さらに、ALP活性測定の結果、2-HQ濃度依存的にALP活性の減少を認めた。また、アリザリンレッド染色およびデンシトメトリック解析の結果、2-HQはHPDLの石灰化ノジュール形成を濃度依存的に減少させることが明らかとなった。

【結論および考察】

エクソームシークエンス解析および遺伝子多型解析より、*PON-1* SNP rs854560を新規の日本人侵襲性歯周炎疾患関連候補遺伝子として同定した。HPDLの硬組織形成細胞への分化に伴い、*PON-1*のmRNA発現が上昇することを見出した。*In vitro*におけるPON-1機能解析の結果、PON-1はHPDLにおいて石灰化関連因子のmRNA発現およびALP活性を上昇させることが明らかとなった。また、2-HQを用いたPON-1阻害実験の結果より、石灰化関連因子の発現、ALP活性、および石灰化ノジュールの形成が、PON-1抑制下では減少することが明らかになった。すなわち、HPDLにおけるPON-1機能解析の結果より、PON-1はHPDLの硬組織形成細胞への分化を促進することにより、歯周組織の恒常性維持に寄与することが示唆された。また、*PON-1* SNP rs854560はPON-1タンパクの安定性を損なうことがこれまでに明らかとされており、*PON-1* SNP rs854560を保有するヒトは、血中PON-1の濃度が低いことが報告されている。このことから、同SNPにより、歯根膜組織におけるPON-1タンパクの発現量が低下し、歯根膜の恒常性が破綻することで、侵襲性歯周炎の発症および進行のリスクが高まることが示唆される。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　枡本　梨沙　）		
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主 査　教授　村上　伸也 副 査　教授　豊澤　悟 副 査　准教授　久保庭　雅恵 副 査　講師　大川　玲奈	

論文審査の結果の要旨

本研究は、日本人のゲノム DNA を用いた、侵襲性歯周炎疾患関連遺伝子の網羅的な探索を行ったものである。

その結果、健常群と比較し、日本人侵襲性歯周炎患者において *Paraoxonase-1* (*PON-1*) の SNP rs854560 の出現頻度が高いことが明らかとなった。また、PON-1 はヒト歯根膜細胞において石灰化関連遺伝子の発現を上昇させる機能を持ち、歯根膜の恒常性維持を担うことが明らかとなった。一方、*PON-1* の SNP rs854560 により歯周組織の恒常性が破綻することで、侵襲性歯周炎が惹起される可能性が示された。

これらの研究成果は、侵襲性歯周炎の発生および進行機序を解明する上で重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位を授与するのに値するものと認める。