

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

愛知学院大学

論 文 提 出 者

森 明 弘

論 文 題 目

非症候性口唇口蓋裂患者における *MEOX2* 遺伝子解析

I. 緒言

口唇口蓋裂は、我が国では、500～600の出生に対して1人の割合で生じるとされる先天異常で、その原因は、遺伝的要因・環境的要因が相互に影響し、一定のしきいを超すと発生するとした、多因子しきい説が有力視されている。すなわち、口唇口蓋裂は口唇や口蓋発生過程が、遺伝的要因と環境的要因によって阻害されることによって発生すると考えられている。口蓋裂の発生に関する遺伝的要因について、遺伝子操作マウスを用いた様々な研究が報告されている。この中で、mesenchyme homeobox 2 (*Meox2*) mutant mouse は、口蓋裂が発生すると報告されており、この *Meox2* mutant mouse では口蓋が一旦形成された後に癒合部が離開して口蓋裂が発生するという従来とは異なるメカニズムでの口蓋裂発生が報告されている。この報告は、*MEOX2* が口蓋裂の発生機序に関連していることを強く示唆している。しかし、ヒトを対象として *MEOX2* の遺伝子解析を行った報告はない。

そこで申請者は、日本人非症候性口蓋裂患者の遺伝子を対象に *MEOX2* 遺伝子解析を行い、*MEOX2* と口蓋裂発生の関連について調査を行った。

II. 非症候性口蓋裂単独患者にける *MEOX2* DNA シークエンス解析

II-1. 対象及び方法

a. 調査対象、DNA 抽出

科学研究費 基盤研究 A 「口腔先天異常疾患関連遺伝子共同研究機構」によりバンキングされている遺伝子資料のうち、口唇口蓋裂センターにおい

て経験豊富な4名の口腔外科医によって、舌小帯短縮症、ピアール・ロバン症候群、22q11.2欠失症候群、歌舞伎メーキャップ症候群やその他の症候性等、粘膜下口蓋裂(SMCP)と診断された者を除外した日本人非症候性口蓋裂単独患者(CP0群)91名(男性31名、女性60名)を抽出した。

インフォームドコンセントは、事前に本人または親から書面にて得た。

健康な日本人のSNP頻度情報は、dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)における*MEOX2* SNPデータ(170サンプル)を参照した(control:dbSNP群)。本研究対象SNPsのうち、rs113582077については、dbSNPにデータがなかったため、健常日本人100名(control:自験群)で、同領域のDNAシーケンス解析を行い、SNP解析を行った。本研究は、愛知学院大学倫理委員会承認番号00004によって承認され行われた。すべてのGenomic DNAは、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, USA)を用いて静脈血試料から抽出した。

b. DNAシーケンス

DNAシーケンスにおける、PCRの反応条件は、genomic DNA template 1.0 μ L (10–20ng)、各 primer (10 μ M) 1.0 μ L、dNTP (final concentrations: 0.3 mM) 3.6 μ L、DNase- and RNase-free water 20.25 μ L、Taq polymerase (HSS LaboPass™ SP-Taq; Bric Bio, Hokkaido, Japan) 0.15 μ L、10 \times reaction buffer (HSS LaboPass kit) 3.0 μ Lの最終容量30 μ Lで行った。温度条件は、①96 $^{\circ}$ C 1分、②94 $^{\circ}$ C 10秒、50 $^{\circ}$ C 5秒、60 $^{\circ}$ C 3分を25cycle、

③60°C 5分とした。ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher, Yokohama, Japan) を使用して DNA シークエンスを行った。DNA シークエンスの反応条件は、5×reaction buffer (HSS LaboPass kit) 1.6μL、各 primer (5pmol/μL) 0.5μL、Genomic DNA (20ng/μL) 1.0μL、および ABI BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, USA) 0.8μL、DNase- and RNase-free water 5.6μL の最終容量 10μL で行った。

c. 塩基配列分析

DNA シークエンスによって得られた塩基配列データは、FinchTV version 1.4.0 (Geospiza 社) を用いて分析した。*MEOX2* 遺伝子配列の照合には、Human BLAT Search Web サイト (<https://genome.ucsc.edu/index.html>) を使用した。

d. 統計解析

ハーディ・ワインベルグ平衡 (HWE)、CPO 群と Control:dbSNP 及び自験群との対立遺伝子頻度の差を評価するため、JMP®プログラム (SAS) を使用し、自由度 (DF) を1とした standard χ^2 test または Fisher's exact test を用いて評価した。また、SNPs における各遺伝子型の分析のため、遺伝子型モデル (Dominant model、Heterozygotes model、Recessive model) を採用し、Genotypic Odds Ratios (GOR) と 95%信頼区間 (95%CI) を使用して評価した。本研究では、 $p < 0.05$ をもって、有意差有りとした。

II-2, 結果

(論文内容の要旨)

No.4.....

