

平成 2 8 年 6 月 2 9 日現在

機関番号：3 2 6 2 2

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：2 4 7 9 2 3 0 5

研究課題名(和文) 双生児のゲノム・エピゲノム比較解析に基づく先天異常の環境要因遺伝子に関する研究

研究課題名(英文) Genome, epigenome compaired analysis of a pair of monozygotic twins discordant for congenital malformation

研究代表者

萬屋 礼子(YOROZUYA, REIKO)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：3 0 3 8 4 3 4 0

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円

研究成果の概要(和文)： 先天異常である唇顎口蓋裂の一卵性双生児(裂児・非裂児ペア)を対象にゲノム・エピゲノムの網羅的解析を行い、双子間でのDNAメチル化発現の差異の有無・領域の同定、双子間の障害差異要因を探求することで唇顎口蓋裂の発生原因探索を行った。ゲノムDNAメチル化領域の濃縮シーケンス解析、メチル化DNA領域をMethylated DNA Binding Domain (MBD)を用いて濃縮後、次世代DNAシーケンサー(Hiseq 2500)にて全ゲノム配列解析を行った。Edge R検定の結果、口蓋裂罹患側に特異的なPromoter領域/非Promoter領域における共通した高/低メチル化領域が同定された。

研究成果の概要(英文)：Monozygotic (MZ) twins show remarkable resemblance in many aspects of disease. MZ twins were usually called “genetically identical”; however, evidence for genetic and epigenetic differences within rare MZ twins has accumulated. Nonsyndromic cleft lip and palate (NCLP) is one of the most common birth defects. It causes severe facial dysmorphism and treatment requires a multifaceted team approach. The causes of NCLP are multifactorial with both genetic and environmental factors. Some study shows that approximately 20% of the genetic contributions to NCLP have been assigned to a small number of genes.

Subjects are two pairs of NCLP/non-NCLP MZ and one pair of NCLP/non-NCLP triplets. We had used Methylated DNA Binding Domain (MBD) for insipissations of methylated DNA domain, and did MBD-based genom-wide methylation sequencing. We used EdgeR software to perform a differential methylation analysis. Few specific high/low methylated gene were found in NCLP subjects.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：エピジェネティクス ゲノム 一卵性双生児 口蓋裂 先天異常

1. 研究開始当初の背景

唇顎口蓋裂や鰓弓症候群など矯正歯科領域の先天異常の発生原因として、近年、遺伝子異常が明らかにされたが単一遺伝子異常で発症する症例は少なく、その大半は多因子遺伝、すなわち遺伝素因の他に環境要因も関係している可能生が示唆されている。しかしながら、環境要因と遺伝素因との関連性に関しては、未だ包括的な理解には至っていない。

唇顎口蓋裂などの症状を持つ場合、その殆どが顎顔面領域における変形を発症し、その治療は、対症療法としての顎裂部骨移植や顎顔面再建術が広く用いられている。しかし、このような症状に対する根治療法（胎児期における先天異常症状の発生を防ぐ）ことが、その後の器官発生・成長を従来のレールのままに誘導することが望まれている。

一卵性双生児は通常、その容姿がそっくりだが、中には片方が健康で他方が疾患を発症することがある。このような場合、DNA は共有しており遺伝的には同一であることから、発症要因は環境要因と判断してきた。そして近年、一卵性双生児間で DNA 上の修飾すなわちエピジェネティクスに違いがみられることが明らかにされ（Sato ら、*Mol Psychiatry* 2002, *Proc Natl Acad USA* 2005, *Twin Res Hum Genet* 2006）、胎生期や生後の環境要因が、DNA 上のエピジェネティックな修飾を変えて遺伝子の働き具合をかえているのではないかと考えがとられるようになってきた。

しかし、このような症状発現に差異のある双子を対象にした口唇口蓋裂や鰓弓症候群などの先天異常発生要因の探索への遺伝学的アプローチの研究はこれまでなされておらず、今後、先天異常の根本的治療法である遺伝子治療による先天異常の予防を可能にするのが急務と考えられる。

エピジェネティクスとは、DNA のメチル化修飾等を基盤とする遺伝子の発現調節機構のことである。遺伝学の基本的な考え方は、「遺伝子に変異が生ずると生成されるタンパク質は変異体となり、蛋白質の正常機能が失われ、その結果、疾患が発症する」というものであった。一方、エピジェネティクスに基づく病態理解は「正常状態では遺伝子スイッチ（プロモーター）が ON であるはずのところ、遺伝子領域の DNA に異常な修飾がなされ、この結果スイッチが OFF となり、蛋白質が生成されず、その結果、疾患が発症する」というものである。従来、染色体の親由来の異常など「後天的なエピジェネティクス疾患」が知られていたが、近年、不十分な栄養やストレス

などの環境因子がエピジェネティクスを変化させ、疾患にいたらしめていると考えられる「後天的なエピジェネティクス疾患」の存在が指摘されるようになってきた。

このように、ゲノムやエピゲノムの配列やパターンは、受精後や組織分化終了後は変化しないと考えられてきた。しかし最近コピー数多型（CNV）とよばれるゲノム領域や DNA のメチル化に代表されるエピゲノムが一卵性双生児間で異なることが報告され（*Proc Nat Acad Sci USA* 2005）、また申請者自身の臨床研究においても頭蓋顎顔面形態が一卵性双生児間で異なるを報告し（*The 13th International Congress on Twin Studies, Korea* 2010）、この常識が覆されつつある。

