

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 8 月 31 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670804

研究課題名(和文) Genetic Analysisによる象牙質劣化における個体差の解明

研究課題名(英文) The individual difference in the dentin deterioration by Genetic Analysis

研究代表者

佐野 英彦 (Sano, Hidehiko)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90205998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：抜去歯の歯髄と象牙質からの抽出方法の検討を行い、9.8ng/ μ lと、5.8 ng/ μ lのDNAを得ることが出来た。また、MMP9におけるrs17576の遺伝子多型をHigh Resolution Melt解析法分析法を検討し、またその遺伝子多型の頻度について分析を行った。NCBIのデータベースで10004サンプルのデータからrs17576のアリル比率ではA/A、A/G、G/Gの頻度は36.7%、44.6%、18.7%であり、HRMAによる分析でも同様に3群に分類された。自動pHサイクル装置を用いた負荷試験と組み合わせることによって、象牙質劣化を遺伝子多型によって分析する方法が確立された。

研究成果の概要(英文)：The dNA extraction procedure from pulp and the dentin specimens of tooth was able to get DNA of 9.8ng/ μ l and 5.8 ng/ μ l. In addition, High Resolution Melt analytical method (HRMA) analysis was performed for rs17576 SNP in MMP9. The frequency of the genetic polymorphism was also analyzed based on the Database of single nucleotide polymorphisms (SNPs) at the National Center for Biotechnology Information. The frequency of A/A, A/G, G/G in the rs17576 SNP is 36.7% 44.6%, 18.7%. It was classified in three groups in the analysis by HRMA on the basis of data of NCBI equally by the data of 10004 samples. A method to analyze was established by dentin deterioration by genetic polymorphism by combining it with the load examination using the device for an automatic pH cycle.

研究分野：保存修復

キーワード：High Resolution Melt分析法 DNA抽出 個体差

1. 研究開始当初の背景

象牙質の劣化は無機質の脱灰だけではなく、Matrix Metalloproteinases(MMP)による象牙質コラーゲンの分解がその一つの要因である。

象牙質の劣化を防ぎ、長期安定性を確立することは、今後の歯科治療のさらなる発展において重要な課題の一つである。近年では象牙質の劣化は無機質の脱灰だけではなく、象牙質に存在するタンパク質群の一つである MMP は活性化によって象牙質のコラーゲンを分解し象牙質の劣化させることが報告されてきている。MMP ファミリーは pH の低下によって活性化されることが報告されており、これらの象牙質の劣化は根面う蝕、そして酸蝕症、摩耗症などの Tooth wear においても重要な因子の一つである。この MMP の活性を阻害し、コラーゲンの分解を抑制する阻害剤として chemically modified tetracycline-3 (CMT-3), Zinc dichloride (ZnCl₂)等が報告されている。

一方で、医療においては薬物と個体差との研究が近年の遺伝子解析手法の進歩に伴い急速に発展しており、Pharmacogenomics として広く浸透してきている。例えば HIV ウイルスの治療薬である Avacavir と HLA-B*5701 の関連性は非常に強く (Odds 値 960) FDA では投薬前の遺伝子多型のスクリーニングを強く推奨しており、迅速で簡便な検査方法の開発も行われている。このような個体差と材料や薬物の関連の研究は臨床と直結しており、臨床にフィードバックしやすい。特定の遺伝子多型の同定に用いられる Single Nucleotide Polymorphism (SNP) の解析は一般的には DNA Sequence で解析されるが、近年、特定の SNP を短時間に検出可能な方法として、High Resolution Melting-curve Analysis (HRMA)が開発されている。この方法ではサンプルからの DNA 抽出から数時間という短時間で、低価格で特定の SNP を分析する事が可能である。さらに、リアルタイム PCR (RT-PCR) 法をも用いて行うため特定の遺伝子の定量も可能である。

保存修復の分野においては、う蝕に関連した遺伝子多型の研究が近年色々と報告されている。2011 年の American Society Human Genetics (アメリカ人類遺伝学会) の 61st Annual meeting において M, Lee らはが裂溝う蝕と平滑面う蝕に関連した染色体領域の存在、そして遺伝子多型についてについて報告しており、他にも、Genome Wide Association Study(GWAS)による乳歯う蝕に関連した遺伝子多型についての報告等なされていた。

