

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 車 玉蘭  
学位 博士(歯学)  
学位記番号 新大院博(歯)第422号  
学位授与の日付 平成31年3月25日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
博士論文名 MAEA rs6815464 polymorphism and periodontitis in postmenopausal Japanese females: a cross-sectional study  
(閉経後日本人女性におけるMAEArs6815464多型と歯周炎:横断研究)

論文審査委員 主査 教授 多部田 康一  
副査 教授 山崎 和久  
副査 教授 小川 裕司

### 博士論文の要旨

学位申請者 車 玉蘭氏より提出された主論文(英語)の要旨(和訳)は以下のとおりである。

【背景および目的】歯周炎と全身疾患、特に糖尿病・肥満・心血管疾患などとの関係について報告されている。申請者らの所属するグループにおいては、これまでの一連の研究結果から、PPAR $\gamma$  やアドレナリン受容体など種々の遺伝子の多型が歯周炎と全身疾患との関連性に影響を与える可能性があることを示唆してきた。MAEA (Macrophage erythroblast attacher) はマクロファージと赤芽球の付着を媒介し、赤芽球やマクロファージにおける核内構造と細胞分裂、成熟細胞への分化に重要な役割を果たしている。MAEA ノックアウトマウスは致死性であるが、胎仔に貧血を呈するとともに、赤血球系、単球/マクロファージ系のいずれにおいても分化異常を示す。東アジアにおけるゲノムワイド関連研究では、MAEA 遺伝子多型(rs6815464)とII型糖尿病の間に有意な関連性が認められた。また日本人を対象とした研究の結果においても、同様の関連性が確認された。そこで本研究では、MAEA と糖尿病・肥満・骨粗鬆症など全身疾患および歯周炎との疫学的関連性を解析し、さらに炎症応答における MAEA の機能についてマクロファージ様細胞を用いて *in vitro* にて解析した。

【方法】新潟市横越地区在住の55~76歳の女性1310人のうち、書面による同意が取れ、卵巣の摘出、骨粗鬆症・肥満・糖尿病に対する投薬治療を受けている人および無歯顎者を除いた閉経後女性344人を対象とした。すべての対象女性において歯周ポケット深さ(PPD)、臨床的アタッチメントロス(CAL)、プロービング時の出血(BOP)などの臨床歯周パラメータを収集した。また、血液検査、骨密度検査、身長・体重測定、生活習慣アンケートを行った。そして同意を得て末梢血からDNAを抽出し、MAEA(rs6815464)遺伝型をTaqMan法にて同定した。*In vitro* では、THP-1由来マクロファージ様細胞において *Porphyromonas gingivalis* (*P. g*) 由来LPSで刺激した際のMAEAの発現変動を定量的PCR法とWestern blot法で解析した。また、siRNAを用いたMAEAノックダウンによるIL-8、TNF- $\alpha$ 産生の変化を測定した。

【結果および考察】MAEA遺伝型間で比較した結果、年齢・閉経年齢・BMI・HbA1c・BMD・hsCRP・歯数・平均PPDについて有意差はなかった。平均CALにおいて、Gアレル保有者と非保有者の間に有意差が認められた( $p=0.031$ )。平均CALおよび平均PPDが5mm以上の部位の割合は、Gアレル保有者が非保有者よりも高かった。多重ロジスティック回帰分析の結果、Gアレル保有が重度の歯周炎と関連し(odds ratio=3.68, 95%CI=1.35-10.05)、肥満・糖尿病および骨粗鬆症に依存していないことが示唆された。一般線形回帰モデル分析より、BMDあるいはHbA1cと平均CALの間に相関は認められず、またその結果にMAEA遺伝型の影響は認められなかった。*In vitro* 実験においては、THP-1由来マクロファージ様細胞におけるMAEAの発現がmRNAレベルおよびタンパクレベルで確認され、細胞膜に強発現していることが観察され

