

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792315

研究課題名(和文) SNPs解析を用いた齲蝕リスク診断の確立と遺伝子検査の開発

研究課題名(英文) The establishment of diagnostic method for caries risk using SNPs analysis and the development of genetic test

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は日本人小児においてDLX3遺伝子のSNPsがう蝕感受性と関連があるか調査することであった。被験者は5、6歳の日本人小児200名とした。う蝕経験群と各アレル、遺伝子型との関連は二乗検定により評価した。S.mutans high level群でのrs2278163 SNPのalleleとgenotypeそれぞれにおいてう蝕経験群との間に有意な相関が認められた。この結果から日本人においてDLX3遺伝子のrs2278163 SNPはう蝕感受性に影響する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated whether single nucleotide polymorphisms(SNPs) in DLX3 is associated with dental caries susceptibility in Japanese children. A total of 200 Japanese children age 5 to 6 years with or without caries were recruited. The association between an allele and caries experience as well as the genotype and caries experience was assessed by Chi-square analysis. In the SNPs analysis, both the alleles and the genotypes of rs 2278163 in DLX3 were associated with dental caries experience in S.mutans high level group. As a result, our findings suggest that rs 2278163 SNP of DLX3 might be associated with dental caries susceptibility in Japanese population.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：う蝕感受性 SNPs解析 DLX3 小児

1. 研究開始当初の背景

これまでう蝕罹患と遺伝要因との関連についての報告はされているが、その詳細は不明な点が多かった。しかしながら、疾患モデルマウスを用いた分子遺伝学的研究が行われ始め、う蝕感受性マウスとう蝕低抗性マウスの確立によりう蝕発症に遺伝的要因が関与していることが示唆され、う蝕感受性に関与する遺伝子の存在する候補染色体が報告されている。また最近、SNPs を応用した遺伝子多型解析が容易となりヒトにおいて宿主を標的にした研究についてう蝕と関連を示唆する遺伝子が複数報告され始めている。さらに、ヒトの全ゲノムワイドに調査した研究から高う蝕感受性と低う蝕感受性に関与する候補染色体領域が報告されている。

2. 研究の目的

近交系マウスの交配実験から初期う蝕感受性に関与する候補遺伝子が染色体 11 番上に存在していることを報告している。さらに染色体 11 番上に存在する *DLX3* 遺伝子についてヒト *DLX3* 遺伝子と相同性があることがわかっている。そこで遺伝性のエナメル質形成不全症の原因遺伝子の1つとされているヒト *DLX3* 遺伝子に注目し小児を対象に SNPs 解析を行いこの SNP が、う蝕発症に関わる危険因子と成り得るのか否かを検討した。

3. 研究の方法

(1). 被験者

本研究について説明し、文書による同意を得られた鶴見大学小児歯科外来を受診した小児と横浜市内の幼稚園に通園している 5~6 歳の小児、計 200 名とした。

(2). *S. mutans* 菌数と dmft による評価

各被験者から Dentcult SM(Orion Diagnostica, Finland) による *S. mutans* 菌数を算出し、 10^4 CFU/ml 未満を *S. mutans* low level 群(low 群)、 10^4 CFU/ml 以上を *S. mutans* high level 群(high 群)とし、さらにそれぞれの群について口腔内診査により算出した dmft から 3 以上を高う蝕経験群(High caries experience)、3

未満を低う蝕経験群(Low caries experience)に分けた。

(3). ゲノム DNA の抽出

滅菌した OmniSwab(Whatman Inc, Piscataway, NJ, USA) を用いて被験者の口腔内、頬内側の上皮細胞を採取し水酸化ナトリウム水溶液(0.2 M) 20 μ L を綿球部あるいは繊維部に浸潤させた後ドライバスを用いて 75 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱した。180 μ L の緩衝液(40 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA pH 7.5)を加えて中和させると同時にゲノム DNA を抽出した。

(4). Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

タイピング:*DLX3* 遺伝子の 7 つの SNPs (表 1, 2 参照) について、各 allele(対立遺伝子)を TaqMan SNP Genotyping Assay System (Applied Biosystems, Foster City CA.) を用いて検出した。蛍光標識 hydrolysis probe 存在下で SNP を含むゲノム DNA 断片を TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)を用いたポリメラーゼ連鎖反応で増幅し、hydrolysis probe の加水分解による蛍光の出現を LightCycler480 リアルタイム PCR 装置(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を用いて測定した。

(5). 統計解析

各 SNP allele および genotype(遺伝子型)とう蝕経験群との相関分析は 自乗検定(chi-square 検定)を用いて行った。

4. 研究成果

DLX3 の各 SNP allele および genotype とう蝕経験群との相関分析の結果、

(1) *S. mutans* high level 群での rs2278163 SNP の allele と genotype それぞれにおいてう蝕経験群との間に有意な相関が認められた($P < 0.05$) (表 1, 2)。また *DLX3* の 6 つの SNPs(rs11656951, rs10459948, rs2303466, rs3891034, rs12452477, rs16948563) において有意差は認められなかった($P > 0.05$) (表 1, 2)。

表 1. DLX3 SNPs における allele 頻度

遺伝子	SNP	う蝕経験	アレル			
DLX3	rs11656951	S.mutan	T	C		
		s high level				
		dmft \leq 2	18	24		
		dmft \geq 3	47	59		
		S.mutan				
		s low level	T	C		
		dmft \leq 2	109	109		
		dmft \geq 3	20	14		

			rs10459948	S.mutan	T	G
s high level						
dmft \leq 2	12			30		
dmft \geq 3	48			58		
S.mutan						
s low level	T			G		
dmft \leq 2	83			135		
dmft \geq 3	15			19		

	*rs2278163			S.mutan	T	C
		s high level				
		dmft \leq 2	21	21		
		dmft \geq 3	80	24		
		P-value	0.0014			
		S.mutan				
		s low level	T	C		
		dmft \leq 2	150	66		
		dmft \geq 3	23	11		

	rs2303466	S.mutan	A	G		
		s high level				
		dmft \leq 2	18	24		
		dmft \geq 3	47	59		
		S.mutan				
		s low level	A	G		
		dmft \leq 2	109	107		
		dmft \geq 3	21	13		

rs3891034	S.mutan	A	G	
	s high level			
	dmft \leq 2	11	31	
	dmft \geq 3	43	61	
	S.mutan			
	s low level	A	G	
	dmft \leq 2	92	126	
	dmft \geq 3	10	24	

	rs12452477	S.mutan	T	C
s high level				
dmft \leq 2		11	31	
dmft \geq 3		31	73	
S.mutan				
s low level		T	C	
dmft \leq 2		71	147	
dmft \geq 3		8	26	

rs16948563		S.mutan	A	G
	s high level			
	dmft \leq 2	19	23	
	dmft \geq 3	48	58	
	S.mutan			
	s low level	A	G	
	dmft \leq 2	114	104	
	dmft \geq 3	16	18	

*P<0.05

表 2. DLX3 SNPs における Genotype 頻度

遺伝子	SNP	う蝕経験	遺伝子型		
DLX3	rs11656951	S.mutans	TT	TC	CC
		high level			
		dmft \leq 2	4	10	7
		dmft \geq 3	7	33	13
		S.mutans			
		low level	TT	TC	CC
		dmft \leq 2	25	59	25
		dmft \geq 3	6	8	3

rs10459948	S. mutans			
	high	TT	TG	GG
	level			
	dmft \leq 2	2	8	11
	dmft \geq 3	8	32	13
rs2278163	S. mutans			
	high	TT	TC	CC
	level			
	dmft \leq 2	5	11	5
	dmft \geq 3	30	20	2
	P-value	0.0053		
rs2303466	S. mutans			
	high	AA	AG	GG
	level			
	dmft \leq 2	4	10	7
	dmft \geq 3	7	33	13
rs3891034	S. mutans			
	high	AA	AG	GG
	level			
	dmft \leq 2	1	9	11
	dmft \geq 3	7	29	16
rs12452477	S. mutans			
	high	TT	TC	CC
	level			
	dmft \leq 2	1	9	11
	dmft \geq 3	2	6	9

rs16948563	S. mutans			
	high	AA	AG	GG
	level			
	dmft \leq 2	8	3	10
	dmft \geq 3	15	18	20
	S. mutans			
	high	AA	AG	GG
	level			
	dmft \leq 2	40	34	35
	dmft \geq 3	5	6	6
*P<0.05				

(2) *S. mutans* high level 群での rs2278163 SNP のアレルについては低う蝕経験群 (dmft \leq 2) と比べて T アレルが高う蝕経験群 (dmft \geq 3) で有意に増加していた (P=0.0014) (表 1、図 1)。

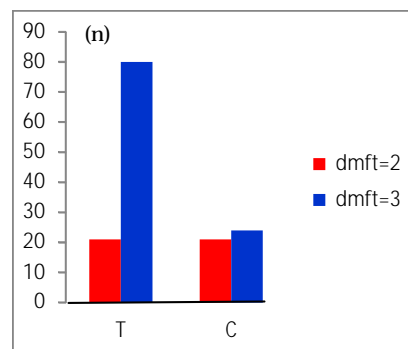


図 1. *S. mutans* high level 群における rs2278163 SNP のアレル分布

(3) *S. mutans* high level 群での rs2278163 SNP の遺伝子型については低う蝕経験群 (dmft ≤2) と比べて TT genotype が高う蝕経験群 (dmft ≥3) で有意に増加し CC genotype においては減少していた (P=0.00529) (表 2、図 2)。

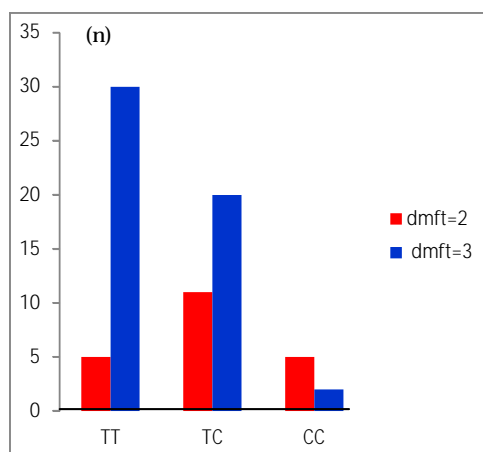


図 2. *S. mutans* high level 群における rs2278163 SNP の遺伝子型分布

上記の結果より *S. mutans* high level 群においてう蝕経験群と rs2278163 SNP との間に有意差が認められたことから *DLX3* の rs2278163 SNP がう蝕感受性に影響する可能性が示唆され、さらに T allele がう蝕感受性、C allele がう蝕抵抗性に関与する可能性が示唆された。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

太田増美、田島格、朝田芳信、
DLX3 遺伝子多型とう蝕感受性との関連性、
第 52 回日本小児歯科学会大会、2014、5、
16-17、品川区立総合区民会館

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