

細胞間接着因子の機能不全による歯周病分子病態の解明

浜松医科大学 実験実習機器センター 准教授 小島 俊男

歯周病は、歯周組織の細菌感染により歯肉の腫脹、出血がみられ、最終的には歯が抜けてしまう、日本人が歯を失う原因としては最も頻度が高い疾患である。歯周病の初期では自覚症状がほとんどないため認識されていないことが多いが、日本人における歯周病の罹患率は、歯肉炎を含めると約8割に達する。また、歯周病は人類が罹患する最も頻度の高い感染症の一つであり、心臓弁膜症、脳梗塞、心筋梗塞、バージャー病、糖尿病、肺炎などの生活習慣病を始めとした全身疾患との関係も確認されている。心筋梗塞やバージャー病では、歯周病原菌が血小板に入り込み血栓を作り易くなることによって発症のリスクが高まる。また、糖尿病ではPorphyromonas gingivalis感染が分泌を促進する腫瘍壊死因子（TNF- α ）によって、糖尿病が増悪され、この糖尿病によって歯周病が増悪されるという負の連鎖が起こる。これらの生活習慣病を始めとした全身性疾患の予防のためにも、歯周病の効果的な予防法、治療法の確立が重要である。それには、歯周病の発症機序、特に分子病態の解明が必須であるが、歯周病分子病態については、ほとんど解明されていない。このため、歯周病の予防、治療法は、物理的な細菌叢の除去が中心となっている。

歯周病は、口腔常在菌の作用により、歯周組織における宿主側の生体応答が惹起され、慢性の炎症状態が持続的に維持されることで、歯周組織の破壊が進行していく疾患である。この細菌作用 生体応答 歯周組織破壊という病態モデルにおいて、生体応答 歯周組織破壊には、宿主側の遺伝背景による感受性の違いが示唆されている。疾患遺伝子変異の同定を目的として、これまで多くの遺伝解析が行われており、感染に対する炎症反応に関与する因子であるIL-1、Fc γ レセプターなどの関与が報告されているが、他の多くの生活習慣病の遺伝解析と同様に再現性のある知見は限られており、遺伝形式の明確なリスク遺伝子変異は同定されていない。

申請者らは、歯周病リスク遺伝子変異の同定を目的として、侵襲性歯周炎を対象として愛知学院大学歯周病学教室との共同研究を行っている。侵襲性歯周炎は、若年性発症（35歳未満）を特徴とし、家族集積性が認められるなど、一般的な歯周病である慢性歯周炎と比較して遺伝背景の強いとされる。口頭および文書によるインフォームドコンセントを行ったうえで侵襲性歯周炎患者108名、歯周健常者100名の協力を得た。協力者のゲノムDNAを用いて高密度SNPsタイピングアレイによるゲノム全域構造解析を行い、一人の患者において、細胞間接着因子をコードする遺伝子Aの欠損を同定した。遺伝子Aの欠損は、歯周健常者100名を含む約2000名には認められず、非常にまれな欠損であることが分かった。次に侵襲性歯周炎患者107名を対象に遺伝子Aの全コード領域のミューテーションスクリーニングを行ったところ、3種類の新規ミスセンス変異（ミスセンス変異a, b, c）を同定した。ミスセンス変異a, bについては、それぞれ一人の患者のみで同定された。これらは100名の歯周健常者では同定されず、非常にまれな変異であることが確認できた。また、ミスセンス

変異aは同定された患者においてホモのミスセンス変異であり、この患者はミスセンス変異cも保有していることも確認できた。ミスセンス変異cは、5名の患者で見つかった。このミスセンス変異は、歯周健常者100名中1名でも同定され、一般集団でもある程度の確率で存在する変異であることが確認できた。ミスセンス変異が同定された患者の臨床症状は、侵襲性歯周炎患者の中でも特に重度であり、ミスセンス変異aを持つ患者の場合、家族性発症が強く疑われることが共同研究先の愛知学院大学歯周病学教室の臨床症状調査、家族歴調査で判明した。これらのミスセンス変異のタンパク質機能に対する影響を調べるために理化学研究所高速分子シミュレーション研究チームの泰地チームリーダー、二木研究員の分子動力学シミュレーションによる解析を依頼したところ、全てのミスセンス変異がこの分子の機能に影響を与えるという結果を得た。以上の研究は、主に申請者らが理化学研究所で行ったものである。

