

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10124

研究課題名（和文）次世代シーケンサー解析を基盤とした口唇裂・口蓋裂の発症原因の追究

研究課題名（英文）Analysis of genes related to cleft lip and palate by next-generation sequencing.

研究代表者

渡邊 章（Watanabe, Akira）

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：50408324

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：我々は日本人の唇顎口蓋裂・唇顎裂（CL/P）、口蓋裂（CP）とその両親を対象にしたトリオ解析をIRF6（1q32.2）、WNT5A（3p14.3）、WNT9B（17q21.32）、TP63（3q28）、MSX1（4p16）、TFAP2A（6p24.3）、PAX9（14q12-q13）、DLX3（17q21.33）、DLX4（17q21.33）、MN1（22q12.1）の10遺伝子の解析を行った。DLX4のミスセンス変異359C>T（P120L）新規の変異とバリエーションを発見することができたが、口唇裂・口蓋裂の発症原因は不明のままです。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本プロジェクトで口唇裂・口蓋裂の発症原因の追究は前進したものの未だ明らかになっていないのが現状である。今後の展望としてDNAのメチル化、ヒストンのメチル化、ヒストンのアセチル化などの epgenome 異常などの今まで捉えられていない構造異常に興味がある。ロングリードシーケンサーでDNAメチル化解析に移行し、DNAの配列だけでなくDNAのメチル化で多因子遺伝子疾患の発症メカニズムを解明していけないか？そして、遠い未来ではあるが口唇裂・口蓋裂の治療が、患者に負担のかかる手術だけでなく新たな治療を選択できる医療へと進むだろう。

研究成果の概要（英文）：We used next-generation sequencing approach for a trio analysis of Japanese patients with CL/P and CP, along with their parents. The specific targeted genes included IRF6 (1q32.2), WNT5A (3p14.3), WNT9B (17q21.32), TP63 (3q28), MSX1 (4p16), TFAP2A (6p24.3), PAX9 (14q12-q13), DLX3 (17q21.33), DLX4 (17q21.33), and MN1 (22q12.1). We discovered a noteworthy missense mutation, 359C>T (P120L), in the DLX4 gene in a single patient with CL/P. Furthermore, novel variants (WNT5A 639+918C>T, TFAP2A 45+2755C>G, WNT9B 904+3061A>G, TP63 1349+8281T>C, PAX9 4+272G>A) in highly conserved sequences within the non-coding regions were observed in three patients with CL/P and two patients with CP. Our genetic analysis of Japanese patients with CL/P, using the next-generation sequencing technology unveiled novel mutations and variants that had eluded previous GWAS. Nonetheless, the underlying causes of CL/P onset remain enigmatic, presenting a continuing challenge in the field of craniofacial genetics.

研究分野：口腔外科

キーワード：口唇裂・口蓋裂 遺伝子異常 次世代シーケンサー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口唇裂・口蓋裂は、一般的に多因子遺伝性疾患と予想されているが、未だにその発症メカニズムの詳細は明らかにされていない。この疾患の遺伝的要因や環境要因など多方面から発症メカニズムの研究は各国で行われている。現在、遺伝子研究は、様々な国でいくつか関連遺伝子の同定が報告されている。しかし、その関連遺伝子を日本人を対象に解析をしても陰性を示すことがほとんどである。他人種のそれと発症メカニズムが異なると考えるまた、発症頻度の高い日本人を対象に解析を行うことが口唇裂・口蓋裂の発症メカニズムの解明に一番の近道である。そこで、我々は、2003年から口唇裂・口蓋裂の発症に関連する遺伝子を解明するために研究を進めている。

### 2. 研究の目的

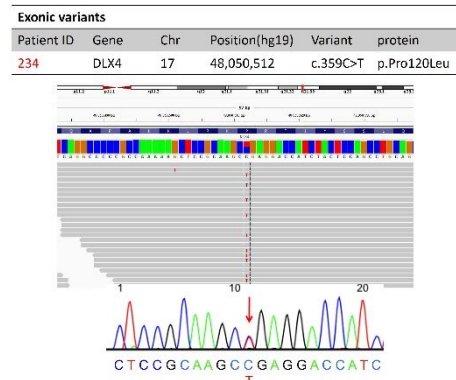
口唇裂・口蓋裂は、遺伝的要因と環境要因が相互に関与した多因子遺伝性疾患と考えられているが、発症原因は不明のままである(図1)。これまでの再発危険率や罹患率などの報告から、罹患同胞相対危険率( $s$ )は5から10で遺伝疾患であることが示唆される<sup>1)</sup>。また、本疾患は他人種で家族集積性が指摘されているが、日本人を含むアジア人では、家族集積は少ないものの諸外国と比べ発症頻度が高い外表奇形である<sup>2)</sup>。そこで、日本人を含むアジア人の口唇裂・口蓋裂の発症メカニズムを追究することが、この疾患の発症原因を解明する一番の近道となる。

