

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463209

研究課題名(和文)ゲノムワイド関連解析から得た顎顔面変形症感受性領域のハプロタイプ同定

研究課題名(英文)Haplotype identification for susceptibility regions from the results of genome-wide association study of maxillofacial deformity

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロサテライトを用いたゲノムワイド関連解析によって、骨格性下顎前突症の感受性遺伝子領域は1p22.3と1q32.2、13q32.1、15q22.2であることが示唆された。

この4つの領域について、他グループで過去に行われた遺伝子連鎖解析による結果と比較した。その結果、1p22.3に存在するマーカーと、連鎖解析の結果で示されたマーカーとは非常に近い距離内にあった。この領域に存在する遺伝子をゲノムブラウザで調べたところ、synovial sarcoma, X breakpoint 2 interaction proteinをコードする遺伝子SSX2IPが存在していた。

研究成果の概要(英文)：It was suggested that the susceptibility chromosome regions of mandibular prognathism were 1p22.3, 1q32.2, 13q32.1, and 15q22.2 from the results of genome-wide association study that we performed.

The four susceptibility regions were compared to the regions reported by previous genome-wide linkage analysis of mandibular prognathism. The region of the marker on 1p22.3 was very near the region (1p22.3) suggested by the results of previous linkage analysis. The locus is approximately 23 kb upstream of the gene, SSX2IP, encoding synovial sarcoma, X breakpoint 2 interaction protein.

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨格性不正咬合は、比較的高い割合で親から子に受け継がれる、多遺伝子の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。骨格性不正咬合のうち、手術を伴う歯科矯正治療を必要とするものを顎変形症と呼ぶが、そのうち骨格性下顎前突症 (Mandibular Prognathism) (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。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、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、ゲノムワイド連鎖解析の報告が数編あるのみであった。数編の連鎖解析の報告で、同一の疾患感受性部位は認められなかった。

(3) 一方、研究代表者である梶井は、平成19-21年度科学研究費若手研究 (B) さらには平成22-24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疾患感受性遺伝子領域をゲノムワイドな遺伝的関連解析を行うことにより明らかにすることを目的として、マイクロサテライトを用いて解析の二次スクリーニングまでを行うことができた。さらに、共同研究先である東海大学総合医学研究所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) 本研究期間終了後の最終的な目標は、骨格性下顎前突症の疾患感受性遺伝子を特定し、その遺伝子変異の判定を薬品キット化することである。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キットを用い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。

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、マイクロサテライトを用いたゲノムワイド関連解析 (GWAS) の二次スクリーニングまでの段階で絞り込んだ下顎前突症感受性遺伝子領域を、individual タイピング (三次スクリーニング) でさらに絞り込み、その領域上に存在する遺伝子が真の原因遺伝子であるかを調べることであった。

3. 研究の方法

(1) individual タイピング (三次スクリーニング)

平成22-24年度科学研究費基盤研究 (C) の補助を受け、マイクロサテライトを用いた GWAS の二次スクリーニングまで行った結果、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。こ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)。

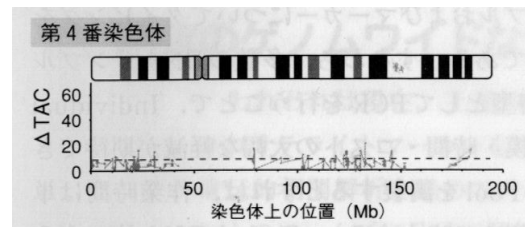


図: ゲノムワイド関連解析の結果 (猪子他、ポストゲノム時代の遺伝統計学、羊土社より転載)。

(2) SNP を用いた、GWAS の追試

マイクロサテライトは全ゲノムを約100 kbの間隔で網羅するものであり (Bahram S, Inoko H. *Nat Rev Genet* 8: 164, 2007) 感受性遺伝子領域の絞り込みとしては不十分である可能性がある。そこで、全ゲノムを約1 kb のより狭い間隔で網羅する Single Nucleotide Polymorphism (SNP) をマーカーとして、全ゲノム領域ではなく individual タイピング後に陽性を示した領域のみ、非血縁患者集団240名 (顎変形症のうち骨格性下顎前突症のみ) と非血縁健常者集団280名による遺伝的関連解析を追試する。

SNP を用いた関連解析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、もし全ゲノム領域 (ゲノムワイド) で行うとなると、研究費補助期間内に全解析が終了しない危険性が極めて高い。この問題の解決策として、まずマイクロサテライトを用いたゲノムワイド関連解析を行い、続いてその陽性領域のみで SNP を用いた関連解析を行うことを既に考えていた。これにより実験規模・時間・コストの大幅な軽減が期待できる。

(3) ハプロタイプ解析

SNP 遺伝子型よりも、ハプロタイプ (SNP の組合せ) が遺伝子表現系の主たる決定因子であることがあるため、SNP を用いた関連解析の結果をふまえて陽性領域で非血縁患者集団 240 名の individual DNA サンプルを用いてハプロタイプの解析も行う。これにより、疾患感受性候補遺伝子の変化についてより詳細に把握することができる。

