

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19019

研究課題名（和文）侵襲性歯周炎の網羅的ゲノム解析-エクソームシーケンスとNOD2変異の機能解明-

研究課題名（英文）Comprehensive genome analysis of aggressive periodontitis- Exome Sequence and functional analysis of NOD2 mutations-

研究代表者

須藤 毅顕 (Takeaki, Sudo)

東京医科歯科大学・統合教育機構・特任助教

研究者番号：10821168

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は、侵襲性歯周炎の遺伝的要因を明らかにすることを目的としている。侵襲性歯周炎のゲノム解析については、本学に設置してあるバイオリソースセンターを活用して採血、DNA抽出を実施した。昨年度DNA抽出した4サンプルに加え、さらに4サンプルの採血、DNA抽出を実施した。引き続きサンプリングは継続していく。

また並行して、登録患者の細菌ゲノムを調べることでヒトゲノムDNAと細菌ゲノムDNAの相関を解析する研究内容を追加した。従来の16S アンプリコンシーケンスに加えて、bitBiome株式会社との共同研究による1細菌レベルでのDNA配列を解析するシングルセルゲノム解析を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

侵襲性歯周炎は若くして急速な歯槽骨破壊をきたす激症型の歯周病である。一度失った骨破壊の回復は難しく、早期発見、早期予防が重要と考えられている。侵襲性歯周炎の原因遺伝子や原因細菌株などはまだまだ不明な点が多く、治療法の確立には至っていない。ヒトゲノム解析による原因遺伝子の同定、並びにマイクロバイーム解析による疾患特異的な細菌叢および細菌株の同定が出来れば、ゲノム診断によるリスク判定や発症前診断を含むオーダーメイド医療の実現が期待出来る。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to clarify the genetic factors of aggressive periodontitis. For genome analysis of aggressive periodontitis, blood sampling and DNA extraction were performed using the BioResource Center established at Tokyo Medical and Dental university. In addition to the 4 samples from which DNA was extracted last year, 4 more samples were collected and DNA was extracted.

At the same time, we added research content to analyze the correlation between human genomic DNA and bacterial genomic DNA by examining the bacterial genome of the same affected patients. In addition to the conventional 16S ribosomal sequence, a single-cell genome analysis was performed to analyze the DNA sequence at the single bacterial level in collaboration with bitBiome Co., Ltd.

研究分野：歯周病のゲノム解析

キーワード：エクソーム解析 侵襲性歯周炎

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は、細菌感染による炎症反応により歯槽骨破壊を引き起こす疾患である。疾患進行には個体差が認められ、その疾患感受性には生体側の因子も大きく関与している。侵襲性歯周炎とは、急速な骨破壊、全身疾患が存在しない、家族集積性、という3点を主な特徴とする若くしてQOLを大きく損なう難治性歯周炎であり、その早期進行メカニズムは不明であるが、遺伝要因の関与が強く示唆されている。これまで、集団に1%以上の頻度で認める遺伝子多型(SNP)に焦点をあてて、多くの遺伝子解析が行われてきたが、原因遺伝子の同定には至っていない。申請者は侵襲性歯周炎罹患率が低いことから、集団に稀な変異(mutation)が疾患発症に寄与していると考え、次世代シーケンサーによる全エクソーム解析を実施し、疾患に関わる原因候補遺伝子(NOD2)の絞り込みに成功した(Sudo et al. Journal of Dental Research 2017)。NOD2は自然免疫に関わる重要な因子であり、侵襲性歯周炎における免疫応答と疾患進行に深く関係している可能性が考えられる。これまでの研究で、5つの遺伝子変異を同定した(図2)が、この変異が疾患発症に及ぼす影響はおろか、NOD2の機能変化に関しては何も分かっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的はまず、申請者が新規発見したNOD2領域遺伝子変異の機能を解明することである。そのためにNOD2の変異が、下流シグナルにどのような影響を及ぼすのかを、ヒト細胞モデルで検証する。申請者は5つの新規NOD2遺伝子変異を同定しており、この新規遺伝子変異と機能解析を結びつけることにより、NOD2遺伝子変異の免疫応答と炎症反応への関与を明らかにする。NOD2の遺伝子変異は炎症性腸疾患に関わっていることが知られており、本結果から他の疾患へのあらたな知見が生まれる可能性も高い。さらにNOD2遺伝子のみで遺伝要因の全てを説明できないため、新たな家系内罹患者の遺伝子解析により疾患発症に寄与する更なる遺伝子変異の同定を行う。

