

機関番号：33902

研究種目：基盤研究 A

研究期間：2007～2010

課題番号：19209062

研究課題名（和文） 口腔先天異常疾患関連遺伝子解析研究

研究課題名（英文） Study concerning analysis of genes causing oral congenital anomalies

研究代表者

夏目 長門 (NATSUME NAGATO)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：90183532

研究成果の概要（和文）：

口腔先天異常疾患は、最も頻度の高い口唇口蓋裂においてもその頻度は0.015%であり、ましてや症候群の場合、一国のみで遺伝子解析を行うことは困難である。そこで本研究では可及的に多くの国々から多数の口腔先天異常の関連遺伝子を収集してバンキングを行い、研究者に提供するシステムの研究開発を行い、以下の成果を得た。

- ・海外での収集サンプル数：7057例

(ベトナム人：4290例、モンゴル人：1999例、ミャンマー人：580例、メキシコ人：30例、ラオス人：158例)

- ・日本人遺伝子サンプル数：1717例

研究成果の概要（英文）：

The incidences of congenital oral anomalies are not so high that even the incidence of cleft lip/palate that is the highest among the congenital oral anomalies is only 0.015%, let alone the incidence of a syndrome of congenital oral anomalies. Therefore, it is difficult to collect samples of a syndrome of congenital oral anomalies from one country alone and genetically analyze them. This study developed a system to collect many genes relating to congenital oral anomalies from as many countries as possible and bank them to provide researchers with those samples.

The results are:

The number of samples collected from foreign people: 7057

(Vietnamese: 4290, Mongol: 1999, Myanmar: 580, Mexican: 30, Laotian: 158)

The number of samples collected from Japanese: 1717

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2008年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
総計	22,900,000	6,870,000	29,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：先天異常、口唇裂、口蓋裂、遺伝子解析、バンキング

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 全国的な口腔先天異常疾患に関する共同研究機構は、我が国初のものであり、国外においてもこのような多数の機関が共同した口唇口蓋裂関係の研究組織は存在しない。

(2) 我々は既に米国アイオワ大学の Jeffrey C. Murray 教授と15年以上に渡り、大学間共同研究としてバンキングを行っており、口唇口蓋裂に関してはすでに我が国最大の遺伝子試料を有する。これを本研究申請にて世界最大を目指したいと考えていた。

(3) 本研究組織は口腔外科のみでなく、遺伝子解析の専門家、産婦人科、人権問題のエキスパートなどと協力して、集学的に研究を行う体制をとっており、いくつかの候補遺伝子と本症の関連の有無が確認される可能性が高い。

(4) 口腔外科領域において1つの施設のみでは限界があり、口腔領域の稀な症候群などの解析のためには、本申請により我が国のみでなくアジアを中心とした海外の口腔外科施設とも協力して早期に研究を開始する必要がある。

(5) 海外医療援助(口唇口蓋裂無償手術ならび技術移転)を通じて、共同研究を行う各国の政府ならびに施設、患者との良好な関係が10~15年以上にわたり構築されている。

(6) 口腔領域にはさまざまな先天性疾患があり、今までは原因不明とされていたこれらの疾患に対して、近年分子生物学研究の発達によりいくつかの候補遺伝子が報告され、また症候群についての遺伝子解析もはじまっている。しかし、最も高頻度で発現するといわれる口唇・口蓋裂でさえ、候補遺伝子として TGFA、TGFB3、MSX1 等が報告されているものの、人種による差もあり、解明には至っていない。

(7) 国内外で遺伝子解析は多数行われているが、我々の研究グループは口唇口蓋裂候補遺伝子(N Engl J Med. 2004)のみでなく、Van der Woude 症候群(Nature Genetics, 2002)を解明するとともに、日本人で初めて基底細胞母斑症候群(Matsuzawa N, Yoshiura K, Machida J, Nakamura T, Niimi T, Furukawa H, Toyoda T, Natsume N, Shimozato K, Niikawa N. Two missense mutations in the IRF6 gene in two Japanese families with Van der Woude syndrome. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 98(4): 414-417, 2004.)

