

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11949

研究課題名(和文)超高速ゲノム解読に基づく骨格性下顎前突症感受性候補遺伝子の探索

研究課題名(英文) Identification for susceptibility genes of mandibular prognathism from the results of next-generation sequencing

研究代表者

梶井 貴史 (KAJII, Takashi)

福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授

研究者番号：60322822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：過去に行ったゲノムワイド関連解析では骨格性下顎前突症の感受性候補遺伝子領域を突き止めることができなかった。そこで全エクソーム解析により遺伝子機能に影響を与える原因変異を探索した。

その結果、罹患者4名の全てに認められ、非罹患者5名のいずれにも認められなかったエクソン領域のアミノ酸置換を伴う一塩基変異は5個であり、この1つであるBEST3遺伝子の一塩基変異はデータベース上に掲載されていない変異であった。そこで比較ゲノム解析を行ったところ、この塩基がコドンとなるアミノ酸は種を超えて保存されていた。よって、BEST3遺伝子の新規の一塩基変異は骨格性下顎前突症の強いリスク因子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格性下顎前突症の感受性候補遺伝子の1つがBEST3遺伝子であれば、成長期の骨格性下顎前突症患者の試料からこの遺伝子の一塩基変異をPCRにて確認することにより、その患者に下顎骨の爆発的な過成長が成長終了期に認められるかどうかを成長期のうちに判断することが可能になる。言い換えれば、矯正歯科治療の一つである成長のコントロールを成長期に行っても、成長終了期には顎矯正手術が必要となってしまうことを成長期のうちに判断することが可能となる。

これは矯正歯科治療において革新的なことであり、不必要な成長のコントロール治療を回避することが可能となり、国民の健康増進に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)： To explore variants related to mandibular prognathism, we undertook whole-exome sequencing in a Japanese pedigree. The pedigree was ascertained as mandibular prognathism. Four affected individuals across 2 generations and 5 unaffected individuals were chosen for whole-exome sequencing. Five non-synonymous single-nucleotide variants (SNVs) were detected in all 4 affected individuals, but in none of the 5 unaffected individuals. A non-synonymous SNV of the BEST3 gene, Chr12(GRCh37):g.70048878G > T, NM_032735.2:c.1816C > A, p.(L606I), was identified as rare missense variant. BEST3 is located on chromosome 12q15 and encodes bestrophin 3 from the bestrophin family of anion channels. The 4 other non-synonymous SNVs of UBASH3B, OR6M1, OR8D4, and OR8B4 were not considered plausible candidates for mandibular prognathism. Our whole-exome sequencing implicates a rare non-synonymous SNV of BEST3 as a candidate for mandibular prognathism in the Japanese pedigree.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯科矯正学 基礎ゲノム科学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨格性下顎前突症 (Mandibular Prognathism) (反対咬合、受け口とも呼ばれる) 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。骨格性下顎前突症は、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。よって、骨格性下顎前突症の原因遺伝子に関する研究は、サンプルが比較的容易に集められることから、国内外の関連研究のなかでも我々日本人が担うべきものと考えられる。

(2) 本研究課題の申請時においては、骨格性下顎前突症の疾患感受性遺伝子の特定に関しては、その存在が示唆される染色体部位についてゲノムワイド連鎖解析の報告が数編あったが、同一の疾患感受性部位は認められていなかった。一方、研究代表者である梶井は、平成 22-24 年度科学研究費基盤研究 (C) さらには平成 25-27 年度科学研究費基盤研究 (C) の補助を受け、骨格性下顎前突症の感受性遺伝子領域に対するゲノムワイドな遺伝的相関解析を行うことができた。しかし、強いリスクを伴う感受性候補遺伝子を突き止めることはできなかった。

(3) そこで、共同研究先である東海大学総合医学研究所の協力を引き続き得て、次世代シーケンサーを使用して、骨格性下顎前突症患者の家系を用いた全エクソーム解析を行うことにより遺伝子機能に影響を与える原因変異を探索することとした。

