

学位論文題名

Microsatellite genome-wide association study for
mandibular prognathism

(マイクロサテライトマーカーを用いた骨格性下顎前突症のゲノムワイド関連解析)

学位論文内容の要旨

【目的】

骨格性下顎前突症は、下顎の前下方への成長が過大であるため側貌における下顎の著しい突出感と反対咬合による咀嚼障害を呈する疾患である。また、その発症率はコーカソイドで約1%であるのに比べ日本人で約10%と多くみられるなど、人種間における差が認められることから、その発症には遺伝的要因が関係していると考えられているがまだ明確ではない。一方、最近の分子遺伝学の進歩によって、感受性遺伝子を探索することが可能になってきている。

現在、骨格性下顎前突症の治療には顎矯正手術が必要となることが多い。一方で成長中の学童期の骨格性下顎前突患者に対しては、下顎骨の成長を抑制するためにチンキャップを長期間使用することが多い。治療の結果、前歯の逆被蓋が改善することが多いが、成長期の後半の下顎骨の旺盛な成長により、再び反対咬合を呈する場合も少なからず存在する。その場合、患者は長期間におけるチンキャップによる治療を受けたにもかかわらず、顎矯正手術も必要となる。もし遺伝子検査で強い骨格性下顎前突症の要因をもつことがわかれば、患者は何年間にもおよぶ不必要な治療を回避することを選択できるようになる。反対に、患者の持つ遺伝的要因が弱ければ、積極的に成長のコントロールを行う治療を選択することができるようになる。したがって、骨格性下顎前突症の感受性領域が同定できれば、それは成長期における下顎前突症の治療法を選択する上で重要な情報になると考えられる。

多因子疾患に対する原因遺伝子の解析法として連鎖解析と関連解析がある。本疾患に対してこれまで2つの連鎖解析が行われており、第一染色体との関連が示唆され

ている。ひとつは日本人と韓国人を用いた罹患同胞対解析で3つの遺伝子座(1p36, 6q25, 19p13.2)が、もう一つはヒスパニックの家系を用いた連鎖解析で5つの遺伝子座(1p22.1, 3q26.2, 11q22, 12q13.13, 12q23)が感受性領域として報告されている。しかし、本疾患に対する関連解析の報告はこれまでにない。本研究では日本人非血縁患者集団を用いたゲノムワイド関連解析(GWAS)を行い、連鎖解析にて示唆された感受性領域と比較検討することを目的とした。

【材料と方法】

実験には患者群として北海道大学病院口腔系歯科口腔外科で顎矯正手術を行った骨格性下顎前突症患者240人、コントロール群として東海大学所有の全身的に健康な日本人一般集団の360人のDNAを使用した。骨格性下顎前突症の基準はセファロ分析で得られたANB角が 0.0° 以下であり、オーバージェットが0.0mm以下であることとした。また、口蓋裂などの先天性疾患を持つ患者は除いた。患者群は17～53歳(平均26歳)であった。本実験は、北海道大学大学院歯学研究科薬学研究科ヒトゲノム倫理委員会、東海大学医学部医の倫理委員会の承認を得ており、すべてのサンプル提供者から書面でインフォームドコンセントを得た。

GWASには、全染色体領域にわたり設定した23,465個のマイクロサテライトをマーカーとして用いた。GWASでは現在SNPとマイクロサテライトマーカーが使われるが、SNPは数が多く、より細かく(～30kb)ゲノム全体をカバーしているが、多型は2つのみである。それに対し、マイクロサテライトマーカーはSNPより数が少なく、マーカー間の距離は約100kbという単位だが、多型が多く連鎖不平衡を突き止めるのに有利であるとの報告がある。また、本実験のスクリーニングはpooled DNA法により行った。Pooled DNA法は実験に費やす時間と費用の大幅な節約が可能な方法である。マイクロサテライトマーカーを用いたpooled DNA法による実験でこれまでにいくつかの疾患で感受性領域の同定が報告されている。

DNAを血液から市販のキット(QIAamp DNA Blood Maxi Kit, QIAGEN, Hilden, Germany)により抽出後、正確に定量を行い、患者群とコントロール群のpooled DNAを作製した。Pooled DNAを用いて通法に従いPCRを行い、自動DNAシーケンサー(ABI Prism 3730, Applied Biosystems Japan Co. Tokyo, Japan)を使用して解析を行った。ソフト(Multi peaks, Applied Biosystems Japan Co. Tokyo, Japan)を用いて患者群とコントロール群で各マーカーにアレル頻度に差があるかどうかを検定した。偽陽性を極力排除するためスクリーニングは2段階で行い、それぞれ独立した集団を使用した。サンプル数は1次スクリーニングで患者群140人、コントロール群180人、2次スクリーニング

で患者群100人、コントロール群180人であった。1次スクリーニングで統計学的に関連が認められたマーカー($p < 0.05$)のみが2次スクリーニングに進み、2次スクリーニングでも $p < 0.05$ であったマーカーのうち、第一染色体に存在するマーカーについて、Pooled DNA法で用いた各個体のDNAによる通常のgenotypingを実施した。Genotypingの結果はハーディー・ワインバーグ平衡から逸脱していないことを確認した。

【結果】

1次スクリーニングで3,859個の陽性マーカーが、2次スクリーニングで590個の陽性マーカーが認められた。2次スクリーニング終了後に、明らかな偽陽性を除外したところ36個の陽性マーカーが残った。この36個の中に、これまでの連鎖解析で報告された感受性領域に有意な関連を示すマーカーは認められなかったが、そのうち第一染色体に存在する5つの陽性マーカーに対してgenotypingを行ったところ、2つの新規領域に有意な関連を示すマーカー(D1S1358i, D1S0411i)が認められた。またその領域はそれぞれ1q32.2($P=4.22E-04$)、1p22.3($P=6.66E-04$)であった。