このように、う蝕に関連した遺伝子多型の関連性が明らかになりつつある。一方で、近年様々な歯科接着材料などが開発されており、その生体親和性も研究されている。

それにもかかわらず、その親和性と遺伝子多型との関連性はほとんど研究されていない。歯科材料は口腔内に存長期にわたって存在するため、その材料から溶出する化学物質と生体との関係、または化学物質と歯質との関係において薬剤と生体との関係と同様な、遺伝子多型と関連性があると考えられる。つまり、特に修復の分野においては象牙質と材料の接着の長期安定性を確立することが重要な課題の一つであり、象牙質の劣化には MMP の酵素が強く関連していることをかんがえれば、その遺伝子多型との関連性を解明する必然性があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究においては接着強さを測定するために抜去歯をトリミングする際に得られる切削片より Human genomic DNA の抽出を行う方法を検討する。また、得られた DNA からは MMP の SNP に対し High Resolution Melting (HRM) 分析方法によるスクリーニング方法の確立を目指す。さらに、我々は、これまで、口腔内の pH 変化をシミュレーション可能な装置を用いた研究を行っており (Matsuda et al, 2006, Dent Mat J)、本研究においても pH サイクルによる負荷に伴う歯質の硬さの変化などを検討する。これらの実験方法の確立により、象牙質劣化を遺伝子多型によって分析する方法の確立をめざす。

3. 研究の方法

1) 歯牙からの DNA 抽出法法の検討

健全ヒト抜去小臼歯の全体を 5%次亜塩素酸ナトリウムを用いて 30 秒洗浄した後に、3%過酸化水素水で 30 秒洗浄した。根尖 4 mmを Isomet 自動精密切断機アイソメットを用いて切断し、根尖切断試料片を作成し PBS 緩衝液にて保存した。根尖切断時のダイヤモンドディスクは切断前に抜去歯と同様に次亜塩素酸と過酸化水素水を用いて表面に残存している DNA を除去した。その後、ディスクオーザブルトレイに満たした PBS 緩衝液を切断洗浄液として用いて、切断時の象牙質切削片混濁液を回収した。さらに、根管内に滅菌した H ファイルを挿入しファイリングし、歯髄および髄壁をファイリングし 根管試料を得た。

根尖切断試料片は TBONE EX KIT (株式会社 DNA チップ研究所) を用いて DNA 抽出を行った。

象牙質切削混濁液と管内試料はの QIAamp DNA Mini Kit (株式会社キアゲン、東京、日本) を応用し DNA 抽出を行った。

象牙質切削混濁液は 15ml 遠心チューブに移し 1000rpm で 10 分間遠心した後、上清を除去した象牙質粉末は 1.5ml 遠心チューブに 500mg 採取し、1ml の溶解溶液 (0.45M EDTA, 0.25mg/ml Protase K, pH8.0) を添

加し 56 で 12 時間インキュベートを行った。その後 5000rpm で 2 分間遠心操作を行い、上清 1ml を 15ml 遠心チューブに移し、Buffer AL (株式会社キアゲン) を 1ml 添加し 56 で 10 分間インキュベートし、その後 1ml のエタノールを添加し混和を行った。全溶解液を 600 μ l づつ QIAamp MinElute Column に添加して QIAamp DNA Mini Kit のプロトコルに準じて DNA 抽出を行った。

根管内試料は H ファイルごと 1.5ml のマイクロ遠心チューブに保存した。360 μ l の Buffer ATL (株式会社キアゲン) に 20 μ l の Proteinase K (株式会社キアゲン) 添加し 56 で一晩インキュベートを行った。その後、300 μ l の Buffer AL を添加後 70 で 10 分間加熱した。その後 14,000 rpm で遠心操作を行ない、上清を新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブに移し 150 μ l のエタノールを添加し、15 秒間混和する。スピンドウンによってチューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。全溶解液を QIAamp MinElute Column に添加して QIAamp DNA Mini Kit のプロトコルに準じて DNA 抽出を行った。抽出された DNA は Nano Drop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて DNA 量を測定した。

