

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592790

研究課題名(和文)う蝕感受性関連タンパク質のジェノタイピング

研究課題名(英文)SNP typing of the cariogenic protein gene

研究代表者

松田 康裕 (Matsuda, Yasuhiro)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：50431317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：特定の遺伝子多型を検出する方法として、PCR-Sequence Specific Primer (SSP)法と融解曲線頂点温度分析方法による検出方法を確立した。また、本方法で検出可能なHLAタイプの頻度は10%以下であり、90%以上のサンプルを識別する事が可能であることが明らかとなった。永久歯う蝕予防を行っていた子供において唾液の緩衝能とrs2274327の遺伝子多型についてう蝕の有無で検討をおこなった。その結果、う蝕無しのグループでは唾液の緩衝能が強く、rs2274327のC>Tの多型が多く、う蝕の感受性において個体差があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the discrimination method of HLA Alleles, we developed the detection method by PCR-Sequence Specific Primer (SSP) and the melt peak analysis (Tm). The frequencies of target Allele calculated from database were less than 10%, therefore our method could discriminate more than 90% samples.

We analyzed the Buffer capacity of saliva and Carbonic Anhydrase VI SNP of Children attended permanent caries preventing program. There were a positive association between caries present and buffer capacity. We could distinguish the rs2274327 (C/T) polymorphism by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) method.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

いろいろなタンパク質や特定の遺伝子多型がう蝕感受性と関連があることが報告されている。唾液タンパクの一つで細菌の付着と関連のあるペリクルの成分である Prorin-Rich Protein (PRP) はう蝕感受性リスクと関連があることが報告されている (J Dent Res, 2001 vol. 80 (11) pp. 2005-10)。PRP にはいくつかの多型が存在し、その内の一つである Db 遺伝子多型 (Pa, Pif) とう蝕罹患率の関係が報告されており、Db (+) の白人では有意にう蝕のリスクが高いことが報告されている。(J Dent Res, 2007 vol. 86 (12) pp. 1176-80) しかし日本人におけるこれらの多型とう蝕との関連性についての報告はまだ報告されていない。これまでも、日本人における PRP の多型を分析する報告が行われているが、それは唾液中の PRP タンパクを用いた方法である (歯科学報, 1990 90 巻 1183-1193)。唾液は採取が容易ではあるが、唾液タンパクは保存中にその一部が変質する可能性がある。一方、DNA は安定度が高いので、唾液、もしくは口腔内用スワブによる採取キットから DNA を採取し、それを用いてう蝕と関連のある遺伝子多型 (SNPs) 解析の方がより効果的である。

2. 研究の目的

2007 年の Science 誌の breakthroughs of the year の第 1 位に選ばれたヒトゲノムにおける Haplotype Project ではヒトゲノムの網羅的探索をおこない、3 億以上にわたる一塩基多型 (SNP's) を特定し、ヒトゲノムのバリエーションについて報告している。実はこのヒトゲノムの遺伝子のバリエーションは個体差の指標の一つとして考えられてきており、これを利用したテーラーメイド医療への発展が期待され、すでに一部では実際に臨床に応用されてきている。

近年の遺伝子解析の技術の進歩により、Sequence Specific Primer PCR 法 (PCR-SSP)、Sequence Specific Oligo nucleotide PCR 法 (PCR-SSO)、PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism 法 (PCR-RFLP) の他に High Resolution Mating curve 分析法 (HRMA) 等の高感度で DNA シークエンス法よりも効率的な SNP 検出方法が報告されている。PCR-SSP, PCR-SSO は既存の SNP をタイピングする方法として確立しており Human Leukocyte Antigen (HLA) のタイピングキットや細菌の同定キットとして用いられてもいる。また、PCR-RFLP 法は PCR の反応生成物を様々な制限酵素のうち SNP の塩基配列に特異的な制限酵素を用いて SNP の解析が行われている。High Resolution Mating curve 分析法 (HRMA) はターゲットとなる DNA 配列であるかどうかを迅速に診断する方法としてインフルエンザウイルスや BK ウイルスの迅速診断に用いられている (J Med Virol 2011 83(12), 2128-2134)。

ヒトゲノムにおける SNP はその種類によって頻度が異なり、非常に希な多型 (rare variant) や一般的な多型 (common variant) が存在する。したがって、対象となる SNP の頻度によってスクリーニングする臨床的な意義が異なってくる。さらに、う蝕感受性とジェノタイピングの検討の発展のため、実際の歯牙を用いてう蝕感受性のシミュレーションの検証が必要である。