2. 研究の目的

(1) 本研究期間終了後の最終的な目標は、骨格性下顎前突症の感受性遺伝子を特定し、その遺伝子変異の判定を PCR にて検査することである。10 歳前後の骨格性下顎前突症患者が初診した際に、骨格性下顎前突症感受性遺伝子変異を PCR 検査にて調べることにより、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。

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) よって、本研究期間内の目標は、骨格性下顎前突症患者の家系を用いた全エクソーム解析を行うことにより遺伝子機能に影響を与える原因変異を探索することまでとした。

3. 研究の方法

(1) 全エクソーム解析

本研究計画はゲノム倫理委員会の承認を得て行われた。

4 世代にわたる 15 個体からなる家系 (うち骨格性下顎前突症患者 5 個体) を用いて全エクソーム解析を行った (図 1)。罹患者 5 個体のうち 4 名、非罹患者 5 名からゲノム DNA を得た。ゲノム DNA から SureSelect v6+UTRs キットを用いてエクソームライブラリを調整し、次世代シーケンサーを用いてこのライブラリをシーケンスした。

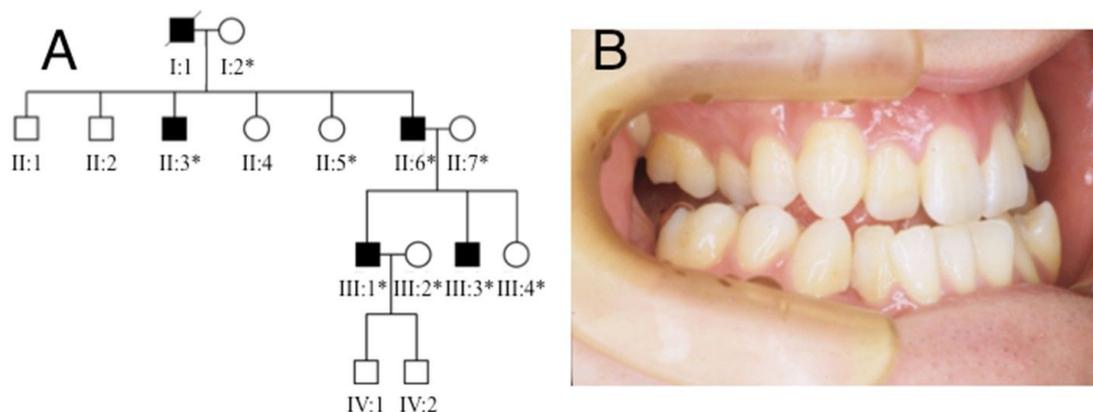


図 1 A: 解析に用いた家系 (アスタリスクは罹患者を示す)
B: 骨格性下顎前突症の口腔内写真

エクソーム解析により得られた、エクソン領域のアミノ酸置換を伴う一塩基変異は、サンガーシーケンシングにより追試された。

(2) 比較ゲノム解析

エクソーム解析によりエクソン領域のアミノ酸置換を伴う一塩基変異が同定されたとしても、その変異が疾患に直接関わっているわけではない可能性がある。この塩基がコドンとなるアミノ酸が種を超えて保存されているならば、この塩基の変異は疾患に直接関わっている可能性が非常に強くなる。そこで、脊椎動物6種（ヒト、サル、マウス、コアラ、ゾウ、メダカ）において保存されているかを比較解析した。

4. 研究成果

(1) 全エクソーム解析

骨格性下顎前突症罹患患者4名に全てに認められ、非罹患患者5名のいずれにも認められなかったエクソン領域のアミノ酸置換を伴う一塩基変異は、5個であった。この変異は、UBASH3B 遺伝子、OR6M1 遺伝子、OR8D4 遺伝子、OR8B4 遺伝子、BEST3 遺伝子上に存在していた。

このうち、OR 遺伝子の一塩基変異はこれらがコードするタンパクの機能に変化を及ぼさないことがほとんどであることから、これらの変異は遺伝子機能に影響を与える原因変異からは除外された。また、UBASH3B 遺伝子の一塩基変異の頻度は欧米人よりも日本人で低いことより、この変異も除外された。BEST3 遺伝子の一塩基変異はデータベースには掲載されていない新規の変異であった。サンガーシーケンスによってもこの変異は同定された（図2）。

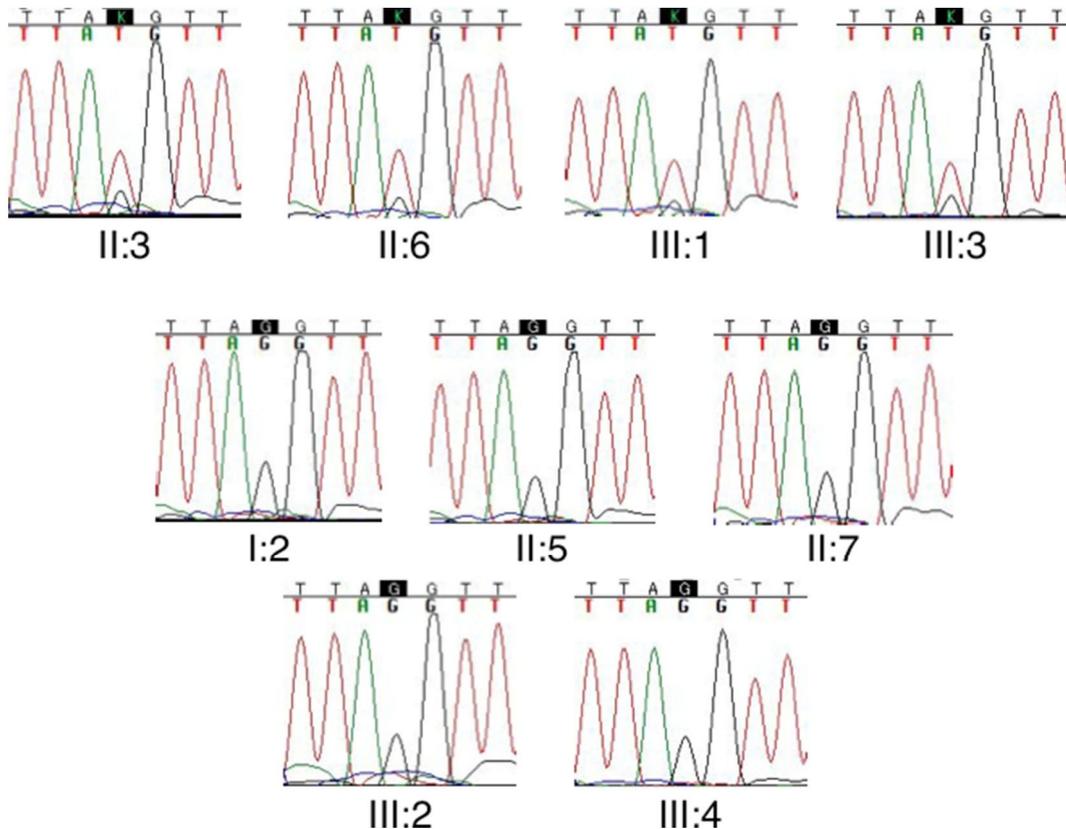


図2 骨格性下顎前突症罹患患者4名、非罹患患者5名の BEST3 遺伝子の一塩基変異をサンガーシーケンスにて追試した結果

(2) 比較ゲノム解析

全エクソーム解析により得られた、BEST3 遺伝子のアミノ酸置換を伴う新規の一塩基変異について、この塩基がコドンとなるアミノ酸が種を超えて保存されているかを、脊椎動物6種（ヒト、サル、マウス、コアラ、ゾウ、メダカ）にて確認した。