2) HRM 分析方法の検討

乳歯初期う蝕のとの関連性が報告されている MMP 9 の Single Nucleotide Polymorphism (SNP) である rs17576 を対象として High Resolution Melting Curve Analysis (HRMA) で分析する方法の確立を検討した。まず、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Database of single nucleotide polymorphisms (dbSNP) から、対象 SNP 周囲の DNA 配列をダウンロードし、そのデータを元に Primer3Plus を用いて設計を行い、UCSC In-Silico PCR のサイトにて PCR 反応が対象領域であることを確認し、5' -ATGGGTCAAAGAACAGGACACA-3' (rs17576-F) と、5' -GCCTTGAAGATGAATGGAAAC-3' (rs17576-R) のプライマーペアを作製した。

抽出した DNA を用いて rs17576 の PCR を行った。PCR 反応は 10 μ l の 2 \times LightCycler[®] 480 DNA SYBR Green I Master Mix (ロッシュ・ライフサイエンス), 5 μ l の DNA テンプレート, 0.2 μ l づつの rs17576-F, rs17576-R プライマーを含み反応総量は 20 μ l に調整した。PCR 反応プログラムは 95 $^{\circ}$ C で 5 分保持した後、95 $^{\circ}$ C で 10 秒, 64 $^{\circ}$ C で 20 秒そして 74 $^{\circ}$ C で 30 秒のサイクルを 35 サイクル行った。融解曲線頂点温度分析 (T_m) は 95 $^{\circ}$ C で 10 秒, 65 $^{\circ}$ C で 10 秒保持した後、1 秒あたり 2 $^{\circ}$ C の温度上昇の速度で 95 $^{\circ}$ C まで加温し、連続的に蛍光強度を測定した。

得られた PCR 生成物は Qiagen PCR

Purification kit を用いて精製した後に High Resolution Melting 分析方法によって分析を行った。HRMA 分析方法では 5 μ l のサンプルの PCR 生成物, 5 μ l の参照物の PCR 生成物, 0.7 μ l の LightCycler1 480 ResoLight Dye (ロッシュ・ライフサイエンス), 0.5 μ l の high salt solution (1.0 M KCl, 0.5 M Tris-HCl at pH 8.0), と 0.8 μ l の滅菌蒸留水を加え、計 12 μ l となる様に調整した。調整した溶液は Light cycler Nano と附属の Gene Scanning software を用いて HRM 分析を行った。

MMP2 における SNP の rs520640 についても対象に、HRM 分析のためのプライマー設計と増幅領域の SNP の頻度について分析を行った。

3) 自動 pH サイクル装置を用いた負荷試験

ヒト下顎前歯を頬舌的に半切し、分割面をスティッキーワックスより被覆した。試料の処理方法により以下の 4 群に分けた。

(1) コントロール群: 処理を行っていない群 (C), (2) ホワイトニング群: ホワイトニングのみを行った群 (W), (3) PRG バーニッシュ群: ホワイトニング直後にイオン徐放性 S-PRG フィラー含有バーニッシュタイプ 1 (松風) を塗布した群 (WPRG), (4) フローデン A 群: ホワイトニング直後にフローデン A (サンスター) を塗布した群 (WF)。

ホワイトニングは 35% 過酸化水素 (Shofu Hi-Lite; 松風) を用いて、添付指示書に従い 3 回の塗布を行った。その後、各群の試料は口腔内の環境を想定した pH サイクル環境下で保管した。pH サイクルには脱灰溶液 (0.2M 乳酸, 3.0mM CaCl₂, 1.8mM KH₂PO₄, pH4.5)、再石灰化溶液 (0.02M HEPES, 3.0mM CaCl₂, 1.8mM KH₂PO₄, 130mM KCl, pH7.0) を用いた。サイクル数は 1 日に 6 回で、各サイクル間のインターバル、及び pH を稼働させない時間 (約 8 時間) は再石灰化溶液に浸漬した。

押し込み硬さ試験

カリオテスター (三栄エムイー) を用い、圧子はエナメル質用 (R=10 μ m) を使用した。測定は pH サイクルを開始した最初の 2 4 時間は 1 サイクル毎、その後 1 週間は 1 日毎、その後は 1 週間毎 4 週間まで行った。硬さは、圧子が押し込まれた深さを求め、清水らによる換算式 $KHN = 6839D - 1.409$ により、ヌーブ硬さ (KHN) に換算した。

Transverse Microradiography (TMR)

