

〔学位論文〕

日本人歯周炎患者のゲノムワイド関連解析 －歯周炎感受性遺伝子検索のための多施設研究－

清水 伸太郎

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系 歯周歯内治療学分野

A genome-wide association study of periodontitis in a Japanese population －Multicenter Research for periodontitis susceptibility gene－

Shintaro SHIMIZU

Division of Periodontology and Endodontology, Department of Rehabilitation, School of Dentistry,
Health Sciences University of HokkaidoKey words : *Periodontitis, Gene, SNP*

緒 言

歯周炎は、いくつかの感受性遺伝子や、環境要因の影響を背景として細菌要因が加わることで発症する多因子疾患であると考えられている (Stabholz et al., 2010)。歯周炎は、成人の歯の喪失の主要な原因として、生活の質に重篤な影響を及ぼしている。

日本人では、慢性歯周炎 (Chronic Periodontitis : CP) の罹患率は約48%、侵襲性歯周炎 (Aggressive Periodontitis : AgP) の罹患率は約0.5%であると考えられている (Okamoto et al., 1988 ; Albandar et al., 2002)。歯周炎は、細菌要因を主要な原因とし、多くの場合口腔清掃不良により増幅される (Berezow et al., 2011 ; Darveau, 2010)。歯周炎の発症と進行は、環境要因である喫煙 (Tomar et al., 2000) 等により影響を受ける。加えて宿主要因である年齢、性別 (Shiau et al., 2010) 等により影響を受ける。

これまで歯周炎に対する候補遺伝子研究では、自己免疫、サイトカインによる炎症反応などに関連する遺伝子に焦点が当てられてきた。しかし未だ一致した結論が得られている遺伝子は認められていない (Laine et al., 2012)。近年では、ゲノムワイド関連解析 (Genome Wide Association Study : GWAS) が注目されており、現在までに欧米人のAgPとCPを対象としたGWASが行われている (Divaris et al., 2013 ; Schaefer et al., 2010)。AgP

についてはGWASの有意水準 ($P \leq 5.0 \times 10^{-8}$) を満たした感受性遺伝子が報告されているが、CPにおいてはGWAS有意水準を満たした感受性遺伝子は認められていない。また、これまでにアジア人の集団でのGWASは行われていない。

本研究では日本人の歯周炎についての感受性遺伝子を同定することを目的として、日本人の歯周炎の被験者に対しGWASを行った。

方 法

被験者 : GWASでは、BioBank Japanの歯周炎の被験者1,593人を使用した。対象者としてBioBank Japanのゲノムワイドスクリーニングデータ7,980人を使用した。再現性研究 (Replication study) では北海道医療大学 (n = 141)、東京医科歯科大学 (n = 35)、及びBioBank Japan (n = 991) の歯周炎の被験者1,167人を使用した。対象者としてBioBank Japanのゲノムワイドスクリーニングデータ7,178人を使用した。本研究は、理化学研究所横浜研究所、北海道医療大学、及び東京医科歯科大学の倫理審査委員会にて承認されており全ての被験者からこの研究のための文書によるインフォームドコンセントを得ている。

被験者の集団の構造化の評価として、HapMap phase II のデータベースから得られた人種ごとの遺伝子型のデータを融合させ、主成分分析を行った。

品質管理 (Quality Controls : QC) として, i) 患者群と対照群で共に Single nucleotide polymorphism (SNP) の Call rate $\geq 99\%$, ii) 対照群のハーディワインベルグ平衡 (Hardy-Weinberg Equilibrium : HWE) が $P > 1.0 \times 10^{-6}$, iii) 患者と対象者で共に低頻度アレル頻度 (Minor Allele Frequency : MAF) ≥ 0.01 , iv) 近親者の検体の除外, v) トップ100SNPについて専門家による解析結果の視覚的チェック, を行った。

GWASで患者群と対象者に対して Human Omni Express BeadChip (OmniExpress, イルミナ株式会社) を使用し 597,434SNPの遺伝子型を同定した。Replication studyではマルチプレックスポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction : PCR) 併用の Invader 法を用いて, GWASの結果において $P \leq 5.0 \times 10^{-4}$ を示す250SNPを選択し, 遺伝子型を同定した。

関連解析は Cochran-Armitage 検定を使用した。GWASでは $P \leq 5.0 \times 10^{-4}$, Replication studyでは $P < 0.05$ を統計的有意水準として定めた。遺伝子環境相互作用 (*P*-interaction) の調査は関連が示唆されたSNPを, 歯周炎と対象者を喫煙歴で層別し解析を行った。また関連の示唆されたSNPは限局型歯周炎と広汎型歯周炎に層別し解析を行った。 *P*-interaction < 0.05 を統計的有意水準として定めた。GWASとReplication studyの結果については, Inverse variance法にて統合解析 (Combined analysis) を行った。Combined analysisの結果にて, $P < 5.0 \times 10^{-8}$ をゲノムワイド関連解析の有意水準とした。また, Replication studyにて $P < 0.05$, GWASとReplication studyで一致した傾向, 及びReplication studyにて $P < 1.0 \times 10^{-5}$ を示すものを関連の示唆されるSNPとした。

結 果

主成分分析より本研究の被験者は一般的な日本人のクラスターと一致していた。また, 被験者における遺伝子型同定のエラーや, 集団の構造化等に起因する偽陽性の可能性は低く, 遺伝子型同定を行う上で問題ないことが示唆された。

GWASとReplication studyの結果2SNPは, Replication studyにて $P < 0.05$, GWASとReplication studyで一致した傾向, 及びCombined analysisにて $P < 1.0 \times 10^{-5}$ を示し関連が示唆された。しかしゲノムワイド関連解析の有意水準 ($P < 5.0 \times 10^{-8}$) を満たすSNPは認められなかった。

既報のGWASにおいてAgPやCPと関連があると報告されている遺伝子は, 本GWASでは有意な関連を認めなかった。

また候補遺伝子研究において今までに歯周炎と関連が

あると報告されている遺伝子多型について検討したところ, 有意な関連を認めなかった。

関連が示唆された2SNPと喫煙歴での層別解析の結果, 喫煙歴とSNPとの間に相互作用を認めた。

また関連が示唆された2SNPについて病型にて層別解析を行いORを比較したところ, 病型とSNPとの間に関連を認めた。

考 察

本研究は, 日本人の歯周炎患者を対象とした初めてのゲノムワイド関連解析である。本研究では関連の示唆される遺伝子座位として2SNPを同定した。

本研究モデルは対照群が遺伝要因以外の宿主因子 (男性, 糖尿病) や環境因子 (喫煙経験) を多く有していることから, 患者群で認められた特徴が遺伝要因以外の宿主因子, 環境因子によるものである可能性が低く, 遺伝要因を見るためには適切なモデルであると考えられた。

既報のGWASにおいてDivarisらは欧米人で慢性歯周炎のゲノムワイド関連解析で関連の示唆される遺伝子を報告し, Schaeferらは欧州人の侵襲性歯周炎のゲノムワイド関連解析でゲノムワイド関連解析の有意水準を満たす遺伝子を報告している。しかしながら, 本研究では歯周炎とこれら遺伝子の間に有意な関連を認めなかった。これら遺伝子は, 病型及び, 診断の違いにより関連を認められなかった可能性, または欧米人との人種差により関連を認められなかったと結論付けられる。

既報の候補遺伝子研究結果から歯周炎と関連があると報告されている遺伝子多型について検討したところ, 有意な関連を認めなかった。これら候補遺伝子は本ゲノムワイドレベルで関連を認めなかったことから, 歯周炎の遺伝率を説明する割合としては低いものと考えられる。しかし歯周炎は多因子疾患であることから候補遺伝子のリスクアレルを複数有することで, 歯周炎の遺伝率を高める可能性も考えられる。

本研究では, 関連が示唆されたSNPに対する喫煙歴の影響を検索した。また関連が示唆されたSNPについて病型別での関連の強さを解析した。喫煙率は限局型歯周炎よりも広汎型歯周炎で高かったことなどから, 遺伝子の喫煙に対する感受性が病型に関連する可能性が考えられた。

これらの結果は, いくつかの環境要因は遺伝要因と相互作用を持ち, SNPと環境要因の総合的な解析は, 歯周炎へのSNPの関連を明確にするために必要であると考えられた。歯周炎の遺伝的要因は細菌要因や環境要因の感受性に関与する可能性がある。よって歯周炎の感受性遺

伝子の同定のためには、細菌要因や環境要因を考慮した検体を用いた総合的な解析が必要である事が示唆された。

結 論

本研究では日本人で初の歯周炎のゲノムワイド関連解析を行い、感受性遺伝子の可能性がある2領域を同定した。本研究で得られた結果についてさらに再現性の確認を行うことによって疾患の病因についての理解や、新たな予防や治療法の開発に繋がる可能性が示唆された。



清水 伸太郎

平成21年3月 北海道医療大学歯学部歯学科 卒業

平成26年3月 北海道医療大学歯学部歯学研究科博士課程 修了

平成26年4月 北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系
歯周歯内治療学分野 助教