

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 20 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究 B

研究期間：平成 22 年度～平成 23 年度

課題番号：22792018

研究課題名（和文） 口唇裂・口蓋裂の候補遺伝子のダイレクトシーケンスによる解析

研究課題名（英文） Mutation in 10 Gene are the Genetic Factor for Nonsyndromic Cleft Lip and/ or Cleft Palate

研究代表者

渡邊 章 (WATANABE AKIRA)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：50408324

研究成果の概要（和文）：

日本人口唇裂・口蓋裂患者およびその両親を対象にRYK(3q22)、EPHB2(1p36.1-35)、EPHB3(3q28-27)、DLX3(17q23)、TBX10(11q13.1)、TGF-B3(14q24)、PAX9(14q12-q13)、CLPTM1(19q13.2)、PVRL1(11q23)、TBX22(Xq21.1)の計10遺伝子を対象に変異解析、case-control study、TDT(伝達不平衡テスト)を行った。その中で、発症に関与すると考えられる遺伝子を見つけた。

研究成果の概要（英文）：We performed mutation analysis of 10 genes (RYK(3q22)、EPHB2(1p36.1-35)、EPHB3(3q28-27)、DLX3(17q23)、TBX10(11q13.1)、TGF-B3(14q24)、PAX9(14q12-q13)、CLPTM1(19q13.2)、PVRL1(11q23)、TBX22(Xq21.1)), case-control study, TDT(transmission disequilibrium test) in the parents with the patients with cleft lip and/or cleft palate. We found a gene associated with the appearance of disease of cleft lip and/or cleft palate.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,400,000	420,000	1,400,000
平成 23 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：口唇裂・口蓋裂 候補遺伝子 SNP 変異解析 相関解析 TDT検定 連鎖不平衡 DNA

1. 研究開始当初の背景

口唇裂・口蓋裂の発症は、黒人では、約 2000 人に 1 人、白人では、約 1000 人に 1 人、日本人では、約 400 人に 1 人と人種間でだいぶ異なる。また原因は遺伝要因と環境要因との複合による多因子しきい説で説明されている。これまでの再発危険率や罹患率などの報

告から、 λ_s は5から10である。また、他人種において家族集積性も指摘され遺伝的素因が関与していると考えられている。環境因子については多くの研究者が成果を挙げているが、遺伝要因に関しては口唇裂・口蓋裂の候補とされている遺伝子が海外で40種類以上あると報告されているに過ぎない。

種々の報告から発症率がコウカシアンよりアジア人種で高いという事実から、人種的に候補遺伝子の種類や塩基配列なども異なっていることが予測される。しかし、発症率の高い日本人人口唇裂・口蓋裂を対象にした候補遺伝子の解析に関しては、いまだ明らかにされていないのが現状である。

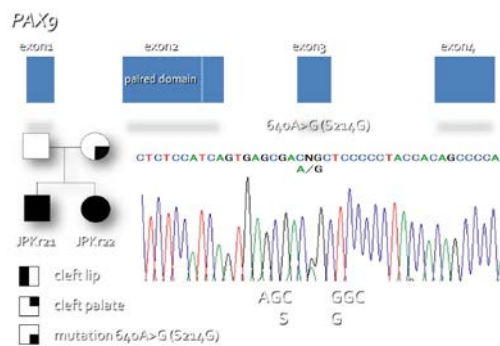
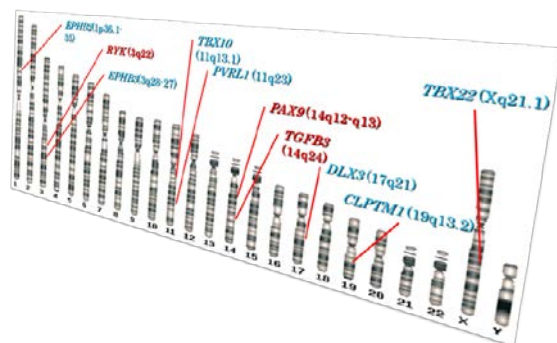
2. 研究の目的

