

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19592372

研究課題名 (和文) ヒトにおける齲蝕候補遺伝子の多型解析によるリスク診断法の開発

研究課題名 (英文) A development of the risk diagnosis method by polymorphism analysis of candidate gene(s) influencing dental caries susceptibility in humans

研究代表者

太田 増美 (OHTA MASUMI)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：40410047

研究成果の概要：これまで近交系マウスの交配実験から初期齲蝕感受性に関与する候補遺伝子が 3、7、8、11、16、17 番の特定領域に位置していることを報告している。そこで今回、齲蝕感受性に関与する候補遺伝子が存在する領域について QTL 解析を用いて絞込みを行ったところ染色体 7 番の 50cM 領域近傍、染色体 8 番の 38.4cM 領域近傍、染色体 11 番の 34.15cM 領域近傍に存在することが示唆された。さらに染色体 8 番上に位置する calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha subunit (*Cacna1a*)、染色体 11 番上に位置する potassium inwardly-rectifying channel, subfamily j member 12 (*Kcnj12*) が候補遺伝子となり得る可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：小児歯科学

1. 研究開始当初の背景

齲蝕発症は歯と唾液に代表される宿主、細菌、食餌の 3 つの主要因と時間の相互作用による多因子疾患である。過去に齲蝕症と主要組織適合抗原 (HLA-DR) との関連について報告されているが、宿主の遺伝的要因についてはほとんど解明されていない。近年、疾患モデルマウスを用いた分子遺伝学的研究が行われ、齲蝕感受性マウスと齲蝕抵抗性マウスの確

立により齲蝕発症に遺伝的要因が関与していることが報告され、齲蝕感受性に関与する遺伝子の存在する候補染色体が特定され始めている。

2. 研究の目的

本研究の目的は過去に報告されている齲蝕感受性に関与する候補染色体(1、2、7、8、17番)(Asada. Y: J Dent Res 71:572,1992. (Abst)., Suzuki. N: Caries Res 32: 262-265, 1998, Uematsu. T: Ped Dent J 13:75-81, 2003, Nariyama. M: Caries Res 38:79-84, 2004)と我々が特定している候補染色体(7、8、11番)(Ohta, M: Ped Dent 15(1) : 79-84, 2005)を踏まえ、

(1) 特定した齲蝕候補遺伝子の存在する候補染色体領域の中から最終的な候補遺伝子を Southern blotting、Real time PCR、Simple sequence length polymorphism (SSLP) から決定する。

(2) 絞り込んだ候補遺伝子の中から、口腔感染症に関与する遺伝子ならびにヒト遺伝子との相同性の高いものをゲノムデータベースから検索し、最終候補遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

(1) 齲蝕実験

供試マウス、供試菌株、実験方法、齲蝕評価については (Ohta, M: Ped Dent 15(1) : 79-84, 2005) を使用した。

(2) 遺伝子型

DNAは(Ohta, M: Ped Dent 15(1) : 79-84, 2005)の試料を使用した。今回、19個のMITマーカーと2個の遺伝子マーカーを遺伝子型判定に使用した(表1)。MITマーカーはResearch Genetics Inc. (Boston, Mass., USA)、Applied Biosystems (Foster city, CA) から購入した。

表1 遺伝子型判定に使用したマーカー

染色体	マーカー		
7	D7Mit194	D7Mit181	D7Mit31
	D7Mit148	D7Mit126	D7Mit262
	D7Mit357	D7Mit101	
8	D8Mit65	D8Mit104	D8Mit78
	Cacna1a	D8Mit213	
11	D11Mit82	D11Mit26	Kcnj12
	D11Mit242	D11Mit339	D11Mit177
	D11Mit262	D11Mit253	

① MITマーカーを用いた遺伝子型判定

DNAはMITマーカーを用いてPCR増幅した(PC806, ASTEC, Tokyo, Japan) (GeneAmp9700 PCR System, Applied Biosystems)。PCR産物は8%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行いデジタルカメラ撮影後、コンピューター

上で遺伝型を判定したものとABI Prism 3100 DNA Analyzer (Applied Biosystems)を用いて解析しGeneScanとGenotyperソフトウェア(Applied Biosystems foster city, CA, USA)を用いて遺伝子型を判定したものの2種類により行った。

