

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861991

研究課題名(和文) 頭蓋顔面形態異常におけるゲノムワイドな遺伝的関連解析

研究課題名(英文) Genome-wide association study for abnormal cranio-facial morphology

## 研究代表者

斉藤 文男 (Saito, Fumio)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：00612889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：5つの遺伝子座(1p32.2, 1p22.3, 6q23.2, 7q11.22, 15q22.22)が骨格性下顎前突症の新規感受性領域として示唆された。遺伝子の候補としてPLXNA2遺伝子とSSX2IP遺伝子、TARID遺伝子、CALN1遺伝子、RORA遺伝子が考えられた。PLXNA2遺伝子はセマフォリンの共受容体をコードする遺伝子でセマフォリン3Aは骨代謝への関係が報告されている。SSX2IP遺伝子は滑膜肉腫と関係する遺伝子であり、RORA遺伝子も骨代謝において何らかの機能を有することが報告されている。これらの遺伝子が下顎前突症と何らかの関係があると推測される。

研究成果の概要(英文)：five loci (1q32.2, 1p22.3, 6q23.2, 7q11.22 and 15q22.22) were likely to be as novel susceptibility regions of mandibular prognathism. PLXNA2, SSX2IP, TARID, CALN1 and RORA genes were considered as a genetic candidate. PLXNA2 gene is a gene encoding semaphorin co-receptors, and the relations to bone metabolism are reported in semaphorin 3A. It has been reported that SSX2IP gene is related to a Synovium Sarcoma and RORA gene has some kind of functions in bone metabolism. We speculate that these genes may be also associated with mandibular prognathism.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯学

## 1. 研究開始当初の背景

骨格性下顎前突症は、下顎の前下方への成長が過大であるため、側貌における下顎の著しい突出感と、反対咬合による咀嚼障害を呈する疾患である。

下顎前突症は、人種間で発生頻度が異なり、アジア人(15%)、コーカソイド(1%)という報告がある。(Allwright WC, Bundred WH: A survey of handicapping dentofacial anomalies among Chinese in Hong Kong. Int Dent J 14 : 505-519, 1964., Emrich RE, Brodie AG, Blayney JR: Prevalence of class I, class II, class III, malocclusions (Angle) in an urban population: an epidemiological study. J Dent Res 44 : 947-953, 1965.) ただし性別による差は報告されていない。

骨格性下顎前突症の原因は、これまでになされた研究では、遺伝要因と環境要因が原因であると報告されているが、長い間、骨格性下顎前突症の原因は遺伝的要因が重要であると考えられている。矯正治療の1期治療では骨格性下顎前突症の治療として、現在、成長期に下あごの成長を抑制するためにチンキャップという装置を使用しているが、長期間におよぶ治療にもかかわらず、成長期の後半の下顎の著しい成長を抑えきれずに、反対咬合を呈するケースを認める。

そういった場合は、手術を行い、外科的に下顎を後方に移動させることが必要になることがある。もし骨格性下顎前突症の原因遺伝子が明らかになれば矯正治療の治療方針を決定する上で重要な情報になると考えられる。例えば、強い遺伝的要因を持つ場合には、顎矯正手術が必要となる可能性が高いので長期間に及ぶ下顎の成長抑制治療を避ける。また、遺伝的要因が弱い場合には、積極的に下顎の成長抑制治療を行う、などのように考えることが可能になる。

現在、下顎前突症のゲノムワイド連鎖解析がいくつか報告されている。例えば日本人と韓国人の罹患同胞対解析(日本 50 人の同胞対、韓国 40 人の同胞対)(Yamaguchi T, Park SB, Narita A, Maki K, Inoue I: Genome-wide linkage analysis of mandibular prognathism in Korean and Japanese patient. J Dent Res 84 : 255-259, 2005.)で、他にはヒスパニックの家系の連鎖解析である(57 人、内患者 28 人、健常者 29 人)(Frazier-Bowers S, Rincon-Rodriguez R, Zhou J, Alexander K, Lange E: Evidence of linkage in a hispanic cohort with a Class II dentofacial phenotype. J Dent Res 88 : 56-60, 2009.)。このように下顎前突症を対象としたゲノムワイド連鎖解析はすでに行われているが、ゲノムワイド関連解析は行わ

