

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：33902  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2017～2019  
課題番号：17K11863  
研究課題名(和文)エクソーム解析による口唇口蓋裂のリスク遺伝子と組織特異的体細胞モザイクの探索  
  
研究課題名(英文) Identification of tissue-specific somatic mosaicism in cleft lip and palate using whole exome sequencing  
  
研究代表者  
鈴木 聡 (SUZUKI, Satoshi)  
  
愛知学院大学・歯学部・非常勤講師  
  
研究者番号：30468996  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：当施設の遺伝子バンキングに保存してある、20名の口唇口蓋裂患者の白血球由来DNAと、手術によって得られた口唇裂披裂縁部軟組織を用いてexome解析を行った。解析における読み深度150-200depthに設定し、シークエンスはペアワイズ法を用いた。解析精度は良好であり、結果も信頼たり得るものであった。解析にて発見された平均SNP数として白血球由来では434928.05個、組織由来では438651.55個であった。よって口唇部軟組織では体細胞性モザイク変異が1サンプルあたり3723.5個確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
この発見は多因子遺伝子疾患におけるmissing heritability解明の突破口になる可能性を秘めている。病変組織における約3700箇所あまりの変異が意味するところは研究試料の種類に関しても十分な考慮が必要であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Exome analysis was performed using leucocyte-derived DNA from 20 patients with cleft lip and palate stored in our institutional gene banking. We also performed exome sequence on the both lip skin tissue obtained by surgery. The reading depth of the analysis was set to 150-200 depth, and the sequence used the pairwise method. The analysis accuracy was more than 98% and the results were reliable. The average SNPs were found in the analysis was 434928.05 from leukocytes and 438651.55 from tissues. Therefore, 3723.5 somatic mosaic mutations were confirmed per sample in the lip soft tissue.

研究分野：口唇口蓋裂、遺伝学

キーワード：エクソーム 口唇口蓋裂 モザイク

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

現在まで、申請者らの共同研究施設で行われた白血球由来の DNA に対する口唇口蓋裂の全ゲノム関連解析 (GWAS) および全エクソン領域解析 (エクソーム解析) を用いた網羅的ゲノム解析により多因子遺伝疾患に対する疾患感受性遺伝子の同定を進めてきた。現在まで、我々の共同研究施設である米国アイオワ大学の Jeffrey C. Murray 教授が米国ピッツバーグ大学の Mary L. Marazita 教授、米国ジョンホプキンス大学の Terri H. Beaty とともに、多人種から構成される約 2000 家系を用いた GWAS (Nat Genet. 2010) とメタ解析 (Nat Genet. 2012) により *ABCA4*、*MAFB*、*PAX7* 等新規の疾患責任遺伝子の発見を報告した。また疾患に関連する遺伝子変異が多数存在するが個々では頻度が低いもしくは影響が少ないという説 (common disease-multiple rare variant 説) に基づき、Murray 教授らは GWAS で得られた遺伝子座を含む近傍の 40kbp 範囲内全てに対して、PCR-Direct sequence 法による Targeted Sequence 解析を行うことで、新たな疾患責任遺伝子として *AHRGAP29* 遺伝子 (Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2012) を報告したが、人種間差もあり全貌解明には至らなかった。

しかしながらその後の確認研究では 100 を超える候補遺伝子が同定されたが総サンプル数の約 5%のみでしか遺伝子変異を見いだせなかった。このことは、『失われた遺伝性』(missing heritability) の 1 つとして考えられている。

## 2. 研究の目的

従来の遺伝子解析方法では主要な PCR 産物しか検出できないため、組織に低頻度で発現していると推測される体細胞モザイク変異は次世代シーケンサーでのみ検出が可能であることなどの理由により、体細胞分裂における失敗や体細胞における突然変異などが口唇口蓋裂の原因の一部となりうると着想した。

そして本研究は missing heritability として知られるこの多因子疾患の遺伝学研究の壁を、「口唇裂披裂縁部軟組織特異的な体細胞モザイクの解明」により克服することとした。このうち発現頻度が高く、症状が重篤である両側性口唇口蓋裂患者のサンプルを用い、白血球由来および組織由来ゲノム DNA を得て、高深度エクソーム解析を行う。これにより、従来の遺伝子解析では解明できなかった組織特異的な体細胞モザイクの高精度検出を目的とした。