候補となる遺伝子はまだ 20 遺伝子近く残っている。ダイレクトシーケンス法によりそれぞれの候補遺伝子の全長のシーケンスを行うことは、経済的にも負担があり、合理的ではないが、人を対象とした解析でこれまで動物実験等で言われている候補遺伝子、マーカー等で関与が示唆されている遺伝子の報告の真意について確実に行わなければならない。本研究の目的は、諸外国のデータ、マウスなどの解析によって合理的に口唇裂・口蓋裂の候補遺伝子として推測される遺伝子群に対してダイレクトシーケンス法を用いて、日本人の候補遺伝子を同定するとともに、人種による候補遺伝子の比較も試みることにある。さらに患者両親の遺伝子検索を行い、各個体における遺伝子多型と形質をデータとして統計的に形質と関連する遺伝子座を探索することも目的である。

3. 研究の方法

東京歯科大学倫理委員会より承認を受けた説明書、同意書で十分にインフォームドコンセントを行い、同意を得た口唇裂・口蓋裂患者およびその両親を含めた家系の血液それぞれ 8ml 採取。そして、古典的な方法で全検体の DNA 抽出をする。また、候補遺伝子は、口唇裂・口蓋裂の発症に関与すると報告されている RYK (3q22), EPHB2 (1p36.1-35), EPHB3 (3q28-27), TGF-β3 (14q24), DLX3 (17q23), PAX9 (14q12-q13), CLPTM1 (19q13.2), TBX10 (11q13.1), PVRL1 (11q23), TBX22 (Xq21.1) とした。解析方法としては、ダイレクトシーケンス法を用いての変異解析および SNP を使用した相関解析、TDT を行った。

4. 研究成果



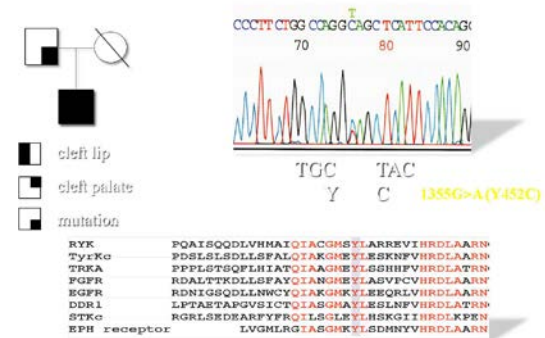
変異解析で変異を認めたものは、PAX9、RYK でした。

PAX9 遺伝子は DNA binding paired domain を持ち、クラスター構造を取らないホモオボックス遺伝子の一つであり、哺乳類の発達や器官形成で重要な役割を担っている遺伝子である。特に PAX9 遺伝子は口蓋や歯牙の形成に関与している神経提由来の間葉細胞において幅広く発現している遺伝子である。PAX9 のミッセンス変異は、exon3 の 214 番目のアミノ酸がセリンからグリシンへ変化した。

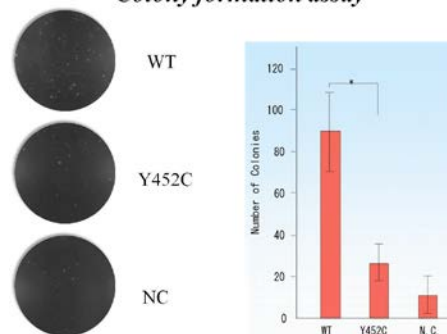
この変異は唇顎口蓋裂の患者兄弟と疾患を伴わない母親で認められ、対照健常者 474 名には認められない。そして、この変異部位は種を越えて保存されている領域でありました。

RYK のミッセンス遺伝子は、エクソン 1 2 の 452 番目のアミノ酸が Y : チロシン (Tyr) から C : システイン (Cys) に変化するものでした。

Y452C は、チロシンキナーゼファミリーでもよく保存されており、細胞内チロシンキナーゼの第二モチーフの中に存在している。



Colony formation assay



RYK は、受容体型チロシンキナーゼであるが、ATP 結合部位に変異をもち、自己リン酸化は起きない。

NIH3T3 細胞系に野生型の遺伝子を導入すると形質転換を起こし、軟寒天培地上でコロニーを形成する。この性質を利用し、lipofection 法で変異遺伝子を NIH3T3 細胞に導入し形質転換能を測定することによって

変異による遺伝子機能の変化を検証した。左に見られるのが、寒天培地上にまいた NIH3T3 細胞で、上から野生型、変異を導入したもの、コントロールである。これらの、NIH3T3 細胞のコロニーをカウントしたものが右のグラフである。この変異は、野生型と比べても約 50%の活性を示すのみであった。