② 遺伝子マーカーを用いた組み換えマウスの遺伝子型判定

SNPについての遺伝子型は”TaqMan SNP Genotyping Assay System (Applied Biosystems, Foster City CA.)を用い、各アレルを検出する蛍光標識hydrolysis probe (TaqManプローブ)存在下でリアルタイムPCRを行うことによりタイピングを行った。

すなわち蛍光色素VIC及びFAMで5'位を標識し、3'位に非蛍光クエンチャー分子を持つ各SNP近傍の塩基配列に相補的なオリゴデオキシヌクレオチドプローブ(TaqMan probe: 下線部がSNPに相補的)二種類を作成し、これら二種類のプローブ存在下、SNPを含むゲノムDNA断片を増幅するためのプライマーペアとTaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)を用いてポリメラーゼ連鎖反応を行った。使用したPCR用プライマーとTaqMan probeの組み合わせは以下の通りである。TaqManプローブの下線はSNPを示している。

rs33498119 (*Cacna1a*): GGGTGATGCAGCTTCTT-TGG (*Cacn* F プライマー); TCATAAACTCAGCCTGGAGTGACTA (*Cacn* R プライマー); TaqMan プローブ 1 (VIC 標識) AAACCACCAAGCG; TaqMan プローブ 2 (FAM 標識) ACCACCGAAGCG, rs28234024 (*Kcnj12*): ACCCACAGAGAT-GTCCTAAAGCT (*Kcnj* F プライマー); AACTGCCTCTGTTGTGTCA (*Kcnj* R プライマー); TaqMan プローブ 1 (VIC 標識) CAGTCAAGGAGGAACA; TaqMan プローブ 2 (FAM 標識) CAGTCAAGCAGGAACA.

LightCycler480 リアルタイムPCR装置 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN)を用い、最初の95°C 10分間の後、(92°C 15秒、60°C 60秒)のサイクルを50回繰り返し、サイクルごとにDNAポリメラーゼの exonuclease 活性によって遊離するVICおよびFAMの蛍光強度を測定して各アレルの存在を推定した。

4. 研究成果

(1) QTL解析

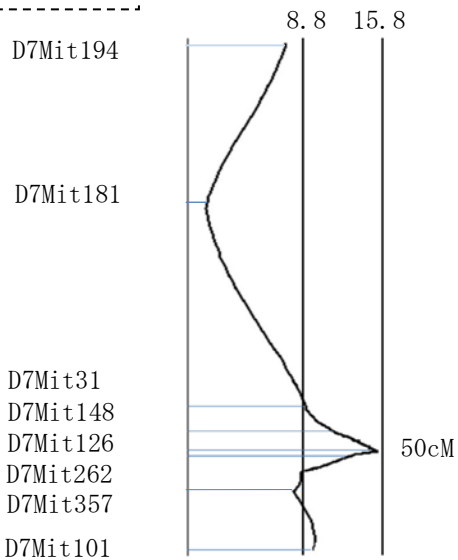
QTL解析の1つであるInterval mappingはMap Manager QTXb19を用いて行った。Permutation testにより決定されたLRSスコアを指標としてInterval mappingによりsuggestive QTLとsignificant QTLとhigh significant QTLを決定した。suggestive

linkage は 8.8 以上、significant linkage は 15.8 以上、high significant linkage は 20.5 以上であった。

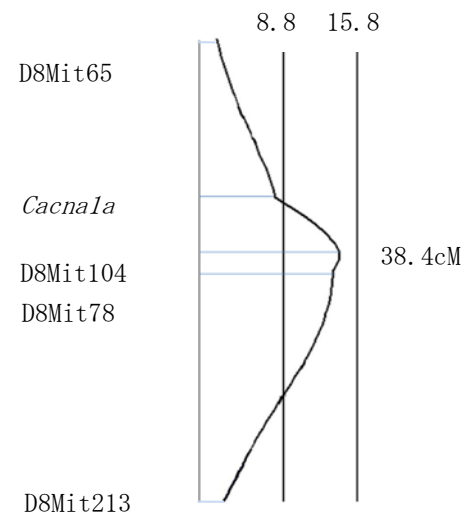
齶蝕スコアと遺伝子型を基にした QTL 解析の結果として染色体 11 番において 1 つの high significant QTL、4 つの significant QTLs、1 つの suggestive QTL、染色体 7 番において 5 つの suggestive QTLs、染色体 8 番において 2 つの suggestive QTLs が検出された。