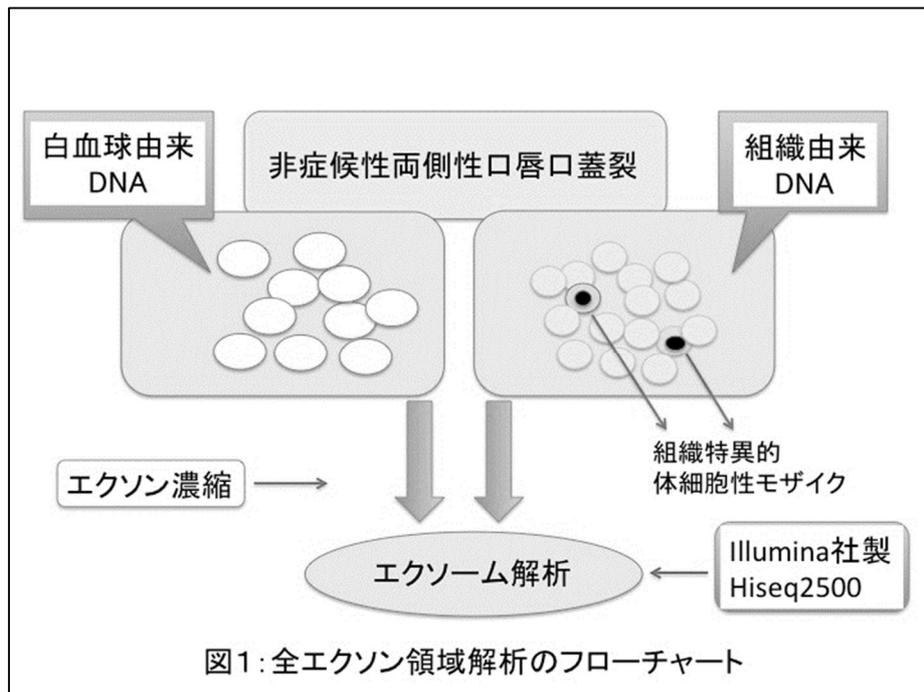
## 3. 研究の方法

(1) 非症候性の日本人両側性口唇口蓋裂患者 20 人 (末梢血液もしくは唾液 20 検体および組織 20 検体) の DNA を抽出する。血液検体は -80 °C 下にて冷凍保存もしくは DNA 保存液である DNA/RNA Shield (Zymo Research 社) にて高度に保存された試料より DNA を抽出する。抽出には最適で素早く抽出できる Qiagen 社製の QIAamp® DNA mini Kit および QIAamp® DNA Blood Midi Kit を用いる。手術で得られた口唇披裂縁部組織は組織保存液 (Allprotect® Tissue Reagent、Qiagen 社) を用いて -20 °C にて保存されており、DNA の破損を抑えている。組織からの DNA 抽出については Gentra Puregene Tissue Kit (Qiagen 社) を用いることにより、高純度で 100 ~ 200 kb の長鎖の DNA 断片を得る。

(2)

