ミニレビュー

エクソームシーケンスによる日本人侵襲性歯周炎の
疾患関連遺伝子探索北垣次郎太, 枡本梨沙, 宮内静香,
藤原千春, 村上伸也

大阪大学大学院歯学研究科・口腔分子免疫制御学講座・歯周病分子病態学

キーワード：エクソームシーケンス, 侵襲性歯周炎, 疾患関連遺伝子, ゲノムワイドアプローチ

緒言

ゲノムとは生命の設計図である全 DNA を指し, 親から子へと引き継がれる遺伝情報に相当するもので, ヒトゲノムは約 30 億個の塩基対から成り立っている。そのヒトゲノムの全塩基配列を解析しようとする試みである「ヒトゲノム解析計画」が 1990 年頃より開始された。当初 15 年での完了を目標として遂行された本計画であったが, 2001 年のヒトゲノムの概要配列解読 (ドラフトシーケンス) の発表を経て, 2003 年 4 月 14 日に当初の計画より 2 年早く完了した¹⁾。「ヒトゲノム解析計画」で解読されたゲノムは数人のゲノムが混雑した状態で解読されたが, 2007 年には, DNA の二重らせん構造の発見によりノーベル賞を受賞したアメリカ人 James Watson 博士が自分自身のゲノム配列をデータベースに公開し, これが世界初の個人ゲノムの解読となった。また, 同時期に分子生物学者の Craig Venter の個人ゲノムも解読され, 論文に発表された²⁾。興味深いことに, 2003 年に完了した「ヒトゲノム解析計画」には, 13 年という期間と 3 千億円 (約 30 億ドル) の費用を費やしたのに対し, 2007 年の James Watson 博士の個人ゲノム解読には 2 カ月という期間と 1 億 2 千万円 (約 100 万ドル) の費用を費やすにとどまった³⁾。その背景には, 2005 年にアメリカのベンチャー企業によって開発され, 2007 年に市場に発売さ

れた「次世代シーケンサー」の誕生が大きなターニングポイントとして挙げられる。従来型のキャピラリー DNA シーケンサーの 1,000 台以上の能力を持つ次世代シーケンサーの登場により, ゲノム解析にかかる時間と費用が大幅に削減され, 現在では個人ゲノムの配列解析にかかる費用は 10 万円 (約 1,000 ドル) を下回る勢いである^{4,5)} (図 1)。その結果, 次世代シーケンサーは, 遺伝子解析分野の研究のめざましい進歩や, バイオインフォマティクス (生命情報科学: 生命現象を情報科学の手法によって解析していく学問) といった新しい研究分野を切り開く原動力となった。さらに近年では, バイオインフォマティクスを駆使した網羅的なゲノム解析手法であるゲノムワイドアプローチ (GWAS: Genome-Wide Association Study) を用いた, がんゲノム解析や疾患関連遺伝子探索が現在の医学界での世界的傾向となっている。その結果, ゲノム解析の結果を医療へと応用するオーダーメイド医療 (個別化医療) やプレジジョン・メディシン (精密医療) という言葉が, 頻繁に用いられるようになってきた。

本総説では, 次世代シーケンサーを用いたプレジジョン・メディシンの実際と, 歯周病学の分野における GWAS を用いた疾患関連遺伝子の探索に関する最新の知見を紹介する。併せて, 我々の研究室が最近報告した侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索について紹介する。

プレジジョン・メディシンとは

プレジジョン・メディシンとは, 患者個々人の個性などを考慮した予防や治療を確立することである⁶⁾。従来型の治療法で処方された薬では, 個々人の薬に対する感受性の違いにより, 得られる効果や副作用に個人差が出ることが予想される。しかしプレジジョン・

連絡先: 北垣次郎太

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-8

大阪大学大学院歯学研究科・口腔分子免疫制御学講座・歯周病分子病態学

E-mail: k-jirou@dent.osaka-u.ac.jp

doi: 10.2329/peri.59.1

図1 ヒトゲノム解析のコスト推移

2000年以降の、シーケンスにかかるコスト（実線）とデータアウトプット（点線）を示した。2007年に次世代シーケンサーが発売されて以降、急激なデータアウトプットの増加とコストの低下が見て取れる。

メディシンにおいては、個々人の薬に対する感受性を事前に把握し、患者個人に最適な処方を行うといった治療が行われる。プレジジョン・メディシンの最先端を行くアメリカでは、2015年1月20日にオバマ米大統領が行った一般教書演説において“Precision Medicine Initiative”が提唱され、2016年の予算としてプレジジョン・メディシンに2億ドル（約220億円）が計上されることとなった。このように、つぎ込まれる莫大な予算額を見れば、プレジジョン・メディシンに大きな期待が込められているのが容易に想像でき、特にがん治療の分野で、プレジジョン・メディシンの展開が大いに期待されている。実際のプレジジョン・メディシンでは、患者より取り出したがん組織の遺伝子変異を次世代シーケンサーにて調べ、得られた遺伝子変異の情報から人工知能システム「ワトソン」等を用いて適切な分子標的薬を見つけ出し処方する、といった方法がとられている⁶⁾。ここにいくつかの例を挙げたい。