の遺伝子を解析した。

(8) 我々は、特定領域研究「口唇・口蓋裂の発生抑制遺伝子の解析」、「顔面奇形の発生抑制遺伝子の解析」、「ゲノム病としての口唇裂、口蓋裂」の研究分析を分担しており、ポストゲノムの班において、本邦の口唇口蓋裂遺伝子解析の代表研究グループとして位置付けられている。

9) 口腔外科を中心とし、遺伝学、産科、さらに倫理の専門家も含めたこのような大規模な組織は、我々が知る限り国内外においても存在しない。

このようなことを背景に研究を実施した。

## 2. 研究の目的

近年分子生物学研究の発達によりいくつかの候補遺伝子が報告されている。しかし、最も高頻度の口唇口蓋裂でもその頻度は0.015%であり、ましてや症候群の場合、症例数が少ないため1施設でこれを行うことは困難である。我々は疫学的研究、疾患モデル動物の開発や成因に関する基礎的研究を行っており、最近15年間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るアイオワ大学小児遺伝学 Jeffrey Murray 教授と共同で研究を行っており、文部科学省一般研究総合研究A(2回)、基盤研究Aを通じて、本センターが研究代表施設として口腔外科学のみでなく、産婦人科学の専門家との共同研究を行う体制をとっている。

本研究では平成14年度科学研究費、基盤研究(C)企画調査費を得て、我が国唯一の口腔先天異常疾患関連遺伝子共同研究機構、いわゆる「Cleft Gene Bank」として企画し、これが平成15年度ハイテクリサーチ拠点に選定され、遺伝子バンキングならび分析システムを設置した。平成16年度より基盤研究(A)の研究費を得て、全国的に運営する体制を構築することにより、我が国の口腔領域の遺伝情報を匿名化し安全かつ正確に情報を保存するとともに、我が国最大となる6,900例に及ぶ遺伝子資料をもとに遺伝子の解析を開始し、その成果を

Nature Genetics(Yoshiura K, Natsume N, (他37名, 26番目): A SNP in the ABCC11 gene is the determinant of human earwax type. Nature Genetics.38(3):324-330,2006.), New England Journal and Medicine(Zuccherro TM, Natsume N, Murray JC. Interferon regulatory factor 6

(IRF6) is a modifier for isolated cleft lip and palate. *N Engl J Med.* 351(8):769-80. 2004)等に報告してきた。平成19年よりはこれをさらにアジアを中心とした海外の施設とも協力して口唇口蓋裂ならびに口唇口蓋裂関連症候群の各種口腔先天異常症候群について、共同研究者が協力して病因を解析することにより、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ていた。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究の協力施設(国内27、海外5)と共に各施設の倫理委員会の承認を得た上で、遺伝子試料の収集を開始する。得られた試料は、これまでの本研究成果として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を配した口腔先天異常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する。

(2) 共同研究者である Jeffrey Murray らにより、Van der Woude 症候群の候補遺伝子 IRF6 が、*Nature Genetics* (32:285-289, 2002)にて報告したが、本研究においては、同遺伝子の V274I を中心として日本人口唇口蓋裂患者を中心に遺伝子解析を行い、口唇口蓋裂患者における IRF6 の関連を日米両国で同時に研究する。

(3) すでにバンキングされている試料より DNA を抽出、CA 配列などを利用してプライマーを設計し、PCRにて増幅したものを電気泳動後、銀染色法によりバンドの検出を行う。それぞれの解析対象遺伝子に関して Direct Sequence 法及び、RFLP(restriction fragment length polymorphism) や VNTR(variable number of tandem repeats)あるいは CA リピートを利用した多型性の検定、ならびに連鎖分析を行い、患者の性別、披裂の程度などを分類した上での本症との関連を検討する。

### 4. 研究成果

(1) 平成19年10月1日に、愛知県にて班会議を実施した。

(2) これまでに倫理委員会への申請を行い得なかった研究分担施設においては、準備を進め申請を行い、可及的に各施設での承認を得た。

(3) 国内においては、初年度に研究分担者と打ち合わせ会議を行い確認した研究実施方法に従い、研究分担施設へ血液採取ならびデータ入力のための物品を送付し、患者とそ

の家族の他、コントロール群の遺伝子試料を収集した。

(4) 海外においては、既に協力関係にある国においては継続して遺伝子試料の提供を受け得るようにするため、また新たに協力関係を築く国に関しては、交渉を行った(ベトナム、ラオス、インドネシア、モンゴル、ブラジル、ミャンマー、メキシコ、エチオピア)。現地の協力者への説明を行い、血液採取用濾紙やシリンジ等の必要な消耗品を送付するとともに、遺伝子試料を入手した。エチオピアにおいては、交渉を行ったが今回はサンプル入手には至らなかった。

