

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 25 年 4 月 1 日現在

機関番号： 37114
 研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2010～2012
 課題番号： 22592272
 研究課題名（和文） pooled DNA タイピングを用いた顎顔面変形症の ゲノムワイド遺伝的関連解析
 研究課題名（英文） A genome-wide association study for maxilla-facial deformity using pooled DNA typing
 研究代表者
 梶井 貴史（KAJII TAKASHI）
 福岡歯科大学・准教授
 研究者番号： 60322822

研究成果の概要（和文）：骨格性下顎前突症の感受性遺伝子領域のゲノムワイド関連解析を進めるに際して、まず二次スクリーニングを行ったところ、有意な相関を示すマイクロサテライトマーカーはまだ十数個残っていた。そこで、二次スクリーニングでも一次スクリーニングと同様に相関を示した十数個のマーカーに関して、一次、二次で行ったような pooled DNA を鋳型にしたタイピングを行うのではなく、個々の患者サンプルを用いた individual タイピング（三次スクリーニング）を行った。その結果、骨格性下顎前突症の感受性遺伝子領域は 1p22.3 と 1q32.2、さらには 15q22.2 である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：At first, we conducted second screening of a genome-wide association study of mandibular prognathism. Over 10 of microsatellite markers showed significant association with mandibular prognathism from the result of second screening. Next we conducted individual typing (third screening) of a genome-wide association study of mandibular prognathism. It was suggested that 1p22.3, 1q32.2, and 15q22.2 are candidate loci for mandibular prognathism.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2011年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2012年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

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) 本研究課題の申請時においては、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、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った。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った。

(3) 一方、研究代表者である梶井は、平成19-21年度科学研究費基盤研究(C)の補助を受け、下顎前突症の疾患感受性遺伝子領域をゲノムワイドな遺伝的相関解析を行うことにより明らかにすることを目的として、一次スクリーニングまでを行うことができた。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教室の協力を得ることは、引き続き可能であった。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、ゲノムワイドな遺伝的相関解析を行うことにより、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位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) 二次スクリーニング用の Pooled DNA 調製

研究開始当初の背景に記した通り、研究代表者である梶井は、平成19-21年度科学研究費基盤研究(C)の補助を受け、下顎前突症の疾患感受性遺伝子領域をゲノムワイドな遺伝的相関解析を行うことにより明らかにすることを目的として、一次スクリーニングまでを既に行った。よって本研究ではまず、一次スクリーニングにて陽性を示した約4,000個のマイクロサテライトマーカーに対して、一次スクリーニングに用いた患者と健常者とは異なるサンプルを用いて、二次スクリーニング用の Pooled DNA 調製を行った。患者としては、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を用いた。

Pooled DNA 法とは、患者100人分、健常者180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である。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。



図 調製された pooled DNA (左; 健常者 右; 患者)

(2) 二次スクリーニング

先に示した Pooled DNA と、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約30,000個のうち一次スクリーニングで陽性を示した約4,000マーカーとを用いて、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ありで行う。

(3) individual タイピング (三次スクリーニング)

二次スクリーニングまで行っても、有意な相関を示すマイクロサテライトマーカーはまだ数十個残っている可能性がある。すなわち、疑陽性を示すマーカーがまだいくつか残っている可能性がある。そこで、二次スクリ

ーニングでも一次スクリーニングと同様に相関を示した数十個のマーカーに関して、一次、二次で行ったような pooled DNA を鋳型にしたタイピングを行うのではなく、個々の患者サンプルを用いた individual タイピングを行う(三次スクリーニング)。

4. 研究成果

(1) 二次スクリーニング

一次スクリーニングにて下顎前突症に陽性を示した約 4,000 個のマイクロサテライトマーカーに対して、一次スクリーニングに用いた患者と健常者とは異なるサンプルの Pooled DNA を用いて、二次スクリーニングを行った。その結果、約 600 個のマイクロサテライトマーカーが陽性を示した。