非小細胞肺癌の原因の1つとして上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor : EGFR) の変異が報告されている。そのため、非小細胞肺癌患者におけるEGFRの遺伝子変異解析を行い、EGFR変異の有無を調べる。そしてEGFR変異陽性の患者に対して、EGFRチロシンキナーゼを選択的に阻害し腫瘍細胞の増殖を抑制する分子標的薬であるアストラゼネカ社の抗悪性腫瘍薬イレッサ® (ゲフィチニブ) を投与する⁷⁾。このことは、「EGFR遺伝子変異陽性の手術不能又は再発非小細胞肺癌」に対して効果があるとイレッサ®の添付文書に明記されている。その他に、非小細胞肺癌の原因の1つであるALK融合遺伝子陽性と診断された患者に対しては、ALK融合遺伝子の分子標的薬であるファイザー社のザーコリ® (クリゾチニブ) を投与する⁸⁾。ザーコリ®に関しても、「十分な経

験を有する病理医又は検査施設における検査により、ALK融合遺伝子陽性が確認された患者に投与すること」と添付文書に記載されている。一方で、EGFRやALK融合遺伝子のように、原因遺伝子と原因遺伝子に適した分子標的薬が開発されておれば、当該分子標的薬を投与されることにより適切な治療を享受することができるが、次世代シーケンサーにより原因遺伝子の同定には至ったものの、適した分子標的薬が見つからない、または開発されていない場合も多くみられる。そのため、2015年に国立がん研究センター主導の下、産学連携全国がんゲノムスクリーニング事業「SCRUM-Japan (Cancer Genome Screening Project for Individualized Medicine in Japan)」が始動した。この事業は、肺がんや消化器がん等の患者を対象とした大規模な遺伝子変異解析により、希少頻度の遺伝子変異をもつがん患者に対して、遺伝子解析の結果に基づいた有効な分子治療薬を処方すること、さらには新たな遺伝子変異を同定し、新規分子標的薬の開発に繋げることを目標としている。

GWAS (ゲノムワイドアプローチ : Genome-Wide Association Study)

がんゲノム解析のような遺伝子の突然変異ではなく、遺伝子多型 (遺伝子の多様性) が「外見的特徴といった個人差」や「病気のなりやすさ」に繋がるということが報告されている。遺伝子多型の一つであるSNP (一塩基多型 : Single Nucleotide Polymorphism) は、ゲノム配列上において1塩基が変異した多様性のことである。SNPの一部がゲノムDNA上のエクソンやプロモーター領域等に存在することで、タンパクの構造や発現量の変化をそれぞれ引き起こすことにより、遺伝的な「個人差」が生じる (図2)。身近な例として、ア

図2 SNP(一塩基多型: Single Nucleotide Polymorphism) SNPは、ゲノム配列上において1塩基が変異した多様性のことである。ここでは、塩基配列Tが塩基配列Aに変異したSNPを示している。ヒトの30億塩基対のゲノムDNAの中で、SNPは300～1,000万ヶ所に存在するといわれている。

ルデヒドを分解する酵素の機能活性を司る ALDH2 遺伝子の SNP が、アルコールに対する強さに関連するとの報告がある⁹⁾。また SNP と「病気のなりやすさ」に関連した報告も多くなされており、様々な疾患における疾患関連遺伝子探索を GWAS (ゲノム中の塩基配列を解析し、SNP の出現頻度と疾患との関連性を、統計学的手法を用いて検討する解析方法) を用いて行われるようになってきた。例えば、日本人における II 型糖尿病の疾患関連遺伝子同定を目的として、患者 15,463 名と 26,183 名の対照群より採取した DNA サンプルを用いた GWAS を行ったところ、これまで疾患との関連性が全く報告されていなかった 7 つの遺伝子が疾患関連遺伝子として同定された¹⁰⁾。

これらと同様に、慢性歯周炎の疾患関連遺伝子探索も盛んに行われている。白人の患者 604 名と 416 名の対照群に対して GWAS を行った結果、13 個の遺伝子を疾患関連遺伝子として抽出した研究が報告されている¹¹⁾。アジア人に目を向けると、日本人の患者 2,760 名と 15,158 名の対照群に対して GWAS を行った結果、KCNQ5 と GPR141-NME8 が疾患関連遺伝子として同定されている¹²⁾。さらに、韓国人の患者 414 名と 263 名の対照群に対して GWAS を行い、TENM2 と LDLRAD4 が疾患関連遺伝子として同定されている¹³⁾。興味深いことに、このように GWAS を用いてゲノムを網羅的に解析することにより、これまで当該疾患と無関係であるとされていた遺伝子が、疾患関連遺伝子であるとの報告が多くなされるようになってきた。

侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索

侵襲性歯周炎は、「全身的に健康ではあるが、急速な歯周組織破壊(歯槽骨吸収、付着の喪失)、家族内集積を認めることを特徴とする歯周炎」である¹⁴⁾。また、一般的には細菌性プラーク付着量は少なく、患者は 10～30 歳代が多く、日本における罹患率は 0.05～0.1%

と言われている¹⁵⁾。「家族内集積を認める」という特徴から、従来よりその発症には遺伝的要因の関与が高いと考えられ、現在までに、炎症性サイトカイン (TNF- α や IL-1)、Fc 受容体、マトリックス分解酵素 (MMP やカテプシン) 等の SNP が、侵襲性歯周炎の発症・進行と関連することを示唆する報告がなされている^{16, 17)}。一方、日本人を対象とした近年の報告では、319 名の歯周炎患者 (慢性歯周炎 147 名、侵襲性歯周炎 172 名) と 303 名からなる対照群を比較し、過去に歯周炎との関連が報告されている 35 の SNP の出現頻度 (MAF: minor allele frequency) を詳細に検討しているが、疾患群と対照群における MAF に有意差を認める SNP の同定には至らなかった¹⁸⁾。このように、これまでの研究成果では、発症前診断において侵襲性歯周炎の疾患感受性が高いと明確に診断できるような疾患関連遺伝子の同定がなされていないのが現状である。その理由の一つとして、単一遺伝子の遺伝子多型に焦点を絞った研究が進められてきたこと、また、炎症や骨代謝に関連した機能既知の遺伝子を対象に行われた研究がほとんどであることが挙げられる。そのため近年、侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索において GWAS が用いられるようになってきた。例えば、ドイツ人・オランダ人の患者 438 名と 1,320 名の対照群に対して GWAS を行い、GLT6D1 遺伝子が疾患関連遺伝子として同定されている¹⁹⁾。また、欧米人を対象とした GWAS も盛んに行われており、IL-10 等が侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子として同定されている²⁰⁾。このように、侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索に関しては、欧米人を対象とした研究は数多く報告されているが、日本人を含むアジア人を対象とした GWAS を用いた侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索に関する論文報告は行われておらず、疾患関連遺伝子の同定には至っていないのが現状である。

日本人侵襲性歯周炎患者のデータベース構築

そこで我々は、GWAS を用いた日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索を行った。GWAS には、ヒトの全ゲノム配列を網羅的に解析するホールゲノムシーケンス、全ゲノム上の既存の SNP を網羅的に解析する SNP アレイ、エクソン領域の配列を網羅的に解析するエクソームシーケンス等が、その解析手法として用いられている。これまでに報告されてきた疾患関連遺伝子の約 85% がエクソン領域に存在すること²¹⁾、*in vitro* での当該遺伝子の発現・機能の解析にまで焦点を当てた研究を行うことを考慮すると、エクソームシーケンスを用いた網羅的な疾患関連遺伝子探索が、本研究の遂行に関しては適切と考えられた (図 3)。大阪大学歯学部附属病院口腔治療・歯周科を受診し、侵襲性歯周炎と診断された患者の中から、本研究への

参加を応諾した者を対象としてゲノム DNA 採取を目的とした採血を行った (大阪大学ヒトゲノム研究承認番号 629)。侵襲性歯周炎の診断は、「日本歯周病学会による歯周病分類システム (2006)」に従った²²⁾。また、6 点法によるポケット測定を含む歯周組織検査、エックス線写真撮影を実施し、歯周組織の炎症面積 (PISA: periodontal inflamed surface area)²³⁾ ならびに、Schei のルーラーを用いた歯槽骨吸収率の解析²⁴⁾ を行い、歯槽骨吸収率 30% 以上を侵襲性歯周炎の罹患歯と定義付けた。侵襲性歯周炎患者 44 名 (限局型: 3 名, 広汎型: 41 名) (男性: 15 名, 女性: 29 名) の平均年齢は 32.55 歳, 平均ポケット値は 4.18 mm, PISA は 1302.96 mm² で, 歯槽骨の平均吸収度は 37.47% であった。侵襲性歯周炎患者より採取した末梢血より抽出したゲノム DNA を用いてエクソームシー