(5) 国内外で得られた試料は、本学の口腔先天異常疾患関連遺伝子共同研究機構の口腔疾患関連遺伝子バンキングルームにて、患者や家族などのサンプル提供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た。これまでの海外での収集サンプル数は、ベトナム人: 4290例、モンゴル人: 1999例、ミャンマー人: 580例、メキシコ人: 30例、ラオス人: 158例、日本人のサンプル数は、1717例となった。

(6) これまでにバンキングされ、遺伝子解析に使用している日本人に加えベトナム人、モンゴル人試料についても本格的に DNA 抽出を行った。遺伝子解析を行い、口唇・口蓋裂との関連性について、検討を行った。

(7) 日本人多発家系の非症候群性の口唇・口蓋裂、約80症例について遺伝子多型の解析を実施した。

(8) ベトナム人の孤発家系の非症候群性本症患者331症例、父親171例、母親191例と、問診により3世代にわたり本症の家族歴を有しない210例を対照群における、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素(MTHFR)の遺伝子の、C677T多型のアレル頻度と本症との関連を検討した。口蓋裂患者の母親ではTアレルが有意に少ない( $p=0.04$ )との結果が得られた。母体環境中の葉酸の作用につき、さらなる検討を要する。

(9) モンゴル人患者ならびにその両親と、対照群における MTHFR の A1298C 多型の解析から、口唇裂と口唇口蓋裂に関しては本症との関連は認められなかったが、口蓋裂に関して母親と女性コントロール群の間に有意差が検出され、口蓋裂との関与が示唆された。

(10) また、本研究において収集したモンゴル人174家系のサンプルを使用し

た他の成果として、AP-2a 遺伝子の内部もしくは近傍に存在する7つの SNP を、他人種の試料とともに、口唇口蓋裂患者および両親について、TaqMan 法にて genotyping し TDT 解析を行った結果、有意差が認められ、この遺伝子の本症への関与が示唆された。

(11) 本研究においては上記の如く、多数の遺伝子サンプルを入手することが出来、これを多くの研究者に提供することにより口腔先天異常疾患関連遺伝子解析研究を飛躍的に進めることが可能であると考えられる。

(12) 本研究の成果をもとに、愛知学院大学口唇口蓋裂センターにおいて口唇口蓋裂、先天異常患者本人ならびに家族に対し遺伝カウンセリングを行い、また希望の患者には名古屋大学医学部と協力して MTHFR の分析を行い、研究成果を臨床に応用しており、その成果を学会発表した。

#### 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6件)

- ① TOMOKI KATO, Nagato Natsume, Milk prevents cleft palate in A/J mice, The Cleft Palate-Craniofacial Journal, 2010, In press 査読有
- ② 加藤大貴, 夏目長門, 口唇形成術後に認められた頬皮野嚢胞および頬表皮嚢胞に関する検討, 日本口蓋裂学会雑誌, 36(1), 2010, In press 査読有
- ③ Takahiro Goto, Keiichi Arakaki, Nagato Natsume, Hajime Sunakawa, Association study of folate pathway gene polymorphisms and nonsyndromic cleft lip with/without cleft palate in a Japanese population, Ryukyu Med. J. 28(3,4), 2009, 13-21 査読有
- ④ 後藤尊広, 新垣敬一, 國仲梨香, 石川拓, 仲間錠嗣, 夏目長門, 大関悟, 砂川元, ミャンマー人における口唇口蓋裂発症と MTHFR 遺伝子 C677T 多型の関連に対する検討, 琉球医学会誌, 28 巻 1-2, 2009, 25-29 査読有