### 3. 研究の方法

症候群の無い日本人の唇顎口蓋裂・唇顎裂(CL/P)、口蓋裂(CP)とその両親を対象にしたトリオ解析を、次世代シーケンサーを用いて行なった<sup>6)</sup>。解析を行なった遺伝子は、GWASでCL/PまたはCPの発症に関連するとされたIRF6, WNT5A, WNT9B, TP63, MSX1, TFAP2A, PAX9, DLX3, DLX4, MN1の10遺伝子とした。解析領域は遺伝子をコードするエクソン以外に、非コード領域であるイントロンを含めた。通常、ゲノム解析においてタンパク質に翻訳されるエクソン領域の配列のみを解読することが多いが、非コード領域であるイントロンには遺伝子の転写量を調整するエンハンサーやプロモーターとしての機能が存在することから10遺伝子のイントロンを含めた解析を行なった。シーケンスはIllumina HiSeq 2500(Illumina Inc, San Diego, California)を用いて行い、得られたゲノム配列はUCSC Human Genome Browser GRCh37/hg19へマッピングした。変異の検出はGenome Analysis Toolkit (GATK)用い、1KJPN、Human Genetic Variant Database (HGVD) 1.42、dbSNP144、1000Genome Project、NHLBI-Exome Sequencing Project(ESP)6500にある遺伝情報から、マイナーアレル頻度0.5%以上を除外した。検出されたバリエーションはサンガーシーケンスにより確認を行なった。

#### 4 . 研究成果

CL/P 患者に DLX4 のミスセンス変異 c.359C>T (p.Pro120Leu) を認めた。これはデータベース上にはない新規の変異であった。DLX 遺伝子は頭蓋神経堤細胞で発現し最終的に歯、軟骨、頭蓋顔面骨、および結合組織を形成する間葉組織において調節的な役割を果たすとされている。今回発見された CL/P 患者における DLX4 のミスセンス変異 c.359C>T (p.Pro120Leu) は他の遺伝子の転写を活性化または不活性化することで形態形成の制御遺伝子の機能を持つとされるホメオドメインに存在



しており、Polyphen2、SIFT、PROVEAN を用いた *in silico* 解析の結果にて分子機能に影響を及ぼす有害な変異であった。また CL/P 患者と CP 患者で、それぞれ非コード領域の保存配列において新規のバリエーションを認めた。高度に保存された配列は生物の進化において維持されてきたことを意味しており、遺伝子発現量をつかさどるエンハンサーやプロモーターとしての機能を持つとされ、検出された新規のバリエーションに関しては更なる検証が必要である。結論としてわれわれは日本人のみの口唇・口蓋裂患者の遺伝子解析を、次世代シーケンサーを用いて行い、過去に GWAS では検出できなかった新規の変異とバリエーションを発見することができた。