【考察】

本実験では、これまでに連鎖解析で報告されている領域には関連を示すマーカーを認めなかったが、2つの新規領域に有意な関連を示すマーカー(D1S1358i, D1S0411i)が認められた。D1S1358iはPLXNA2遺伝子のイントロンに存在している。PLXNA2遺伝子はセマフォリン共受容体のplexin Aファミリーをコードする遺伝子である。セマフォリン3Aは骨代謝への関係が報告されている。D1S0411iはSSX2IP遺伝子の約23kb上流に存在していた。SSX2IP遺伝子は滑膜肉腫に関係している遺伝子であり、下顎骨の成長に関わりの深い顎関節にも滑膜が存在することから、骨格性下顎前突症との関連が推測される。

【結論】

第一染色体において2つの遺伝子座(1q32.2, 1p22.3)が骨格性下顎前突症の新規感受性領域として示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 飯 田 順一郎
副 査 教 授 北 川 善 政
副 査 教 授 鄭 漢 忠

学位論文題名

Microsatellite genome-wide association study for mandibular prognathism

(マイクロサテライトマーカーを用いた骨格性下顎前突症のゲノムワイド関連解析)

審査は審査員全員出席の下で行った。まず申請者に提出論文要旨の説明を求めるとともに、適宜提出論文の内容と関連分野に関する説明を求め、その後、口頭試問の形式でその内容および関連分野について試問した。まず申請者から以下の説明がなされた。

【緒言】骨格性下顎前突症は、下顎の前下方への成長が過大であるため側貌における下顎の著しい突出感と反対咬合による咀嚼障害を呈する疾患であり、その治療には顎矯正手術が必要となることが多い。その発症には遺伝要因と環境要因が関係していることが考えられているがまだ明確ではなく、原因遺伝子が明らかになれば矯正治療の治療方針を決定する上で重要な情報になると考えられる。多因子疾患に対する原因遺伝子の解析として連鎖解析と関連解析があるが、本疾患に対してこれまで2つの連鎖解析が行われており、第一染色体との関連が示唆されている。しかし、本疾患に対する関連解析の報告はこれまでにない。本研究では日本人非血縁患者集団を用いたゲノムワイド関連解析(GWAS)を行い、連鎖解析にて示唆された感受性領域と比較検討することを目的とした。

【材料と方法】実験には本院口腔外科で顎矯正手術を行った下顎前突症患者240人、健常者360人のDNAを用いた。GWASには、全染色体領域にわたり設定した23,465個のマイクロサテライトをマーカーとして用いた。Pooled DNA法により1次スクリーニング(1S)(患者140人、健常者180人)、2次スクリーニング(2S)(患者100人、健常者180人)を行い、統計学的に関連が認められたマーカーのうち、第一染色体に存在するマーカーについて、Pooled DNA法で用いた各個体のDNAにて通常のgenotypingを実施した。

【結果と考察】1S で 3,859 個の陽性マーカーが、2S で 590 個の陽性マーカーが認められた。2S 終了後に、明らかな偽陽性を除外したところ 36 個の陽性マーカーが残った。この 36 個の中に、連鎖解析で報告された感受性領域に有意な関連を示すマーカーは認められなかったが、第一染色体において2つの新規領域に有意な関連を示すマーカー (D1S1358i, D1S0411i) が認められた。またその領域はそれぞれ 1q32.2 ($P=4.22E-04$)、1p22.3 ($P=6.66E-04$) であった。D1S1358i は骨代謝との関係が推察される *PLXNA2* 遺伝子のイントロンに存在し、D1S0411i は滑膜肉腫と関係する *SSX2IP* 遺伝子の約 23kb 上流に存在していた。

【結論】第一染色体において2つの遺伝子座 (1q32.2、1p22.3) が下顎前突症の新規感受性領域として示唆された。

以上の論術に引き続き、以下の項目を中心に口頭試問を行った。

1. 顎変形症の病態について。
2. サンプルの収集方法について。
3. 解析の手法について。
4. コントロール群として用いた集団について。
5. 今後の研究の展望について。

成長途上における骨格性下顎前突症の患者に対する矯正治療においては、患者の下顎骨の成長が今後どの程度進行するか、その判断に苦慮することが多い。外科矯正の手法を選択する場合と矯正治療のみで治療する場合には、歯を移動する方向が異なるために、現在は、将来外科矯正の選択が必要となるか否かを間違いなく判断できるまで、治療開始を遅らせることもある。このような背景における、臨床に根差した発想から、本研究では、顎変形症の遺伝子診断を可能にすることを目的として、これまでに成されていなかったゲノムワイド関連解析の手法を用いて、顎変形症に関連する遺伝子について検討したものである。その結果、ヒト第一染色体において、2つの新規領域に顎変形症と有意な関連を示すマーカーが明らかになった。この成果は成長期における骨格性下顎前突症の患者に対する治療法を選択する際に、極めて有益な情報を与える遺伝子診断の可能性を示したものであり、今後の歯科医療の発展に大きく寄与するものと高く評価できる。

加えて、試問に対する申請者の回答は適切なものであり、本研究に直接関係する事項のみならず、関連分野における基礎的、臨床的な広い学識を申請者が有していること、さらに今後の研究の展望についても評価された。

よって審査担当者は、申請者が博士 (歯学) の学位を授与される資格を有するものと認めた。