エピジェネティクスは可逆性を有する遺伝子調節メカニズムであり、モデルマウスを用いた Rett 症候群研究では生後の治療で神経障害が完治したとの報告もある。エピジェネティクス疾患は可逆性に根ざした治療が可能であることから、一卵性双生児の従来のゲノムとエピゲノムを比較検討し、先天異常の先天的・後天的原因の解明を遺伝学的観点から探索する必要があると考えられる。

2. 研究の目的

唇顎口蓋裂や第一・第二鰓弓症候群などの先天異常の一卵性双生児（罹患児・非罹患児のペア）例を対象にゲノム・エピゲノムの網羅的な解析を行い、双子間での CNV 発現量や DNA のメチル化の差異領域を特定し、この影響で発現差異を認める遺伝子、すなわち双子間の障害差異要因の候補遺伝子の同定を行い、先天異常の原因探索を行う。

3. 研究の方法

双子間差異を呈する CNV 領域の同定実験
末梢血リンパ球のゲノム DNA を制限酵素で断片化し、蛍光色素（双子それぞれ別種のもの）で標識したものを CNV アレイ（40 万 CNV プローブを含む）（アジレント社製）にハイブリダイズし、蛍光強度に差のある CNV を検出する。

双子間のメチル化差異領域の同定
末梢血リンパ球ゲノム DNA を制限酵素で断片化し、メチル化された DNA を特異的に吸着するカラム（メチルコレクター、アクチブ

モティーフ社)を用いてメチル化されたゲノム領域を濃縮。双子それぞれの濃縮DNA産物をプロモーターマイクロアレイ(アフィメトリックス社製)にハイブリダイズして比較解析する。これにより、姉だけでメチル化された遺伝子(妹だけで脱メチル=発現している遺伝子)が妹を軽症化させている分子の候補となる。

関連遺伝子近傍のCNVの選定

双子間で差異のあったCNV領域のうち、領域内またはその近傍に関連遺伝子が存在するCNV(その遺伝子の発現に影響を与える)を、ゲノムデータベースをもとに選定する。

関連メチル化差異遺伝子の選定

双子間でメチル化の程度に差異のあった遺伝子プロモーター領域のうち、関連遺伝子のプロモーター領域を選定する。

遺伝子のエピゲノム(DNAメチル化)制御の詳細確認

アレイ解析結果に基づく選定されたプロモーター領域内のDNAのメチル化の詳細(個々のメチル化CpG部位)をbisulfite処理サンプルのシーケンス(Kubota et al., Nat Genet1997)で把握する。

双子間の差異症状の要因となった発現差異遺伝子の同定

双子各々で発現量差異が大きい遺伝子、関連遺伝子を探索する。

4. 研究成果

矯正歯科治療を要する先天異常のうち、唇顎口蓋裂の一卵性双生児(裂児・非裂児ペア)を対象にゲノム・エピゲノムの網羅的解析を行い、双子間でのDNAメチル化発現の差異の有無・領域の同定、さらにはこの発現差異を認める遺伝子、すなわち双子間の障害差異要因を探索することで、唇顎口蓋裂の発生原因探索を行った。一卵性双生児で一方が口蓋裂児で他方が非口蓋裂児のペア2組、一人が口蓋裂児で他2名が非口蓋裂児の三つ子1組の計3組を被験者として、双生児ゲノム・

エピゲノム比較解析に基づく先天異常の環境要因遺伝子に関する研究を行った。

第一段階として、ゲノム上の特異的SNPジェノタイピングを行い、SNPおよびCNVコピー数の双生児間差異を解析したが、双生児間に有意差は存在しなかった。

次に、第二段階として、ゲノムDNAメチル化領域の濃縮シーケンス解析、つまり、メチル化DNA療育をMethylated DNA Binding Domain (MBD)を用いて濃縮後、次世代DNAシーケンサー(Hiseq 2500)を用いて全ゲノム配列解析を行った。さらに得られたリード配列を用いてシーケンスの品質評価、シーケンスリードのReference配列へのマッピング、ピーク同定、各ピークへのアノテーション付加、検体間比較、双子間での3組比較などをバイオインフォマティクス解析にて行った。Edge R検定の結果、ゲノムは同一な一卵性双生児であるが、口蓋裂罹患側側に特異的なPromoter領域/非Promoter領域における共通した高/低メチル化領域が同定された。

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 1 件)

1) R. Shibasaki-Yorozuya, A Yamada, S Nagata, K Ueda, AJ. Miller, K Maki. Three-dimensional longitudinal changes in craniofacial growth in untreated hemifacial microsomia patients using cone beam computed tomography (CBCT). Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2014 May; 145(5): 579-594

〔学会発表〕(計 1 件)

ISCFS 2015 Maihama(Chiba)
14th-18th September, 2015/02/16
Orthopedically induced orbital-maxillary-condylar growth in a patient with hemifacial microsomia. Reiko

Shibazaki-Yorozuya, Akira
Yamada, Satoru Nagata, Koutaro
Maki

〔図書〕(計 1 件)

- 1) 萬屋 礼子:3章矯正歯科治療(71
~77ページ) こどもの口唇裂・口
蓋裂の治療とケア(第1版), 大久
保 文雄 著
2014年4月 メディカ出版

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

萬屋 礼子(YOROZUYA, Reiko)
昭和大学・歯学部・歯科矯正学講座・助教
研究者番号: 3 0 3 8 4 3 4 0

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: