

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19791561  
 研究課題名 (和文) pooled DNA タイピングを用いた骨格性下顎前突症の疾患感受性遺伝子の同定  
 研究課題名 (英文) A genome-wide association study of mandibular prognathism using pooled DNA typing  
 研究代表者  
 梶井 貴史 (KAJII TAKASHI)  
 北海道大学・大学院歯学研究科・助教  
 研究者番号：60322822

研究成果の概要 (和文)：非血縁患者 (骨格性下顎前突症) 集団のヒトゲノム DNA を 140 名分合わせた pooled DNA と、非血縁健常者集団の 180 名分のヒトゲノム DNA による pooled DNA とを試料として、既に設定済みの全ゲノムを約 100 kb の間隔で網羅する多型マイクロサテライトマーカーを用いて、非血縁患者集団と非血縁健常者集団による相関解析を補正なしでまず開始した (一次スクリーニング)。その結果、総数で約 30,000 個あるマーカーから、約 750 個の陽性マーカーまで、疾患遺伝子領域を絞ることができた。

研究成果の概要 (英文)：The pooled DNA of 140 of mandibular prognathism (case) group and that of 180 of healthy (control) group were prepared. We conducted a genome-wide association study of mandibular prognathism using micro-satellite markers and the pooled DNA. The first screening of genome-wide association study focused 750 of loci associated with mandibular prognathism from 30,000 of total loci.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 700,000   | 0       | 700,000   |
| 2008年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2009年度 | 600,000   | 180,000 | 780,000   |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 2,400,000 | 510,000 | 2,910,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：歯科矯正学、基礎ゲノム科学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 不正咬合の大多数は、比較的高い割合で親から子に受け継がれる、多遺伝子的要因や

環境的要因による多因子性疾患であることは周知の事実である。しかし、その原因遺伝子は今まで全く不明である。国内・外を問わず、全人類に対して不正咬合者の割合は比較

的多く、50%以上にも及ぶ。しかし、地域、人種、民族別で不正咬合の内訳の割合は異なり、そのうち骨格性下顎前突症（反対咬合、受け口とも呼ばれる）は、日本人を含むモンゴロイドでの出現頻度が圧倒的に高い疾患である。

(2) 頭蓋顎顔面領域における疾患感受性遺伝子の特定に関する報告は、先天異常を伴わないものでは、今の所、国内外で、Vastardisらにおける歯の先天性欠如に関する論文らわずかである。下顎前突症に関しては、疾患感受性遺伝子は未だ特定されておらず、その存在が示唆される染色体部位についても、Yamaguchiらの連鎖解析の報告があるのみである。

(3) 一方、研究代表者である梶井は、平成14-16年度科学研究費若手Bの補助を受け、咬合に關与する可能性のある遺伝子変異マウスを用いた研究も行ってきた。さらに、研究協力先である東海大学医学部基礎医学系分子生命科学第2教室の手法であるゲノムワイドな遺伝的相関解析を行うことは、既に可能であった。これらより、本研究の着想に至った次第である。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目標は、骨格性下顎前突症の疾患感受性遺伝子を特定することである。その特定方法を薬品キット化して10歳前後の骨格性下顎前突症患者で感受性遺伝子を調べることにより、将来外科手術を併用して治さざるを得ないか、もしくは成長期に成長のコントロールを行うことにより外科手術を回避できるかどうかを確定診断できることが予想される。これは、矯正歯科治療において革命的なことであり、不必要な成長のコントロールや外科手術を回避することを可能にし、国民の健康増進と不必要な治療費の抑制に寄与する。

さらに最終的な目標は、骨格性下顎前突症の疾患感受性遺伝子を特定し、その結果を臨床に応用し、歯科矯正装置や外科的矯正歯科治療を用いずに骨格性下顎前突症の予防、治療を可能にすることである。

しかし、骨格性下顎前突症は多因子遺伝疾患であることが強く示唆されており、この最終的な目的を本研究期間内に明らかにすることは困難である。

(2) そこで、骨格性下顎前突症の患者よりゲノムDNAを調製し、下顎前突症の原因遺伝子が全ゲノム領域のどの位置に座している

かを明らかにすることまでを、本研究期間内の研究目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) モデル動物による発症原因確認

患者からサンプルを収集する前に、遺伝的要因と環境的要因の比重について検討する。具体的には、下顎前突症を自然発症するBALB/c-bm/bmマウス（先天的に軟骨のグリコサミノグリカンが低硫酸化している）をモデル動物として用いて、この動物が不正咬合を発症した後に動物の切歯を適度な長さに切断して、不正咬合の重篤度が変化するかを観察する。

(2) サンプル収集

北海道大学病院を受診した外科手術を伴う骨格性下顎前突症患者のうち、ゲノム倫理委員会の承認のもとに同意・承諾を文書で得られた者より、血液一般検査時に血液（8.5 ml）を採取し、DNA抽出キット（QIAGEN社）を用いてヒトゲノムDNAを調製する。下顎前突症の治療年齢は通常青年期であり、親のサンプルを比較的収集しやすい。これより同時に患者の親のうち同意・承諾を文書で得られた者からもサンプルを採取しておく。

(3) ゲノムワイド遺伝的相関解析

既に設定済みの全ゲノムを約100 kbの間隔で網羅する多型マイクロサテライトマーカーを用いて、非血縁患者集団と非血縁健康者集団による相関解析を補正なしでまず行う。この一次スクリーニングで相関を示したマーカーに関して別の患者集団を用いて補正ありで二次スクリーニングを行う。