れていない。

## 2. 研究の目的

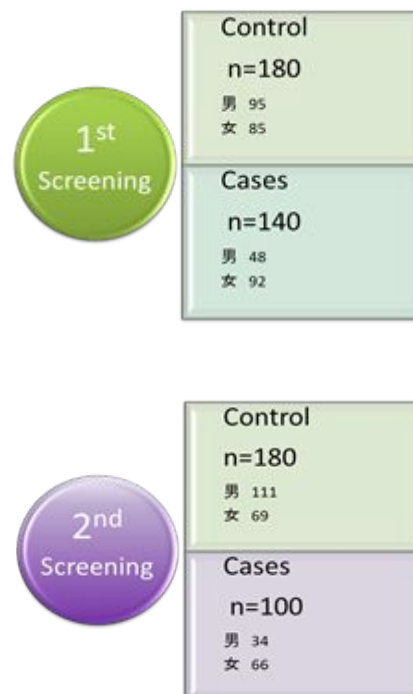
マイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイド関連解析により、骨格性下顎前突症の感受性対立遺伝子領域を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

各段階のスクリーニングに使用したサンプル数は一次スクリーニングではコントロール 180 人、患者 140 人、二次スクリーニングではコントロール 180 人、患者 100 人の血液を収集した。

血液から DNA を分離し、各個人の DNA サンプルの濃度の定量を行い、DNA プール(pooled DNA)を作製した。

一次スクリーニングでは 23465 個のマイクロサテライトマーカーを、二次スクリーニングでは一次スクリーニングで陽性となったマイクロサテライトマーカーを用いて、通法の PCR を行った。PCR product は適切な濃度に調整し、指標となる試薬を加え、DNA の 2 本鎖を引き離した上で自動 DNA シーケンサーにて測定、解析を行った。二次スクリーニングで陽性となったマーカーに対し Individual genotyping を行った。



血液からの DNA の分離



Pooled DNA の作製



1st screening of DNA typing



2nd screening of DNA typing

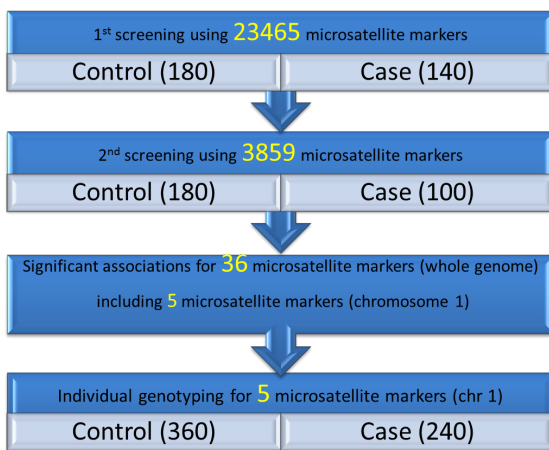


Individual DNA typing

#### 4. 研究成果

スクリーニングの結果は一次スクリーニングで 3859 コのマーカーが陽性、二次スクリーニングで明らかに偽陽性と考えられるものを省き 36 マーカーが陽性となった。

その中で 12 個のマーカーに対し Individual genotyping を行った。理由としては時間的、財源的な問題があったため、今回は途中までの結果を報告し、今後の展望として全マーカーを網羅する予定である。



#### < MS Markers >

- ( 1 ) D1S411
- ( 2 ) D1S0411i
- ( 3 ) D1S1358i
- ( 4 ) D1S1028i
- ( 5 ) D1S0337i
- ( 6 ) D4S0965i
- ( 7 ) D6S0827i
- ( 8 ) D7S0133i
- ( 9 ) D10S0554i

