

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19620

研究課題名（和文）多因子トランスオミックス解析で挑む口唇口蓋裂研究の新戦略

研究課題名（英文）New Strategies in Cleft Lip and Palate Research through Multifactorial Trans-Omics Analysis

研究代表者

犬伏 俊博（INUBUSHI, TOSHIHIRO）

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：30550941

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、家族性の口唇口蓋裂患者とその両親を含む3家系より血液サンプルを採取し、ホールエクソームシーケンシングによるゲノミクス解析を行なった。その結果、1家系において口唇口蓋裂の発症に関与していると予想される遺伝子変異を同定した。今後、多因子の相互作用を解析するパイプラインの開発が強く望まれる。さらに、数家系の血液サンプルの採取と、数家系のリクルートを終えている。現在、まずはゲノミクス解析により遺伝的な要因の同定をすすめている。しかし、当初の目標達成には、口唇口蓋裂患者20名程度のデータが必要と見積もっており、必要十分数を確保するためには継続してゲノミクス解析を実施する必要性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、2つの異なる遺伝子変異によって口唇口蓋裂が発症していると考えられる症例を見出した。このような口蓋裂の原因となる遺伝子や因子を明らかにしていくことで、関連因子や病因因子をもとに口唇口蓋裂を新たに分類できる可能性がある。これにより、治療に対する効果や予後のデータをもとに各分類（関連因子や病原因子）に最適化された治療の提供が可能となり、これまでの口唇口蓋裂の治療体系を大きく変革させる可能性がある。このように、本研究は高い学術的意義が認められる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we collected blood samples from three families, including patients with familial cleft lip and palate and their parents, and conducted genomic analysis through whole-exome sequencing. As a result, we identified a genetic mutation anticipated to be involved in the development of cleft lip and palate in one family. Moving forward, there is a strong need for the development of a pipeline to analyze the interactions of multiple factors. Additionally, we have completed the recruitment and collection of blood samples from several families. Currently, we are advancing the identification of genetic factors through genomic analysis. However, to achieve our initial goals, data from approximately 20 patients with cleft lip and palate is estimated to be necessary, and there is a need to continue conducting genomic analysis to secure a sufficient number of samples.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：口唇口蓋裂 多因子

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂は先天性奇形の中でも最も頻度が高い難治性の疾患である。口唇口蓋裂のような多因子性疾患の病態を解明するためには、多数の因子を統合的に解析する必要がある。近年の解析技術の飛躍的な進化により、プロテオミクスやメタボロミクスといった各因子についての網羅的な解析(オミックス解析)が可能になってきた。さらに、これら解析で得られたビッグデータは機械学習を応用して次元削減し、統合解析する(トランスオミックス解析)ことで、多因子性疾患の新規病因因子を検索することが可能となってきている(右図1)。申請者は、これまでヒトの糖鎖合成・修飾・分解の遺伝子異常が口唇口蓋裂を引き起こすことに着目し、マウス動物実験モデルを用いて、糖鎖の異常がヒト口唇口蓋裂に酷似した表現型を示すことを実証してきた(日本矯正歯科学会 2020, 日本口蓋裂学会 2021にて発表)。さらに、我々が同定した新規の糖鎖分解酵素である *Tmem2* 遺伝子(Yamamoto H et al., J Biol Chem 2017)の変異マウスは、ヒト口唇口蓋裂で最も多く認められる片側性唇顎口蓋裂を発症することを見出した。遺伝子改変マウスでは、口蓋裂単独の表現型を示すものは多く報告されているが、唇顎口蓋裂を示すものは非常に稀であり、特に原因が明らかになっていないヒト唇顎口蓋裂の新規病因因子である可能性がある。全ゲノムの約2パーセントは何らかの形で糖鎖合成に関与するものと考えられているが、糖鎖合成酵素ないし糖鎖修飾酵素の多くは未知である。そのため、口唇口蓋裂において糖鎖合成・修飾・分解の異常を明らかにするためには、遺伝子解析に加えてグライコミクス解析や、メタボロミクス解析を統合して解析することが必要である。さらに本研究では、各患者の臨床的な表現型をHuman Phenotype Ontology (HPO) 形式にて記号化することで、オミックス解析データとの関連解析を可能にする。

### 2. 研究の目的

本研究では、口唇口蓋裂に対する次世代型の予防・治療法の開発を最終的な目標とする口唇口蓋裂研究の新戦略の緒として、新規病因因子の同定や口唇口蓋裂の病型や原因に応じた分類を可能にする口唇口蓋裂発症の分子基盤の確立を目的とした。本研究の中で、多因子によって口蓋裂が引き起こされていると考えられる症例の遺伝子変異を同定したので以下に成果として示す。

### 3. 研究の方法

症例の概要:

**【症例】**

16歳3か月 男児  
粘膜下口蓋裂  
多指症  
歯肉切除2回既往あり  
(母、弟、叔父も同症状)

歯科的所見:

眼間解離、眼瞼裂斜下、眼瞼下垂  
口唇が前突し、オトガイの後退したconvex type profile  
口唇閉鎖不全  
Gummy smile  
歯肉腫脹  
両側Class IIの大白歯咬合関係  
OJ +9.0mm, OB 0mm  
5 矮小、5 先天欠如、E 残存  
骨格性2級  
High mandibular plane angle  
上下顎前歯唇側傾斜



患者の同意のもと、患者とその家族から血液サンプルを採取し、そこから得られたDNAを全エクソームシーケンス解析に使用した。遺伝子検査の実施に際しては、大阪大学大学院歯学研究科・歯学部、歯学部附属病院倫理委員会の承認のもと、患者とその家族から同意を得た上で行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 患者の臨床状の HPO 化

	HPO	KCNQ1
歯肉線維腫症	Gingival fibromatosis, HP: 0000169	✓
粘膜下口蓋裂	Submucous cleft hard palate, HP: 0000176	(✓)
第2趾多趾症	Polydactyly affecting the 2nd toe, HP: 0010328	?
眼瞼下垂	Ptosis HP :0000508	?
眼間解離	Hypertelorism HP :0000316	?
眼瞼裂斜下	<u>Downslanted palpebral fissures</u> HP :0000494	?

##### (2) 遺伝子変異の同定

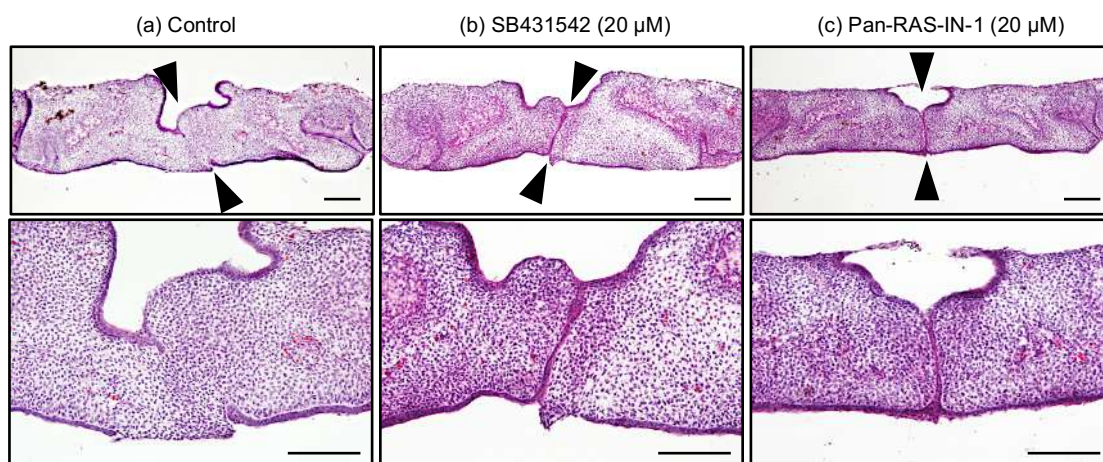
全エクソームシーケンス解析の結果、歯肉増殖を呈する患者、母、弟に KCNQ1 遺伝子のミスセンス変異 (NM\_000218:exon3:c. T538A:p. C180S, NM\_181798:exon3:c. T157A:p. C53S) を認めた。

Clinvar	記載なし
病原性スコア	CADD: 21.8 Provean: -8.609



##### (3) KCNQ1 の機能解析

野生型マウス (E14.5) の水平口蓋器官培養像を示す。器官培養前に (a) ジメチルスルホキシド (DMSO), (b) TGF $\beta$  受容体阻害剤 SB431542 (20  $\mu$ M), (c) Ras 阻害剤 Pan-Ras-IN-1 (20  $\mu$ M) で前処理した。(b) SB431542 処理群および (c) Pan-Ras-IN-1 処理群で、口蓋突起の先端に存在する medial edge epithelial cell (MEE 細胞) が残存し、融合不全となった。



