

# 論 文 要 旨

*GPR141* 遺伝子と歯周炎の関連に対する喫煙の影響

令和5年度

北海道医療大学大学院歯学研究科

岡田 裕吉

## 【緒論】

歯周炎に罹患した日本人を対象に行った全ゲノム関連解析で、*GPR141* の SNP である rs2392510 が疾患関連遺伝子として示唆されている。また *GPR141* は喫煙歴との間には遺伝子環境相互作用を認められている。

*GPR141* 遺伝子は末梢動脈疾患患者のマクロファージにおいて、その発現が低下する遺伝子として報告されている。また、歯周病原細菌に対する単球・マクロファージの炎症性サイトカイン産生は、歯周炎と末梢動脈疾患の双方の増悪に関連する事が明らかにされている。このように単球・マクロファージにおいて、*GPR141* は炎症性サイトカイン産生と関連している可能性があるが、その機能は明らかにされていない。

本研究は、臨床研究で、1) 日本人の歯周炎を対象に rs2392510 と臨床症状や喫煙との関連を解析すること、2) 歯周炎における歯周組織での *GPR141* タンパク質の発現を評価すること、細胞実験で、3) 全身および口腔内健常者で非喫煙者の末梢血から分離した単球細胞の *P. g* LPS, ニコチンおよび同時刺激による *GPR141* の発現を評価すること、4) ヒト急性単球性白血病細胞株 (THP-1) 培養細胞における *P. g* LPS, ニコチンおよび同時刺激による *GPR141* の発現評価と *GPR141* タンパク質陽性細胞の観察することであった。

## 【材料と方法】

### A. 臨床研究

#### 1. 被験者

北海道医療大学にて DNA 等の試料や臨床情報を収集・保管中の歯周炎患者 115 名を対象とした。年齢、喫煙の有無、血清コチニン濃度などの全身情報及び歯周ポケット深さ (PPD) を含む口腔検査データを用いた。遺伝子検査として、同定済みの rs2392510 の遺伝子型を用いた。

#### 2. rs2392510 の遺伝子型と臨床情報の解析

被験者を喫煙者と非喫煙者とに分類し、rs2392510 の遺伝子型 (AA, AG, GG) での臨床情報の比較を行った。4 mm以上の PPD(%)と残存歯数で層別化し、rs2392510 と喫煙歴の遺伝子環境相互作用を解析した。4 mm以上の PPD (%)と残存歯数を目的変数、遺伝子型、年齢、性別及び喫煙歴を従属変数として重回帰分析を行った。

#### 3. 歯周組織の *GPR141* タンパク質の評価

北海道医療大学歯科クリニックで、歯周外科手術を行った患者の歯周組織を用いた。連続切片を作製し、H-E 染色、*GPR141* 抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

### B. 細胞実験

#### 1. ヒト急性単球性白血病細胞株細胞 (THP-1) の解析

1.0 µg/mL に調整した *P. g* LPS 及びニコチンで、1, 4, 12, 24, 48, 72 及び 96 時間刺激時の *GPR141* の遺伝子発現量を定量的 PCR 法にて測定した。

## 2. THP-1 細胞の *GPR141* タンパク質の評価

*P. g* LPS, ニコチン及び同時刺激時で、48 時間刺激後に *GPR141* 抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、*GPR141* 抗体陽性細胞率を計測した。

## 3. 患者単球の解析

北海道医療大学歯科クリニックを受診した全身・口腔内健常者の末梢血を採血し、rs2392510 の遺伝子型各 1 名の被験者 (計 3 名) を選出した。末梢血から分離した単球は *P. g* LPS, ニコチン及び *P. g* LPS+ニコチン刺激時で、48 時間刺激後の *GPR141*, IL-8 及び MCP-1 の遺伝子発現量を比較した。

### 【結果】

#### A. 臨床研究

年齢、性別、血清コチニン濃度、4 mm 以上の PPD (%) に喫煙者と非喫煙者で有意差を認めた。重回帰分析の結果、4 mm 以上の PPD (%) は rs2392510 の多型と有意な関連を認め、残存歯数は年齢と有意な関連を認めた。喫煙者において AA は AG+GG と比較し、4 mm 以上の PPD (%) が有意に大きく、残存歯数は有意に少なかった。4 mm 以上の PPD (%) 及び残存歯数に対する rs2392510 と喫煙歴の遺伝子環境相互作用は認められなかった。歯周炎患者の歯周組織では、上皮下に炎症性細胞の浸潤と *GPR141* タンパク質の発現を認めた。

#### B. 細胞実験

THP-1 細胞の *GPR141* の遺伝子発現量は *P. g* LPS 及びニコチン刺激後 48 時間で最も低下した。患者単球の *GPR141* の遺伝子発現量は、AA ではコントロールと比較し *P. g* LPS 刺激時に有意な低下を認めた。また *P. g* LPS 刺激時に AA は AG+GG と比較し有意な低下を認めた。IL-8 の発現量は、AA では、コントロールと比較し *P. g* LPS, ニコチン及び *P. g* LPS+ニコチン刺激時に有意な増加を認めた。また *P. g* LPS+ニコチン刺激時に AA は AG+GG と比較し有意な増加を認めた。MCP-1 の発現量は、AA ではコントロールと比較し、*P. g* LPS 及び *P. g* LPS+ニコチン刺激時に有意な増加を認めた。THP-1 細胞の *GPR141* タンパク質は、未刺激と比較し、*P. g* LPS, ニコチン及び *P. g* LPS+ニコチン刺激で *GPR141* タンパク質陽性細胞率が有意に低下した。

### 【考察】

臨床研究の結果、rs2392510 の AA は喫煙下で歯周炎の感受性が増加され、PD 増加や残存歯数減少のリスクとなる可能性が示された。また、歯周炎患者の歯周組織の蛍光免疫染色の結果、上皮下の炎症性細胞の浸潤領域に *GPR141* タンパク質陽性細胞を認めたことから *GPR141* の炎症状態への関与が示唆され

た．細胞実験の結果，培養 THP-1 細胞の蛍光免疫染色では，*GPR141* の発現が *P. g* LPS，ニコチン及び *P. g* LPS+ニコチン刺激時に低下していた．また，単離した遺伝子型 AA の単球における *GPR141* の遺伝子発現は *P. g* LPS 刺激によって低下し，IL-8 の遺伝子発現は *P. g* LPS，ニコチン及び *P. g* LPS+ニコチン刺激時に有意な増加を認め，MCP-1 の発現量は *P. g* LPS 及び *P. g* LPS+ニコチン刺激時に有意な増加を認めた．IL-8 及び MCP-1 は遺伝子発現レベルが歯周炎の進行とともに増加することが知られ，IL-8 及び MCP-1 はそれぞれ好中球と単球に対して強い遊走効果を有することから，遺伝子型 AA の喫煙者における *GPR141* の発現低下がケモカイン産生亢進を介して炎症性細胞の炎症部位への集簇を促進する可能性が示唆された．

#### 【結論】

rs2392510 の AA は，喫煙下で 4 mm以上の PPD の割合が有意に大きく，残存歯数が有意に少ないことが示された．*GPR141* は *P. g* LPS 刺激下で発現低下を起こすことでケモカインである IL-8 や MCP-1 の産生亢進により，単球細胞と好中球の遊走に関連する可能性が示された．rs2392510 の AA は，歯周炎増悪の感受性の亢進に関連する因子である可能性が示唆された．