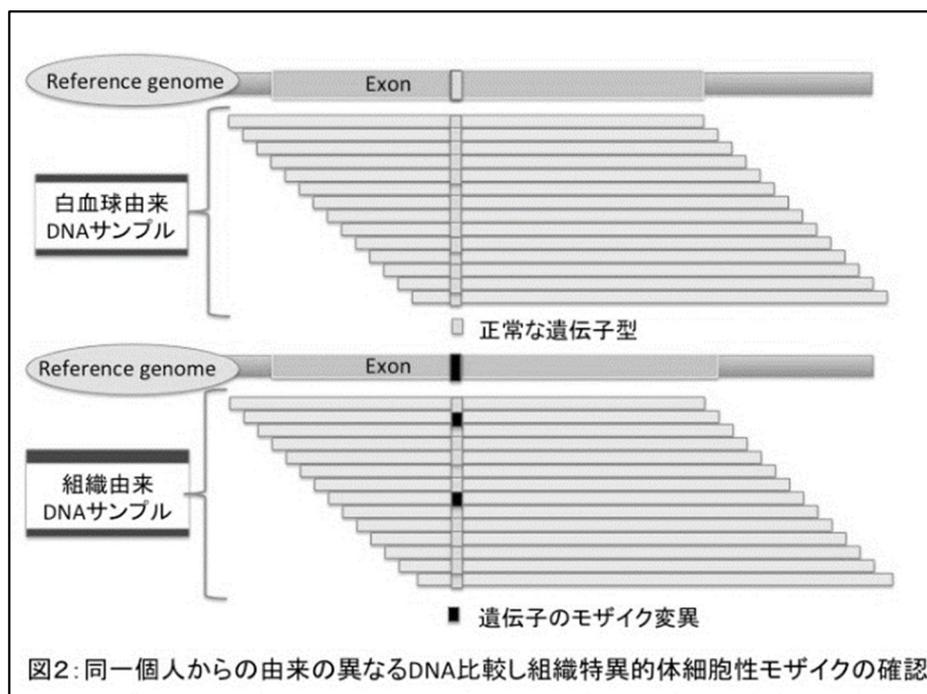
得られた DNA 断片に対して SureSelect Target Enrichment Human All exon V6+UTR

(Agilent 社)kit を用いてエクソンの濃縮化を行い、次世代シーケンサーである Hiseq2500 (Illumina 社) でシーケンスする (図 1)。本申請では組織特異的体細胞モザイクの発現は非常に低頻度と想定しており、シーケンスの平均読み深度を 200depth 行うことで検出力を 99.99%以上にする。



データの調整 (アノテーション) を CLC workbench、解析パイプラインは無料で提供されている GATK (Broadinstitute 提供) を用いる。モザイク変異の検出力を高めるために平均読み深度を最大 200depth と設定し、データの信頼度は 99.99%と設定する。高深度エクソーム解析の手順は下記の 2 つを行う。