##### (4) 新たな遺伝子変異の検索

患者のみに ANKRD17 のミスセンス変異を認めた。ANKRD17 の機能喪失変異により、知的障害、発語の遅れ、特徴的な顔貌と口蓋裂を示すことが報告されている (Chopra *et al.*, 2021. Am J Hum Genet. PMID: 33909992)。

本症例では、患者のみに粘膜下口蓋裂を認めたことから、歯肉増殖症の患者と家族に共通して認められた KCNQ1 の機能変異では患者のみに認められた粘膜下口蓋裂の表現型について説明がつかない。一方で、KCNQ1 遺伝子の変異は、RAS/MAPK シグナル伝達経路を介して歯肉線維腫症を引き起こす可能性が示唆されている (Gao Q *et al.*, J Periodontal Res., 2021)。また、口蓋裂と RAS/MAPK シグナル伝達経路の関連は近年明らかになりつつあり、ANKRD17 と KCNQ1 の相互作用が粘膜下口蓋裂の発症に関係している可能性が考えられる。今後、多因子の相互作用を解析するパイプラインの開発が強く望まれる。

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 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yanagisawa Shunryou, Nagasaki Karin, Chea Chanbora, Ando Toshinori, Ayuningtyas Nurina Febriyanti, Inubushi Toshihiro, Ishikado Atsushi, Imanaka Hiromichi, Sugiyama Eiji, Takahashi Ichiro, Miyauchi Mutsumi, Takata Takashi	4. 巻 17
2. 論文標題 Oral administration of bovine lactoferrin suppresses the progression of rheumatoid arthritis in an SKG mouse model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0263254 ~ 0263254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0263254	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 Inubushi Toshihiro, Nakanishi Yuichiro, Abe Makoto, Takahata Yoshifumi, Nishimura Riko, Kurosaka Hiroshi, Irie Fumitoshi, Yamashiro Takashi, Yamaguchi Yu	4. 巻 18
2. 論文標題 The cell surface hyaluronidase TMEM2 plays an essential role in mouse neural crest cell development and survival	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 1009765 ~ 1009765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1009765	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 Inubushi Toshihiro	4. 巻 0
2. 論文標題 In Vitro Investigation of the Effects of the Hyaluronan-Rich Extracellular Matrix on Neural Crest Cell Migration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/64749	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 Li A., Sasaki J.I., Inubushi T., Abe G.L., N?r J.E., Yamashiro T., Imazato S.	4. 巻 102
2. 論文標題 Role of Heparan Sulfate in Vasculogenesis of Dental Pulp Stem Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 207 ~ 216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/00220345221130682	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Inubushi, T., Fujiwara, A., Hirose, T., Aoyama, G., Uchihashi, T., Yoshida, N., Shiraishi, Y., Usami, Y., Kurosaka, H., Toyosawa, S., Tanaka, S., Watabe, T., Kogo, M., Yamashiro, T.
2. 発表標題 The Ras signaling effector gene, Rreb1, is required for the dissociation of MEE cells in palatogenesis.
3. 学会等名 14th international congress of cleft lip, palate & related craniofacial anomalies. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yokoyama, M., Inubushi, T., Shiraishi, Y., Yoshida, Y., Hirose, T., Yoshida, N., Kurosaka, H., Yamashiro, T.
2. 発表標題 The role of Chst11-mediated sulfation of chondroitin sulfate during palatogenesis.
3. 学会等名 14th international congress of cleft lip, palate & related craniofacial anomalies. (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究分担者	田中 晋  (TANAKA SUSUMU)  (00367541)	大阪大学・大学院歯学研究科・教授    (14401)	
研究分担者	山口 雅也  (YAMAGUCHI MASAYA)  (00714536)	大阪大学・大学院歯学研究科・准教授    (14401)	
研究分担者	藤原 千春  (FUJIWARA CHIHARU)  (00755358)	大阪大学・大学院歯学研究科・助教    (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	黒坂 寛  (KUROSAKA HIROSHI)  (20509369)	大阪大学・大学院歯学研究科・准教授    (14401)	
研究分担者	白石 優季  (SHIRAIISHI YUKI)  (40912457)	大阪大学・歯学部附属病院・医員    (14401)	
研究分担者	内橋 俊大  (UCHIHASHI TOSHIHIRO)  (60757839)	大阪大学・大学院歯学研究科・助教    (14401)	
研究分担者	山城 隆  (YAMASHIRO TAKASHI)  (70294428)	大阪大学・大学院歯学研究科・教授    (14401)	
研究分担者	飛澤 悠葵  (TOBISAWA YUKI)  (70623768)	岐阜大学・医学研究科・助教    (11101)	

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