

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861783

研究課題名(和文) 顎顔面領域に発現する先天異常疾患の原因遺伝子探索

研究課題名(英文) Search for causative genes for birth defects expressed in maxillofacial area

研究代表者

岡本 奈那 (OKAMOTO, NANA)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60645216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、矯正歯科分野で従来行われている検査から得られる表現型の定量的評価と網羅的ゲノムスクリーニングを組み合わせることで、表現型とゲノム構造の関連性を解明し、顎顔面領域の先天異常疾患の病因遺伝子を同定と新規の顎顔面領域の臨床診断アルゴリズムを構築することを目的とした。原因遺伝子の同定に至ったのは全体の30%で、候補遺伝子の有る場合無い場合とも遺伝的異質性からか全てに変異遺伝子が得られるわけではないこともわかり、疾患のリクルートに対して有用な情報の積み重ねが行えた。一方、表現型に対する遺伝子の機能的な影響とその評価は対象変異をモデル動物での再現が困難など、さらに症例の蓄積を進める必要があった。

研究成果の概要(英文)：In this research have been proposed to combine quantitative evaluation of phenotype obtained from examination which has been conventionally done in the field of orthodontics, and comprehensive genome screening. We aimed to identify the pathogenic genes of congenital anomalies of maxillofacial and to construct a novel clinical diagnostic algorithm. We worked out to clarify the phenotype and genotype correlation used by the patients related to congenital anomalies in maxillofacial area. We identified some causative genes. The coverage was about 30% of the total analyses. We also found that the mutations were not always the pathogenic genes which were obtained from genetic heterogeneity in the absence or presence of the candidate gene. These conclusions has been useful for recruitment of disease to accumulate information. On the other hand, we could not find out the correlation both functional influences and evaluations of gene related on the birth defects were difficult to define.

研究分野：矯正歯科

キーワード：ゲノム 先天異常 顎顔面形態 奇形 変異

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムプロジェクトの進行に伴い分子レベルでの病態解明を目指した網羅的解析が精力的に推進され、膨大なオミックス情報が蓄積されてきている。2004年に、1 kb以上のサイズのゲノムコピー数変化として定義される copy number variation (CNV)が、先天異常疾患のみならず健常者でもヒトゲノムの30%以上の領域に存在することが明らかにされ、一般集団における表現型の多様性や疾患感受性などとの関連が報告されてきている。また、2002年からは Single Nucleotide Polymorphism (SNP) をマーカーにした網羅的ゲノム関連解析 (GWAS) が進められて多大な成果が得られ、2007年には次世代型高速シーケンサー (NGS) が登場したことで、個人ゲノム時代到来とともに疾患ゲノム研究のビッグバンが起こっている。このような状況の中で、先天疾患の病態に関わる遺伝的背景 (ゲノム一次構造異常) を解明し病態発生機構を理解するためには、単一遺伝子異常から複雑で大きな CNV 内に含まれる多くの遺伝子のコピー数変化ならびにそれらの複合 (Multi-hit) まで、あらゆる遺伝子変異に関して検討を行うことが必要になっている。さらに、候補遺伝子の病因としての妥当性やその病態発生機序を解明するには、遺伝子機能を実験的に検証し、あるいは変異の疾患特異性を詳細に評価する必要があるが、機能的な検証は遅れている。

本研究で着目する顎顔面領域の奇形は、先天異常疾患の1/3に付随して出現する表現型である。先天異常疾患の臨床診断では顔貌などの外表所見が有用であるが、その判断は臨床医の経験に頼り、奇形に対する明確で定量的な評価基準に乏しいため、疾患との関連を客観的に検証することが困難である。申請者は、矯正歯科分野で従来から顎顔面領域の硬組織と軟組織の計測からの定量的評価を治療に取り入れていることに着目し、原因不明の多発奇形を伴う複数症例における顎顔面領域の表現型の定量的評価と検出された