その後、明らかに偽陽性を示したマーカーをソフトウェアにより除去したところ、36 個のマイクロサテライトが陽性マーカーとして残った。

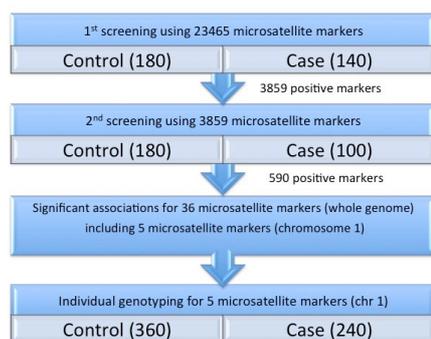


図 一次、二次、三次スクリーニングの結果

(2) 三次スクリーニング

二次スクリーニング終了後に陽性マーカーとして残った 36 個のマイクロサテライトのうち、第 1 染色体上に位置する 5 個のマイクロサテライトを用いて、個々の患者サンプルを用いた individual タイピングを行った。この三次スクリーニングの施行により相関を追試したところ、骨格性下顎前突症の感受性遺伝子領域は 1p22.3 と 1q32.2 である可能性が示唆された。1p22.3 上には Synovial Sarcoma, X breakpoint 2 Interaction Protein をコードする遺伝子 (SSX2I P) が存在し、1q32.2 上には神経軸索や骨形成を促進するセマフォリンの受容体である Plexin A2 をコードする遺伝子 (PLXNA2) が存在する。

また、二次スクリーニングで最も有意な相関を示した 15q22.2 についても三次スクリーニングを施行したところやはり有意な相関が認められた。15q22.2 上には RAR-related orphan receptor A をコードする遺伝子

(RORA) が存在する。

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、三次スクリーニングのうち残りのマーカーについては未施行である。

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 6 件)

梶井貴史: 成長期の骨格性下顎前突症における下顎骨の過大な成長の予測 -形態学的研究とゲノム解析を用いて-. 福岡歯科大学学会雑誌 査読無 38 巻・139-144 頁 2012.

Kajii TS, Alam MK, Mikoya T, Oyama A, Koshikawa-Matsuno M, Sugawara-Kato Y, Sato Y, Iida J: Congenital and postnatal factors inducing malocclusions in Japanese unilateral cleft lip and palate patients- determination using logistic regression analysis. Cleft Palate-Craniofacial Journal 査読有, 50: in press, 2013.

Takahashi K, Kajii TS, Tsukamoto Y, Saito F, Wada S, Sugawara-Kato Y, Iida J: Histological study of the nasal septal cartilage in BALB/c-*bm/bm* mouse which spontaneously induces malocclusion. Orthodontics and Craniofacial Research 査読有, 15: 84-91, 2012.

Saito F, Kajii TS, Sugawara-Kato Y, Tsukamoto Y, Arai Y, Hirabayashi Y, Fujimori O, Iida J: Morphological evaluation of cranial and maxillary shape differences of the brachymorphic mouse with spontaneous malocclusion using three-dimensional micro-computed tomography. Orthodontics and Craniofacial Research 査読有, 14: 100-106, 2011.

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, 33: 43-49, 2011.

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: 710.e1-710.e5, 2010.

[学会発表] (計 3 件)

生野啓一郎、梶井貴史、岡晃、斉藤文男、猪子英俊、石川博之、飯田順一郎：下顎前突症 (mandibular prognathism) のゲノムワイド関連解析. 日本人類遺伝学会第 57 回大会 東京、プログラム・抄録集 150 頁 2012.

Kajii TS, Sato Y, Iida J : Congenital and postnatal factors affecting malocclusions of Japanese unilateral cleft lip and palate patients -Using multivariate statistical analysis-. The meeting of the 20th anniversary celebration of sister school affiliation between Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University and School of Dentistry, Chonbuk National University, Jeju, Abstract 17P, 2011. (招待講演)

梶井貴史、飯田順一郎：顎変形症の発症原因解明に対する考察—顎変形症自然発症モデル動物を用いて—。第 20 回日本顎変形症学会総会 札幌、日本顎変形症学会雑誌 20 巻 プログラム・抄録号・76 頁 2010. (招待講演)

[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)
福岡歯科大学・准教授
研究者番号：60322822

(2) 研究分担者

岡 晃 (OKA AKIRA)
東海大学・総合医学研究所・講師

研究者番号：80384866

(3) 連携研究者
なし