クエンズを実施したところ, 平均深度は 133.25, 深度 10 以上のリードは 97.75% であった。エクソームシーケンスの精度の指標である平均深度の値が 100 以上であれば, シークエンズの精度としては十分と判断されることから, 本研究でのエクソームシーケンスは成功裏に行われていると判断した。エクソームシーケンスデータを用いた遺伝子多型解析の結果, 1 名につき平均 74677.87 個の SNP データベースが得られた。得られたエクソームシーケンスデータは, 国立遺伝学研究所内の DNA Data Bank of Japan に登録されている (JGAS00000000024 ならびに JGAS00000000040)。

疾患関連遺伝子 GPR126 の抽出

日本人侵襲性歯周炎患者のエクソームシーケンスデータベースの解析に当たっては, 以下のスクリーニングを用いて疾患関連遺伝子の探索を行った。すなわち, ① 1000 ゲノムデータベース²⁵⁾ で MAF が 1% 以下であること。② 深度が 5 以上であること。③ 新規の SNP であること。④ SNP により生じるアミノ酸配列の変異が, タンパクの機能・構造に変異を引き起こすと推測された SNP であること。⑤ 2 検体以上で認められる SNP であること。以上の①~⑤の選定基準をもとに, 得られたデータベースの解析を行った。さらに, 本研究の対照群として, 京都大学が一般公開している日本人遺伝子リファレンスデータベース (HGVD: Human Genetic Variation Database) を用いた²⁶⁾。対照群と疾患群を比較検討し, SNP の発現頻度に統計学的有意差 (p 値 < 0.05) を認める遺伝子を抽出したところ 10 個の遺伝子が疾患関連候補遺伝子として抽出された。その中で G タンパク質共役受容体 (GPR126: G protein-coupled receptor 126) の新規 SNP rs536714306 を日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子として同定した。SNP rs536714306 (c.3086G>A, p.Arg 1029 Gln) は 3086 番目の塩基が G から A に置換することで, アミノ酸がアルギニンからグルタミンに置換する SNP である。疾患群での MAF が 2.44% であったのに対し, 対照群での MAF は 0.27% であり, p 値は 2.20×10^{-3} , オッズ比は 9.09, 95% 信頼区間は 1.64~50.36 となり, SNP の出現頻度に統計学的有意差が認められた²⁷⁾。抽出された 10 個の遺伝子の中で GPR126 に注目した理由としては, GPR126 のノックアウトマウスでは四肢の形成に異常が認められること²⁸⁾, さらには, GPR126 が思春期特発性側弯症の原因遺伝子の一つであることから²⁹⁾, GPR126 が硬組織形成に重要な役割を担っていると推測されていることが挙げられる。歯根膜に含まれる未分化間葉系幹細胞は, 骨芽細胞やセメント芽細胞といった硬組織形成細胞に分化する能力を有しており, 歯周組織の再生や, 恒常

図4 歯根膜細胞の骨芽細胞への分化に対するGPR126ならびにrs536714306の効果

HPDLに野生型GPR126もしくは変異型GPR126を遺伝子導入した。

(A) 2日間培養後、cAMPの発現量をELISAにより検討した結果を示す。解析結果は2群の平均値±標準誤差で示した。

(B) 石灰化誘導培地で24時間培養後、BSPならびにオステオポンチンのmRNA発現をリアルタイムPCR法にて解析した結果を示す。解析結果は、4群の平均値±標準誤差で示した。*: $p < 0.05$

コントロール: Empty vector, 野生型: 野生型GPR126, 変異型: rs536714306を含む変異型GPR126

性維持に重要な役割を演じていることが明らかとなっている³⁰⁾。そこで我々は、GPR126が歯根膜細胞の骨芽細胞への分化制御において、どのような役割をしてい

るかを *in vitro* 細胞培養系を用いて検討した。ヒト歯根膜細胞 (HPDL: human periodontal ligament cells) に野生型もしくはSNP rs536714306を含む変異型GPR126を遺伝子導入し、 β -グリセロリン酸 (5 mmol/l) とアスコルビン酸 (50 μ g/ml) を含む α MEM培地にて培養後、GPR126のシグナル下流因子cAMPの発現をELISA法にて、石灰化関連因子の発現をリアルタイムPCRにてそれぞれ検討した。その結果、野生型GPR126はcAMPの発現を上昇させ、石灰化関連因子であるBSP (骨シアロタンパク) ならびにオステオポンチンの発現を上昇させた。一方、変異型GPR126を遺伝子導入したHPDLでは、cAMPの発現上昇ならびに石灰化関連因子の発現上昇は認められなかった (図4)。以上のことから、GPR126のSNP rs536714306により、GPR126の機能が阻害された結果、HPDLの骨芽細胞への分化が抑制されることが示唆された。このようなGPR126の機能変調の結果、歯周組織の恒常性が破綻をきたしやすくなり、早期に歯周組織破壊を惹起しているのではないかと推察される。