QTL 解析の結果を図 1 に示す。染色体 11 番において *Kcnj12*(34.15cM) で high significant より高い値を示し、D11Mit26(33.9 cM)、D11Mit339(34cM)、D11Mit177(36cM)、D11Mit262(46cM) で significant より高い値を示し、D11Mit242 で suggestive より高い値を示した。染色体 8 番においては D8Mit78(38.4cM)、*Cacnala*(38.5cM) で suggestive より高い値を示した。染色体 7 番において D7Mit31(44cM)、D7Mit148(46.4cM)、D7Mit126(50cM)、D7Mit262(46 cM)、D7Mit101(60cM) で suggestive より高い値を示した。

Chromosome 7



Chromosome 8



Chromosome 11

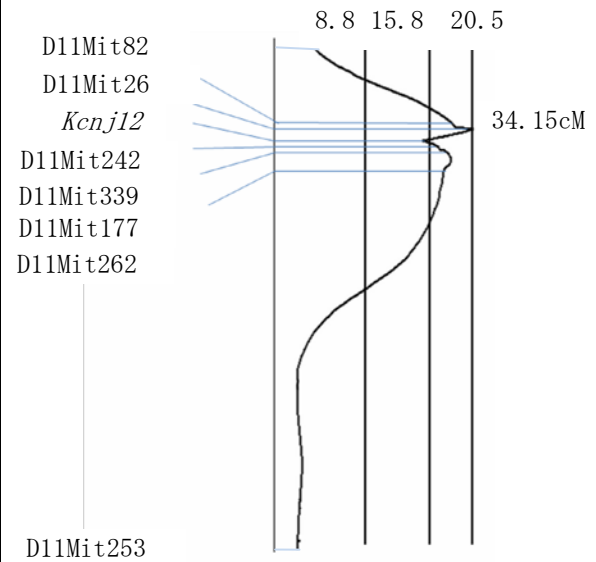


図 1 染色体 7、8、11 の Interval mapping

上記の結果より、マウスにおける齶蝕感受性に関与する候補遺伝子はそれぞれ染色体 11 番の 34.15 cM の近傍領域、染色体 7 番の 50 cM の近傍領域、染色体 8 番の 38.4 cM の近傍領域に存在する可能性が示唆された。また染色体 11 番は high significant な値を示したことから、強く関連があることが示唆された。今回、遺伝子マーカーを加え QTL 解析を試みたが 11 番染色体上に存在した *Kcnj12* は high significant な値を示し、8 番染色体上に存在した *Cacnala* は suggestive な値を示したことからこれらの 2 つの遺伝子は齶蝕感受性に関与する候補遺伝子となり得る可能性があることが判断できる(表 2)。今後、さらに候補遺伝子をピックアップし、

特定された候補遺伝子を用いた遺伝子の single nucleotide polymorphism(SNP) から齲蝕発症に関わる危険因子となり得るかについて検討し、個々の齲蝕予防のためのリスク診断につなげていきたいと考えている。

表 2. 齲蝕感受性に関与する候補遺伝子

染色体	染色体上の位置(cM)	候補遺伝子
8	38.5	<i>Cacna1</i> (calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit)
11	34.15	<i>Kcnj12</i> (potassium inwardly-rectifying channel, subfamily, member 12)

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1件)

Shimoda, S., Ohta, M., Mohideen, Y., Ohshima, T., Maeda, N., Kawasaki, K., Asada, Y.: A volume evaluation of dental caries in a mouse with the use of the micro-CT scan. J of hard tissue biology 17(3):109-114, 2008

[学会発表] (計2件)

- ① MASUMI OHTA, Mapping of candidate gene(s) influencing dental caries susceptibility in mice, 2008, 7, 4, Canada, Tronto
- ② 太田増美、ヒト齲蝕リスク診断法確立のための基礎的研究、第45回日本小児歯科学会、平成17年7月19日、タワーホール船堀 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 増美(OHTA MASUMI)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号：40410047

(2) 研究分担者

大島 朋子(OHSHIMA TOMOKO)
鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：50233101

前田 伸子(MAEDA NOBUKO)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：10148067

朝田 芳信(ASADA YOSHINOBU)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：20184145

(3) 連携研究者