これら一次および二次スクリーニングでは膨大な数のマーカーについて多型タイピングを行う必要があるため、研究費補助期間内に全解析が終了しない危険があるという問題がある。この問題の解決策として、100人分のゲノムDNAを等量ずつ混合したPooled DNAを鋳型としてタイピングする方法（Pooled DNA法）を用いる。これにより、Individualタイピングに比べて実験規模・時間・コストの大幅な軽減が期待できる。

表 ゲノムワイド相関解析のデザイン

| スクリーニング | 一次                 | 二次                 | 三次                  |
|---------|--------------------|--------------------|---------------------|
| サンプル数   | 100~数100人<br>非血縁集団 | 100~数100人<br>非血縁集団 | 100~数100家系<br>TDT集団 |
| サンプル構造  | Pooled DNAタイピング    | Pooled DNAタイピング    | Individualタイピング     |
| タイピング方法 | 30000              | 15000+*            | 70+*                |
| マーカー数   | 0.05               | 0.05               | 0.05                |
| 有意水準    | 0.80               | 0.80               | 0.80                |
| 検出感度    |                    |                    |                     |

\*：真の陽性マーカー数 (x)

#### 4. 研究成果

##### (1) モデル動物による発症原因確認

下顎前突症を自然発症する BALB/c-*bm/bm* マウスを用いて、発症後に切歯を適度な長さに切断して、不正咬合の度合が変化するかを観察したところ、一度発症した不正咬合は、切歯を切断後に完全には改善されないものの、ある程度まで改善した。このことは、不正咬合の発症に対しては遺伝的要因がほぼ必須であるが、環境的要因もその増悪には大きく関係していることを示した。

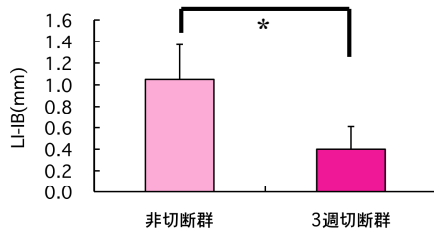


図 不正咬合自然発症マウスの上下顎切歯を切断していないものと切断したものの編位量の差

##### (2) サンプル収集

結果的には、一次スクリーニング用に非血縁患者（骨格性下顎前突症）140名、非血縁健常者180名分の血液から、既製のDNA抽出キット（QIAGEN社）を用いてヒトゲノムDNAを調製した。この各々のヒトゲノムDNA濃度を同一にして、それぞれの pooled DNA を作成した。

二次スクリーニング用に患者100名、健常者100名の血液を採取した。三次スクリーニング用に患者を含む20家系の血液を採取した。

##### (3) ゲノムワイド遺伝的相関解析

多型マイクロサテライトマーカーをプライマーとして用いて、それぞれの pooled DNA を PCR 反応させた。その PCR 産物と DNA シーケンサーを用いて、非血縁患者集団と非血縁健常者集団によるゲノムワイド遺伝子相関解析を補正なしでまず行った（一次スクリーニング）。

その結果、総数で約 30,000 個あるマーカーから、約 750 個の陽性マーカーまで、疾患遺伝子領域を絞ることができた。

共同研究先（東海大学医学部 分子生命科学）に設置されている共用のシーケンサーを用いてスクリーニングを行ったが、当初の予定よりも共用する使用者が多かったため、二次スクリーニングと三次スクリーニングは未施行である。

#### 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 3 件）

Tsukamoto Y, Kajii TS, Sugawara-Kato Y, Hirabayashi Y, Fujimori O, Iida J : Relationship between degree of malocclusion and occlusal interference in mice that spontaneously develop anterior transverse crossbite. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics 査読有, 138: in press, 2010.

Saito F, Kajii TS, Sugawara-Kato Y, Tsukamoto Y, Arai Y, Hirabayashi Y, Fujimori O, Iida J : Three-dimensional cranio-maxillary characteristics of the mouse with spontaneous malocclusion using micro-computed tomography . European Journal of Orthodontics 査読有, 32: in press, 2010.

Tsukamoto Y, Kajii TS, Oonishi Y, Sugawara-Kato Y, Hirabayashi Y, Iida J : Growth and development of the cranial base of BALB/c-*bm/bm* mouse that spontaneously induces anterior transverse crossbite: Histological study. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics 査読有, 134: 675-682, 2008.

〔学会発表〕（計 4 件）

梶井貴史：不正咬合自然発症マウスの顎顔面形態 -マイクロ CT を用いて-。北海道歯学会 9 月例会（招待口演） 札幌、北海道歯誌 30 巻・133 頁 2009 年 9 月 24 日。

梶井貴史：ゲノムワイド関連解析を用いた顎顔面変形症の発症予測システム構築。北大若手研究者の会第 2 回若手研究者交流会 札幌、プログラム・要旨集 10 頁 2009 年 7 月 17 日。

Saito F, Kajii TS, Hirabayashi Y, Arai Y, Iida J : Three-dimensional craniofacial measurements of the mice with induced spontaneous malocclusion using the micro computed tomography . 41st Annual Scientific Congress of Korean Association of Orthodontists (KAO) and 2nd Joint Meeting of KAO and Japanese Orthodontic Society, Seoul, Abstract 131 -2P,

Nov/7/2008. (優秀ポスター賞受賞)

Kajii TS, Alam MK, Iida J : Chronological change in sizes of teeth-alveolar bone in Japanese orthodontic patients . 83rd congress of European Orthodontic Society, Berlin, on-site program 108P , June/23/2007.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梶井 貴史 (KAJII TAKASHI)  
北海道大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：60322822

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし