

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463025

研究課題名(和文) 口唇裂・口蓋裂の発症原因の追究

研究課題名(英文) Mutation analysis of 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・講師

研究者番号：50408324

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)：口唇裂口蓋裂は、遺伝要因が強いが、原因遺伝子の解明には至っていない。今回、原因遺伝子を追究するために、次世代シーケンサーを用いてゲノム解析を行った。対象は、東京歯科大学唇顎口蓋裂外来を受診した患者で過去に口唇裂口蓋裂との関連が報告されている10遺伝子(TP63, IRF6, Wnt5A, Wnt9B, PAX9, MSX1, TFAP2A, MN1, DLX3/4)に対し、Illumina HiSeq2500を用いた。DLX4, Wnt5A, TFAP2Aの3遺伝子から一般集団に存在しない3つのバリエーションを検出した。このうちDLX4のc.359C>Tへの変化は、ミスセンス変異で口唇裂口蓋裂の発症に關与する。

研究成果の概要(英文)：The pathogenesis of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL±P) and nonsyndromic cleft palate only (NSCP) is thought to associate with genetic factors. Here we conducted mutation analysis using a Next Generation Sequencer. We selected 10 genes (IRF6, TP63, WNT5A, MSX1, TFAP2A, PAX9, WNT9B, MN1, DLX3 and DLX4) from genome-wide association study and candidate gene analyses, performed targeted resequencing in 78 Japanese patients with NSCL±P, and 14 Japanese patients with NSCP. The single nucleotide variants found on IRF6 and DLX4 were missense mutations, and on WNT5A, TFAP2A, WNT9B, TP63, and PAX9 were rare variants in the non-coding region, but no de novo mutation was found in trio samples. The amino acid change on DLX4 was found within the highly conserved homeodomain and predicted as a deleterious impact on the protein function in-silico analysis. The DLX4 missense mutation c.359C>T (Pro120Leu) was found in one Japanese with NSCL±P, was located in the homeodomain.

研究分野：口腔外科

キーワード：口唇裂・口蓋裂 原因遺伝子

1. 研究開始当初の背景

口唇裂・口蓋裂などの口腔顔面裂は、様々な視点から各施設で原因追究の研究が行われている。これまでの再発危険率や罹患率、家族性発症などの報告から、遺伝要因が強く考えられる。最近、分子遺伝学的研究が爆発的に進歩し、口唇裂・口蓋裂の原因追究という課題も解決へ向かうことと思われる。しかし、これまでの研究成果は直接この疾患の原因と結びついていない。これまでの研究成果の見直すとともに、深く追究し、そして候補遺伝子の解析を行う。

平成 22 年度科学研究費補助金若手研究 B に採択され、以下の結果が得られた。

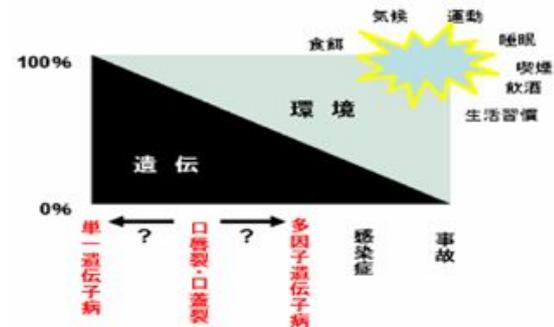
東京歯科大学倫理委員会より承認を受けた説明書、同意書で十分にインフォームドコンセントを行い、同意を得た口唇裂・口蓋裂患者およびその両親を含めた 150 家系の血液それぞれ 8ml 採取を完了した。そして、古典的な方法で全検体の DNA 抽出を完了した。また、候補遺伝子は、口唇裂・口蓋裂の発症に関与すると報告されている PVRL1、PAX9、CLPTM1、TBX22、EPHB2、EPHB3、RYK、TBX10、DLX3、TGFB3 とした。解析方法としては、ダイレクトシーケンス法を用いての変異解析および SNP を使用した相関解析、TDT を行った。結果として変異解析では、RYK、PAX9 にミッセンス変異を認めた。RYK に認められた 5 つの SNP の内の 3 つ (A287G, IVS12+13A>C, IVS13+63T>C) においては case-control study と TDT 検定を行った。この 3 つの SNP は、0.15 以上のマイナーアレル頻度であった。また、それらは Hardy-Weinberg 平衡において、日本人で連鎖不平衡の状態にあった。しかも患者といかなる SNP との間においても p 値が >0.1 を示す有意な差は認められなかった。3 つの RYK-SNP (snp1-snp4-snp5) から作られる 7 つのハプロタイプのうち、1 つ (A-A-C) が case-control study で $<5 \times 10^{-4}$ と $<2.59 \times 10^{-6}$ の p 値を認め、日本人の CL/P と CPO において有意な値が得られた。しかし、ハプロタイプを使用した TDT 検定では、有意な差は認められなかった。

また、TGFB3 では、23 SNP をタイピングし p-value が 0.05 以下を示すものは 9SNP あった。一番低い p-value を示したのは IVS1+5321 と IVS1+5417 であり、完全な連鎖不平衡 ($r^2 = 1$) の状態であった。Case-control study で case の minor allele 頻度が >0.2、 $p < 0.01$ を示した IVS1+2118 と IVS1+5321 の 2 つの SNP で TDT を行った。IVS1+5321 で p-value 0.0412 を示し、有意差を認めた。IVS1+5321 と他の SNP で haplotype を構成した。8 の haplotype で $p < 0.01$ 以下の有意差が認められた。日本人の CL/P と CPO において有意な値が得られた。

2. 研究の目的

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、s は 5 から 10 である。また、他人種において家族集積性が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。我々は、これまでに、日本人口唇裂・口蓋裂患者を対象に候補遺伝子の変異解析、SNP を用いての case-control study、TDT(伝達不平衡テスト)を行った。また、いくつかの遺伝子座に有意と思われる結果が得られた。しかし、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、前回のゲノムワイド解析の研究成果、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求することも目的である。本研究は、原因の追究、診断、予防など今後の医療の発展への第一歩だと思われる。また、今後、口唇裂・口蓋裂の原因遺伝子を見つける上でも無駄なくひとつひとつ確かめることが重要なことである。

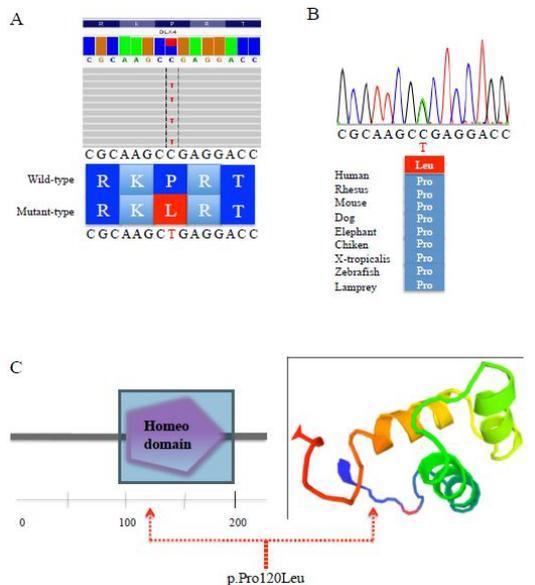
3. 研究の方法

東京歯科大学千葉病院唇顎口蓋裂外来を受診した、日本人の症候群を持たない唇顎口蓋裂および口蓋裂を伴わない唇顎裂 (NSCL±P) 患者 78 人と、症候群を持たない口蓋裂単独 (NCP) 患者 14 人を対象とした。これらの患者と採取可能であった両親 148 人から静脈血を採取し DNA を抽出した。解析を行った遺伝子は、過去に NSCL±P、NCP の発症に関与するとされている 10 遺伝子 IRF6、TP63、WNT5A、MSX1、TFAP2A、PAX9、WNT9B、MN1、DLX3、DLX4 とし、これら 10 遺伝子のエキソンと、イントロンの保存領域を含めた 153Kbp に対し、illumina HiSeq 2500 を用いて遺伝子解析を行った。