3. 研究の方法

本研究では、NOD2領域における遺伝子変異の機能解析および他集団での変異解析を行う。また新たな家系内罹患者の遺伝子解析により、新たな疾患発症に寄与する遺伝子変異の同定を行う。本研究のフローチャートを示す(図3)。

1. NOD2の機能解析(図3)

・発現ベクターの作成

変異の入ったNOD2を強制発現させるベクターを作成する。NOD2の全長が約4000bpでありその遺伝子配列は判明している。そこで、全長NOD2をタカラバイオ社の人工遺伝子合成受託サービスにて作成する。このwildタイプの遺伝子配列に対して、Mutagenesis法にて特定部位変異遺伝子導入を行う。変異導入したNOD2領域を発現ベクターに組み替える。また、発現確認用にFLAG端末をつけた発現ベクターも作成する。Mutagenesis法が奏功しない場合には、変異の入っている遺伝子配列を人工合成遺伝子にて作成する。

・変異型NOD2発現の条件設定

ヒトNOD2変異とマウスNOD2変異では、機能に差があることが報告

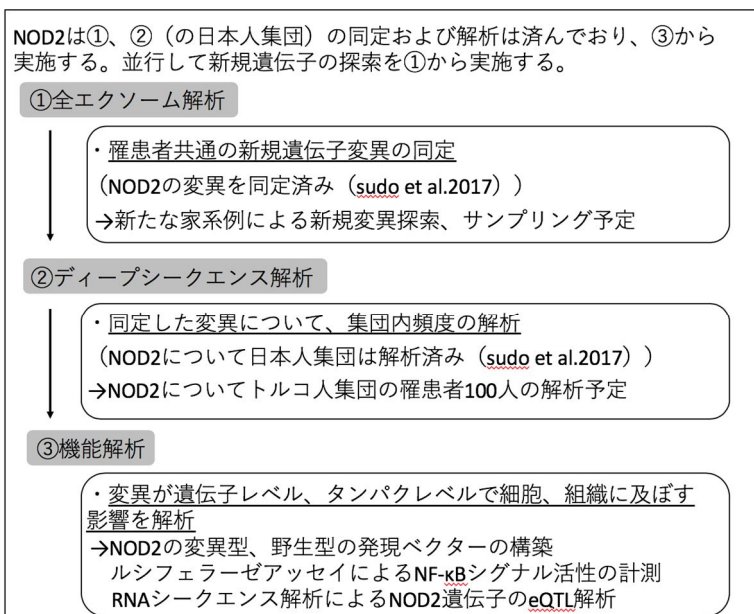


図3.本研究のフローチャート

されているため、本研究ではヒト細胞を用いた解析研究を行う。変異型 NOD2 を強制発現させドミナントネガティブな実験を行うため、内在性 NOD2 発現の少ない HEK293 細胞を最初に用いる。HEK293 で上手くいかない場合には、他の細胞の使用を検討する。トランスフェクション効率は、抗ヒト NOD2 抗体と抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロットング法により確認し、最適化を行う。

・NF- κ B レポーターアッセイ

過去の報告から NOD2 変異の NF- κ B への関与が示唆されている。そこで、NF- κ B レポーターベクターを用いたルシフェラーゼアッセイにより、NF- κ B シグナル活性を測定する。細胞への刺激物として、NOD2 のリガンドである MDP(Muramyl dipeptide)を用いる。また、NOD2 のリガンドだけではなく、TLR からの刺激によるクロストークの影響をみるために、*P.gingivalis* 菌体の超音波破砕物、*A.actinomycetemcomitans* 菌体の超音波破砕物での刺激 実験も行う。

・トランスクリプトーム解析

NOD2 領域の変異が特定のサイトカインを低下させている事例が報告されている(クローン病 NOD2 変異による IL-10 抑制 Noguchi Nat Immunol 2009)。そのため RNA シークエンス解析による発現遺伝子の網羅的解析を行う。細胞を刺激後、mRNA を回収し、ライブラリを作成する。ライブラリ作成後のシークエンスは IonProton を用いる。シークエンスデータである Fastq ファイルを用いたパイオインフォマティクス解析に用いるソフトウェアとして、レファレンス配列へのマッピングは TopHat、遺伝子発現の定量及びサンプル間の発現量の差の算出は cufflinks を、グラフの作成は R パッケージの cummeRbund を使用する。

2. NOD2遺伝子の他集団における変異解析 (図3.)

日本人以外の集団における侵襲性歯周炎罹患者に対して NOD2 領域のディープシークエンス解析を行い、変異の有無を検討し、遺伝子変異の人種を超えた generality を明らかにする。Abant Izzet Baysal 大学の研究者との共同研究により、トルコ人集団における侵襲性歯周炎罹患者および健常人の DNA サンプルを 90 サンプルずつ使用する。

3. 新たな家系例を用いた全エクソーム解析 (図3.)

侵襲性歯周炎罹患者を複数含む新たに収集された家系を用いて全エクソーム解析を行い、NOD2 以外の新たな遺伝子変異を探索する。

i) 家系例の抽出

東京医科歯科大学歯学部附属病院歯周病外来に来院され、侵襲性歯周炎と診断された患者の問診より、親族も発症している家系例のサンプリングを行う。

ii) ライブラリ作成、シークエンスによる塩基配列の取得

次世代シークエンサーは Ion Chef、シークエンスは Ion Proton を用いる。塩基配列データを取得した後、Torrent Suite ソフトウェアによる変異検出を行う。

iii) パイオインフォマティクス解析による変異の絞り込み

得られた 1 サンプル当たり数万の変異を統合し、下記のフィルタリングを行う。

(1) 低 depth 変異の除去、(2) Insertion/deletion の除去、(3) 罹患者に共通した変異以外の除去、(4) 同義置換の除去、(5) 公共データベース (Human Genetic Variation Browser、1000-genome database、NHLBI Exome Sequence Project) に登録され頻度 1% 以上のコモンバリエーションの除去。絞り込まれた変異の確認をサンガーシークエンス法にて行う。

4 . 研究成果

侵襲性歯周炎のゲノム解析については、本学に設置してあるバイオリソースセンターを活用して採血、DNA 抽出を実施している。昨年度 DNA 抽出した 4 サンプルに加え、さらに 2 サンプルの採血、DNA 抽出を実施したが、コロナウイルスの影響で外来業務、バイオバンク事業の一時休止ならびに外来患者数の制限もあり、予想より登録患者数が増えなかった。

よって当初の計画である患者数を増やしてのエクソーム解析による新規原因候補遺伝子の同定と並行して、登録患者の細菌ゲノムを調べることによる同一患者由来のヒトゲノム DNA と細菌ゲノム DNA の相関を解析する内容を追加することとした。

細菌ゲノムの解析は、従来の 16S アンプリコンシーケンスに加えて、bitBiome 株式会社との共同研究による 1 細菌レベルでの DNA 配列を解析するシングルセルゲノム解析を実施する。現在までに、4 名の罹患部位におけるプラークおよび健常 2 名の健常部位のプラークを採取し、次世代シーケンサーによる DNA 配列の取得を行った。細菌ゲノムについては、バイオインフォマティクス解析によるデータの分析を進めており、罹患者共有の細菌種および細菌株の同定を目標に研究をさらに進めていく予定である。さらに、当初の目的であった患者のヒト由来 DNA 配列において患者特有の遺伝子変異が同定出来た際には、宿主の遺伝子変異と細菌の組成および機能について、その相関およびメカニズムの解明を目指していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shungin D, Haworth S, Divaris K, et al.	4. 巻 10 (1)
2. 論文標題 Genome-wide analysis of dental caries and periodontitis combining clinical and self-reported data	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 NATURE COMMUNICATIONS	6. 最初と最後の頁 2773
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-10630-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------