

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861757

研究課題名(和文) 国際共同研究による日本人とベトナム人口唇口蓋裂責任遺伝子の同定と多人種比較研究

研究課題名(英文) Candidate gene study of cleft lip and/or cleft palate in Japan and Vietnam by international collaboration.

研究代表者

鈴木 聡 (SUZUKI, SATOSHI)

愛知学院大学・歯学部・非常勤助教

研究者番号：30468996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：口唇口蓋裂は外表先天異常の中で最も高頻度で現れる多因子遺伝疾患であり、以前より数多くの原因遺伝子が報告されてきた。今回の研究によって、ベトナム人口唇口蓋裂においては、IRF6遺伝子マーカーに強い統計学的有意差が認められた。そして微弱ながらもFOXE1 遺伝子とMAFB遺伝子にも単純なTDT解析においては有意差を認めた。しかしながら、日本人口唇口蓋裂においてはVAX1遺伝子のみ有意差が認められ、同じアジア人種においても原因と推定される遺伝子が異なることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Genome wide association studies of non-syndromic cleft lip and/or cleft palate have been identified multiple genetic loci including MAFB, VAX1, PAX7, FOXE1 and ABCA4. We used independent 404 case-parents trios from Vietnam which were cleft lip only (CLO;104 trios), cleft lip and palate (CLP;135 trios) and cleft palate only (CPO;165 trios) were genotyped by either TaqMan assays or Fluidigm. Transmission disequilibrium test was performed by Family based Association Test and PLINK. Statistically significant associations were observed in genes including IRF6, FOXE1 and MAFB. Regarding CL/P, There were associations with IRF6 (rs2235371, $p=6.80E-06$ and rs2013162 $p=0.03486$) and MAFB (rs17820943, $p=0.002266$, rs13041247 and rs11696257, $p=0.001862$). Also FOXE1 (rs894673 and rs3758249, $p=0.02$) was slightly associated with CL/P. However, after Bonferroni correction, only IRF6 showed significant association. In Japanese, only VAX1 showed statistical significance (rs7078160, $p=0.00511$)

研究分野：口腔外科学

キーワード：口唇口蓋裂 遺伝学 遺伝子 DNA TDT

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒトゲノム解析研究を含む分子生物学研究が急速に発達し、多くの候補遺伝子が報告されている。口唇口蓋裂は先天異常の中でも最も高い発現頻度で見られる外表奇形であり、全アジア人種においては0.015%の発生頻度である。原因論としては多因子遺伝疾患のモデルが用いられることが多いが、地域または人種により発現頻度が異なることは古くから知られている。現在ではゲノム解析技術の向上、ハイスループットなシーケンサーの登場により遺伝子多型と口唇口蓋裂との関わりが明らかにされつつある。そのなかでも口唇口蓋裂の発現に深く関わっていると考えられる遺伝子の中で、米国 Iowa 大学の Jeffrey.C.Murray らが大規模な国際的な共同研究により VAX1、PAX7、MAFB、FOXE1、IRF6 などが報告されている。

2. 研究の目的

口唇口蓋裂は先天異常の中でも最も高い発現頻度で見られる外表先天異常であり、地域または人種により発現頻度が異なることは古くから知られているが、遺伝学的には共通の原因遺伝子が数多く存在すると考えられている。現在において、

世界中の研究機関から大規模な Genome Wide Association Study (GWAS)研究が報告されているが、未だはっきりとは解明されていない。今回我々はアジア人種であり、日本人と遺伝的に類似点の多いベトナム人の非症候群性の口唇口蓋裂（口蓋裂、口唇口蓋裂、口唇裂）に関連する解析を共同研究として行うことで、施設間での研究解析プロトコル上でのバイアスを回避しながら行うことで、人類共通の原因遺伝子およびベトナム人種特有の原因遺伝子を探索することを目的とした。私は口腔先天異常の遺伝子解析で WHO のこの分野の責任者であった米国 IOWA 大学の Jeffrey.C.Murray 教授ならびに Pittsburgh 大学の Mary L Marazita 教授らと共同研究を行い、多人種間での比較を行うことにより、人類共通の原因遺伝子と人種による原因遺伝子の違いを解明し、人類の口腔先天性疾患の克服のための基礎的研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では倫理委員会の承認を得たのちに、遺伝子試料の収集を開始した。全ての資料については歯科医師みずからの

インフォームドコンセントを行い、研究への同意が得られたもののみを使用している。また、同意の撤回は書面により可能とした。試料は文部科学省ハイテクリサーチ拠点補助金で設置した匿名化システム、大型超低温フリーザー、特注遺伝子試料保管庫に指紋認証システム、自動発電装置保管施設など配した口腔先天疾患関連遺伝子共同研究機構の遺伝子試料保管室（バンキングセンター）にて、患者のプライバシーに十分留意するとともに安全に保管している。海外、今回におけるベトナムからの乾燥血液濾紙については、バクテリアおよび真菌の繁殖を可能な限り抑制するために、湿度管理が可能な施設において保存、使用した。

