

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670881

研究課題名(和文)ゲノムワイド関連解析から顎口腔領域に関連する形質の遺伝因子を解明する

研究課題名(英文) Genome-wide association study identifies novel temporomandibular joint osteoarthritis susceptibility loci

研究代表者

山口 徹太郎 (Yamaguchi, Tetsutaro)

昭和大学・歯学部・准教授

研究者番号：40384193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症は関節軟骨ならびに軟骨下骨に及ぶ退行性病変である。本研究はゲノムワイド関連解析により東アジア人集団における顎関節変形性関節症の疾患感受性遺伝子の同定を目的とした。日本人罹患者86名非罹患者143名、韓国人罹患者39名、非罹患者178名を対象とした。関連解析の結果、これまで関連が報告されていない新規の3遺伝子座位が同定された。これまでに顎関節変形性関節症に対するゲノムワイド関連解析の報告はなく、原因遺伝子の同定は病態の理解に寄与することができる。

研究成果の概要(英文)：We have conducted the first GWAS to identify susceptibility genes underlying degenerative bony changes of the TMJ that were diagnosed by examination of a panoramic radiograph and/or MRI and/or CT images. As a result, 41 SNPs located in 22 independent loci showing association signals with degenerative bony changes of the TMJ. Our data may be useful for a future meta-analysis of GWAS data sets.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：ゲノムワイド関連解析 変形性関節症 遺伝(子)

1. 研究開始当初の背景

咬合育成における上・下顎成長発育の理解はきわめて重要な課題である。本申請課題研究者らはこれまでゲノム情報と歯の形態や頭蓋顎顔面形態との関連を探索してきた。外胚葉異形成症、ラーロン症候群、永久歯先天性欠如の原因遺伝子が健常集団においても歯の形質や顎顔面計測項目と関連することを明らかにした。本申請課題研究者らは先天性疾患や遺伝子改変動物の表現型、ならびに集団遺伝学の応用に基づく「候補遺伝子関連解析」により顎口腔領域における形質・疾患の遺伝因子同定に成功してきた。

一方、歯の形態や頭蓋顎顔面形態をはじめとする顎口腔領域に関連した形質は強い遺伝性を呈するがそのほとんどは多因子疾患・形質である。多因子形質は、メンデル型の遺伝形式を取らず、複雑な遺伝形式をとるものである。複数の遺伝子と環境が量的形質、質的形質に与える影響の形式は、フィッシャーにより相加的ポリジーンモデルとして定式化されている (Trans Roy Soc Edinburgh, 1918)。これに基づき、近年、ヒトゲノム上の数十万のマーカーのデータを用いた関連解析が可能となった。この手法をゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study; GWAS) と呼ぶ。ゲノムワイド関連解析は多因子形質の遺伝的原因を解明する有力な手法であり、新規の、あるいは機能が明らかにされていない遺伝因子を同定することができる。本研究は歯の形態や頭蓋顎顔面形態をはじめとする顎口腔領域に関連する形質に関する新規の、あるいは機能が明らかにされていない遺伝因子をゲノムワイド関連解析から解明することを目的とする。

これまでの顎口腔領域に関連した疾患・形質に関する遺伝因子についての研究は先天性疾患や遺伝子改変動物の表現型、ならびに集団遺伝学の応用に基づく「候補遺伝子関連解析」が実施されてきた。しかし、歯の形態や頭蓋顎顔面形態をはじめとする顎口腔領域に関連した形質のほとんどは多因子形質である。本研究はゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study; GWAS) という先進的な研究手法を応用し顎口腔領域に関連する形質に関する新規の、あるいは機能が明らかにされていない遺伝因子を解明するものである。歯の形態は強い遺伝性を有するにもかかわらず、ゲノムワイド関連解析実施は報告されていない。新規の、あるいは機能が明らかにされていない遺伝因子の解明は顎離断等の手術を要する顎変形症や歯槽と歯の大きさの不均衡によって生じる叢生などの咬合異常における病態理解を急激に推し進めるものとなる。

2. 研究の目的

本課題研究者らは顎離断等の手術を要する

顎変形症や歯槽と歯の大きさの不均衡によって生じる叢生など咬合異常の病態理解に寄与することから、先天性疾患や遺伝子改変動物の表現型、ならびに集団遺伝学の応用に基づく「候補遺伝子関連解析」により顎口腔領域における形質・疾患の遺伝因子同定に成功してきた。一方、「ゲノムワイド関連解析」は、多因子形質の遺伝的原因を解明する有力な手法であり、新規の、あるいは機能が明らかにされていない遺伝子との関連も検証することができる。本申請では、強い遺伝性を呈するがそのほとんどが多因子形質である歯の形態や頭蓋顎顔面形態をはじめとする顎口腔領域に関連した形質について「ゲノムワイド関連解析」から新規の、あるいは機能が明らかにされていない遺伝因子を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

平成 25 年度は追加対象者の臨床情報の収集・解析と並行してゲノム解析を行った。ゲノム解析はゲノムワイド関連解析約 50 万 SNPs (一塩基多型) のタイピング (イルミナ OmniExpress) と遺伝統計学的解析を行う。平成 26 年度ではタイピングデータ解析から遺伝統計学的解析結果をもとに補完 SNPs のタイピング (DigiTag2 法、Taqman 法)、遺伝統計学的解析を実施した。以上の工程を経て、顎口腔領域に関連した形質に関する新規の、あるいは機能が明らかにされていない遺伝因子を解明した。

本申請課題は既に関連倫理委員会の承認を得ている (昭和大学ヒトゲノム・遺伝子解析倫理委員会 承認番号 108 号 平成 20 年 12 月 16 日付)。対象者は昭和大学歯科病院矯正歯科に来院されている成人患者について協力を依頼、文書による同意を得たものである。平成 24 年 8 月末までに一次スクリーニングとしての約 500 名の検体収集、DNA 抽出、ゲノム解析 (タイピング) を完了している。また、本申請課題が実施可能な二次スクリーニングとしての約 200 名の検体収集、DNA 抽出も完了している。

1) 臨床データの抽出

口腔内模型、側面頭部 X 線規格写真、正面頭部 X 線規格写真、パノラマ X 線規格写真、コーンビーム X 線撮影画像などすでに解析経験のある形質について解析した。

2) 遺伝子型の決定

全ゲノム増幅 (1000 倍以上) 断片化 (300 ~ 600bp 程度) 処理 ビーズチップ (経費申請: イルミナ OmniExpress) とのハイブリダイゼーション ポリメラーゼによる伸張反応 蛍光標識 スキャナーによる生データ読みとり の工程を経て遺伝子型を決定した。高いエラー率、非ランダムなデータ欠失、低

いコールレート（ホモ接合性、ヘテロ接合性を判定することが可能な割合）により偽陽性が大幅に増加するため、高品質なタイピングデータを獲得した。

3) GWAS データセットの quality control

遺伝マーカーの実験データについてタイピングのチェック、Hardy-Weinberg 平衡の検定を実施した。

4) 遺伝統計学的解析

集団の構造化の検定 ハプロタイプ推定 (Genotype imputation ; コンテンツが異なるマーカーセット間でのジェノタイピングデータの推測) 関連解析(独立性検定) を経て疾患・形質に関連する遺伝子座位を特定した。

5) 補完 SNPs の解析

本申請課題では DigiTag2 法、Taqman 法によるタイピングを採用した。SNPs(一塩基多型)のタイピングを精度、再現性を維持しながら可及的に低コストで実施した。

6) 研究成果の総括

本研究成果を学会報告した。論文を投稿した。

4 . 研究成果

変形性関節症は関節軟骨ならびに軟骨下骨に及ぶ退行性病変である。これまで顎関節における変形性関節症の遺伝因子に関する報告は極めて少ない。一方、ゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study) は多因子形質の遺伝的原因を解明する有力な手法である (Nat Genet, 2002)。本研究はゲノムワイド関連解析により東アジア人集団における顎関節変形性関節症の疾患感受性遺伝子の同定を目的とした。日本人罹患者 86 名非罹患者 143 名、韓国人罹患者 39 名、非罹患者 178 名を対象とした。顎関節における変形性関節症の罹患の有無はパノラマ X 線写真により診断した。各個人の遺伝子型はイルミナ OmniExpress を用いて決定した。BEAGLE (Am J Hum Genet, 2009) による genotype imputation を実施した。日本人と韓国人は個別に患者対照関連解析を行い、両者の結果をメタ解析で統合し、p-value を算出した。メタ解析には DerSimonian-Laird random effects model (Control Clin Trials, 1986) を用いた。本研究は昭和大学ならびに関連機関の倫理委員会により承認を得て実施した。全サンプルの平均 Call rate は 99.7% であり、良好なタイピング結果が得られた。Genotype imputation から日本人、韓国人ともに約 5,800,000 一塩基多型 (SNP) の情報が利用可能となった。関連解析の結果、 $P < 10^{-5}$ の有意水準でこれまで関連が報告されていない新規の 3 遺伝子座位が同定された。これまでに顎関節変形性関節症に対するゲノムワイド関連解析の報告はなく、原因遺伝子の同定は病態の理解に寄与することができる。

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 8 件)

Identification of gene expression profile of neural crest-derived cells isolated from submandibular glands of adult mice. Takahashi M, Suzawa T, Yamada A, Yamaguchi T, Mishima K, Osumi N, Maki K, Kamijo R. Biochem Biophys Res Commun 446:481-486, 2014

Genome-wide association study of degenerative bony changes of temporomandibular joint in East Asian populations. Yamaguchi T, Nakaoka H, Yamamoto K, Fujikawa T, Kim YI, Yano K, Haga S, Katayama K, Shibusawa T, Park SB, Maki K, Kimura R, Inoue I. Oral Dis 20(4):409-15, 2014

Measurement of unerupted permanent teeth using cone beam computed tomography. Futaki K, Yamaguchi T, Katayama K, Haga S, Hasebe A, Maki K. Hosp Dent Oral-Maxillofac Surg 26(1):7-10, 2014

Comparison of two-jaw surgery outcomes between patients with skeletal class III open bite and those with skeletal class III maxillofacial deviation. Tsutsui S, Yamaguchi T, Atarashi M, Furuya R, Yoshiba S, Shirota T, Maki K. Hosp Dent Oral-Maxillofac Surg 26(1):11-16, 2014

The skeletal maturation status estimated by statistical shape analysis: Axial images of Japanese cervical vertebra. Shin SM, Kim YI, Choi YS, Yamaguchi T, Maki K, Cho BH, Park SB. Dentomaxillofac Radiol 2014 Nov 20:20140323.

Common polymorphisms in WNT10A affect tooth morphology as well as hair shape. Kimura R, Watanabe C, Kawaguchi A, Kim YI, Park SB, Maki K, Ishida H, Yamaguchi T. Hum Mol Genet 2015 May 1;24(9):2673-80.

Quantitative skeletal maturation estimation using cone-beam computed tomography-generated cervical vertebral images: a pilot study in 5- to 18-year-old Japanese children. Byun BR, Kim YI, Yamaguchi T, Maki K, Ko CC, Hwang DS, Park SB, Son WS. Clin Oral Investig 2015 Feb 12.

Quantitative assessment of cervical vertebra maturation using cone-beam computed tomography in Korean girls. Byun BR, Kim YI, Yamaguchi T, Maki K, Son WS. Comput Math Methods Med Volume

〔学会発表〕(計7件)

第24回特定非営利活動法人日本顎変形症学会総会・学術大会 平成26年(2014年)6月10日(火)・11日(水)福岡 自然立位と3次元顎椎形態との関連. 権佳奈、山口徹太郎、中島榮一郎、榎宏太郎

第24回特定非営利活動法人日本顎変形症学会総会・学術大会 平成26年(2014年)6月10日(火)・11日(水)福岡 顎顔面外科手術前後の咀嚼効率変化 第1報. 常岡美里、山口徹太郎、中村道、榎宏太郎

第73回 東京矯正歯科学会 平成26年7月10日 東京 電動スライダーによるボタンプル計測と顎顔面形態との関係. 古谷亮子、木村仁、山口徹太郎、伊能教夫、榎宏太郎

第73回 日本矯正歯科学会大会 2014年10月20日~22日 千葉 永久歯先天欠如の新規原因遺伝子. 山口徹太郎、細道一善、矢野圭介、芳賀秀郷、方山光朱、中脇貴俊、富田大介、中村 雅典、上條竜太郎、井ノ上逸朗、榎宏太郎

第19回 日本顔学会大会 2014年10月25日~26日 東京 日本人における第三大臼歯4歯先天欠如の顔面形態の特徴. 芳賀 秀、山口徹太郎、榎宏太郎

International symposium on Genome Science 2015 January 20-21, 2015, Tokyo. A novel causative gene for permanent tooth agenesis. Yamaguchi T, Hosomichi K, Kim YI, Yano K, Haga S, Katayama K, Park SB, Maki K, Inoue I
昭和大学歯学部 文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成26年度シンポジウム「次世代型顎口腔組織再生医療の研究開発拠点形成」研究成果発表会 2015年3月28日 東京 非症候群性永久歯先天欠如の新規原因遺伝子の同定. 山口徹太郎、細道一善、芳賀秀郷、方山光朱、中脇貴俊、富田大介、大塚裕忠、野中直子、中村 雅典、井ノ上逸朗、榎宏太郎

〔図書〕(計1件)

新・歯科衛生士教育マニュアル 歯科矯正学 2015年1月10日 クインテッセンス出版株式会社 編者 葛西一貴、新井一仁、須田直人、三浦廣行

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 徹太郎 (YAMAGUCHI, Tetsutaro)
昭和大学・歯学部・准教授
研究者番号：40384193

(2) 研究分担者

榎 宏太郎 (MAKI, Koutaro)
昭和大学・歯学部・教授
研究者番号：80219295

(3) 研究分担者

木村 亮介 (KIMURA, Ryosuke)
琉球大学・亜熱帯島嶼科学超域研究推進機構・准教授
研究者番号：00453712

(4) 研究分担者

井ノ上 逸朗 (Inoue Ituro)
国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・教授
研究者番号：00192500

(5) 研究分担者

友安 洋子 (TOMOYASU, Yoko)
昭和大学・歯学部・普通研究生
研究者番号：50551206