

機関番号：15401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792122

研究課題名 (和文) 血族婚家系に発症する侵襲性歯周炎の原因遺伝子同定

研究課題名 (英文) Identification of responsible gene involved with aggressive periodontitis in consanguinity

研究代表者

水野 智仁 (MIZUNO NORIYOSHI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60325181

研究成果の概要 (和文)：親がいとこ婚である 2 人の侵襲性歯周炎を発症している兄弟のゲノム DNA を抽出した。SNP タイピングを行い、得られたデータを Homozygote Fingerprinting 法を用いることによってホモ接合領域を同定した。侵襲性歯周炎 2 名で各ホモ接合領域が重なる部分を実験のターゲット領域とした。次世代シーケンサーを用いた結果、5 つの遺伝子で報告されていないアミノ酸配列置換を伴う変異が認められた。

研究成果の概要 (英文)：I analysed two Japanese siblings from consanguineous marriages who had aggressive periodontitis. I performed a genome-wide scan of single nucleotide polymorphisms by using the GeneChip, and selected for the run of homozygous SNPs (RHSs) using homozygosity mapping. I extracted overlapped RHSs of two sblings as the candidate region. I listed up to 5 candidate genes which had non-synonymous mutation using next-generation sequencing technology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：侵襲性歯周炎

## 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。侵襲性歯周炎に関する報告は数多く存在するが、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。侵襲性歯周炎患者の中には、好中球の機能異常を示す患者グループが

存在すること、また家族性に発症する患者グループが存在するなど、いくつかのグループが存在し、原因因子は多様性があると考えられる。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、僻地に居住し、血族婚の家系であり、その原因因子は劣性遺伝子であることが強く疑われる患者が存在する。

劣性疾患遺伝子同定法の 1 つに Homozygote Fingerprinting 法がある。血族婚の患者が多く、常染色体劣性遺伝の疑われ

る疾患の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism : SNP) 解析では、SNP がホモ結合となる領域が連続することが予想される。患者各個人の SNP アレイではホモ接合連続領域が別々に見られても、これらの連続ホモ接合部を重ねあわせることによって、十分領域が狭められる。

事実、肺胞にリン酸カルシウムが沈着する常染色体劣性遺伝の疾患である肺胞微石症では数名の血液サンプルから約 40 の遺伝子が候補にあげられ、結果第 4 染色体上にある SLC3442(type II b Na-Pco-transporter) 遺伝子の異常が同定された。

そこで本研究は、少数の患者サンプルから疾患原因遺伝子の同定できる homozygote Fingerprinting 法を用いて、血族婚家系に発症する侵襲性歯周炎患者の原因遺伝子を同定し、早期診断に役立てることを目的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するが、分子あるいは遺伝子レベルの異常と発症の解明は十分になされていないのが現状である。本研究では侵襲性歯周炎の常染色体劣性遺伝を示すと考えられる家系において、侵襲性歯周炎を発症している兄弟 2 名の患者サンプルから疾患関連遺伝子の同定ができる Homozygote Fingerprinting 法を用いて、常染色体劣性遺伝性の家系に発症する侵襲性歯周炎患者の疾患関連遺伝子を同定し、侵襲性歯周炎の発症機序を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 血族婚家系の選択と臨床所見の分析

広島大学病院歯周診療科に通院する血族婚家系の侵襲性歯周炎患者 2 名から SNP 解析用に 7ml の血液を採取する。

### Homozygote Fingerprinting 法を用いた候補遺伝子同定の流れ

血液サンプルから genomic DNA を抽出

↓

Affymetrix SNP Chip Ver. 6.0 を用いて約 90 万個の SNP タイピング

↓

### ホモ接合領域の同定

2cM 以上ホモ接合 SNP が連続した領域をホモ接合領域とする。

↓

### ターゲット領域の設定

侵襲性歯周炎兄弟 2 名で重なるホモ接合領域を候補領域として着目する。ヒトゲノムデータベースを用いて、候補領域に存在する遺伝子情報を取得。各遺伝子のエクソンおよび周辺配列をターゲット領域として設定する。

↓

### シーケンスキャプチャー

- i) ゲノム DNA を断片化しポリッシング。
- ii) リンカーをゲノム断片の両端に結合。
- iii) ターゲット領域に対するプローブを搭載したマイクロアレイにハイブリダイゼーション後、アレイを洗浄し、ターゲット以外の DNA 断片を除去。
- iv) マイクロアレイからターゲット DNA を抽出、溶解し、ターゲット DNA 断片を増幅。
- v) 次世代シーケンサーによって DNA 配列の解読。

↓

### 候補遺伝子の同定

- i) Applied Biosystems 3130 sequencer を用いて、次世代シーケンサーによって得られた遺伝子変異結果の確証を行う。
- ii) バイオインフォマティクスを駆使し、現在まで報告されておらず (dBSNP は除外する)、かつアミノ酸置換を伴う遺伝子変異の存在する候補遺伝子の同定を行う。

## 侵襲性歯周炎患者のゲノムDNAを用いた変異の解析

100名の侵襲性歯周炎患者および健常者250名のゲノムDNAを用いて、同定した疾患関連遺伝子の変異がどの程度認められるかまた分布状況をABI 377auto sequencerでシーケンスを行う。

### 4. 研究成果

- i) 広島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の指針に基づき、親がいとこ婚である侵襲性歯周炎を発症する2名の兄弟から採血を行い、ゲノムDNAを抽出した。
- ii) Affymetrix SNP Chip ver. 6.0を用いて約90万箇所のSNPタイピングを行い、得られたデータをHomozygote Fingerprinting法を用いることによってホモ接合領域を同定した。なお2cM以上ホモ接合SNPが連続した領域を有意とした。
- iii) 侵襲性歯周炎兄弟患者2名で各ホモ接合領域が重なる約5Mbp部分を本実験のターゲット領域とした。(図1)
- iv) シーケンスキャプチャー法を用いてターゲット領域に存在する遺伝子のエクソン部分を抽出し、その塩基配列を次世代シーケンサーを用いて解析した結果、現在まで報告がなされておらず、アミノ酸変異を伴う遺伝子変異部8箇所をリストアップした。
- v) この8箇所の遺伝子変異部に着目し、Applied Biosystems 3130 sequencerを用いて遺伝子変異の検証を行ったところ、5箇所の遺伝子変異が検証された。3箇所に関しては次世代シーケンサーによる解析で冗長度が少なく、Applied Biosystems 3130 sequencerを用いた解析のほうが信頼度が高いと考えられる。
- vi) 遺伝子変異の認められた5つの遺伝子はAAA-ATPase TOB3(ATAD3B), Neuroblastoma breakpoint family member 3(NBPF3), periodic tryptophan protein 1 (PWP1), ATPase

family AAA domain-containing protein 3C(ATAD3C), nucleolar complex associated 2 homolog(NCA2)である。

- vii) 5箇所の遺伝子変異が健常者100名において認められるかを調べたところ、ATAD3B, NBPF3, ATAD3C, NCA2においては健常者でも変異が認められたため、本侵襲性歯周炎の原因遺伝子ではないと考えられた。
- viii) PWP1において認められた遺伝子変異は健常者250名において認められなかったことから、本侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子の可能性があることが示唆された。しかし、侵襲性歯周炎の弧発例、および家族性侵襲性歯周炎症例あわせて80名においてもこの遺伝子変異は認められなかったため、今後、侵襲性歯周炎の検体数をさらに増やして調べる必要がある。

<図1> 侵襲性歯周炎兄弟患者2名で重なったホモ接合領域を黒塗り以示す。



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)

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1 Mizuno N, Niitani M, Shiba H, et al.  
Proteome analysis of proteins related to aggressive periodontitis combined with neutrophil chemotaxis dysfunction. Journal of Clinical Periodontology 38(4) 2011 310-317 査読有
  
- 2 水野智仁、八木亮一、岩田倫幸、他侵襲性歯周炎に関する最近の話題 広島歯科医学雑誌 38(1) 2011 10-16 査読無

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 智仁 (MIZUNO NORIYOSHI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60325181

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：