- ⑤ Lkhagva-OchirErkhambaatar, Tserenkhand Tsooj, Yoshida Waka, Goto Takahiro, Niimi Teruyuki, Furukawa Hiroo, Fujiwara Kumiko, Tumendemberel Ochirbat, Minami Katsuhiro, Suzuki Satoshi, Koshiji Chikako, Ariuntuul Garidhuu, Erkhambaatar Tudevdorj, Natsume Nagato, A RELATIONSHIP BETWEEN NONSYNDROMIC CLEFT LIP OR CLEFT LIP AND PALATE AND METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE (MTHFR) GENE A1298C POLYMORPHISMS IN MONGOLIAN, Aichi-Gakuin Dental Science, 22, 19-24, 2009 査読有

- ⑥ Tserenkhand Tsooj, Lkhagva-OchirErkhambaatar, Yoshida Waka, Ariuntuul Garidkhuu, Lkhagvasuren Tserenkhuu, Erkhambaatar Tudevdorj, Furukawa Hiroo, Fujiwara Kumiko, Niimi Teruyuki, Minami Katsuhiro, Suzuki Satoshi, Goto Takahiro, Koshiji Chikako, Maeda Hatsuhiko, Natsume Nagato, MATERNAL A1298C POLYMORPHISM OF THE 5,10-METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE IS ASSOCIATED TO OCCURRENCE OF CLEFT PALATE ONLY IN MONGOLIANS, Aichi-Gakuin Dental Science, 22, 25-33, 2009 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 後藤尊広, 新垣敬一, 仲間錠嗣, 石川拓, 天願俊泉, 古川博雄, 南克浩, 新美照幸, 鈴木聡, 藤原久美子, 吉田和加, 越路千佳子, 夏目長門, 砂川元, 日本人非症候群性口唇口蓋裂の発症と葉酸代謝酵素遺伝子多型における関連解析, 第34回日本口蓋裂学会学術集会, 2010.5.27, 東京
- ② 藤原久美子, 山本正彦, 種村道代, 鈴木聡, 古川博雄, 夏目長門, 口唇口蓋裂患者とその家族に対する遺伝カウンセリングの現状第2報クライアントの特長について, 第53回日本口腔科学会中部地方部会, 2010.10, 富山
- ③ Natsume N, Takato T, Noguchi M, Sugiyama Y, Echigo S, Uchiyama T, Omura K, Kubota E, Sakashita H, Imai Y, Kurita K, Yamamoto M, Kogo M, Mori Y, Sugihara K, Nakamura N, Ozeki S, Takahashi T, Yanagisawa S, Goto M,

Ikenoue T, Yoshiura K, Sunakawa H, Suzuki S, Yoshida W, Hayakawa T, CLEFT LIP AND/OR PALATE CONGENITAL ORAL DISEASE GENE BANK, 2009, The 11th International Congress on Cleft Lip and Palate and Related Craniofacial Anomalies, September 10th to 13th 2009, Fortaleza, Brazil

- ④ Natsume N, Imai Y, Koshiji C, Senda A, Maeda H, Otsuka T, Numabe H, Yoshida W, Od B, Bulgan B, Azzaya U, Ariuntuul G, Erkhembaatar T, CLEFT LIP AND PALATE SURVEILLANCE AT THE CENTER FOR MONITORING OF CONGENITAL ABNORMALITIES IN MONGOLIA, The 67th Annual Meeting of the American Cleft Palate-Craniofacial Association, 3/20/2010, Fort Worth, USA
- ⑤ 夏目長門, 鈴木聡, 古川博雄, 新美照幸, 南克浩, 藤原久美子, 山本正彦, 口腔先天異常遺伝カウンセリング, 第20回日本小児口腔外科学会, 平成20年9月19日, 川越

[その他]

ホームページ等

[http://www.aichi-gakuin.ac.jp/~cong\\_ano/](http://www.aichi-gakuin.ac.jp/~cong_ano/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

夏目 長門 (NATSUME NAGATO)  
愛知学院大学・歯学部・教授  
研究者番号：90183532

### (2) 連携研究者

久保田 英朗 (KUBOTA EIRO)  
神奈川歯科大学・医学部・教授  
研究者番号：50170030

福嶋 義光 (FUKUSHIMA YOSHIMITSU)  
信州大学・医学部・教授  
研究者番号：70273084

吉浦 孝一郎 (YOSHIURA KOICHIRO)

