

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06389

研究課題名(和文)顎顔面形成異常にかかわる新規原因遺伝子の探索

研究課題名(英文)Research on new genes contributing to craniofacial development

研究代表者

森田 知里(Morita, Chisato)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：50754727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、顎顔面形成異常に関わる既知や未知の遺伝子変異やSNPsを同定することを目的とし、口唇口蓋裂を有する患者およびその家族においてエクソーム解析を行った。今回、口唇口蓋裂を1家系内で複数名発症している家系を対象に研究協力を行い、同意が得られた3家系について解析を行った。その結果、3家系全てに共通する変異は見られず、口唇口蓋裂において報告されているMSX1、IRF6、TGFB3といった既報遺伝子の変異も検出されなかった。今後、1家系目と2家系目で見られた同一遺伝子の変異についてマウスモデルを作製し、解析を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：A cleft lip and/or palate is the most common craniofacial abnormality, and the frequency is higher in Asian population. The onset of cleft caused by a combination genetic and environmental factors.

In this study, we tried to clarify genetic factors related to craniofacial malformations by exome sequencing. We performed whole-exome sequencing for 7 patients and 2 unaffected in three families with cleft lip and/or palate.

As a result, we couldn't detect no common mutations in all three families, nor the previously reported genetic variants such as MSX1 and TGFB2. However, we found two mutations in the same gene observed in two families (one is novel, and the other is already assigned Reference SNP ID). We are going to create transgenic mice with novel mutation in order to investigate the roles of this mutation.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：遺伝学 先天異常 歯科矯正学

1. 研究開始当初の背景

顎顔面口腔領域の形態異常を有する患者では、臨床症状から症候群が診断され、原因遺伝子の変異や発現様式が同定されていないことが多い。また、形態異常に伴い、上下顎骨が不調和となり、永久歯萌出異常による歯列不正が併発することで、その改善には矯正治療が必要となる。

近年、次世代ゲノムシーケンサーの技術進歩・普及に伴い、ヒトのゲノム単位での遺伝子解析が容易となり、単一遺伝子疾患だけでなく多因子疾患へのアプローチが可能となった。全ゲノム解析より低コストのエクソーム解析と呼ばれる新たな手法が確立し、あらゆる分野で遺伝子病の原因遺伝子の解析が進んでいる。歯科領域でも、口唇口蓋裂や同一家族内に発症する確率の高い早期発症型歯周炎の報告がある。

先天性の顎顔面口腔領域の形態異常や咬合異常を有するヒトで認められる遺伝子異常については未解明な部分が多く、顎顔面口腔領域の形態異常や咬合異常における遺伝子の異常同定は関連遺伝子との相互ネットワークや発症機構の解明へとつながり、非常に高い意義をもつと考えられる。遺伝子異常が形態に寄与する影響については未解明であり、これを明らかにすることで、臨床において、遺伝子発現に基づく根本的でより有効な治療法が選別できる可能性が期待される。

2. 研究の目的

口蓋裂をはじめとする先天性の顎顔面奇形は顎顔面骨格の発育異常や永久歯萌出異常による歯列不正が併発することで、咀嚼・発音等の口腔機能障害と顔貌の審美障害をきたし、治療において矯正歯科治療は中心的役割を担う分野である。

本研究では、顎顔面口腔領域に形態異常をきたす先天性疾患を有する患者において、患

者とその家族の遺伝子解析を行う。同一家系内あるいは近親の非罹患者との比較を行うことで、より効率的に遺伝子変異や未知のSNPsを同定し、口腔顔面領域の発生、発育に関わる新規遺伝子、遺伝子間のシグナルを探索し、データベースの構築と新たな分子診断法の確立を図る(図1)。

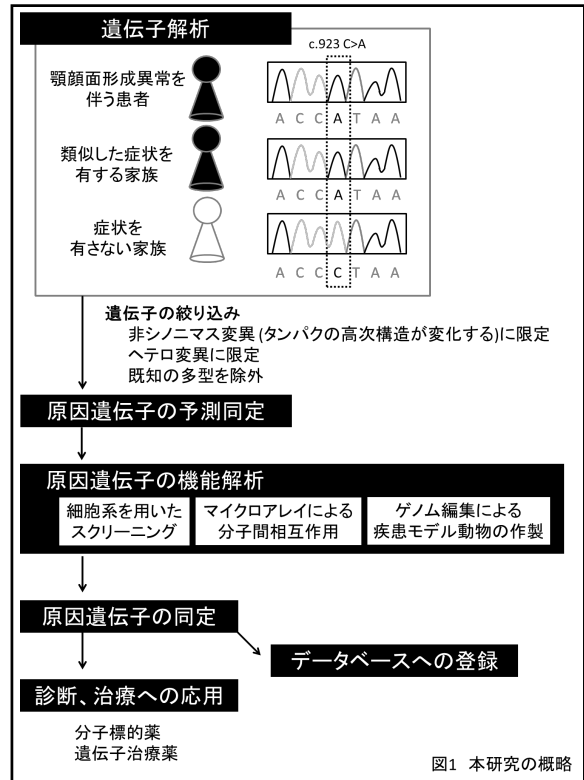


図1 本研究の概略

3. 研究の方法

対象者の選定

口唇口蓋裂を1家系内で複数発症している家系のうち、本研究への参加に同意が得られた3家系9名を対象として、ゲノムDNA採取を目的とした採血を行った(ヒトゲノム研究承認番号597)。