- ( 10 ) D11S4179
- ( 11 ) D9S0793i
- ( 12 ) D15S0154i

#### < Cytobands >

- ( 1 ) 1p31.1
- ( 2 ) 1p22.3
- ( 3 ) 1q32.2
- ( 4 ) 1p34.3
- ( 5 ) 1p34.1
- ( 6 ) 4q28.2
- ( 7 ) 6q23.2
- ( 8 ) 7q11.22
- ( 9 ) 10p15.1
- ( 10 ) 11q13.5
- ( 11 ) 9q31.2
- ( 12 ) 15q22.22

#### < Physical position of amplicon >

From ( 1 ) 69589074

- ( 2 ) 84713646
- ( 3 ) 208192261
- ( 4 ) 38110025
- ( 5 ) 44272738
- ( 6 ) 128862847
- ( 7 ) 133837264
- ( 8 ) 72050853
- ( 9 ) 5843919
- ( 10 ) 76685216
- ( 11 ) 105439380
- ( 12 ) 61218060

To ( 1 ) 69589277

- ( 2 ) 84713933
- ( 3 ) 208192361
- ( 4 ) 38110364
- ( 5 ) 44273030
- ( 6 ) 128862943
- ( 7 ) 133837503
- ( 8 ) 72051155
- ( 9 ) 5844068
- ( 10 ) 76685451
- ( 11 ) 105439531
- ( 12 ) 61218325

Forward ( 1 ) GAGGTCAGTTGATCCAGTGG

- ( 2 ) TGCTTGAACCTGATAGGTAGAG
- ( 3 ) AGTCACCACCTGCCATATG
- ( 4 ) TGACGTGATATTTGAAATCATA
- ( 5 ) GAGCTATTAGCAATGTCAGAAAAC
- ( 6 ) GTTACAGAAGATACTCCTGGCAG
- ( 7 ) GCTGCGCAATTAGAATAATAAA
- ( 8 ) CCAATTAAC TAATTCTACCATCAC
- ( 9 ) CCTGCATAAGTAATAATTTCTTTC
- ( 10 ) GGATGTAAGAGTAAGTGGCTCCG
- ( 11 ) TGATAATGCTAAGGTAAGTACTGTATTC
- ( 12 ) GTGGCTCATAAATAGATCATGA

Reverse ( 1 ) AAGTTTCTGAGAACCTTTTTGTG  
 ( 2 ) GGCTTGTAGATGCTAGGAAAG  
 ( 3 ) TCCAGGGTTGTCTTGTCC  
 ( 4 ) CTATTGGCATTGCTAAGATTATAG  
 ( 5 ) GCTTGAGCATGAGAATCAC  
 ( 6 ) ACAGAGACATGGATGGACAC  
 ( 7 ) GCACAACCAATTTCTTGATG  
 ( 8 ) ATTAGCCAAGCATGGTATAATC  
 ( 9 ) TATCTCCTCTGAAATTAGTCACTAGTC  
 ( 10 ) GAAAATGTTCTGCCTGAGGG  
 ( 11 ) GACCTCTCCTATTCCCTGC  
 ( 12 ) AGCTTGAATATTACAGGTCTTAAC

すでに連鎖解析で報告された領域は含まれていなかったが、あるアレルの頻度にケースコントロール間で差があり、5つのマーカーで有意な相関が認められ、そのP valueは10のマイナス4乗~5乗レベルだった。

MS Markers	Cytobands	Allele frequency		Fisher's exact test P-value	
		Case	Control	2x2	2xm
D1S1028i	1p34.3	0.058	0.086	0.084	0.318
D1S0337i	1p34.1	0.119	0.082	0.043	0.077
D1S411i	1p31.1	0.174	0.230	0.02	0.084
<b>D1S0411i</b>	1p22.3	0.165	0.247	<b>0.000666</b>	<b>0.002</b>
<b>D1S1358i</b>	1q32.2	0.362	0.465	<b>0.000422</b>	<b>0.007</b>
D4S0965i	4q28.2	0.444	0.539	0.002	0.015
<b>D6S0827i</b>	6q23.2	0.057	0.115	<b>0.000661</b>	<b>0.015</b>
<b>D7S0133i</b>	7q11.22	0.183	0.113	<b>0.000845</b>	<b>0.014</b>
D9S0793i	9q31.2	0.067	0.038	0.061	0.478
D10S0554i	10p15.1	0.057	0.093	0.028	0.084
D11S4179	11q13.5	0.274	0.214	0.018	0.044
<b>D15S0154i</b>	15q22.22	0.216	0.324	<b>0.0000571</b>	<b>0.002</b>

\* Significant allele shows the size of the amplicon.

5つの関連が示唆されたマーカーに近接する遺伝子の候補として *SSX2IP* 遺伝子、*PLXNA2* 遺伝子、*TARID* 遺伝子、*CALN1* 遺伝子、*RORA* 遺伝子が挙げられる。そのうちイントロンに存在していた遺伝子はそれぞれ D1S1358i-*PLXNA2* 遺伝子、D6S0827i-*TARID* 遺伝子、D7S0133i-*CALN1* 遺伝子、D15S0154i-*RORA* 遺伝子であり、D1S0411i は *SSX2IP* 遺伝子の約23kb上流に存在していた。

MS Markers	Cytobands	Physical position of amplicon*		Nearest gene
		From	To	
D1S0411i	1p22.3	85179329	85179616	<i>SSX2IP</i>
D1S1358i	1q32.2	208365606	208365706	<i>PLXNA2</i>
D6S0827i	6q23.2	134200095	134200334	<i>TARID</i>
D7S0133i	7q11.22	71153774	71154076	<i>CALN1</i>
D15S0154i	15q22.22	59297551	59297816	<i>RORA</i>

\* Physical position of amplicon and gene location refer to the GRCh build 38/hg38

*PLXNA2* 遺伝子はセマフォリンの共受容体をコードする遺伝子でセマフォリン 3A は骨代謝への関係が報告されており、*SSX2IP* 遺伝子は滑膜肉腫と関係する遺伝子である。下顎の成長にも滑膜が存在する顎関節が関係しており、何らかの関係が推測される。*RORA* 遺伝子は骨基質成分を直接調整することが示唆されており骨代謝に関与している。また、

*TARID* 遺伝子はがん抑制遺伝子、*CALN1* 遺伝子は精神分裂病の原因遺伝子として報告されており、骨格性下顎前突症との関連性については今後の検討が必要である。

結論として、5つの遺伝子座 (1p32.2, 1p22.3, 6q23.2, 7q11.22, 15q22.22) が骨格性下顎前突症の新規感受性領域として示唆された。そして 1p22.3 は過去の連鎖解析の結果と同じ領域であった。

## 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0件)

[学会発表](計2件)

KAJII Takashi, IKUNO Keiichirob, OKA Akira, SAITO Fumio, IIDA Junichiro, ISHIKAWA Hiroyuki : GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY FOR MANDIBULAR PROGNATHISM USING MICROSATELLITE, 8<sup>th</sup> International Orthodontic Congress, 2015.9.27-2015.9.30, ExCeL London (UK)

生野啓一郎、梶井貴史、岡晃、斉藤文男、猪子英俊、石川博之、飯田順一郎：日本人集団を用いた骨格性下顎前突症のゲノムワイド関連解析、第72回日本矯正歯科学会大会、学展-290、2013年10月7日-2013年10月9日、キッセイ文化ホール(長野県)

[その他]

ホームページ等  
 北海道大学大学院歯学研究科口腔機能学講座歯科矯正学教室ホームページ  
<http://www.den.hokudai.ac.jp/orthodontics/research/ken02/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

斉藤 文男 (SAITO FUMIO)  
 北海道大学・北海道大学病院・助教  
 研究者番号：00612889

(2)研究分担者

なし