

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11388

研究課題名(和文) 家族性侵襲性歯周炎の関連遺伝子同定と病態解析

研究課題名(英文) Identification of related gene and pathologic analysis in familial aggressive periodontitis

研究代表者

水野 智仁 (Mizuno, Noriyoshi)

広島大学・病院(歯)・講師

研究者番号：60325181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：侵襲性歯周炎は若年時に発症し、高度な歯周組織破壊を示す。また、侵襲性歯周炎は遺伝的な要因が報告されている。しかしながら、今日まで原因遺伝子は同定されていない。本研究では、優性遺伝の遺伝形式を取る日本人1家系を対象として、リンケージ解析とエクソームシーケンシングを用いて、原因遺伝子と変異を同定した。さらにTALENゲノム編集ツールを用いる事によって、KIマウスとKOマウスを作成した。絹糸結紮歯周炎誘発モデルを用いると、KIマウスおよびKOマウスはWTマウスに比べて著大な歯槽骨吸収が起こった。得られた知見は侵襲性歯周炎の病態を理解すること、また、新たな治療方法の開発に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Aggressive periodontitis (AgP) has its onset in juvenile and is characterized by severe and rapid periodontal tissue destruction. AgP has been reported in relation to genetic background. However, to date, causative gene has not been identified. In this study, we analyzed a Japanese AgP family with autosomal dominant hereditary by using linkage analysis and exome sequencing. To understanding this pathology, we used the genome-editing tool transcription activator-like effector nuclease (TALEN) and generated knock-in (KI) mice. The aimed missense mutation and frameshift mutations were obtained. Alveolar bone loss by ligature induced inflammation was significantly increased in KI mice and KO mice compared to wild type (WT) mice. Our findings will be useful for understandings the different facets of host-pathogen interactions in AgP and developing new specific therapy for AgP.

研究分野：歯周病学

キーワード：侵襲性歯周炎 原因遺伝子 KIマウス

1. 研究開始当初の背景

侵襲性歯周炎は若年者に発症し、プラークの残存は比較的軽度であるにもかかわらず、急速に著しい歯周組織破壊を惹起する歯周炎である。以前から、家族内に集積することが多数報告されており、遺伝子の関与が強く疑われるが、原因遺伝子の同定には至っていない。遺伝学的手法で原因遺伝子を同定しようとする場合、同一遺伝子座に原因遺伝子が存在することが重要であるため、発症者が複数存在する家系の存在が必要となる。現在、少子化の影響もあり、大家系の数は少なくなっているのは事実であるが、広島大学病院歯周診療科に通院する侵襲性歯周炎患者の中に、常染色体優性遺伝性の遺伝形式をとり、同一家系内に複数の患者が4世代にわたって認められる大きな家系が存在する。

ホモ接合ハプロタイプ法は患者個人の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism:SNP)解析で得られた情報をもとに、患者間で保存されている領域を狭める方法である。ホモ接合ハプロタイプ法を用いて常染色体優性遺伝である Marfan 症候群家系の情報から疾患関連遺伝子である FBN-1 遺伝子を含む染色体領域の同定が証明されている。ホモ接合ハプロタイプ法を用いれば、同一家系内で発症している患者各個人の SNP アレイの情報を重ねあわせることによって、疾患関連遺伝子の含まれる染色体領域が十分に狭められる。申請者らはすでに、本家系内で侵襲性歯周炎を発症している患者9名に本研究の主旨を説明し同意を得たうえで、患者9名のDNAを Affymetrix SNP Chip Ver.6.0 を用いて約90万個のSNPタイピングを行った。得られた結果をホモ接合ハプロタイプ法を用いて、原因遺伝子の含まれる染色体候補領域を特定している。

また、Exome 解析法は、全ゲノムのうちエキソン配列のみを網羅的に解析する方法である。エキソンのサイズは全ゲノムの約1-1.5%に過ぎないが、タンパク質に翻訳される領域であることから、機能的に重要であり、遺伝性疾患の多くがエキソン領域の変異によって引き起こされると推定されている。そのため全ゲノム配列解析に比べ、効率よく疾患関連遺伝子を同定できる方法として注目されており、常染色体劣性遺伝形式をとる疾患のみならず、常染色体優性遺伝形式をとる歌舞伎症候群や白質脳症などの疾患関連遺伝子が同定されている。Exome 解析法を用いれば、ホモ接合ハプロタイプ法によって絞り込まれた原因遺伝子の含まれる染色体候補領域内に存在する遺伝子変異を効率よく検出することができる。本家系の原因遺伝子の変異が同定されれば、現在のところ侵襲性歯周炎を発症していない15歳以下の若年者において早期診断が可能とする本研究を着想した。

2. 研究の目的

侵襲性歯周炎に関する報告は数多く存在し、家系内に集積する症例が存在することはよく知られているが、分子あるいは遺伝子レベルでの発症の原因の解明は十分になされていないのが現状である。ホモ接合ハプロタイプ法を用いて原因遺伝子の存在する染色体上の候補領域を絞り込み、エキソン配列を網羅的に解析する Exome 解析法を用いてエキソン上に存在する遺伝子変異を効率的に検出することによって、家系内に複数の患者が存在する侵襲性歯周炎の原因遺伝子を同定し、同一家系内で未だ侵襲性歯周炎を発症していない若年者の遺伝子診断を行い、早期診断に役立てることを目的とした。

3. 研究の方法

1.Exome シークエンス

- ターゲット領域はヒト全エキソン (Roche Nimblegen V3 を使用)
- ライブラリの調整 ハイブリダイゼーション エンリッチメントの確認 シークエンシング (coverage は X150, 総データ量 10 Gb 以上)

2.バイオインフォマティクス解析

- BWA+GATK2 による解析
- SNP,InDel 変異の効果予測(アミノ酸置換やフレームシフト)とアノテーション付与
- アミノ酸置換変異とフレームシフト変異のタンパク質への影響予測 (Polyphen2,SHIFT,Mutation tester を使用)
- dBSNP と 1000 人ゲノムプロジェクトのアレル頻度情報の付与
- タンパク質に病原性を与える変異とアレル頻度情報による変異の絞り込み
- ABI3130sequencer を用いたサンガ シークエンス法によって、変異の確認

3.TAL エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) の作製

TALEN Targeter を用いた同定した疾患関連遺伝子変異を標的とする TALEN 設計 6-module assembly(選定した標的配列に対応する RVD リピートの連結)

BsaI 処理済み pFUS vector、モジュールフラグメントの調整

ライゲーション法による 6 モジュールの連結

コロニーPCR によるクローンのスクリーニング

6 モジュール連結プラスミドの調整

Golden Gate 法 による pnDNA/pCAGGS-TAL-NC2 ベクターへのモジュール連結

コロニーPCRによるクローンのスクリーニング

BspEIによるモジュール連結のチェック
SSA assay(標的配列を有するレポーターベクターとTALEN発現ベクターを共導入し、レポーター活性から切断活性を測定する。) SSAレポーターベクターの作製
SSAレポータープラスミドのシークエンス解析

トランスフェクション
ルシフェラーゼアッセイ

4. KI および KO マウスの作製

受精卵にTALENおよびssODNのインジェクション

5. 本家系以外の侵襲性歯周炎患者のゲノムDNAを用いた遺伝子変異の解析

150名(孤発例120名および常染色体優性遺伝性30名)の侵襲性歯周炎患者および健康者240名のゲノムDNAを保有している。以下の変異解析をABI3130sequencerを用いたサンガシークエンスによって調べる。

1. 本家系以外の侵襲性歯周炎患者のゲノムDNAを用いて、同定した疾患関連遺伝子の変異がどの程度の割合で認められるか。
2. 本家系以外の侵襲性歯周炎患者のゲノムDNAを用いて、同定した疾患関連遺伝子の全エクソン部位における他のSNP(ナンセンス変異あるいはミスセンス変異)およびInDelの有無。
3. 健康者のゲノムDNAを用いて上記1および2の変異が認められないことの確認。

4. 研究成果

患者情報

広島大学病院に通院する患者家系内に4人の侵襲性歯周炎患者が存在する家系を抽出した。本家系内で4人の発症者と4人の非発症者から血液を採取しDNAを抽出した。

リンケージ解析

7名のDNAをリンケージ解析に用いた。single nucleotide polymorphisms (SNPs)のジェノタイピングにはGenome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)を用い解析はAllegro softwareで行った。第3染色体と第7染色体にロッドスコアの高い領域が存在した。それぞれのロッドスコアは1.8047と1.8058であった。

エクソームシークエンスを用いた候補遺伝子の同定

エクソームシークエンスはGATKとSamtoolsでバリエーションコールを行い、Annovarでアノテーションを行った。アミノ酸変異のダメー

ジ予測はPolyPhen-2, Mutation TasterとSIFTを用いた。gDNAライブラリーの作成はSeqCap EZ Human Exome Library v2.0 (Roche, Basel, Switzerland)を用いた。シークエンスはHiSeq2000 sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA)を用い、100-bpペアエンドで行った。得られた遺伝子変異はApplied Biosystems 3130 DNA sequencer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いてサンガシークエンスを行い確定した。

発症者3名のDNAから90,000を超える遺伝子変異が検出された。オープンデータベース(dbSNP, 1000 Genomes, and EPS 6400)を用いて候補遺伝子変異の絞り込みを行い、3名に共通した282変異を抽出した。自分達の持つ中枢変性疾患のデータベースを参考にさらに絞り込みを行い、最終的に7つのヘテロ遺伝子変異を抽出した。

本家系内の発症者が共通して保有し、および非発症者が共通して保有しない遺伝子変異は1つのみであった。この変異はリンケージ解析においても高いロッドスコアを示す領域に存在した。

TALENを用いたゲノム編集によってノックインマウスの作成

KIマウスはTALENゲノム編集ツールを用いて作成した。TALENはターゲットである付近にdouble-stranded breakが起こるように設計した。活性が高くオフターゲット効果の低いTALENを作成し、MEGAscript T7 transcription kit (Thermo Fisher Scientific, Yokohama, JAPAN)を用いてmRNAを合成し、4つのヌクレオチド変異(ターゲットとなるC>T置換と制限酵素PstIを認識する置換)を含む25bpのssODNとともにC57BL/6の受精卵にインジェクションした。目的とする変異以外にも、フレームシフトを伴う5bp, 7bp, and 11bpのdeletionやinsertionがゲノム編集によって得られた。

絹糸結紮歯周炎誘発モデル

歯周炎とそれに伴う歯槽骨吸収は8週齢の雄マウスの第二臼歯に5-0絹糸をまくことによって誘発した。結紮7日後にセメントエナメルジャンクションから歯槽骨裂開部までの距離を、第一臼歯遠心、第二臼歯近心および遠心、第三臼歯近心の4点を計測し評価した。KIマウスおよびKOマウスにおいてWTマウスに比べて高度な歯槽骨吸収が認められた。

遺伝子変異保有率の解析

保有する150名の侵襲性歯周炎患者の中

に同定した遺伝子変異および他の遺伝子変異も認められなかった。

研究者番号：00633041

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

2017年 日本歯周病学会 京都
「家族症例を用いた侵襲性歯周炎原因遺伝子の解明」
水野智仁

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

水野 智仁 (MIZUNO NORIYOSHI)
広島大学・病院・講師
研究者番号：60325181

(2)研究分担者

川上 秀史 (KAWAKAMI HIDESHI)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号：70253060

岩田 倫幸 (IWATA TOMOYUKI)
広島大学・大学病院・助教
研究者番号：30418793

加治屋 幹人(KAJIYA MIKIHITO)
広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・助教