疾患関連遺伝子 SMPD3 の抽出

上述のスクリーニングでは、「1000ゲノムデータベースでMAFが1%以下であること」を抽出条件としていることから、サンプル数が大きくない場合は統計学的な検出力が低下する可能性がある。そこで、より網羅的な日本人侵襲性歯周炎患者の疾患関連遺伝子探索を目的として、以下のスクリーニングを行った。すなわち、① 1000ゲノムデータベースでMAFが5%以下であること。② 深度が10以上であること。③ 5検体以上で検出されたSNPであること。④ SNPにより生じるアミノ酸配列の変異が、タンパクの機能・構造に変異を引き起こすと推測されたSNPであること。以上の①~④の選定基準に示すように、「1000ゲノムデータベースでMAFが5%以下であること」と抽出条件を緩和した。その上で、得られたデータベースよりSNPを抽出し、対照群と疾患群を比較検討したところ、SNPの発現頻度に統計学的有意差 (p 値 < 0.05) を認める遺伝子として、8個のSNPを疾患関連候補遺伝子として抽出した。抽出された8個のSNPの詳細を検討した結果、生体膜リン脂質の主要構成成分であるスフィンゴ脂質を分解する酵素、中性スフィンゴミエリナーゼ2 (nSMase2: neutral sphingomyelinase 2) をコードする遺伝子SMPD3 (sphingomyelin phosphodiesterase 3) のSNP rs145616324に焦点を当て、その発現・機能の解析を実施することとした。SNP rs145616324 (c.412C>T, p.Leu138Phe) は、412番目の塩基がCからTに置換することで、アミノ酸がロイシンからフェニルアラニンに置換するSNPである。侵襲性歯周炎疾患群におけるSNP rs

図5 歯根膜細胞の骨芽細胞への分化に対する SMPD3 ならびに rs145616324 の効果

HPDL に野生型 SMPD3 もしくは変異型 SMPD3 を遺伝子導入した。

(A) 2日間培養後、nSMase 活性を解析した結果を示す。解析結果は4群の平均値±標準誤差で示した。
*: $p < 0.05$

(B) 石灰化誘導培地で3日間培養後、ALPase ならびに I 型コラーゲンの mRNA 発現をリアルタイム PCR 法にて解析した結果を示す。解析結果は、4群の平均値±標準誤差で示した。
*: $p < 0.05$

コントロール: Empty vector, 野生型: 野生型 SMPD3, 変異型: rs145616324 を含む変異型 SMPD3

145616324 の MAF が 10.23% であるのに対し、対照群での MAF は 4.55% であり、 p 値は 1.42×10^{-2} 、オッ

ズ比は 2.39, 95% 信頼区間は 1.17~4.89 であった³¹⁾。SMPD3 に着目した理由としては、SMPD3 ノックアウトマウスにおいて骨格形成が遅延していること³²⁾、骨形成不全症 III 型モデルマウス *fro/fro* マウス³³⁾ において、SMPD3 遺伝子が一部欠失していること³⁴⁾、さらには *fro/fro* マウスと I 型コラーゲンをプロモーターとした SMPD3 のトランスジェニックマウスを交配させると、*fro/fro* マウスの骨格異常の症状が改善したことが報告されており³⁵⁾、SMPD3 の硬組織形成への関与が示唆されていることが挙げられる。さらに、*fro/fro* マウスにおいて歯槽骨ならびに象牙質形成が抑制されていることが報告されており^{36, 37)}、SMPD3 が歯周組織の恒常性維持に関与していることが示唆されている。そこで我々は、歯根膜細胞の骨芽細胞への分化過程における SMPD3 の効果を検討した。HPDL に野生型 SMPD3 もしくは、SNP rs145616324 を含む変異型 SMPD3 を遺伝子導入し、nSMase 活性と石灰化関連因子の発現量を検討した。その結果、野生型 SMPD3 を導入した細胞において nSMase 活性が上昇した。さらに、野生型 SMPD3 は ALPase (アルカリホスファターゼ) ならびに I 型コラーゲンといった石灰化関連遺伝子の発現量を上昇させた。一方で、変異型 SMPD3 を導入した細胞では nSMase 活性ならびに石灰化関連遺伝子の発現上昇を認めなかった (図 5)。以上から、SNP rs145616324 により SMPD3 のシグナル伝達が抑制されることにより、HPDL の骨芽細胞への分化が抑制されることが示唆された。このような SMPD3 の機能変調の結果、歯周組織の恒常性の維持が破綻しやすくなり、早期に侵襲性歯周炎が惹起されているものと考えられる。