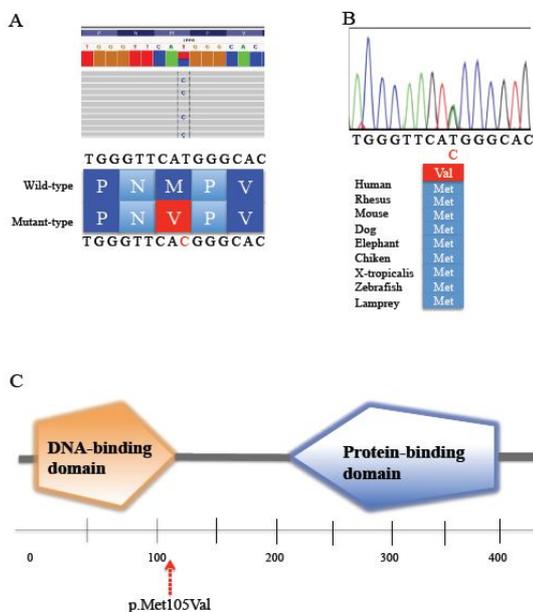
東京歯科大学倫理委員会の承認を得て行った (承認番号 548)

4. 研究成果

7 遺伝子 (DLX4、IRF6、WNT5A、TFAP2A、WNT9B、TP63、PAX9) から一塩基多様性 (SNVs) を検出した。これらの SNVs は、遺伝情報に存在しない新規の SNVs であった。このうち 2 名の NSCL±P 患者にそれぞれ DLX4 の exon2 と IRF6 の exon4 にヘテロ接合ミスセンス変異を認めた。DLX4 のヘテロ接合ミスセンス変異 c.359C>T (Pro120Leu) はホメオドメインに認め、保存領域であった。この変異は In-silico 解析の結果、有害な変異であることが予測された。DLX4 はその他の DLX ファミリーの発現を調節する役割を持っており、DLX4 の遺伝子異常は DLX ファミリーの発現異常を引き起こし、頭蓋顔面の形質異常を発症する。特定した DLX4 のミスセンス変異は他の正常な遺伝子の発現に影響を与えることで、口唇裂・口蓋裂の発症に関与することが示唆された。IRF6 のヘテロ接合ミスセンス変異 c.313T>C (Met105Val) は DNA 結合領域の変異であった。Van der woude syndrome (VWS) と、popliteal pterygium syndrome (PPS) は、口唇裂・口蓋裂を伴う疾患で、IRF6 が原因遺伝子である。VWS と PPS を引き起こす IRF6 の変異は、DNA 結合ドメインとタンパク質結合ドメインに認める。本研究にて同定した IRF6 のヘテロ接合ミスセンス変異 (Met105Val) は、DNA 結合ドメインに認めたことから、口唇裂・口蓋裂の発症に関与することが示唆された。TFAP2A、WNT5A、WNT9B、TP63、PAX9 の SNVs は非コーディング領域に認め、このうち TFAP2A と WNT5A の SNVs は保存領域であった。WNT9B、TP63、PAX9、に認めた SNVs は非コーディング領域で保存度は低かった。これらの 7 つの SNVs は両親の DNA が採取できなかったため、denovo mutation または transmitted allele であるか確定はできなかった。日本人 NSCL±P に DLX4 のホメオドメイン領域に変異を認めた報告は初めてである。この領域における変異は唇顎口蓋裂の発症に関与することが考えられた。



DLX4 のヘテロ接合ミスセンス変異



IRF6 のヘテロ接合ミスセンス変異

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 0 件)

現在、The Cleft Plate -Craniofacial Journal- に投稿中である。

〔学会発表〕(計 2 件)

柴野正康 渡邊章

口唇裂・口蓋裂の遺伝子変異解析

第 6 1 回日本口腔外科学会総会・学術大会

2013年11月25日-11月27日

柴野正康 渡邊章 次世代シーケンサー
を用いた口唇裂・口蓋裂の遺伝子変異解析
第40回日本口蓋裂学会総会
2017年5月26日-5月27日

〔図書〕(計 1件)
顎口腔領域の疾患 渡邊章 永末書店
2017 2ページ

〔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・歯学部・講師
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：

(4) 研究協力者

()