なお、解析対象者は原則として罹患者数名と同一家系内の非罹患者を含む形で協力を依頼した。対象群とするリファレンス配列には日本人のゲノム情報データベース(HGVD)を用いた。

各解析の対象者は以下の通りである(図2)。解析1 罹患者3名(両側性唇顎裂1名、両側性唇顎口蓋裂2名)、非罹患者1名

解析2 罹患者2名(口蓋裂2名)

解析3 罹患者2名(片側性唇顎裂1名、裂型詳細不明1名)、非罹患者1名

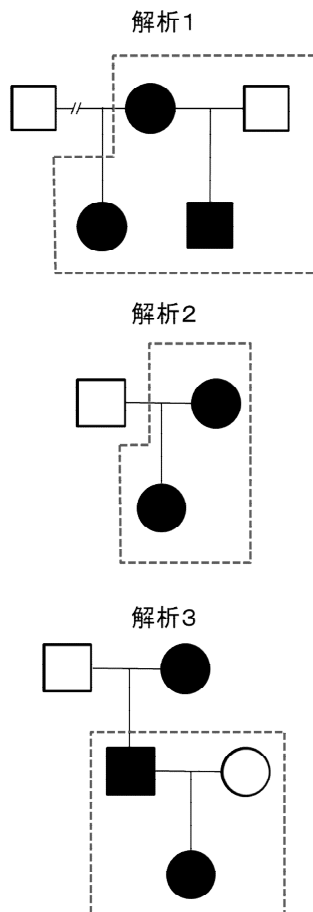


図2 被験者の家系図
点線枠内が解析対象

DNA 抽出

血液からのDNA抽出はNucleoSpin® Blood L (タカラバイオ株式会社、草津市)を用いて行った。精製DNAの純度はNanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific社、横浜市)を用いて OD_{260}/OD_{280} 値が1.6以上であることにより確認した。

エクソーム解析

サンプルを全て匿名化した上で、エクソーム解析をタカラバイオ株式会社に委託した。得られたFASTQファイルの参照配列へのマッピングやVCFファイルの作成(図3)は本学医学研究科ゲノム情報共同研究講座に依頼した。

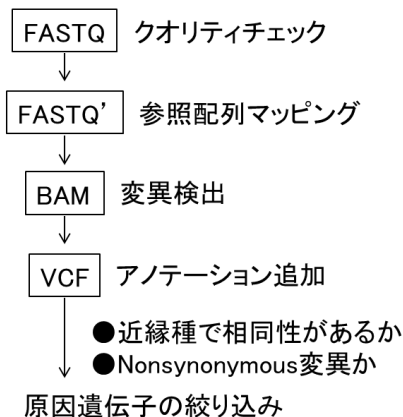


図3 解析パイプライン

4. 研究成果

今回、解析対象とした口唇口蓋裂では発症に遺伝的要因と環境要因が寄与することが知られている。しかし、口唇口蓋裂の発症頻度はアジア人において500~600人に1人(0.1~0.2%)であり、白人より高頻度である。これまで口唇口蓋裂の発症に寄与する候補遺伝子としてMSX1、IRF6、TGFB2、TGFB3、F13A1が報告されている。

本研究では3家系9名について解析を行った。その結果、解析対象者1名あたり約100,000個のSNV (single nucleotide variation)が検出された。

MAF(minor allele frequency) < 0.001として絞り込んだところ、罹患者のみに共通するSNVとして解析1では86個、解析2では155個、解析3では118個検出された。この中に、これまで口唇口蓋裂に関することが示唆されているMSX1、IRF6、TGFB3といった既報遺伝子の変異は検出されなかった。

また、MAF < 0.1でも3解析全てで共通するSNVはなかったが、解析1, 2間で同一遺伝子内の2変異が検出された(rs778065501と新規SNV)。これらのSNVが検出された部位は3塩基しか離れておらず、非常に近接していた。

今後、この新規SNVについてマウスモデルを作製し、解析を行う予定である。

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 2 件)

(1) Morita C, Tome W, Kurosaka H, Hosokawa K, Yamashiro T : Craniofacial manifestations of Loeyes Dietz syndrome: A case report and a review of the literature. 阪大歯学雑誌 60(1), 31-37.

(2) 伊藤慎将、竹内優斗、森田知里、吉川浩史、黒坂 寛、山城 隆 : 当科における歯科矯正用アンカースクリュー植立成功率に関する研究 近東矯歯誌 51: 25, 2016.

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 森田知里、岡 綾香、社浩太郎、谷川千尋、山城 隆 : タングクリブ、インプラントアンカーおよび筋機能療法を用いて非抜歯にて治療した成人開咬症例 第 122 回 大阪大学歯学会例会、2016 年 7 月 14 日、大阪

(2) Sarper Safiye、三浦治郎、山口 哲、今里 聡、森田知里、山城 隆 : 歯のエナメル上皮における RUNX1 と CBFB は、マウスのエナメル質形成のため重要です 第 58 回 歯科基礎医学会学術大会、2016 年 8 月 25 日、北海道

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 知里 (MORITA, Chisato)

大阪大学歯学部附属病院 矯正科 医員

研究者番号 : 50754727