まとめ

本研究において、我々はエクソームシーケンスを用いて、日本人侵襲性歯周炎患者のデータベース構築を行った。本データベースを用いて GWAS を行った結果、GPR126 の SNP rs536714306 ならびに SMPD3 の SNP rs145616324 を日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子として同定した。また *in vitro* 細胞培養実験を行い、GPR126 ならびに SMPD3 がヒト歯根膜細胞の骨芽細胞への分化を促進することを明らかにした。さらに、上記 SNP により GPR126 ならびに SMPD3 の遺伝子の機能活性が低下した結果、歯根膜細胞の骨芽細胞への分化能は低下し、歯周組織の恒常性の破綻、ならびに侵襲性歯周炎の発症の一因となると考えられる。今後は、本研究によって得られた GPR126 の SNP rs536714306 ならびに SMPD3 の SNP rs145616324 を指標とした、これまでに例を見ない侵襲性歯周炎の早期診断へと繋げ、早期治療による侵襲性歯周炎の進行予防へと繋げたいと考えている。さらには、がん治療

におけるプレシジョン・メディシンと同様に、ケミカルスクリーニングを行って分子標的薬を作製し、侵襲性歯周炎の治療へと応用したいと考えている。

今回の論文に関連して、開示すべき利益相反状態はありません。

文 献

- 1) 山田 聡, 村上伸也: ゲノム科学時代の歯周病学. 日歯周誌, 46: 1-9, 2004.
- 2) Levy S, Sutton G, Ng PC, Feuk L, Halpern AL, Walenz BP, Axelrod N, Huang J, Kirkness EF, Denisov G, Lin Y, MacDonald JR, Pang AW, Shago M, Stockwell TB, Tsiamouri A, Bafna V, Bansal V, Kravitz SA, Busam DA, Beeson KY, McIntosh TC, Remington KA, Abril JF, Gill J, Borman J, Rogers YH, Frazier ME, Scherer SW, Strausberg RL, Venter JC: The diploid genome sequence of an individual human. PLoS Biol, 5: e254, 2007.
- 3) Wadman M: James Watson's genome sequenced at high speed. Nature, 452: 788, 2008.
- 4) Mardis ER: A decade's perspective on DNA sequencing technology. Nature, 470: 198-203, 2011.
- 5) Hayden EC: Technology: The \$1,000 genome. Nature, 507: 294-295, 2014.
- 6) Aronson SJ, Rehm HL: Building the foundation for genomics in precision medicine. Nature, 526: 336-342, 2015.
- 7) Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, Gemma A, Harada M, Yoshizawa H, Kinoshita I, Fujita Y, Okinaga S, Hirano H, Yoshimori K, Harada T, Ogura T, Ando M, Miyazawa H, Tanaka T, Saijo Y, Hagiwara K, Morita S, Nukiwa T; North-East Japan Study Group: Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. N Engl J Med, 362: 2380-2388, 2010.
- 8) Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, Ou SH, Dezube BJ, Jänne PA, Costa DB, Varella-Garcia M, Kim WH, Lynch TJ, Fidias P, Stubbs H, Engelman JA, Sequist LV, Tan W, Gandhi L, Mino-Kenudson M, Wei GC, Shreeve SM, Ratain MJ, Settleman J, Christensen JG, Haber DA, Wilner K, Salgia R, Shapiro GL, Clark JW, Iafrate AJ: Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. N Engl J Med, 363: 1693-1703, 2010.
- 9) Yokoyama M, Yokoyama A, Yokoyama T, Funazu K, Hamana G, Kondo S, Yamashita T, Nakamura H: Hangover susceptibility in relation to aldehyde dehydrogenase-2 genotype, alcohol flushing, and mean corpuscular volume in Japanese workers. Alcohol Clin Exp Res, 29: 1165-1171, 2005.
- 10) Imamura M, Takahashi A, Yamauchi T, Hara K, Yasuda K, Grarup N, Zhao W, Wang X, Huerta-Chagoya A, Hu C, Moon S, Long J, Kwak SH, Rasheed A, Saxena R, Ma RC, Okada Y, Iwata M, Hosoe J, Shojima N, Iwasaki M, Fujita H, Suzuki K, Danesh J, Jørgensen T, Jørgensen ME, Witte DR, Brandslund I, Christensen C, Hansen T, Mercader JM, Flannick J, Moreno-Macias H, Burt NP, Zhang R, Kim YJ, Zheng W, Singh JR, Tam CH, Hirose H, Maegawa H, Ito C, Kaku K, Watada H, Tanaka Y, Tobe K, Kawamori R, Kubo M, Cho YS, Chan JC, Sanghera D, Frossard P, Park KS, Shu XO, Kim BJ, Florez JC, Tusié-Luna T, Jia W, Tai ES, Pedersen O, Saleheen D, Maeda S, Kadowaki T: Genome-wide association studies in the Japanese population identify seven novel loci for type 2 diabetes. Nat Commun, 7: 10531, 2016.
- 11) Divaris K, Monda KL, North KE, Olshan AF, Lange EM, Moss K, Barros SP, Beck JD, Offenbacher S: Genome-wide association study of periodontal pathogen colonization. J Dent Res, 91: 21S-28S, 2012.
- 12) Shimizu S, Momozawa Y, Takahashi A, Nagasawa T, Ashikawa K, Terada Y, Izumi Y, Kobayashi H, Tsuji M, Kubo M, Furuichi Y: A genome-wide association study of periodontitis in a Japanese population. J Dent Res, 94: 555-561, 2015.
- 13) Hong KW, Shin MS, Ahn YB, Lee HJ, Kim HD: Genomewide association study on chronic periodontitis in Korean population: results from the Yangpyeong health cohort. J Clin Periodontol, 2015 in press.
- 14) Armitage GC: Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol, 4: 1-6, 1999.
- 15) 特定非営利活動法人 日本歯周病学会, 歯周治療の指針 2015, 医歯薬出版, 東京, 2015, 10-11.
- 16) Diehl SR, Wang Y, Brooks CN, Burmeister JA, Califano JV, Wang S, Schenkein HA: Linkage disequilibrium of interleukin-1 genetic polymorphisms with early-onset periodontitis. J Periodontol, 70: 418-430, 1999.
- 17) Laine ML, Crielaard W, Loos BG: Genetic susceptibility to periodontitis. Periodontol 2000, 58: 37-68, 2012.
- 18) Kobayashi T, Nagata T, Murakami S, Takashiba S, Kurihara H, Izumi Y, Numabe Y, Watanabe H, Kataoka M, Nagai A, Hayashi J, Ohyama H, Okamatsu Y, Inagaki Y, Tai H, Yoshie H: Genetic risk factors for periodontitis in a Japanese population. J Dent Res, 88: 1137-1141, 2009.
- 19) Schaefer AS, Richter GM, Nothnagel M, Manke T,

