

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593061

研究課題名(和文) ホモ接合ハプロタイプ法による侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子同定

研究課題名(英文) Identification of responsible gene involved with aggressive periodontitis by homozygosity haplotype analysis

研究代表者

水野 智仁 (Mizuno, Noriyoshi)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：60325181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：同一家系の侵襲性歯周炎を発症している患者からDNAを抽出した。SNPタイピングを行い、得られたデータをホモ接合ハプロタイプ法を用いることによって候補領域を決定した。また侵襲性歯周炎4名のDNAを用いてエキソーム解析を行った結果、2つの遺伝子でアミノ酸配列置換を伴う変異が認められた。Master mind like 2遺伝子の変異はホモ接合ハプロタイプ法によって決定した候補領域内に存在した。

研究成果の概要(英文)：I extracted DNA from patients who had aggressive periodontitis and same family members. I performed a genome-wide scan of single nucleotide polymorphisms by using the Gene Chip and decide the candidate region by using homozygosity haplotype analysis. Two candidate genes which had non-synonymous mutation was listed up by exome sequence using DNA from four patients. Mutations of master mind like 2 exists in candidate region that decided by homozygosity haplotype analysis.

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、プラークの集積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。侵襲性歯周炎には複数のリスクファクターが存在し、原因には多様性があると考えられている。遺伝学的手法で疾患関連遺伝子を同定しようとする場合、同一遺伝子座に疾患関連遺伝子があることが重要であるため、発症者が多く存在する大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、同一家系内に多数の患者が存在する家系 A に遭遇した。

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性である Marfan 症候群家系の患者 6 名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合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。そこで、ホモ接合ハプロタイプ法を用いて、常染色体優性遺伝性侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子を究明する本研究を着想した。

2. 研究の目的

常染色体優性遺伝性の侵襲性歯周炎患者

に関する報告は存在するが、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。本研究で用いるホモ接合ハプロタイプ法は少数の患者サンプルから疾患関連遺伝子の同定ができる。常染色体優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、侵襲性歯周炎の病態解明および早期診断さらに予知医療・予防医療に役立てることを目的とする。

3. 研究の方法

次世代シーケンサーを用いた候補遺伝子同定

1. ターゲット領域の設定

ヒトゲノムデータベースを用いて、ホモ接合ハプロタイプ法によって得られた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。

2. シーケンスキャプチャー (ターゲット領域 DNA 配列の解読)

- 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。

3. 候補遺伝子の同定

バイオインフォマティクスを駆使し、変異の存在する候補遺伝子の同定を行う。家系 A 内の侵襲性歯周炎患者すべてに変異が認められ、健常者で変異の認められないことを確認。

侵襲性歯周炎患者のゲノム DNA を用いた変異の解析

申請者は現在、80 名（孤発例 60 名および常染色体優性遺伝性 20 名）の侵襲性歯周炎患者および健常者 170 名のゲノム DNA を保有している。以下の変異解析を ABI3130sequencer によって調べる。

1. 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. 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ナンセンス変異あるいはミスセンス変異の有無。

3. 健常者のゲノム 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

家系内で侵襲性歯周炎を発症している患者 7 名、および発症していない健常者 6 名に本研究の主旨を説明し同意を得たうえで、採血し DNA を抽出した。家系内で侵襲性歯周炎を発症している患者 7 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、家系 A 内で発症している侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子の含まれる染色体領域を

特定した。なお 2cM 以上ホモ接合ハプロタイプの一致する領域を優位とした。その結果、chromosome11 の長腕にハプロタイプ的一致する領域を認めた。

さらに発症者 4 名の DNA を用いてエクソームシーケンスを行ったところ、150 名のコントロールでは保持しておらず、発症者に共通して保持している遺伝子変異で頻度の少ない変異あるいは、全く報告のない変異は mastermind-like 2 (MAML2) の c.G1099A:p.E367K および olfactory receptor, family 5, subfamily AU, member 1 (OR5AU1) の c.G518A:p.R173H の 2 つであった。OR5AU1 の変異は Polyphen-2 で possibly damaging (score 0.807)、mutation tester で disease causing (score 0.995)、SIFT で DAMAGING (score 0.01) であったが rs138056054 としてすでに報告があり、機能的にも侵襲性歯周炎とは関係がないと判断し除外した。MAML2 の変異は Polyphen-2 で possibly damaging (score 0.999)、mutation tester で disease causing (score 1)、SIFT で DAMAGING (score 0.02) と病原性の高い変異であることが予想され、これまでに報告のない変異である上に、前述のホモセ都合ハプロタイプ法で候補領域とした領域に存在することから、本家系の侵襲性歯周炎の関連遺伝子変異である可能性がある。

さらにコントロール 170 名の DNA を追加して MAML2 の c.G1099A:p.E367K の変異の有無をサンガーシーケンス法によって調べたが検出されなかったため、本変異はレアな変異であることが示された。

侵襲性歯周炎患者 80 名の DNA を用いて MAML2 の全エクソンの遺伝子変異を調べたが、検出されなかった。よって、今後も侵襲性歯周炎患者の DNA を増やし遺伝子変異の有無を調べる必要がある。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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・医歯薬保健学研究院・助教
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 (IWATATOMOYUKI)
広島大学・大学病院・助教
研究者番号：30418793

(3) 連携研究者

()

研究者番号：