TGFB3 (SNP) Case-control study

SNP position	SNP ID in NCBI	Alleles (Major/Minor)	Minor allele frequency		p-value
			CLP	Control	
TGFB3					
IVS1+2118	rs2268626	A/G	0.31*	0.359	0.0024
IVS1+2183		C/T	0.000	0.034	0.0047
IVS1+3306	rs2284792	C/T	0.394	0.466	0.0233
IVS1+5321	rs3917168	A/T	0.377	0.462	0.0016
IVS1+5417	rs3917169	G/A	0.377	0.462	0.0016
IVS1-1572	rs2268625	A/G	0.344	0.408	0.0239
IVS1-1283	rs2268624	G/C	0.344	0.408	0.0239
IVS1-952	rs2268623	G/C	0.344	0.408	0.0239
IVS3+1641	rs2268622	A/G	0.347	0.412	0.0271

Significant Bonferroni-corrected p-value is 0.00065 (0.05/76)
 IVS1+5321 and IVS1+5417 are in complete linkage disequilibrium (LD) ($r^2=1$)
 IVS1-1572 and IVS1-1283 and IVS1-952 are in complete LD ($r^2=1$)

10 遺伝子の 76SNPの内、p-valueが 0.05 以下を示したものはTGFB3 遺伝子内の 9つの SNPだけであった。

TGFB3 遺伝子の 9つのSNPで $p < 0.05$ の有意差が認められ、一番低いp-valueを示したのは IVS1+5321 と IVS1+5417 で、完全な連鎖不平衡 ($r^2=1$) の状態であった。

今回のcase-control studyは多重検定であり、その補正法としてBonferroni (ボンフェローニ) の補正を行った。しかし、補正した有意水準(0.00065)を下回るSNPは認められない。IVS1+5321 と IVS1+5417、また、IVS1-1572 と IVS1-1283 と IVS1-952 はそれぞれ完全な連鎖不平衡 ($r^2=1$) を示したため、同じ値になっている。

TGFB3 (haplotype) Case-control study

Haplotype-constructing SNPs	Haplotype	Frequency of haplotype in		p-value
		CLP	Control	
TGFB3				
IVS1+5321 / IVS1-1572	A/A	0.6183	0.4669	0.00055
	T/A	0.0549	0.1265	0.00677
IVS1+5321 / IVS1-1283	A/G	0.6183	0.4669	0.00055
	T/G	0.0549	0.1265	0.00677
IVS1+5321 / IVS1-952	A/G	0.6183	0.4669	0.00055
	T/G	0.0549	0.1265	0.00677
IVS1+5321 / IVS3+1641	A/A	0.6079	0.4636	0.00102
IVS1+5321 / IVS4+256	A/G	0.5712	0.4291	0.00159

Significant Bonferroni-corrected p-values 0.00104 (0.05/48)
 IVS1-1572 and IVS1-1283 and IVS1-952 are in complete (LD) ($r^2=1$)

SNP単独のcase-control studyとTDT、オッズ比でpositiveな結果を示した。IVS1+5321 と TGFB3 遺伝子内のほかのSNPでhaplotypeを構成しcase-control studyを行った。

頻度の低いhaplotypeは比較的低いp-valueを示す傾向がありfalse positiveな結果を示しやすいため、caseにおける頻度が >0.05 、 $p < 0.01$ の条件を満たしたものを示す。

8つのhaplotypeで $p < 0.01$ 以下の有意差が認

められた。その中で、IVS1+5321 と IVS1-1572 の連鎖不平衡グループ (IVS1-1572、IVS1-1283、IVS1-952 はまったく同じ値を示す) のmajor allele同士のhaplotypeで最も低いp-value (0.00055) を示す。さらに多重検定である為Bonferroniの補正を行い、補正した有意水準 (0.00104) よりもその値は下回っていた。

最も低いp-value を示したhaplotypeでは IVS1-1572 の連鎖不平衡グループが含まれていたため、代表として IVS1-1572 のSNP単独でのTDTを行ったが、有意差は認められなかった。