- Domisch H, Jacobs G, Arlt A, Rosenstiel P, Noack B, Groessner-Schreiber B, Jepsen S, Loos BG, Schreiber S: A genome-wide association study identifies GLT6D1 as a susceptibility locus for periodontitis. *Hum Mol Genet*, 19: 553-562, 2010.
- 20) Schaefer AS, Bochenek G, Manke T, Nothnagel M, Graetz C, Thien A, Jockel-Schneider Y, Harks I, Staufenbiel I, Wijmenga C, Eberhard J, Guzeldemir-Akcakanat E, Cine N, Folwaczny M, Noack B, Meyle J, Eickholz P, Trombelli L, Scapoli C, Nohutcu R, Bruckmann C, Doerfer C, Jepsen S, Loos BG, Schreiber S: Validation of reported genetic risk factors for periodontitis in a large-scale replication study. *J Clin Periodontol*, 40: 563-572, 2013.
 - 21) Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P, Nayir A, Bakkaloglu A, Ozen S, Sanjad S, Nelson-Williams C, Farhi A, Mane S, Lifton RP: Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 19096-19101, 2009.
 - 22) 特定非営利活動法人 日本歯周病学会, 歯周病の診断と治療の指針 2007, 医歯薬出版, 東京, 2007, 4-5.
 - 23) Nesse W, Abbas F, van der Ploeg I, Spijkervet FK, Dijkstra PU, Vissink A: Periodontal inflamed surface area: quantifying inflammatory burden. *J Clin Periodontol*, 35: 668-673, 2008.
 - 24) Schei O, Waerhaug J, Lovdal A, Arno A: Alveolar bone loss as related to oral hygiene and age. *J Periodontol*, 30: 7-16, 1959.
 - 25) Sudmant PH, Rausch T, Gardner EJ, Handsaker RE, Abyzov A, Huddleston J, Zhang Y, Ye K, Jun G, Hsi-Yang Fritz M, Konkel MK, Malhotra A, Stütz AM, Shi X, Paolo Casale F, Chen J, Hormozdiari F, Dayama G, Chen K, Malig M, Chaisson MJ, Walter K, Meiers S, Kashin S, Garrison E, Auton A, Lam HY, Jasmine Mu X, Alkan C, Antaki D, Bae T, Cerveira E, Chines P, Chong Z, Clarke L, Dal E, Ding L, Emery S, Fan X, Gajral M, Kahveci F, Kidd JM, Kong Y, Lameijer EW, McCarthy S, Flicek P, Gibbs RA, Marth G, Mason CE, Menelaou A, Muzny DM, Nelson BJ, Noor A, Parrish NF, Pendleton M, Quitadamo A, Raeder B, Schadt EE, Romanovitch M, Schlattl A, Sebra R, Shabalín AA, Untergasser A, Walker JA, Wang M, Yu F, Zhang C, Zhang J, Zheng-Bradley X, Zhou W, Zichner T, Sebat J, Batzer MA, McCarroll SA, 1000 Genome Project Consortium, Mills RE, Gerstein MB, Bashir A, Stegle O, Devine SE, Lee C, Eichler EE, Korb J: An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. *Nature*, 526: 75-81, 2015.
 - 26) Narahara M, Higasa K, Nakamura S, Tabara Y, Kawaguchi T, Ishii M, Matsubara K, Matsuda F, Yamada R: Large-scale East-Asian eQTL mapping reveals novel candidate genes for LD mapping and the genomic landscape of transcriptional effects of sequence variants. *PLoS One*, 9: e100924, 2014.
 - 27) Kitagaki J, Miyauchi S, Asano Y, Imai A, Kawai S, Michikami I, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S: A Putative Association of a Single Nucleotide Polymorphism in GPR126 with Aggressive Periodontitis in a Japanese Population. *PLoS One*, 11: e0160765, 2016.
 - 28) Monk KR, Oshima K, Jors S, Heller S, Talbot WS: Gpr126 is essential for peripheral nerve development and myelination in mammals. *Development*, 138: 2673-2680, 2011.
 - 29) Kou I, Takahashi Y, Johnson TA, Takahashi A, Guo L, Dai J, Qiu X, Sharma S, Takimoto A, Ogura Y, Jiang H, Yan H, Kono K, Kawakami N, Uno K, Ito M, Minami S, Yanagida H, Taneichi H, Hosono N, Tsuji T, Suzuki T, Sudo H, Kotani T, Yonezawa I, Londono D, Gordon D, Herring JA, Watanabe K, Chiba K, Kamatani N, Jiang Q, Hiraki Y, Kubo M, Toyama Y, Tsunoda T, Wise CA, Qiu Y, Shukunami C, Matsumoto M, Ikegawa S: Genetic variants in GPR126 are associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Nat Genet*, 45: 676-679, 2013.
 - 30) Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S: Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364: 149-155, 2004.
 - 31) Miyauchi S, Kitagaki J, Masumoto R, Imai A, Kobayashi K, Nakaya A, Kawai S, Fujihara C, Asano Y, Yamashita M, Yanagita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S: Sphingomyelin phosphodiesterase 3 enhances cytodifferentiation of periodontal ligament cells. *J Dent Res*, 2016in press.
 - 32) Stoffel W, Jenke B, Blöck B, Zumbansen M, Koebke J: Neutral sphingomyelinase 2 (smpd3) in the control of postnatal growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 4554-4559, 2005.
 - 33) Muriel MP, Bonaventure J, Stancu R, Maroteaux P, Guenet JL, Stancu V: Morphological and biochemical studies of a mouse mutant (fro/fro) with bone fragility. *Bone*, 12: 241-248, 1991.
 - 34) Aubin I, Adams CP, Opsahl S, Septier D, Bishop CE, Auge N, Salvayre R, Negre-Salvayre A, Goldberg M, Guenet JL, Poirier C: A deletion in the gene encoding sphingomyelin phosphodiesterase 3 (Smpd3) results in osteogenesis and dentinogenesis imperfecta in the mouse. *Nat Genet*, 37: 803-805, 2005.
 - 35) Khavandgar Z, Poirier C, Clarke CJ, Li J, Wang N,