以上の研究成果を踏まえて、本事業では、東北大学、愛知学院大学、理化学研究所と共同研究により以下の研究を進めている。

1 これまでの研究成果の論文発表準備

上記の研究成果は論文未発表のため、遺伝子配列データの確認、患者家族歴、臨床症状整理、分子動力学シミュレーションデータとりまとめを進め、論文発表の準備を行っている。

2 歯周組織での遺伝子A, タンパク質A発現の組織学的解析

遺伝子Aのヒト歯周組織での発現は、PCR法により確認しており、また、米国国立生物工学情報センター（NCBI）の遺伝子発現データ公開データベース（the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) database）上のデータからも確認できる。本研究では、アカゲザル歯周組織での遺伝子A、タンパク質Aの発現を組織学的手法により確認を進めている。

遺伝子Aについては、以下のように解析を進めている。アカゲザル脳組織から調整したtotal RNAから、遺伝子Aコード領域の一部の相補的DNAをクローニングした。この相補的DNAを用いて相補的RNAを合成してプローブとして用い、in situ hybridization法によってアカゲザル成獣歯周組織での遺伝子発現を解析したが、発現を確認できなかった。タンパク質発現については、市販の抗体を用いて免疫組織学的に解析を行ったが、発現確認にはいたらなかった。他の組織での解析により、遺伝子Aの発現レベルはあまり高くないことが知られているため、in situ hybridization用のプローブ設計の変更を行い、解析を継続する予定である。また、発生、発達段階で発現が変化する可能性も考えられることから、発生、発達期の解析も視野に入れたいと考えている。

3 侵襲性歯周炎患者で同定されたミスセンス変異のタンパク分子機能に与える影響の解明

ヒト骨芽腫細胞株U2OSから調整したtotal RNAからPCR法を用いて遺伝子Aのコー

ド領域全長をクローニングした。次に、侵襲性歯周炎患者で同定された3種類のミスセンス変異にそれぞれ対応する変異を導入した3種類のオリゴDNAを合成し、PCR法を用いて3種類のミスセンス変異を導入した遺伝子Aを合成した。また、患者で同定された2箇所のミスセンス変異を同時に持つ遺伝子Aも導入した。今後これらの5種類の遺伝子A（野生型1種類、変異型4種類）を用いて、以下の研究を予定している。

分子動力学シミュレーションでは、歯周病患者で同定されたミスセンス変異はタンパクAの接着能に影響を与えるという結果を得た。この結果を細胞生物学的および生化学的実験により検証する。

a) 哺乳動物細胞を用いた、分子間接着強度の解析

野生型遺伝子Aと歯周病患者で同定されたミスセンス変異を導入した遺伝子Aを哺乳動物細胞内で強制発現し、これらの細胞の振盪培養中の凝集程度を比較する事により、細胞表面に発現した分子の接着能を直接的に観測し、ミスセンス変異の影響を解析する。

b) 原子間力顕微鏡を用いた接着力の解析

大腸菌を用いて遺伝子Aとミスセンス変異を導入した遺伝子Aの組み換えタンパク質を作成し、野生型タンパクAとその変異体の接着力を原子間力顕微鏡を用いたフォースカーブ測定により、微視的定量的に測定し、野生型と変異体での接着力の比較を行う。原子間力顕微鏡は、尖端の尖った探針を試料表面に近接させ、探針と表面の間に生じる原子間力（微小な反発力や吸着力）を計測する装置である。

報告書作成時点において、具体的な研究成果は得られていないが、今後も研究を継続し、歯周病の分子病態の解明を目指したい。