TGFB3 (SNP) TDT

SNP position	SNP ID in NCBI	Alleles (Major/Minor)	p-value *
TGFB3			
IVS1+2118	rs2268626	A/G	0.7630
IVS1+5321	rs3917168	A/T	0.0412

* Calculated by FBAT version 1.5.5

Case-control studyでcaseのminor allele 頻度が >0.2 、 $p < 0.01$ を示したTGFB3 遺伝子内の IVS1+2118 と IVS1+5321 の2つのSNPでTDTを行った。

TDTの結果、2つのSNPの内、IVS1+5321 で p-value 0.0412 を示し、有意差が認められない。

RYK(haplotype) Case-control study

Haplotype	Frequency of haplotype in					
	Japanese			Vietnamese		
	Case	Control	p-value	Case	Control	p-value
RYK A287G / IVS12+13 A-C / IVS 13+63 T-C						
CLP						
A/A/T	0.134	0.149	0.55	0.365	0.296	0.07
G/A/T	0.272	0.273	0.97	0.069	0.077	0.73
A/C/T	0.369	0.384	0.68	0.013	0.004	0.18
G/C/T	0.126	0.126	0.57	0.403	0.416	0.51
A/A/C	0.016	0.0006	5×10^{-4}	0.163	0.207	0.16
G/A/C	0.202	0.189	0.51	0	0	1
CPO						
A/A/T	0.076	0.149	0.30	0.365	0.296	0.25
G/A/T	0.5	0.273	0.01	0.122	0.077	0.22
A/C/T	0.346	0.384	0.69	9.3×10^{-15}	0.004	0.61
G/C/T	2.7×10^{-4}	0.126	0.86	0.324	0.416	0.15
A/A/C	0.038	0.0006	2.5×10^{-4}	0.189	0.207	0.74
G/A/C	1.2×10^{-7}	0.189	0.01	0	0	1

RYK遺伝子中の3つのSNP (A287G / IVS12+13 / IVS 13+63) のハプロタイプを用いてのCase-control studyを示す。

ハプロタイプA-A-Cは、日本人のCL/PとCPOだけに χ^2 検定でp値が、 5×10^{-4} 2.59×10^{-6} とそれぞれ有意な差が認められた。

また、3つのSNPのハプロタイプを用いてTDT検定を行った。いずれのハプロタイプも χ^2 検定でp値が0.01以上のものは見つからなかった。

以上の結果より、PAX 9、TGFB3、RYKの3遺伝子は、日本人口唇裂・口蓋裂の発症に関与していることが示唆された。
また、今後、**Association study**のデータは、日本人口唇裂口蓋裂のマーカーとして使えることが考えられる。

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 渡邊章 秋田定伯 夏目長門 中野洋子
内山健志 吉浦孝一郎

RYK遺伝子変異は非症候性の口唇裂・口蓋裂発症における遺伝要因の一つである

日本口蓋裂学会雑誌(0386-5185)35 巻 1 号
Page9-17(2010.04)

② Hikida M, Tsuda M, Watanabe A, Kinoshita A, Akita S, Hirano A, Uchiyama T, Yoshiura :
No evidence of association between 8q24 and susceptibility to nonsyndromic cleft lip with or without palate in Japanese population, Cleft Palate Craniofac J. 2011 Oct 7.

[学会発表] (計3件)

①口唇裂・口蓋裂の分子遺伝学研究 これまでの研究成果とこれからの原因追究 口唇裂・口蓋裂発症に関与するとされている10遺伝子の解析：渡邊章 日本口蓋裂学会

②口唇裂・口蓋裂発症に関与の報告がある10遺伝子の解析

渡邊章, 内山健志, 夏目長門, 引田正宣, 中野洋子, 須賀賢一郎, 大畠仁, 高野伸夫, 柴原孝彦：日本口腔外科学会雑誌(0021-5163)57 巻 Suppl. Page226(2011.09)

③日本人唇顎口蓋裂の関連遺伝子 8q24 領域の解析：引田正宣, 津田雅由, 渡邊章, 平野明喜, 吉浦孝一郎, 高野伸夫, 内山健志：日本口蓋裂学会雑誌(0386-5185)36 巻 2 号 Page83(2011.04)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊章 (WATANABE AKIRA)

東京歯科大学口腔外科学講座・助教

研究者番号：50408324

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：