- McKee MD, Hannun YA, Murshed M: A cell-autonomous requirement for neutral sphingomyelinase 2 in bone mineralization. *J Cell Biol*, 194: 277-289, 2011.
- 36) Khavandgar Z, Alebrahim S, Eimar H, Tamimi F, McKee MD, Murshed M: Local regulation of tooth mineralization by sphingomyelin phosphodiesterase 3. *J Dent Res*, 92: 358-364, 2013.
- 37) Goldberg M, Opsahl S, Aubin I, Septier D, Chaussain-Miller C, Boskey A, Guenet JL: Sphingomyelin degradation is a key factor in dentin and bone mineralization: lessons from the fro/fro mouse. The chemistry and histochemistry of dentin lipids. *J Dent Res*, 87: 9-13, 2008.

Identification of genetic risk factors of aggressive periodontitis in a Japanese population by exome sequencing

Jirouta Kitagaki, Risa Masumoto, Shizuka Miyauchi,
Chiharu Fujihara and Shinya Murakami

Department of Periodontology, Division of Oral Biology and Disease Control,
Osaka University Graduate School of Dentistry

Key words: Exome sequencing, Aggressive periodontitis, Genetic risk factor,
Genome-wide association study

Corresponding author: Jirouta Kitagaki

Department of Periodontology, Division of Oral Biology and Disease Control, Osaka University Graduate School of Dentistry

1-8 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

E-mail: k-jirou@dent.osaka-u.ac.jp