本研究の目的は (1) 特定の HLA を対象として、多数の SNP について効率的なタイピング方法を検討する。(2) 平成元年から行われていた、歌登町における永久歯う蝕予防対策のフィールドにおいて、う蝕罹患率と唾液の緩衝能、う蝕感受性タンパクの一つである Carbonic Anhydrase VI (CA6) の SNP である rs2274327 のタイピングを行い、う蝕感受性との関連を検討する。(3) 実際の歯牙によるシミュレーションのため、これまで我々が開発してきた自動 pH サイクル装置のを用いてフッ素バーニッシュによる脱灰抑制効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) HLA-B*35:05 と HLA-B*57:01 を効率的に検出するためのプライマーは IMGT/HLA Database website にある the Probe and Primer Search Tool を用いて PCR-SSP 法のためのプライマーのデザインを行った。(http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/probe.html) GAPDH and ACTB は PCR のポジティブコントロールとして用い、ターゲットのプライマーと明確に異なる Tm を示すように設計した。

融解曲線頂点温度分析

QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて白血球分画から DNA の抽出を行った。抽出した DNA を用いて HLA-B*35:05 と HLA-B*57:01 そしてポジティブコントロールの PCR を行った。PCR 反応は 10 μ l の 2 \times LightCycler[®] 480 DNA SYBR Green I Master Mix, 5 μ l の DNA テンプレート, 0.1 μ l ずつの GAPDH と ACTB のプライマー、0.2 μ l ずつの HLA-B*57:01 または HLA-B*35:05 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 まで加熱し、連続的に蛍光強度を測定した。ポジティブサンプルは Micro SSP HLA Typing Kit (One Lambda Inc., Conoga Park, CA) を用いて再確認を行った。

我々の方法を確認するために HLA-B*35:05 (8 試料)、HLA-B*57:01 (9 試料)、HLA-B*57:02 (1 試料)、HLA-B*57:03 (1 試料) と 80 の陰性試料をテストした。加えて無作為に抽出した 176 の DNA サンプルと 8 個の HLA-B*35:05 と

9 個の HLA-B*57:01 は LAB Type SSO HLA Typing Kit (One Lambda Inc., Conoga Park, CA) で対象である対立遺伝子の頻度を検討した。

(2)

平成元年から行われていた、歌登町における永久歯う色予防対策のフィールドにおいて、平成 16 年から蝕感受性関連細菌産生酵素および唾液タンパク質検索・解析のために採取された唾液緩衝能、唾液サンプルを用いて CA6 遺伝子多型とう蝕感受性についての分析を行った。永久歯う色予防対策の参加者のうちインフォームドコンセントが得られた参加者を対象として唾液の緩衝能分析を行った。パラフィンワックスを 30 回噛んでもらい 15 ml の遠心チューブに全唾液を採取した。採取した唾液 50 μ l をコンパクトツイン pH メーター (B-212, HORIBA) に滴下し全唾液の pH を測定した後に、5 μ l の 0.1 規定塩酸を加えて混和後の唾液の pH を測定した。その後、残りの唾液は遠心分離し -80 $^{\circ}$ C で凍結保存された。

凍結された唾液からの DNA 採取は QIAamp DNA Mini (Qiagen, USA) を用いて行った。2 ml の遠心チューブに唾液 1 ml と同量の PBS buffer を加え Voltex mixer で撹拌した後、2000rpm で 10 分間遠心を行った。遠心後、上清を廃棄し 200 μ l の PBS buffer を加えてサスペンドした。その後 200 μ l の Buffer AL を加えた後、手順に沿って DNA の抽出を行った。採取された DNA は Carbonic Anhydrase VI の exon2 に特異的なプライマーを用いてリアルタイム PCR 反応によって増幅した。

反応時間は 96 5 分間、95 5 秒、64 4 秒、74 5 秒で 43 回反応させた。その後、PCR 生成物を QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, USA) を用いて精製した。rs2274327 の配列に特異的な制限酵素である BtsCI (New England Biolab) を用いて rs2274327 の解析を行った。0.1 μ l の BtsCI、2 μ l の 10x cutting buffer そして 3 μ l の PCR 生成物を加え反応総量 20 μ l として、50 $^{\circ}$ C で 16 時間保温し制限酵素処理を行った。その後 2% のアガロースゲルで電気泳動を行い rs2274327 の SNP を CC、C/T、TT の 3 種類に分類した。

(3) 塗布材料として従来型ガラスイオノマーセメント (Fuji GP FAST CAPSULE, GC) (FN)、フッ素バーニッシュ (5% Neutral Sodium Fluoride Varnish, CariFree) (FVC)、(White Fluoride Varnish 5% Sodium Fluoride, BUTLER) (FVB) の 3 種類を選択した。観察試料として、ヒト抜去大白歯を 8 本使用し (n=8)、それぞれ頬舌的、近遠心的に切断して 4 分割した。分割された試料のうち 3 個については、エナメル質と歯根面に CEJ を挟んで約 3mm の幅で各材料を塗布し、1 個は材料を塗布しないコントロール (C) とした。37 $^{\circ}$ C の脱イオン水中に 24 時間浸漬させた後、

塗布した部位が含まれるように歯軸に平行に切断した後厚さ約 200 μ m に調製し、研磨面をスティッキーワックスで被覆して single-section 試料とした。pH サイクルの設定は、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、1 サイクルで pH が 5.5 以下である時間 (脱灰時間) が平均 15.0 \pm 1.41 分、初期の pH に戻るまでの時間 (回復時間) が平均 52.17 \pm 3.82 分とした。サイクル数は一日に 6 回、各サイクル間のインターバルは 120 分で、この期間及び 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。各試料の TMR を実験開始前、pH サイクル 2、4 週間後に撮影し、得られた画像は Image J を用いた画像解析方法により解析し、IML (integrated mineral loss) (Vol% \times μ m) の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) 本研究では HLA-B*35:05 と HLA-B*57:01 を含むいくつかの対立遺伝子を迅速に検出する方法を開発した。HLA-B*35:05、HLA-B*57:01 とポジティブコントロールである GAPDH と ACTB のプライマー配列、PCR 生成物の実際に計測された融解曲線頂点温度 (T_m) の実測値と理論値、長さ、GC 比率を示す。

(A)		配列	
対象遺伝子	名前		
HLA-B*35:05	UM-F1	5'- GTC TCA CAC CCT CCA GAG C - 3'	
	UM-R1	5'- GAG CCA CTC CAC GCA CAG - 3'	
HLA-B*57:01	UM-F2	5'- GGT CTC ACA TCA TCC AGG T - 3'	
	UM-R2	5'- GTC TCC TTC CCG TT(Y) TCC A - 3'	
GAPDH	GAPDHF	5'- AGA GCA CAA GAG GAA GAG AGA GAC - 3'	
	GAPDHR	5'- CCA GAC CCT AGA ATA AGA CAG GAC - 3'	
ACTB	ACTBF	5'- TTC CGT AGG ACT CTC TTC TCT GAC - 3'	
	ACTBR	5'- TGT GCA CCT ACT TAA TAC ACA CTC C - 3'	

(B)				
対象遺伝子	T _m 測定値 ($^{\circ}$ C)	T _m 理論値 ($^{\circ}$ C)	PCR生成物長さ	GC (%)
HLA-B*35:05	90.88(0.32)	90	232bp	69%
HLA-B*57:01	91.16(0.24)	90	262bp	67%
GAPDH	84.81(0.35)	84	207bp	55%
ACTB	81.24(0.27)	81	211bp	48%

表 1

これらのプライマーを用いて融解曲線頂点温度分析を行った結果を示す。

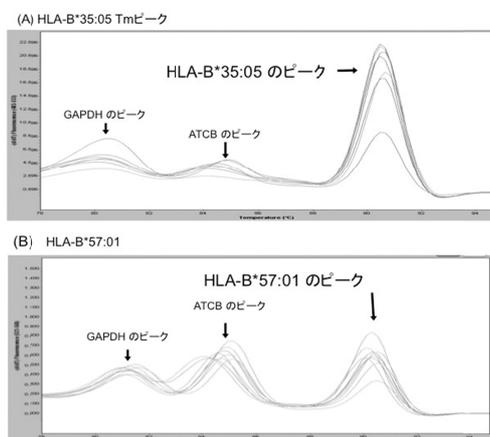


図 1

対立遺伝子頻度

対立遺伝子	全体	白人	アフリカアメリカ人	東洋人	本研究
HLA-B*35:05	1.55%	0.46%	0.28%	1.16%	0.00%
HLA-B*57:01	6.84%	7.46%	3.41%	2.17%	6.70%

表 2

この方法で検出される対立遺伝子群は複数あるが、その頻度は下のテーブルで示すように、HLA-B*57:01 の最も頻度が高い白人では8%以下であり、HLA-B*35:05 では2%であった。

この方法でスクリーニングする事により95%以上の患者のスクリーニングを行うことが可能であることが明らかとなった。

(2) 平成元年から行われていた、歌登町における永久歯う蝕予防対策のフィールドにおいて、平成16年から蝕感受性関連細菌産生酵素および唾液タンパク質検索・解析にタイしてインフォームドコンセントが得られた118人において唾液中の緩衝能の結果を分析した。う蝕有り群の91人のうち、pH4.5以下の人は69人で、う蝕無し群の27人のうち15人がpH4.5以下で、カイ二乗による統計解析の結果う蝕の有無と、唾液の緩衝能に有意差が認められた。

