

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：15401
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011 ～ 2012
課題番号：23659978
研究課題名（和文） 劣性遺伝解析による侵襲性歯周炎関連遺伝子の同定
研究課題名（英文） Detection of disease causing genes of aggressive periodontitis by recessive analysis
研究代表者
栗原 英見（KURIHARA HIDEMI）
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授
研究者番号：40161765

研究成果の概要（和文）：Homozygosity mapping 法およびエキソームシーケンシング法を用いることによって、1 家系に発症する侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子の候補遺伝子を 4 つ（ARHGF16, SLC2A7, SLC2A5, CASZ1）を同定した。しかしながら、侵襲性歯周炎の孤発例において、これらの遺伝子に新たな変異は認められなかったため、検体数を増やして調べる必要がある。

研究成果の概要（英文）：We detected the four mutations (ARHGF16, SLC2A7, SLC2A5, CASZ1) in patients with aggressive periodontitis by using homozygosity mapping and exome sequence. However, these mutations were not detected in our sporadic and control exomes. More samples are needed to be examined

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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

劣性遺伝

関連遺伝子

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。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、親が血族婚で、侵襲性歯周炎を発症する兄弟が存在し、その疾患関連遺伝子は劣性遺伝であることが強く疑われる家族症例に遭遇した。

劣性疾患遺伝子同定法の 1 つに

Homozygosity mapping 法がある。血族婚の患者遺伝子の一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism：SNP）解析では、SNP がホモ結合となる領域が連続する。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、疾患と関連する遺伝子の領域を十分に狭めつことが可能になる。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（Pulmonary alveolar microlithiasis）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 SLC34A2 遺伝子の異常が同定された。さらに、患者が兄弟である場合は、同一遺伝子座に疾患関連遺伝子が存在するため、疾患関連遺伝子を同定できる可能性が極めて高くなる。

そこで、2 名の血族婚由来の兄弟患者サンプルから、疾患原因遺伝子を同定するために、Homozygosity Mapping 法およびエクソームシーケンス法を用いて、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本研究を着想した。本研究で成果をあげることが出来れば HOMOZYGOSITY Mapping 法およびエクソームシーケンス法は、侵襲性歯周炎関連遺伝子同定の強力なツールとなりうるばかりでなく、侵襲性歯周炎関連遺伝子同定に成功すれば予知医療、また新たな歯周治療の開発につながる可能性がある。

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 HOMOZYGOSITY mapping 法およびエクソームシーケンス法を用いて、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、未だ明らかとなっていない、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

常染色体劣性遺伝性の侵襲性歯周炎患者の選択と臨床所見の分析

Affymetrix SNP Chip ver.6.0 を用いた SNP 解析用に約 7ml の

血液を採取。

血液提供者は広島大学病院歯周診療科に通院する、常染色体劣性遺伝の疑われる侵襲性歯周炎の兄と妹の患者 2 名（両親がいとこであり、血族婚）

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

1. DNA の抽出

QIAamp DNA blood Midi kit を用いて、患者血液からゲノム DNA を抽出。

2. SNP タイピング

Affymetrix SNP Chip Ver.6.0 を用いて、約 90 万個の SNP タイピングを行う。

3. HOMOZYGOSITY Mapping 法を用いた候補領域 (RCHH: region of conserved homozygosity haplotype) の設定

3CM 以上ホモ接合領域の続く部分を候補領域とする。

4. 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、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。

5. エキソーム シーケンス

i) sample genome DNA test

ii) prepare fragment library
Nimblegen SeqCap EZ Exome V3.0 を用いる

iii) target fragments enrichment

- iv) enriched library amplification
- v) library quality control and quantification
- vi) Hiseq 2000 sequencing

6. 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

本家系に特異的な遺伝子変異の抽出

(148名のエキソームシーケンスのデータベースを使用)

Polyphen2, mutation taster, SIFT を使用することによって、遺伝子変異の prediction を行う。

サンガー法 (Applied Biosystems 3130 sequencer) によって遺伝子変異の存在を確認

孤発例の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192名のゲノムDNAを保有している。このゲノム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サンガー法 (Applied Biosystems 3130 sequencer) でシーケンスを行う。

4. 研究成果

解析結果として、7つのSNPが得られた。Insertionおよびdeletionは得られなかった。これらの遺伝子変異7つに着目し、Applied Biosystems 3130 sequencerを用いて、遺伝子変異の検証を行ったところ、7か所の遺伝子変異すべてが検証された。さらに7か所の遺伝子が健常者192名において調べたところ、3つの遺伝子変異が健常者において認められたため除外した。本家系の侵襲性歯周炎患者において特異的な変異を有する遺伝子は Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 16 (ARHGEF16), Solute Carrier Family 2A7 (SLC2A7), Solute Carrier Family 2A5 (SLC2A5), Caster Zinc Finger 1 (CASZ1)である。

Predictionの結果は、ARHGEF16はpolyphen2においてBenign、mutation tasterにおいてPolymorphism、SIFTにおいてToleratedであった。SLC2A7はpolyphen2においてPossibly damaging、mutation tasterにおいてdisease causing、SIFTにおいてToleratedであった。SLC2A5はpolyphen2においてBenign、mutation tasterにおいてPolymorphism、SIFTにおいてDamagingであった。CASZ1はpolyphen2においてPossibly damaging、mutation tasterにおいてPolymorphism、SIFTにおいてToleratedであった。Predictionの結果からでは、SLC2A7とCASZ1の遺伝子変異がタンパク質変異に与える影響が大きいことがわかった。

しかし、侵襲性歯周炎の孤発例100名においても、これら4つの遺伝子変異は認められなかった。また、ARHGEF16, SLC2A7, SLC2A5, CASZ1のすべてのエクソンを調べても新しい遺伝子変異は認められなかった。よって、今後、侵襲性歯周炎の検体数を増やして調べる必要がある。

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)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗原 英見 (KURIHARA HIDEMI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授
研究者番号: 40161765

(2) 研究分担者

水野 智仁 (MIZUNO NORIYOSHI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号: 60325181

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 (IWATA TOMOYUKI)
広島大学・病院・助教
研究者番号：30418793

(3) 連携研究者
()

研究者番号：