その結果、この塩基がコドンとなるアミノ酸は種を超えて保存されていた（図3）。

```

[Homo_sapiens]          586 FLKRWSLPGFLGSSHTSLGNLSPDPMSSQPALLI-DTETSSEISGINIVA 634
[Macaca_mulatta]      572 FLKRWSFPGFLESSHTSLGNLSPDPMSSQPALLI-DTETSSEVSGINIVA 620
[Mus_musculus]        576 FPKRWSLPEFLESRHTSLGNLGPDPVSPRDALLPDTETPSETNGIHPGA 625
[Phascolarctos_cinereus] 583 YQKRWSLPRFLESSQTSLSGLSPEPAALETILLL-DTETSSQSSGINFVA 631
[Loxodonta_africana]  590 FLKKWSPECELESNHTSLACLNLDPSPSEPTLLL-DTETSPETGGINIVP 638
[Nothobranchius_furzeri] 453 RGRQFSLQFSRQTSKASVRSLPSPNALGRRRKALGRHQSRSPS---PTP 499
      :::*          : :::* : *          .          :          ::          . .          .

```

L606I (amino acid), C1816A :exon10 (DNA)

図3 比較ゲノム解析（ヒト、サル、マウス、コアラ、ゾウ、メダカの6種）の結果

全エクソーム解析と比較ゲノム解析の結果より、BEST3 遺伝子のアミノ酸置換を伴う新規の一塩基変異は、骨格性下顎前突症の強いリスク因子であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kajii TS, Oka A, Hatta M, Yamazaki J, Yamashita J, Iida J	4. 巻 9
2. 論文標題 PLXNA2 identified as a candidate gene by genome-wide association analysis for mandibular prognathism in human chondrocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomedical Reports	6. 最初と最後の頁 253-258
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.3892/br.2018.1128	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kajii TS, Oka A, Saito F, Mitsui J, Iida J	4. 巻 122
2. 論文標題 Whole-exome sequencing in a Japanese pedigree implicates a rare non-synonymous single-nucleotide variant in BEST3 as a candidate for mandibular prognathism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 193-198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.03.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kajii TS, Oka A	4. 巻 2
2. 論文標題 Candidate gene analysis of mandibular prognathism	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Dentistry and Oral Biology	6. 最初と最後の頁 Article1068
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://pdfs.semanticscholar.org/9504/38a12862cce414e7cdb01b6b63a1d3eb44d6.pdf	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Saito F, Kajii TS, Oka A, Ikuno K, Iida J	4. 巻 152
2. 論文標題 Genome-wide association study for mandibular prognathism using microsatellite and pooled DNA method	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics	6. 最初と最後の頁 382-388
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajodo.2017.01.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kajii TS, Oka A, Iida J, Hatta M, Yamazaki J, Yamashita J, Tamaoki S
2. 発表標題 The function of PLXNA2, which was suggested to be candidate genes by genome-wide association study for mandibular prognathism, on chondrocytes
3. 学会等名 11th Asian Pacific Orthodontic Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kajii TS, Oka A, Saito F, Mitsui J, Iida J
2. 発表標題 Whole-genome sequencing in a Japanese pedigree ascertained as mandibular prognathism
3. 学会等名 The 66th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梶井貴史、岡 晃、斉藤文男、八田光世、玉置幸雄、飯田順一郎
2. 発表標題 骨格性下顎前突症のゲノムワイド関連解析により得た感受性遺伝子PLXNA2は軟骨内骨化に関与する
3. 学会等名 第36回日本頭蓋顎顔面外科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kajii TS
2. 発表標題 Genome-wide association study for mandibular prognathism using microsatellite
3. 学会等名 Translational Research Meeting with Dr. Thesleff at Fukuoka Dental College (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	岡 晃 (OKA Akira) (80384866)	東海大学・総合医学研究所・講師 (32644)	
研究 分担者	八田 光世 (HATTA Mitsutoki) (30344518)	福岡歯科大学・口腔歯学部・教授 (37114)	