唾液サンプルから採取されたDNAをもちいて、Carbonic Anhydrase VI のエクソン2に特異的なプライマーを用いてリアルタイムPCR反応を行った。平均Cpは23.09で、DNAが最も少ない試料と最も多い試料ではCpの差が9.2であり630倍のDNA濃度の違いが認められた(図2a)。PCR反応プログラムではアニーリング時間、エクステンションの時間を短くし適正な値にする事によってクリアなTmピークが得られた(図2b)。

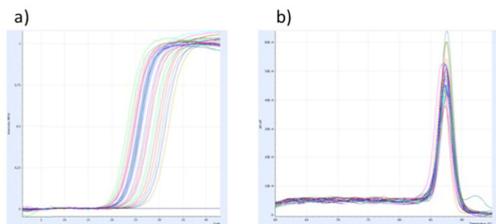


図2

精製したPCR生成物を制限酵素で処理し、電気泳動を行った結果、rs227432のSNPがCCのSNPでは制限酵素により切断されず200bpのバンド、TTのSNPでは制限酵素処理され100bpのバンドが示され、C/TヘテロのSNPでは両方のバンドが示された。

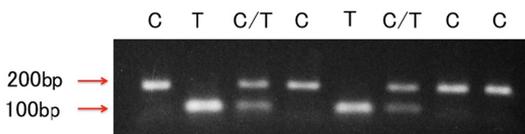


図3

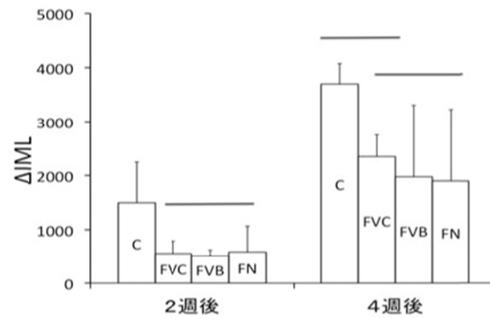


図4

rs227432のSNPとう蝕の有無との関連を検討は引き続き行っている。DNAが低濃度のサンプルからのDNA回収方法の改善、また当初の対象であった Prorin-Rich Protein (PRP) と分析も引き続き行っている。

(3) フッ素バーニッシュのシミュレーションでは2週、4週目のTMRの画像において、各材料周囲の象牙質の脱灰が抑制されている像が観察された。2週後では全ての材料群(FN, FVB, FVC)のΔIMLはコントロールと比較して有意に低い値を認めた。4週後ではFVCとコントロールで有意差は認められなかったが、FN、FVBとコントロールでは有意差が認められた。

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2件)

松田康裕、う蝕と遺伝子解析. 北海道歯誌 (査読有) 33: 50-52, 2013 (1-3)

Yasuhiro Matsuda, Hidehiko Sano, Yuichi Iwaki, Effective Screening for the HLA-B*35:05 and HLA-B*57:01 Alleles by Using an Allele-Specific Polymerase Chain Reaction Melting Assay. 2013 International Conference on Biological, Medical and Chemical Engineering (BMCE 2013) 12/2013;、査読有、SESSION 2: BIOLOGICAL SCIENCE AND ENGINEERING APPLICATIONS:160 - 168.

[学会発表](計3件)

Yasuhiro Matsuda, Hidehiko Sano, Yuichi Iwaki, Iwaki, Effective Screening for the HLA-B*35:05 and HLA-B*57:01 Alleles by Using an Allele-Specific Polymerase Chain Reaction Melting Assay. 2013 International Conference on Biological, Medical and Chemical Engineering (BMCE 2013), 2013 December 1-2, Royal Park Hotel (Hong Kong, China)

Naoki HASHIMOTO, Yoshiki FUNATO, Saiko OKI, Yasuhiro. MATSUDA, Katsushi OKUYAMA, Hiroko YAMAMOTO, Hisanori KOMATSU, and Hidehiko SANO, Comparison of Fluoride Regimens on Fluorine Uptake in Carious Enamel. IADR 2013 General Session. 2013 March 22th, Washington Convention Center (Seattle, USA)

Saiko OKI, Yasuhiro MATSUDA, Naoki HASHIMOTO, Katsushi OKUYAMA, Hiroko YAMAMOTO, Yoshiki FUNATO, Hisanori KOMATSU, and Hidehiko SANO, Demineralize Prevention of Dentin With Fluoride Varnish via Automatic pH-cycling. IADR 2013 General Session. 2013 March 22th, Washington Convention Center(Seattle, USA)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松田康裕 (MATSUDA YASIHORO)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号 : 50431317

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

太田 亨 (OHTA TORU)
北海道医療大学・个体差健康科学研究所・教授
研究者番号 : 10223885