

論文要旨

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

平成 25 年度

北海道医療大学大学院歯学研究科

清水 伸太郎

【諸言】

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。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。歯周炎は慢性歯周炎（Chronic Periodontitis, CP）と侵襲性歯周炎（Aggressive Periodontitis, AgP）に大別されている。日本人ではCPは一般的な病型で35歳以上の成人で発症することが多く約30%の罹患率を示し、AgPは15 - 35歳の若年期に発症することが多く0.05 - 0.1%の罹患率を示す。AgPではプラーク細菌の量や停滞時間が少ないにもかかわらず重篤化すること、家族内集積がみられることから、特異的な歯周病原菌の感染、免疫応答の障害、歯周炎の遺伝的感受性などの特徴が報告されてきたが、未だ明確な機序は明らかとなっていない。これまでの歯周炎に対する候補遺伝子の研究では、自己免疫、サイトカインによる炎症反応、細胞表面の受容体、酵素や主要組織適合遺伝子複合体に関連する遺伝子に焦点を当てている。しかし未だ一致した結論の得られている遺伝子は認められておらず、結果については議論の余地があると考えられている。近年では、疾患の発症機序等の前提を考慮せず、ゲノム全体を網羅的に調べ、疾患と関連する遺伝子を同定する研究手法である Genome Wide Association Study (GWAS) が注目されている。現在までに欧米人のAgPとCPを対象としたゲノムワイド関連解析が行われており、AgPについてはゲノムワイド関連解析の有意水準（ $P \leq 5.0 \times 10^{-8}$ ）を満たした感受性遺伝子が報告されたが、CPのゲノムワイド関連解析においては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、上記以外の人種でのGWASは報告されていない。今回の研究では、日本人の歯周炎の感受性遺伝領域、または候補となる領域の同定と、その領域と疾患との関連を検討することである。

【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 597,434 SNP 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 250 SNP 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 (Pintraction) 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。Pintraction <

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。

【結果及び考察】

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。本研究は2,760人の歯周炎患者と15,158人の対象者を用いている。GWAS と Replication study の結果 2 SNP 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。

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。

【結論】

本研究では本邦の歯周炎患者を対象としたゲノムワイド関連解析を行い、感受性遺伝子の可能性のある 2 領域を同定した。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。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に繋がる可能性が示唆された。