によるミネラル分析

試料は、pH サイクル浸漬前に歯軸に平行に切断し、厚さ 200 μ m に調整し、前述の 4 群と同様の処理を行った。材料を塗布した面を除く全ての歯面をワックスにて被覆し、pH サイクル環境下に浸漬した。TMR は試料

作製後、pH サイクル 2、4 週後に撮影し、画像解析ソフトを用いて解析し、エナメル質の脱灰量 IML(integrated mineral loss) (Vol% × μm) の変化を検討した。

2週間後、4週間後の IMLの増加量(IML) の各群間の比較を Kruskal-Wallis 検定を用いて統計解析を行った。

4. 研究成果

1) 歯牙からの DNA 抽出法の検討

根尖切断試料片、象牙質切削辺混濁液、根管試料からはそれぞれ 9.8(1.6) ng/μl と、1.0(0.5) ng/μl 5.8(2.0) ng/μl の DNA を得ることが出来た。

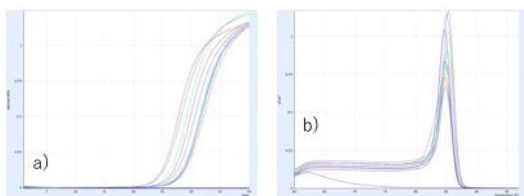
象牙質切削辺混濁液からの DNA 抽出量は少なく PCR を用いた増幅では PCR 生成物を得ることが出来なかった。したがって、根尖切断試料片、根管試料からの DNA 抽出方法が、今後の研究に適していると考えられた。

2) HRM 分析方法の検討

NCBI のデータベースを元にして 138017 サンプルの rs520640 のアリル比率分析を行った。A/G のアリルで A と G の比率がそれぞれ 43.42% と 56.58% であった。今回設計した PCR の増幅領域には他にも SNP が存在している。その内の 1 つが rs646910 の比率は A が 20.67%、T は 79.33% であるが AA のホモタイプは 7.79% であり、AT ヘテロを含む T allele の比率は 92.21% であった。その他のいくつかの SNP は確認されているものの、比率が 1% 未満のアリルであった。したがって我々の設計したプライマーを用いることにより rs520640 の SNP を迅速に識別出来る可能性が示唆された。

また乳歯う蝕との関連性が報告されている MMP9 における rs17576 の遺伝子多型を High Resolution Melt 解析法分析法を検討し、またその遺伝子多型の頻度について分析を行った。

PCR 反応物の融解曲線頂点温度分析 (T_m) のピークは平均 84.97 ± 0.23 であった。



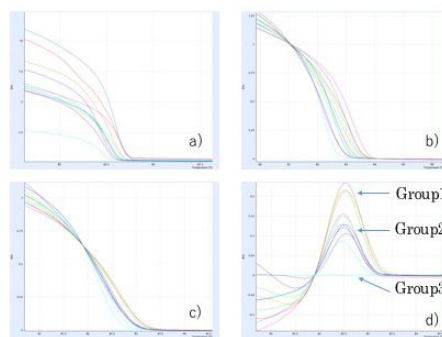
a) qPCR 反応曲線 b) 融解曲線頂点温度分析 (T_m)

NCBI のデータベースで 10004 サンプルのデータから rs17576 のアリル比率の分析を行った。その結果 rs17576 の A/A, A/G, G/G の頻度は 36.7%、44.6%、18.7% であり、HRMA による分析においても同様に 3 群に分類された。

またそれ以外の SNP についてもその頻度を検討したが、サンプルデータが無いが、または 99.9% 以上の確立で特定の SNP が存在

し、今回の HRM 分析法によって rs17576 のスクリーニングが行える事が明らかとなった。

3) 自動 pH サイクル装置を用いた負荷試験



a) HRM 生データ, b) Normalization データ
c) Temperature Shift データ, d) Different point データ

押し込み硬さ試験ではホワイトニングを行った全ての群でホワイトニング直後に硬さは減少するが、WPRG 群・WF 群では pH サイクル 1 サイクル後にホワイトニング前の硬さに戻り、その後の硬さは一定であった。それに対し、C 群・W 群では pH サイクル 4 サイクル後まで減少し、その後の硬さは一定であった。IML 4 週間後、W 群は C 群と WPRG 群に比べ有意に高い値を示した。WF 群では他の群との有意差が認められなかった。TMR 画像観察では、C 群と W 群で表層の軟化が認められ、WPRG 群でほとんど脱灰は認められず。WF 群では主に表層下脱灰が認められた。WPRG 群は押し込み硬さの値が高く、TMR による評価でも脱灰量が少ないため、脱灰の抑制が示唆された。

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 7 件)

松田康裕 う蝕リスクの遺伝子変異
北海道歯学雑誌, 査読無 36(1):
21-23 2015

Shibata S, Vieira L. C, Baratieri L. N, Fu J, Hoshika S, Matsuda Y, Sano H. Evaluation of microtensile bond strength of self-etching adhesives on normal and caries-affected dentin. Dent Mater J (査読有) 35 (2) : 166-173 2016. DOI:10.4012/dmj.2014-330

Ushimura, S, Nakamura K, Matsuda Y, Minamikawa H, Abe S, Yawaka Y. Assessment of the inhibitory effects of fissure sealants on the demineralization of primary teeth using an automatic pH-cycling system. Dent Mater J (査読有) 35

(2) : 316-324 2016. doi:
10.4012/dmj.2015-297.
Matsuda Y, Okuyama K, Yamamoto H,
Komatsu H, Koka M, Sato T, Hashimoto
N, Oki S, Kawamoto C, Sano H.
Fluorine uptake into the human
enamel surface from
fluoride-containing sealing
materials during cariogenic pH
cycling. (2015) Nucl Instrum Meth B.
(査読有) 348:156-159.
doi:10.1016/j.nimb.2015.01.062
Yamamoto H, Iwami Y, Yagi K, Hayashi
M, Komatsu H, Okuyama K, Matsuda Y,
Yasuda K. Evaluation of caries
progression in dentin treated by
fluoride-containing materials
using an in-air micro-PIGE and
micro-PIXE measurement system.
(2015) Nucl Instrum Meth B. (査読
有) 348:152-155.
doi:10.1016/j.nimb.2015.01.068
Funato Y, Matsuda Y, Okuyama K,
Yamamoto H, Komatsu H, Sano H A
new technique for analyzing trace
element uptake by human enamel,
Dent Mater J (査読有) 34 (2) :
240-245 2015. doi:
10.4012/dmj.2014-127
Ting S, Chowdhury AFM A, Pan F, Fu
J, Sun J, Kakuda S, Hoshika S,
Matsuda Y, Ikeda T, Nakaoki Y, Abe
S, Yoshida Y, Sano H Effect of
different remaining dentin
thickness on microtensile bond
strength of current adhesive
systems. Dent Mater J (査読有) 34
(2) : 181-188 2015 doi:
10.4012/dmj.2014-130

〔学会発表〕(計 4 件)

Okuyama K, Matsuda Y, Yamamoto H,
Komada Y, Abe M, Sano H, Tamaki Y
Evaluation of dentin-bound
fluoride uptaken from
fluoride-containing dental
materials. 45th Meeting of AADR,
3/16-3/19,2016 Los Angeles
Convention Center (Los Angeles)
Miyata S, Tanaka S, Matsuda Y,
Hashimoto N, Sano H and Kawakami M
Caries prevention after surface
reaction-type prereacted glass
ionomer filler-containing coating
resin removal from root surfaces.
Nano Korea 2015 Symposium 7/1-7/3,
2015 Coex (Seoul)

Matsuda Y, Hashimoto N, Okuyama K,
Koka M, Sato T, Nakamura K, Abe S and
Sano H. Quantitative analysis of
fluorine uptake in
pre-demineralized enamel from
filling materials. Nano Korea 2015
Symposium 7/1-7/3, 2015 Coex
(Seoul)
福山麻衣, 川本千春, 橋本直樹, 松田
康裕, 清水明彦, 佐野英彦 オフィ
スブリーチング後のエナメル質に対
するペースト型知覚過敏抑制材の効
果 日本歯科保存学会 2015 年度
春季学術大会 10/30-10/31, 2014
山形テルサ(山形)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 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
佐野 英彦 (SANO, Hidehiko)
北海道大学大学院・歯学研究科・歯科保
存学教室・教授
研究者番号 : 90205998

(2)研究分担者
松田 康裕 (MATSUDA, Yasuhiro)
北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再
建学系・う蝕制御治療学分野・講師
研究者番号 : 50431317