愛知学院大学

本解析では、新たな遺伝子変異を認めなかった。今回のシーケンス領域には、Exon3 に位置する rs2237493 と Exon1 に位置する rs113582077 の2つの遺伝子多型 (SNPs) を認め、これらの2つの SNPs に対して遺伝多型解析を行った。rs2237493 は、*MEOX2* Exon3 の169番目の塩基 (全体の859番目の塩基) が T/G の多型 (Reference Allele: T) を示し、塩基配列が TAT から GAT 変化することで、アミノ酸がイソロイシン (I : 中性、非極性) から、ロイシン (L : 中性、非極性) へと変化し (c. 859A>G p. Ile287Leu)、ミスセンス変異を示す。この SNP による遺伝子型 (Genotype) は、T/T T/G G/G となり、本調査における、各 Genotype 頻度は、CPO 群では、T/T 34 名、T/G 41 名、G/G 16 名であるのに対し、control:dbSNP 群では、T/T 42 名、T/G 92 名、G/G 36 であった。Genotype 頻度について、CPO 群と control:dbSNP 群間で χ^2 二乗検定を行ったところ、両群間に有意な差は認められなかった。口蓋裂について、各 Genotype の発症リスクを明らかにするため、この SNP における3つの model (Dominant model, Heterozygotes model, Recessive model) に対して Genotypic odds ratio (GOR) を算出し、解析を行った。その結果、Dominant model (TT 対 TG+GG) において、GOR 1.82 (95%: 1.05-3.15)、*p* value 0.032 であり、T/T は、それ以外の配列である T/G, G/G と比較して、口蓋裂を発症するリスクが統計学的有意に 1.82 倍高くなることが明らかとなった。

rs113582077 では、*MEOX2* Exon1 の230番目の塩基の T と 231番目の塩基の

G と 232 番目の塩基の G が欠失することで、77 番目のアミノ酸のヒスチジンが欠失する。この SNP における Genotype は、TGG/TGG、TGG/-、-/- となり (c. 230_232delTGG p. His77del)、CP0 群の Genotype 頻度は、TGG/TGG が 4 名、TGG/- が 33 名、-/- が 54 名であった。control: 自験群については、TGG/TGG が 1 名、TGG/- が 35 名、-/- が 64 名であった。Fisher's exact test の結果、両群間に差は認められず、GOR においても有意な結果は得られなかった。

III. 非症候性口唇口蓋裂患者に対する rs2237493 遺伝子多型解析

III-1. 対象および方法

a. 調査対象、DNA 抽出

DNA シークエンスにおいて有意差が認められた SNP (rs2237493) に対して、バンキングされている遺伝子資料のうち、口唇口蓋裂センターにおいて経験豊富な 4 名の口腔外科医によって舌小帯短縮症、ピエール・ロバン症候群、22q11.2 欠失症候群、歌舞伎メーキャップ症候群やその他の症候性等と診断を受け、かつ、SMCP を除外した日本人非症候性口唇口蓋裂患者 (NSCL/P) 582 名 (男性 301 名、女性 281 名) を対象として Taqman assay を用いた調査を行った。このうち、裂型は口唇裂単独 (CLO) 142 名 (男性 72 名、女性 70 名)、口唇口蓋裂 (CLP) 342 名 (男性 195 名、女性 147 名)、口蓋裂 (CP0) 108 名 (男性 38 名、女性 70 名) であった。Control (Non-cleft) 群は、前述の dbSNP より得た日本人の Genotype frequency (170 サンプル)

とした。インフォームドコンセントは、事前に本人または親から書面にて得た。本研究は、愛知学院大学倫理委員会承認番号 00004 によって承認され行われた。すべての Genomic DNA は、QIAamp DNA Mini Kit を用いて静脈血試料から抽出した。

b. Taqman assay

各サンプルの Genotype 決定には、Applied Biosystems 社 (Foster City, CA, USA) から供給された Taqman プローブを用いた Taqman assay (Applied Biosystems, Foster City, USA) を使用した。PCR は、Taqman PCR master mix (×2) 5.0μL、Taqman probe (×50) 0.2μL、DNA template (10ng/uL) 2.0μL、DNase and RNase free water 3.8μL で、最終容量 10μL にて行った。反応条件は①Pre-PCR read 60℃30秒 ②Holding stage 95℃10分 ③Cycling stage 92℃15秒 60℃1分30秒を 50cycle ④Post PCR read 60℃30秒で行い、Step One real time PCR system (Applied Biosystems) を用いて、VIC/FAM 標識プローブからの蛍光シグナル検出をした。Genotype は、StepOne™ Software v2.3 (Applied Biosystems) を用いて分析した。

c. 統計解析

対立遺伝子頻度、ハーディ・ワインベルグ平衡および SNP の GOR の算出には SAS を使用した。本研究では、症例 (口唇口蓋裂全般: CL/P) を、CLO、CLP、CPO の 3 つに細分し、CL/P 群、CLO 群、CLP 群、CPO 群の 4 群に対して、対象 (control 群) 間との対立遺伝子頻度の差を、standard χ^2 test によ

って比較した。また、各遺伝子型の分析のため、遺伝子型モデル (Dominant model、 Heterozygotes model、 Recessive model) を採用し、GOR と 95%CI を使用して評価した。 $p < 0.05$ をもって、有意差有りとした。

III-2, 結果

CL/P 群、CLO 群、CLP 群、CPO 群の 4 群に対して、control 群 (Non-cleft) との対立遺伝子頻度の差を解析したところ、CL/P 群、CLO 群、CLP 群では有意差は認められなかったが、CPO 群において有意な傾向 ($p=0.089$) が認められた。対立遺伝子頻度から、全裂型 (CL/P, CLO, CLP, CPO) について GOR を算出し、解析を行った。本調査では、CL/P、CLO、CLP の 3 群では有意な差は認められなかったが、CPO 群の Dominant model (TT 対 TG+GG) において、GOR は 1.79 (95%CI: 1.06 -3.03, $p=0.028$) であり、CPO 群で遺伝子型 TT は、統計学的有意に口蓋裂を伴うリスクが高いことが明らかとなった。

IV. 考察

これまで、口唇口蓋裂発症メカニズム解明のため多数の遺伝子改変マウスを用いた実験が行われているが、これらの結果をヒトへフィードバックする研究はあまり行われていない。今回、ヒト非症候性口蓋裂単独と *MEOX2* 遺伝子変異の関与を分析するため、日本人非症候性口蓋裂単独患者の DNA を用いて、DNA シークエンスと Taqman assay による *MEOX2* 遺伝子解析を行った。本研究では、*MEOX2* の Exon3 に位置する rs2237493 の Dominant model (TT 対 TG+GG) において、GOR が 1.82 (95%: 1.05-3.15)、 p value 0.032 であ

った。つまり、rs2237493 の Genotype T/T は、それ以外の Genotype T/G, G/G と比較して、口蓋裂を発症するリスクが統計学的有意に 1.82 倍高くなることが明らかとなった。この結果は、Taqman assay を用いた解析でも同様の傾向が得られた (GOR 1.79、95%CI: 1.06 -3.03, $p = 0.028$)。口唇口蓋裂の原因は、遺伝的要因・環境的要因が相互に影響し一定のしきいを超すと発生するとした、多因子しきい説が有力視されており、日本人においてこの Genotype が、口蓋裂発生の遺伝的要因の一つである可能性が示唆された。また、*Meox2* は *Meox1* と共に中胚葉/間葉組織ホメオボックスファミリーに属し、体節の分化と発達に必須の遺伝子として知られる。*Meox1* と *Meox2* は互いに重複した機能を持ち、*Meox1* と *Meox2* は発生期マウスの骨と筋の両方の形成に必須であるとされる。MEOX2 のホメオドメインと 95% の相同性を持ち、重複した機能を持つとされる MEOX1 と共に解析することにより MEOX family と口蓋裂に関連する新たな知見が得られる可能性が示唆された。

V. 結論

ヒトにおける口蓋裂発生の *MEOX2* が関連しているかを調査するため、日本人非症候性口唇口蓋裂患者の DNA サンプルを使用して、*MEOX2* の遺伝子解析を行った。その結果 1、非症候性口蓋裂単独患者の DNA サンプルにおいて、*MEOX2* の新規遺伝子変異は認めなかった。2、*MEOX2* の SNP、rs2237493 の Dominant model において、遺伝子型 TT は、他の遺伝子型と比較して、最大 1.82 倍統計学的有意に口蓋裂を発症するリスクが高いことが明らかと

(論文内容の要旨)

No.9.....

愛知学院大学

なった。3、CL/P 群、CLO 群、CLP 群、CPO 群による多型解析において、*MEOX2* と関連があるのは CPO 群のみであることが明らかとなった。

また、今後は粘膜下口蓋裂患者を対象とした *MEOX2* 遺伝子解析や、*MEOX1* を含めた遺伝子解析を行うことで新たな知見が得られることが期待された。