ヒトゲノム解析研究が急速に進展しており、International Hapmap project はじめ、1000Genome project などインターネットを通じて web サイトからヒト遺伝子情報を獲得する事が出来る。また、今までの米国の Iowa 大学、Pittsburgh 大学等が行った大規模研究の結果およびプロトコルを当施設での遺伝子解析に応用することによって研究主義、解析方法でのバイアスを排除し、原因遺伝子の推定、人種間での比較、未知の原因遺伝子の発

見等が期待できた。

< 実験方法 >

GWAS や家系解析 (TDT) を用いた研究は多く報告され、疾患と特異的に関連のある一塩基多型部位 (SNP) を推定している。共同研究施設である Iowa 大学および Pittsburgh 大学では、フィリピン人、中国人、ヨーロッパ系アメリカ人、アフリカ系アメリカ人、ノルウェー人、デンマーク人、インド人について illumina 社製の Beads array chip を用いた網羅的ゲノム解析を行い、ケースコントロール study と TDT 解析を行った。統計学的な補正は Bonfferoni 法を用いた。ベトナム人については、まず血液サンプルからキアゲン製の抽出キットを用いて DNA を抽出し、Taqman Assay および Fluidigm system を用いてハイスループットに SNP を決定した。SNP マーカーは共同実験施設で得られたデータを基に設定された。また PCR (polymerase chain reaction) を利用した PCR-direct sequence 法により遺伝子及び近傍の塩基配列を解読した。今回の研究で使用したベトナム人 DNA 資料は口唇裂 104 家系、口唇口蓋裂 135 家系、口蓋裂 165 家系である。日本人口唇裂 23 家系、口唇口蓋裂 55 家系、口蓋裂 20

家系である。決定された SNP は FBAT(Family based association) v 1.73 および PLINK v 1.07 を用いた。全てのメンデルアンエラーおよび Genotyping エラーを排除した後に、検定を行い、その後 Bonfferoni の補正を行った。

4 . 研究成果

今回の研究においては、人種間での共通遺伝因子および差異を解析するために全ゲノム解析に注目した。最近の全ゲノム遺伝子解析が米国アイオワ大学 Jeffrey C . Murray 教授および米国ジョンホプキンス大学 Terri Beaty により報告され、アメリカ人、フィリピン人等において MAFB, VAX1、PAX7 等の幾つかの遺伝子座が新たに口唇口蓋裂の候補遺伝子領域として発見された。この度、この結果が関連しているかどうかを確認する為に独立した症例を使用した。使用した SNP マーカーは 22 遺伝子 48 マーカーであった。ベトナム人サンプルを使用した Case-Control Study において有意差が確認できたため、二次解析としてモンゴル人 404 家系を使用した。遺伝子解析においては、MAFB, VAX1、PAX7、FOXE1 遺伝子の近傍もしくは内部に存在する SNP について解析した。連鎖不平衡解析および多型

解析には TDT 解析である FBAT と PLINK を使用した。ベトナム人家系において、いくつかの有意差がみられた。IRF6 (rs2235371、 $p=6.80E-06$ および rs2013162 $p=0.03486$)、MAFB (rs17820943、 $p=0.002266$ 、rs13041247 および rs11696257、 $p=0.001862$)、FOXE1 (rs894673 および rs3758249、 $p=0.02$) これらの事により、IRF6、MAFB、FOXE1 遺伝子多型の直接的もしくは間接的な関与が口唇口蓋裂発生に深く関与していることが示唆された。しかしながら、Bonfferoni 補正では、IRF6 のみが統計学的有意差をみとめた。

日本人家系においても有意差が認められた (VAX1, rs7078160, $p=0.00511$) が、ベトナム人とは異なった結果であった。

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 2 件)

Zhonglin Jia, Elizabeth J. Leslie, Margaret E. Cooper, Azeez Butali, Jennifer Standley, Jennifer Rigdon, Satoshi Suzuki, Ayana Gongorjav, T.Enkhtur Shonkhuuz, Nagato Natsume, Bing Shi, Mry L. Marazita, Jeffrey C. Murray: Replication of 13q31.1

Association in Nonsyndromic Cleft lip with Cleft Palate in Europeans. Am J Med Genet, 167(5): 1054-1060, 2015. (査読あり)

Tomoki Kato, Seiji Mizuno, Kenji Kurosawa, Satoshi Suzuki, Teruyuki Niimi, Nagato Natsume: Jacobsen syndrome associated with cleft lip: A patient report and review. J Oral Maxillofac Surg Med Pathol, 27(2): 236-239, 2015. (査読あり)

[学会発表](計 1件)

S.Suzuki, H.Imura, N.Natsume: The mechanism of cleft palate after palatal fusion. 65th American Society of Human Genetics Annual Meeting(Baltimore), 2015.10.6-10.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 聡 (SUZUKI SATOSHI)

愛知学院大学・歯学部・非常勤助教

研究者番号 : 30468996

(2)研究協力者

夏目 長門 (NATSUME NAGATO)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号 : 90183532

吉浦 孝一郎(YOSHIURA Koh-ichiro)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授

研究者番号 : 00304931