長崎大学・医歯（薬）学総合研究科・教授  
研究者番号：00304931

新川 詔夫 (NIIKAWA NORIO)  
北海道医療大学・個体差健康科学研究所・教授  
研究者番号：00111170

平原 史樹 (HIRAHARA FUMIKI)  
横浜市立大学・医学部・教授  
研究者番号：30201734

野口 誠 (NOGUCHI MAKOTO)  
富山大学・医学部・教授  
研究者番号：50208328

遠藤 俊明 (ENDO TOSHIAKI)  
札幌医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：90213595

高戸 毅 (TAKATO TSUYOSHI)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：90171454

戸塚 靖則 (TOTSUKA YASUNORI)  
北海道大学・歯学研究科（研究院）・教授  
研究者番号：00109456

杉山 芳樹 (SUGIYAMA YOSHIKI)  
岩手医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00162909

福島 明宗 (FUKUSHIMA AKIMUNE)  
岩手医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：20208937

越後 成志 (ECHIGO SEISHI)  
東北大学・歯学研究科（研究院）・教授  
研究者番号：70005114

福田 雅幸 (FUKUDA MASAYUKI)  
秋田大学・医学部・准教授  
研究者番号：20272049

内山 健志 (UCHIYAMA TAKESHI)  
東京歯科大学・医学部・教授  
研究者番号：40085874

小村 健 (KOMURA KEN)  
東京医科歯科大学・医歯（薬）学総合研究科・教授  
研究者番号：10334434

麻野 和宏 (ASANO KAZUHIRO)  
獨協医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70296135

栗田 賢一 (KURITA KENICHI)  
愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：40133483

高松 潔 (TAKAMATSU KIYOSHI)  
東京歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：30206875

坂下 英明 (SAKASHITA HIDEAKI)  
明海大学・歯学部・教授  
研究者番号：10178551

山本 正彦 (YAMAMOTO MASAHIKO)  
愛知学院大学・心身科学部・教授  
研究者番号：40378039

古郷 幹彦  
大阪大学・歯学研究科 (研究院)・教授  
研究者番号：20205371

成相 義樹 (NARIAI YOSHIKI)  
島根大学・医学部・講師  
研究者番号：60333465

森 悦秀 (MORI YOSHIHIDE)  
九州大学・歯学研究科 (研究院)・教授  
研究者番号：00231639

杉原 一正 (SUGIHARA KAZUMASA)  
鹿児島大学・医歯 (薬) 学総合研究科・教授  
研究者番号：00117516

中村 典史 (NAKAMURA NORIFUMI)  
鹿児島大学・医歯 (薬) 学総合研究科・教授  
研究者番号：60217875

後藤 昌昭 (GOTO MASAOKI)  
佐賀大学・医学部・教授  
研究者番号：10145211

池ノ上 克 (IKENOUE TSUYOMU)  
宮崎大学・医学部・教授  
研究者番号：60232211

大関 悟 (OZEKI SATORU)  
福岡歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：80117077

高橋 哲 (TAKAHASHI TETSU)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：60226850

砂川 元 (SUNAKAWA HAJIME)  
琉球大学・医学部・教授  
研究者番号：30112452

飯田 征二 (IIDA SEIJI)  
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：40283791

上妻 志郎 (KOUTSUMA SHIRO)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：10272569  
(H21年度まで連携研究者)

亀山 洋一郎 (KAMEYAMA YOICHIRO)  
愛知学院大学・歯学部・名誉教授  
研究者番号：70113066

井上 誠 (INOUE MAKOTO)  
愛知学院大学・薬学部・教授  
研究者番号：50191888

古川 博雄 (FURUKAWA HIROO)  
愛知学院大学・心身科学部・准教授  
研究者番号：70291763

南 克浩 (MINAMI KATSUHIRO)  
愛知学院大学・歯学部・講師  
研究者番号：70346162

新美 照幸 (NIIMI TETUYUKI)  
愛知学院大学・歯学部・講師  
研究者番号：60291762

(3) 研究協力者  
前田 初彦 (MAEDA HATSUHIKO)  
愛知学院大学・歯学部・教授  
研究者番号：30175591

吉田 和加 (YOSHIDA WAKA)  
愛知学院大学・歯学部・助教  
研究者番号：10513210

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

藤原 久美子 (FUJIWARA KUMIKO)  
愛知学院大学・歯学部・講師  
研究者番号：60404737