た。MAEA の遺伝子発現量は *P. g* LPS 刺激により濃度依存的および時間依存的に有意に減少した。*P. g* LPS 刺激による TNF- $\alpha$  と IL-8 の産生は MAEA のノックダウンによって有意に減少した。これらのことから、MAEA はマクロファージ様細胞において炎症応答を制御することが *in vitro* で示唆された。

【結論】MAEA 遺伝子多型が重度の歯周炎と関連し、MAEA の機能が歯周炎の病態形成に影響を与える可能性が示唆された。しかしながら、MAEA 遺伝子多型が歯周炎と全身疾患の関連に影響を与えるという結果は得られなかった。

#### 審査結果の要旨

本研究の学術的背景、学術的意義に関しての試問について以下の回答を得た。MAEA 遺伝子多型が 2 型糖尿病に関連するとの 2 編の既存論文がある。東アジア人集団を対象としたゲノムワイド関連解析で合計 18,817 人の結果を統合し、ヒトゲノム全体に分布する約 250 万個の一塩基多型 (SNP) について 2 型糖尿病の発症と関連する遺伝子領域の探索を行ったところ、2 型糖尿病の発症に関わる 8 つの新たな遺伝子領域が同定された。その中でも MAEA rs6815464 が 2 型糖尿病と最も強い関連を示した。その後、日本人を対象としたゲノムワイド関連解析研究でも同様の関連性が確認された。さらに、MAEA は赤血球、マクロファージ、骨芽細胞、破骨細胞など様々な細胞に発現すると報告されている。特にマクロファージにおける機能については MAEA の発見当初から詳しく研究されており、マクロファージの成熟に MAEA が重要な役割を果たすことが知られている。マクロファージは歯周炎の発症や進行において、食作用、サイトカイン産生、抗原提示、活性酸素産生など重要な役割を担っている。歯周炎は糖尿病や低骨密度などの全身疾患と密接に関わっており、全身的な慢性炎症を引き起こすことが知られている。これらのことから MAEA に注目し、MAEA 遺伝子多型 rs6815464 が糖尿病のみならず、低骨密度、歯周炎に関連し、これらの疾患の間の関連性にも影響を与える可能性があると考えた。

研究方法の選択に関する審査事項について審査が行われた。閉経後女性を対象とした理由は、MAEA 遺伝型は糖尿病と歯周炎の両方に関連していると予想されることから、閉経後女性はエストロゲンレベルの低下が原因で、男性や若い女性よりも糖尿病と歯周炎の感受性が高い。そこで閉経後女性を対象にこの研究を行えば、MAEA 遺伝型の影響の有無がより明確になると考えられた。歯周炎について CDC-AAP による定義を使用した理由として、2012 年に CDC-AAP により提唱された歯周炎の定義を使用した。この定義は集団を対象とした様々なタイプの研究に適切とされており、現在までに広く世界中で使用されている。MAEA は血球のみでなく、歯根膜細胞、骨芽細胞、破骨細胞など広く様々な組織や細胞に発現しているため、ポケット深さのみでなく、歯周組織破壊や骨代謝にも関与する可能性があると考え CAL を含む定義を使用した。しかし全身疾患と炎症との関係を明確にするため、今後、PISA 及び BGI についても解析する予定である。THP-1 細胞ではなく、MAEA 各遺伝型の対象者の末梢血から採取した単球より誘導したマクロファージに LPS 刺激を行って炎症性サイトカイン産生を調べるべきではないかとの問いに対しては、MAEA 遺伝子多型による炎症応答の差を解析する良い方法である。しかし同意を得て採血し、解析に十分な数の健常者を各遺伝型について集める必要がある。そして MAEA 遺伝型による機能差が、他の遺伝子多型による影響、年齢差、日間、日内変動などにより覆い隠されるため、それらの条件をできるかぎりコントロールするよう注意が必要であるとの回答を得た。MAEA 遺伝子多型と糖尿病に有意な関連性が認められないが、ロジスティック回帰分析に糖尿病を考慮した理由及び関連して、対象者の中で糖尿病患者数が少ないことの指摘に対して、以下が回答された。本研究においては糖尿病の患者数が少なかったため MAEA 遺伝子多型と糖尿病の関連性が統計学的に有意にならなかったと考えている。ロジスティック回帰分析に投入する因子数はアウトカムとした重度歯周炎を有する女性の人数が少なかったため限定せざるを得なかったが、MAEA 遺伝子多型と糖尿病と歯周炎の関係を解析するため HbA1c は除外できなかった。当初、MAEA 遺伝子多型は糖尿病を介して歯周炎と関連すると考えたが、それとは別の経路で、MAEA 遺伝子多型と重度歯周炎の間に関連性があることが示唆された。今後、より多い糖尿病患者を含む集団を対象に解析し、歯周炎と MAEA 遺伝子多型の関連性に糖尿病が関与するか否かを改めて検証したいと考えている。

研究結果の解析、読解の適切性に関する審査が行われた。ロジスティック回帰分析において G アレルがリスクアレルと示唆されたことから、重度歯周炎に対して遺伝型 GG の関連性が最も強いはずである。GG アレルと重度歯周炎の関連性が有意でないことの考察について以下の回答を得た。全身状態および歯周炎パラメータについて、GG 遺伝型 (C allele non-carriers) とそれ以外の遺伝型 (C allele carriers) の間に有意差が認められなかった (単変量解析)。本研究の対象者は 344 人で、GG 遺伝型は 40 人、CG 遺伝型は 159 人、CC 遺伝型は 145 人であった。GG 遺伝型の保有者が少なかったため、たとえ生物学的には GG 遺伝型と重度歯周炎の関連性が強いとしても、統計学的に有意にされなかった可能性がある。今後、疫学研究をより大規模な集団で行い、対象者の総数を増やすことで、MAEA 遺伝子多型が歯周炎に及ぼす影響がより明らかになる可能性がある。ロジスティック回帰分析に投入した交絡因子は充分だったかの考察に以下の回答を得た。本研究の対象者は 344 名であった。従って多変量解析で投入できる独立変数は限られている。MAEA 遺伝子多型に最初に注目した理由が、糖尿病と MAEA 遺伝子多型が関連するとの既存の報告であったため、HbA1c は除外できなかった。年齢と喫煙はよく知られた歯周炎発症・進行のリスクファクターであるため投入した。肥満と骨密度との関連性は本研究の目的の一部であるため low BMD と BMI を投入した。今回解析に投入した交絡因子以外にもプラークコントロール、口腔内の細菌検査結果、社会経済的因子など重要な因子があるが、残念ながら今回の疫学研究ではそれらのデータを得ることができなかった。今後、より大規模な集団で上記を含め多数の因子を投入した解析を行い本研究の結果を検証する必要がある。

論旨、考察の展開に関する審査事項を行った。本研究の MAEA 遺伝子のイントロンに位置する SNP が、どのような働きで歯周炎に影響を与えるかについて以下の回答を得た。MAEA rs6815464 について機能的解析は、まだ報告されていない。イントロンは転写後に切り出されて、完全な mRNA ができ、それが翻訳される。一般的にはイントロンの遺伝子多型はスプライシングを変化させる、エンハンサーやサプレッサーとして作用する、などの場合がある。その結果として、本来翻訳されることの無い蛋白質が作られるか、スプライシングが遅くなって完全な mRNA ができるまでに時間がかかりすぎて、必要量より少ない蛋白質が翻訳される、ということが起こるかもしれない。したがって、MAEA 遺伝子の SNP による遺伝子発現量および表現型の変化が、歯周炎の感受性に影響する可能性が考えられる。もちろん、近傍の遺伝子が機能に影響を与えている場合もある。

学位申請者 車 玉蘭氏より提出のあった主論文をもとに上記事項のように審査を実施し、合格と判定した。

以上