#### 今後の展望として

口唇裂・口蓋裂をはじめとする多因子疾患のゲノム研究は疾患のリスクをわずかに上昇させる SNPs の集積が関与すると考えられ、特定の SNPs 出現頻度を疾患コホートと正常コホートで比較するという考え方が基本であった。これは、多因子疾患は「ありふれた疾患はありふれたバリエーションにより起こる」という仮説 (common-disease common-variant 仮説) に従うであろうと考えられていたからである<sup>8)</sup>。SNPs を用いた GWAS によって多くの口唇裂・口蓋裂に関連する感受性バリエーションが発見されたが、発見されたバリエーションのほとんどが非コード領域にあり、コード領域のバリエーションはわずか 4.9% でしかなかった<sup>11)</sup>。さらに GWAS で発見されたバリエーションは一般にオッズ比が 1.05 ~ 1.2 と非常に弱い効果を示すにすぎなかった。この結果から、現在の多因子疾患における遺伝学モデルの仮説は、遺伝子非コード領域の GWAS バリエーションの意義が、遺伝子調節領域にあり遺伝子発現量をつかさどるもので、非常に弱い非常に多数あるとする説と、SNPs を用いた GWAS では発見できなかった未知のレアバリエーションが存在する可能性であるとする 2 つの説が挙げられる。この仮説の検証には次世代シーケンサーを用いて GWAS で検出された口唇・口蓋裂の感受性座位の網羅的な解析が必要である。レアバリエーションの検出には GWAS と同様に大規模なサンプルサイズが必要であり、日本人正常コホートと比較するには日本人を対象とした全ゲノム情報の作成が課題となる。次世代シーケンサーを用いた網羅的なゲノム解析により、口唇裂・口蓋裂を含めた多因子疾患のゲノム研究は疾患・遺伝子座マッピングが盛んに行われ、疾患発現の機序が解明されたその先には、遺伝的リスクスコアの予測が可能となるであろう。一方、これまでの本プロジェクトで口唇裂・口蓋裂の発症原因の追究は前進したものの未だ明らかになっていないのが現状である。今後の展望として DNA のメチル化、ヒストンのメチル化、ヒストンのアセチル化などの epigenome 異常などの今まで捉えられていない構造異常に興味をわく。ロングリードシーケンサーで DNA メチル化解析に移行し、DNA の配列だけではなく DNA のメチル化で多因子遺伝子疾患の発症メカニズムを解明していけないか？そして、遠い未来ではあるが口唇裂・口蓋裂の治療が、患者に負担のかかる手術だけでなく新たな治療を選

扱できる医療へと進むことを夢見ている。

## 引用文献

### 1. 渡邊章

治療法の再整理とアップデートのために 専門家による私の治療 口唇裂・口蓋裂（解説）  
日本医事新報, 5090:42, 2021

### 2. Watanabe, A.

Unraveling Genetic Factors in Cleft Lip and Palate among Japanese Patients: A Two Decade Effort.

J Oral Dent Health Res, 5(4): 164, 2023 doi: <https://doi.org/10.36266/JODHR/164>

### 3. 渡邊章、柴野正康、吉田秀児、加藤宏、高野正行 歯学の進歩・現状 顎骨疾患プロジェクト

からの情報発信 口唇裂・口蓋裂の原因遺伝子の追究 歯科学報, 122:431-435, 2023

### 4. 渡邊章（分担執筆）

標準口腔外科学 第5版 第4章 先天異常および発育異常 :医学書院, 東京, p86-94 106-120 2024

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 渡邊 章、柴野正康、吉田秀児、加藤 宏、高野正行	4. 巻 122
2. 論文標題 歯学の進歩・現状 顎骨疾患プロジェクトからの情報発信 口唇裂・口蓋裂の原因遺伝子の追究	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 歯科学報	6. 最初と最後の頁 431-435
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Watanabe Akira, Yoshida Shuji, Kato Hiroshi, Matsuzaka Kenichi, Takano Masayuki	4. 巻 83
2. 論文標題 A rare case of static bone cavity in the anterior mandibular region of a 10-year-old boy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Surgery Case Reports	6. 最初と最後の頁 106019 - 106019
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Masayasu Shibano, Akira Watanabe, Nobuo Takano, Hiroyuki Mishima, Akira Kinoshita, Koh Ichiro Yoshiura, Takahiko Shibahara	4. 巻 57
2. 論文標題 Target Capture/Next-Generation Sequencing for Nonsyndromic Cleft Lip and Palate in the Japanese Population	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cleft Palate-Craniofacial Journal	6. 最初と最後の頁 80-87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Watanabe Akira
2. 発表標題 Approach to future of orthognathic surgery in Tokyo Dental College
3. 学会等名 15th Asian Congress of Oral and Maxillofacial Surgery（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊章
2. 発表標題 私たちの行っている顎矯正手術の現状と未来
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊章
2. 発表標題 我々の行っている下顎後退症に対する顎矯正手術
3. 学会等名 第30回日本顎変形症学会総学術大会 シンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 渡邊章	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本医事新報	5. 総ページ数 1
3. 書名 治療法の再整理とアップデートのために 専門家による私の治療 口唇裂・口蓋裂	

1. 著者名 渡邊章	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 9
3. 書名 別冊the Quintessence 口腔外科YEARBOOK 一般臨床家, 口腔外科ハンドマニュアル'20 顎裂部骨移植術/ 瘻孔閉鎖術	

1. 著者名 渡邊章（分担執筆）	4. 発行年 2024年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 24
3. 書名 標準口腔外科学 第5版 第4章 先天異常および発育異常	

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関