4 . 研究成果

(1) individual タイピング (三次スクリーニング)

GWAS の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、13、15 染色体上に位置するマイクロサテライトに対して、individual タイピングを行うこと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、1q32.2、13q32.1、15q22.2 である可能性が示唆された。

(2) ゲノムブラウザによる領域の確認と遺伝子探索

individual タイピング後に SNP を用いた関連解析を行う予定であったが、使用予定であった共同研究先 (東海大学総合医学研究所) の共用のシーケンサーを使用する研究者が多かったため、SNP を用いた関連解析を施行する前にゲノムブラウザによる遺伝子探索を行った。

その結果、1p22.3 上には Synovial Sarcoma, X breakpoint 2 Interaction Protein をコードする遺伝子 (*SSX2IP*) 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*) が存在していた。13q32.1 上には DAZ interacting zinc finger protein をコードする遺伝子 (*DZIP1*) が存在し、15q22.2 上には RAR-related orphan receptor A をコードする遺伝子 (*RORA*) が存在していた。

さらに、これらの疾患感受性遺伝子領域について、他グループで過去に行われたゲノムワイド連鎖解析の結果の領域とゲノムブラウザを用いて比較した。

表 : マイクロサテライト間の距離

MS Markers	Cytobands	Physical position of amplicon (hg19)		Distance Mega-base
		From	To	
D1S435*	1p22.2	91558698	91559043	3.21
D1S2865*	1p22.3	88351081	88351416	3.17
D1S0411i	1p22.3	85179329	85179616	

* Markers suggested association by Frazier-Bowers et al (2009).

その結果、連鎖解析の結果で示された 1p22.1 に位置するマーカーは、現在のデータ

ベースでは 1p22.3 に位置しており、われわれが明らかにした 1p22.3 に存在するマーカーと近い距離にあることが示された。すなわちこの 2 つの領域は同一であることが示唆された。

よって、この領域に存在する遺伝子 *SSX2IP* が、骨格性下顎前突症の疾患感受性遺伝子の 1 つであることが示唆された。

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 5 件)

石川博之、梶井貴史、玉置幸雄 : 機能と美のシンフォニー 骨格性下顎前突症の外科的矯正治療後における軟組織側貌の予測について . 日本顎変形症学会雑誌 25 巻・1-9 頁 2015. (査読有り)

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjjd/25/1/25_1/_pdf

Ikuno K, Kajii TS, Oka A, Inoko H, Ishikawa H, Iida J: Microsatellite genome-wide association study for mandibular prognathism. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 145:757-762, 2014. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.ajodo.2014.01.022.

Koshikawa-Matsuno M, Kajii TS, Alam MK, Sugawara-Kato Y, Iida J: The effects of palatoplasty and pre-surgical infant orthopedic treatment on occlusion in unilateral cleft lip and palate patients. *Orthodontic Waves* 73:114-120, 2014. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.odw.2014.06.006.

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* 50:466-472, 2013. (査読有り)
DOI: 10.1597/11-150.

Alam MK, Iida J, Sato Y, Kajii TS: Postnatal treatment factors affecting craniofacial morphology of unilateral cleft lip and palate (UCLP) patients in a Japanese population. *British*

Journal of Oral Maxillofacial Surgery
51:e205-e210, 2013. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.bjoms.2012.10.001.

〔学会発表〕(計 5 件)

梶井貴史、生野啓一郎、岡晃、斉藤文男、飯田順一郎、石川博之：ゲノムワイド関連解析 (GWAS) による骨格性下顎前突症の感受性遺伝子領域同定。第 23 回日本歯科医学会総会 プログラム・抄録集印刷中 福岡国際会議場 (福岡市) 10 月 21~23 日, 2016.

Kajii TS, Ikuno K, Oka A, Saito F, Iida J, Ishikawa H: Genome-wide association study for mandibular prognathism using microsatellite. 8th International Orthodontic Congress, London (UK), September 27-30th, 2015.

Handa C, Kajii TS, Ishikawa H: Estimation of effects of activator treatment on mandibular growth using analyzing components of condylar growth and total rotation of the mandible. 8th International Orthodontic Congress, London (UK), September 27-30th, 2015.

Hata S, Yamazaki J, Kajii TS, Ishikawa H: MMP inhibitor suppresses myofibroblastic differentiation in three-dimensional wound-healing model of rat skin. 115th annual session of American Association of Orthodontists, San Francisco (USA), May 15-19th, 2015.

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：日本人集団を用いた骨格性下顎前突症のゲノムワイド関連解析。第 72 回日本矯正歯科学会大会 キッセイ文化ホール (松本市) 10 月 7~9 日, 2013.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等：なし

6 . 研究組織

(1) 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

(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
石川 博之 (ISHIKAWA HIROYUKI)
福岡歯科大学・口腔歯学部・教授
研究者番号：20184492

(3) 連携研究者

なし