CNV 領域との関連性 (Genotype-phenotype relationship) を明らかにすることで新規症候群を提唱した (J Hum Genet. 2012)。この成果は本領域では初の試みである。一方で、600症例以上の多発奇形 (MCA) / 精神発達遅滞 (MR) 症例や顎顔面領域奇形症例の網羅的ゲノムコピー数解析では、70%については未だ異常が検出されず、また異常領域を検出できた例の多くも領域内に複数見出された候補遺伝子から病態に直結する遺伝子を絞り込むことが困難な背景がある。

2. 研究の目的

新生児の3-5%に何らかの先天異常を生じ、その約1/3に顎顔面領域の奇形を認め、機能面だけでなく社会生活や精神面に大きく影響するが、病因となる異常が未同定のものが多い。本研究は、矯正歯科分野で従来行われている検査から得られる表現型の定量的評価と網羅的ゲノムスクリーニングを組み合わせることで、表現型とゲノム構造の関連性を解明し、顎顔面領域の先天異常疾患の病因遺伝子を同定と新規の顎顔面領域の臨床診断アルゴリズムを構築することを目的とする。そのために、硬・軟組織の画像診断手法を用いた顎顔面領域奇形の定量評価の指標構築と効率的・段階的ゲノム一次構造解析とを行い、結果を統合解析することで病態関連遺伝子候補をリスト化し、候補遺伝子に対して、モデル動物等を用いた発現・機能解析を行って病因遺伝子を絞り込む体系的なアプローチを施行する。

3. 研究の方法

顎顔面領域の奇形を伴う疾患を対象に、以下のように病因遺伝子探索と診断アルゴリズム構築を進める。

顎顔面領域の硬組織・軟組織に対して各種診断技術を用いた表現型の定量評価を行う。

臨床診断から、既知疾患は既報の病因遺伝子の検索・同定と表現型との関連性の再評価を行う。

本態不明の疾患は SNP アレイ解析を施行し、CNV、ヘテロ接合性消失や片親性イソダイソミーを検出する。検出された異常を検証し、異常領域を決定して病因関連遺伝子候補を得る。

アレイ解析で異常が検出されなかった症例は、表現型ごとに細分化し NGS を用いたエクソーム解析を行い、検出された異常を検証し病因関連遺伝子候補を得る。

候補遺伝子に対して、表現型との関連性から絞り込みを行い、さらにモデル動物を用いた発現・機能解析(ゼブラフィッシュを用いた形態機能解析、胎児期マウス標本を用いた発現解析)を行う。

以上の結果を統合し、データベースを構築し、それぞれの過程にフィードバックする。

4. 研究成果

研究期間において合計 27 名(共同研究機関: 徳島大学人類遺伝学分野症例を含む)を収集した。男女比は、男性: 10 名、女性: 17 名であった。3 年間のうち、最初の 2 年間に於いて症例収集を行った。解析結果の内訳として、原因遺伝子の同定に至った症例が 9 名(33.3%)、疾患と関連する要因が特定できなかった症例が 14 名(51.9%)、候補遺伝子の絞り込みには至ったものの、原因遺伝子の同定には至らなかった症例が 2 名(7.4%)であった。残りの 2 名は保因者であった。本研究の変異検出率に対する診断同定率は、既報の結果と概ね一致する約 3 割であった。

候補遺伝子のある場合ない場合とも、遺伝的異質性からか、全てに病因と考えるような変異遺伝子が得られるわけではないこともわかり、初年度には今後の疾患のリクルートに対して有用な情報の積み重ねが行えた。一方、これに伴う表現型に対する遺伝子の機能的な影響に関しては、各疾患に対する症例が少ないこと、得られた変異を用いモデル動物作製を試みるも顎顔面形態の評価を正確に再現するほどの再現性がとれないなど困難