- 1) 白血球由来 DNA のエクソーム解析を行う。
- 2) 組織由来 DNA のエクソーム解析を行う。



#### 4 . 研究成果

全てのサンプルに対するエクソームシーケンスは無事に終了した。1 サンプルあたり2回のランを行い、シーケンスは150bpのペアワイズで正確性を担保した。

Target 領域の平均読み深度は組織で152.8であり血液では158.5であった。またカバレッジは両方サンプル群ともに99.8%であった。イルミナ社の推奨するクオリティコントロール後のデータの有効性は血液サンプルで98.6%であり組織サンプルでは98.5%であった。結果として各サンプル平均 SNP 数は436789.8個でありサンプル平均 INDEL 数は71265.15個であった。また組織サンプルと血液サンプルの ts/tv の平均値の差には有意差は見られなかった。しかしながら novel ts/tv (2.0305 / 1.7765)にははっきりした差が見られた。また平均 SNP 数では白血球由来では434928.05個、組織由来では438651.55個であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hall Everett G, Wenger Luke W, Wilson Nathan R, Kousa Youssef A, Natsume Nagato, Ito Masaaki, Mori Akihiro, Imura Hideto, Kroc Sarah A, Adeyemo Wasiu L, Eshete Mekonen A, Bjork Bryan C, Suzuki Satoshi, Murray Jeffrey C, Schutte Brian C, Butali Azeez, Saadi Irfan	4. 巻 29
2. 論文標題 SPECC1L regulates palate development downstream of IRF6	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 845 ~ 858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddaa002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takashi Kikuri, Hiroyuki Mishima, Hideto Imura, Satoshi Suzuki, Yusuke Matsuzawa, Takashi Nakamura, Satoshi Fukumoto, Yoshitaka Yoshimura, Satoshi Watanabe, Akira Kinoshita, Takahiro Yamada, Masanobu Shindoh, Yoshihiko Sugita, Hatsuhiro Maeda, Yasutaka Yawaka, Tadashi Mikoya, Nagato Natsume, Koh-ichiro Yoshiura	4. 巻 176 (12)
2. 論文標題 Patients with SATB2-associated syndrome exhibiting multiple odontomas	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Med Genet	6. 最初と最後の頁 2614 ~ 2622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajmg	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Carlson Jenna C., Standley Jennifer, Christensen Kaare, Hecht Jacqueline T., Garidkhuu Ariuntuul, Moreno Uribe Lina M., Nagato Natsume, Orioli Ieda M., Suzuki Satoshi, Beaty Terri H., Feingold Eleanor, Murray Jeffrey C., Marazita Mary L., Leslie Elizabeth J, et al.	4. 巻 41
2. 論文標題 Identification of 16q21 as a modifier of nonsyndromic orofacial cleft phenotypes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genetic Epidemiology	6. 最初と最後の頁 887 ~ 897
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/gepi.22090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Imura Hideto, Suzuki Satoshi, Mizuno Seiji, Sakuma Chisato, Natsume Nagato	4. 巻 29
2. 論文標題 A case of Tetrasomy 15q with left cleft lip and alveolus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 427 ~ 429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2017.03.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Suzuki S, Ono M, Niimi T, Yamamoto M, Imura H, Nguyen C, Leslie E, Cooper ME, Natsume N, Nguyen M, Marazita ML, Murray JC
2. 発表標題 Replication of GWAS candidate genes in non-syndromic cleft lip and / or cleft palate in Vietnamese population.
3. 学会等名 The Joint Meeting of the 59th Annual Meeting of the Japanese Teratology Society and the 13th World Congress of the International Cleft Lip and Palate Foundation - CLEFT 2019 (Nagoya) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki S, Marazita ML, Cooper ME, Dragan E, Butali A, Mansila M, Natsume N, Suzuki Y, Niimi T, Yamamoto M, Ayanga G, Erkhembaatar T, Furukawa H, Minami K, Imura H, Fujiwara K, L'Heureux J, Durda K, Lidral AC, Murray JC
2. 発表標題 Replication of genome wide association findings for Cleft Lip and Palate - a role for variants in MAFB, VAX1 and PAX7 in Asian populations.
3. 学会等名 The Joint Meeting of the 59th Annual Meeting of the Japanese Teratology Society and the 13th World Congress of the International Cleft Lip and Palate Foundation - CLEFT 2019 (Nagoya) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tran LD, Imura H, Mori A, Suzuki S, Niimi T, Hayakawa T, Nguyen THT, Pham TP, Nguyen CU, Hoang V, Trinh MH, Nguyen MD, Ngo TV, Phan MV, Natsume N
2. 発表標題 Association of MEOX2 polymorphism with nonsyndromic cleft palate only in a comparison between a Japanese population and a Vietnamese population.
3. 学会等名 The Joint Meeting of the 59th Annual Meeting of the Japanese Teratology Society and the 13th World Congress of the International Cleft Lip and Palate Foundation - CLEFT 2019 (Nagoya) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 磨弥, 古川 博雄, 鈴木 聡, 山内 楓子, 井村 英人, 新美 照幸, 夏目 長門
2. 発表標題 エチオピア連邦民主共和国における先天異常に関する研究(第5報)
3. 学会等名 第30回日本小児口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 明弘, 井村 英人, 鈴木 聡, 吉田 磨弥, 古川 博雄, 新美 照幸, 佐久間 千里, 伊東 雅哲, 南 克浩, 秋山 泰範, 早川 統子, 夏目 長門
2. 発表標題 日本人非症候性口唇口蓋裂におけるBMP4遺伝子の一塩基多型(rs4444235)遺伝子多型解析
3. 学会等名 第42回日本口蓋裂学会総会・学術集会(大阪)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 E.J. Lesile, J.C.Standley, A.Petrin, J.R.Shaffer, A. Butali, C. J. Buxo, E. Castilla, K. Christensen, F.W.D. Deleyiannis, J.T.Hecht, L.L.Field, A.Garidkhuu, L.M. Moreno-Uribe, N. Nagato, L.M.Orioli, C. Poietta, S.Suzuki, A.R. Vieira, G.L. Wehby, S.M. Weingold, J.C. Murray, M.L. Marazazita
2. 発表標題 Identfication of 16q21 as a modifier locus for orofacial cleft phenotypes
3. 学会等名 The American Society of Human Genetics 2017 Annual Meeting(国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	夏目 長門  (Natsume Nagato)  (90183532)	愛知学院大学・歯学部・教授   (33902)	
連携研究者	吉浦 孝一郎  (Yoshiura Koichiro)  (00304931)	長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授   (17301)	