な点が多く、さらに症例収集を進め、各疾患ごとの表現型データの蓄積を進める必要と短期間で結果を得るためのモデル動物の選考が今後の課題である。

顎顔面領域の硬組織・軟組織に対して各種診断技術を用いた表現型の定量評価

顎顔面領域の硬組織に対して側面セファロ規格写真を用いたポリゴン分析を行い、日本人を基準としたモデルを用い、性別および年齢別の評価を施行した。疾患に顕著な硬組織変化として定量評価できる部位を検出するために健常者との比較を行った。症例数が少ないこと、軽度の変化では健常との差が表出されないことが問題点として挙げられた。一方、軟組織は 3D 画像および 2D のデジタル写真画像を用いて検討を試みた。研究期間の年数では経年変化が十分追えないため、成長発育による変化を反映することは困難と判断し、2D デジタル画像と既報の報告等(Kochel et al., 2010)を参考に基準点の選定を行うことから検討した。健常者の設定と患者とを有用に鑑別できる点を検討したが明確な結果を得ることができなかった。また、一地点での定量性評価は可能であったが、症例数の問題から、定量性の再現がどこまで取れるのかを判断するだけのデータ数をそろえることができなかった。さらに、使用した機種の特性上、毛髪や眉毛などの黒い部分が描出できないことは先天異常疾患の顔貌的特徴を正確に表現できないことから、本アルゴリズムの構築で目的としている診断への応用は現状では困難と判断した。

臨床診断から、既知疾患は既報の病因遺伝子の検索・同定と表現型との関連性の再評価

当該研究機関において既に他科受診があり、それに伴い複数名の医師が診察している疾患は、各科で臨床診断がついている

ため全身検索も十分進められている状態であった。そのため、診断がつかない理由としては、これまでの遺伝子検索手法では見いだせなかった症例、あるいは十分な検索を施行されていなかった症例、およびそもそも遺伝学的診断の機会がなかった症例が主であった。そのため、既知疾患の原因遺伝子としてすでに報告のある遺伝子をターゲットとして、解析を進めた。結果、基底細胞母斑症候群の1例、Stickler症候群の2例、大理石骨病の1例、先天性眼振の兄弟例3例において、臨床診断と一致する原因遺伝子変異を認めた。また、Mesomelia-synostoses症候群の1例については染色体構造異常による欠失を検出し、疾患と関連するゲノム構造異常を同定した。少ない症例数ではあるものの、正確で詳細な臨床所見が専門科の医師により規定され、複数の所見を認める場合は、遺伝子解析結果においても臨床診断と矛盾しない結果が得られることが示唆された。一方で、新規変異として検出した症例も臨床所見による十分な裏付けがあることから妥当性を維持できると考えられるが、モデル動物等の機能解析まで追いつかず、データベース上の蓄積が主体になっている現状がある。本研究に関わらず、遺伝子変異症例においては で検討したような機能解析への着手が早期に求められると考えられた。新規変異を認めた基底細胞母斑症候群、先天性眼振の兄弟例、および既報の報告と一致する変異を認めた Stickler症候群は、結果として論文報告している。また、新規変異を認めた大理石骨病については、現在投稿準備中である。また、Mesomelia-synostoses症候群の1例についても論文報告済みである。

本態不明の疾患に対する遺伝子解析およびアレイ解析で異常が検出されなかった症例：本体不明の疾患で、MCA/MR

(multiple congenital anomalies / mental retardation) を伴う1例について、これまでの遺伝子解析手法では原因を特定できていなかった症例であった。それに対して、ゲノムリアレンジメントによって生じたと考えうる複雑な染色体構造異常を同定し、報告した。本疾患の詳細な遺伝子解析は本邦初であり、複雑な染色体構造異常のメカニズム解明の一助となると考えられた結果である。モデル動物を用いた発現・機能解析：得られた疾患原因遺伝子に対して、モデル動物での発現解析を検討した。モデル動物として、研究期間を考慮し、短期間で結果を確認できるゼブラフィッシュを選定した。Pilot studyとして、野生型ゼブラフィッシュの頭部の表現型評価を行うために計測ポイントをオリジナルで規定した。硬組織をアリザリンレッドにより染色することで、明瞭化した。それを基に、距離計測による頭部骨格の計測を行った。さらに、野生型に対して、モルフォリノオリゴ注射による刺激によって表現型に与える影響に関して検証した。結果、野生型の頭部の距離計測において個体差が大きくでてしまい、SD値の規定が困難であった。また、注射の刺激による表現型への影響については、成長発育に伴い、キャッチアップを認める個体も認めたものの、手技・操作によるバラツキや個体差が大きくなってしまいう結果となり、今後の検討が必要であった。

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)

1. Nana Okamoto, Takuya Naruto, Tomohiro Kohmoto, Takhide Komori, Imoto Issei.

A novel PTCH1 mutation in a patient with Gorlin syndrome.

Human Genome Variation. (2014)1, 14022 査

読:有

DOI: 10.1038/hgv.2014.22.

2. Tomohiro Kohmoto, Nana Okamoto, Shigeko Satomura, Takuya Naruto, Takahide Komori, Toshiaki Hashimoto, Issei Imoto.

A *FRMD7* variant in a Japanese family causes congenital nystagmus.

Human Genome Variation. (2015)2, 15002 査読:有

DOI: 10.1038/hgv.2015.2.

3. Tomohiro Kohmoto, Takuya Naruto, Haruka Kobayashi, Miki Watanabe, Nana Okamoto, Kiyoshi Masuda, Issei Imoto, Nobuhiko Okamoto.

A novel *COL11A1* mutation affecting splicing in a patient with Stickler syndrome.

Human Genome Variation. (2015)2, 15043 査読:有

DOI: 10.1038/hgv.2015.43.

4. Tomohiro Kohmoto, Takuya Naruto, Miki Watanabe, Yuji Fujita, Sae Ujira, Nana Okamoto, Hideaki Horikawa, Kiyoshi Masuda, Issei Imoto.

A 590 kb deletion caused by non-allelic homologous recombination between two LINE-1 elements in a patient with mesomelia-synostosis syndrome.

American Journal of Medical Genetics partA. 2017 ;173(4):1082-1086. 査読:有

DOI: 10.1002/ajmg.a.38122.

5. Tomohiro Kohmoto†, Nana Okamoto†, Takuya Naruto, Chie Murata, Yuya Ouchi, Naoko Fujita, Hidehito Inagaki, Shigeko Satomura, Nobuhiko Okamoto, Masako Saito, Kiyoshi Masuda, Hiroki Kurahashi, Issei Imoto

A case with concurrent duplication, triplication, and uniparental isodisomy at 1q42.12-qter supporting microhomology-mediated break-induced replication model for replicative rearrangements.

Molecular Cytogenetics 201710:15 査読:有

DOI: 10.1186/s13039-017-0316-6

〔雑誌論文〕(計5件)

1. A novel *COL11A1* mutation affecting splicing in a Japanese patient with Stickler syndrome

Takuya Naruto, Tomohiro Kohmoto, Haruka Kobayashi, Miki Watanabe, Nana Okamoto, Kiyoshi Masuda, Nobuhiko Okamoto, Issei Imoto

The 13th International Congress of Human Genetics(April 3-7.,2016), presentation

date : April 4 2016, place : Kyoto International Conference Center (Kyoto, Japan)

2. 大理石骨病患者に対し矯正治療を行った1例

北山美登里、岡本奈那、西村玲美、木本明、古森孝英

第32回日本障害者歯科学会総会および学術大会(会期:2015年11月6日~8日)発表日:2015年11月7日、会場:名古屋国際会議場(愛知県)

3. 連続する1q42.12-q42.2のduplication、1q42.2-q43のtriplicationと1q43-qterの片親性アイソダイソミーを認めた症例

岡本奈那、村田知慧、増田清士、河本知大、里村茂子、岡本伸彦、堀川秀昌、古森孝英、井本逸勢

日本人類遺伝学会第60回大会(会期:2015年10月14日~17日)発表日:2015年10月16日、会場:京王プラザホテル(新宿)(東京都)

4. 神経疾患を標的にした次世代シーケンサー解析で診断したBaraitser-Winter症候群の1例

岡本奈那

第31回日本障害者歯科学会総会および学術大会(会期:2014年11月14日~16日)発表日:2014年11月15日、会場:仙台国際センター(宮城県)

〔学会発表〕(計4件)

〔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

岡本 奈那 (Okamoto Nana)

神戸大学医学部附属病院 歯科口腔外
科・医員

研究者番号：60645216

(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

()