

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06388

研究課題名(和文) 22q11.2欠失症候群における硬組織形成異常発症機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of hard tissue hypoplasia in 22q11.2 deletion syndrome

研究代表者

藤川 順司 (Fujikawa, Junji)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：40760377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：22q11.2欠失症候群は22番染色体長腕の微細欠失により起こる重篤な先天的発生異常を示す。疾患の特徴として、先天性心疾患、免疫不全症、低カルシウム血症等に加えてエナメル質形成不全を認める。本疾患の原因候補遺伝子としてTbx1等が同定され、TBX1の発現の変化がエナメル質形成不全に影響を与えることが報告されている。しかし、本疾患における歯牙石灰化の程度が患者によって異なることや逆に象牙質石灰化亢進が見られる症例が見出されていることなどから、Tbx1以外にも歯の硬組織形成異常の発症を制御する遺伝子の存在が考えられる。本研究より、Slc25a1、Dgcr2などにその可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：22q11.2 deletion syndrome (22q11.2DS) patients exhibit severe congenital developmental abnormalities caused by small deletion of chromosome 22 chromosome long arm. Severe congenital heart defects are always observed as a phenotype but patients also suffer from immunodeficiency, hypocalcemia, and enamel hypoplasia (low tooth enamel maturation). It has been shown that TBX1 is a candidate gene for this disease. Regarding the tooth mineralization, transgenic mice those differ in the expression of TBX1 influence enamel dysplasia. However, there are conflicting observations in human case, which dentin hypercalcification is observed. Therefore, I hypothesized that there may be genes that control the development of dental hard tissue dysplasia in addition to TBX1. Here, I found possibility for genes such as Slc25a1, Dgcr2 in the deleted region of 22q11.2DS patients.

研究分野：解剖学

キーワード：遺伝子

1. 研究開始当初の背景

22q11.2 欠失症候群は 22 番染色体長腕の微細欠失により起こる疾患である。この症候群は DiGeorge 症候群 (DGS:MIM#188400)、口蓋心臓顔面症候群 (VCFS:MIM#192430) などとしても知られている。発症頻度は 4000 出生に 1 人とも言われおり比較的頻度の高い疾患である。疾患の特徴として、先天性心疾患、胸腺の低形成による免疫不全症、副甲状腺の低形成による先天性低カルシウム血症、口蓋裂、鼻咽腔閉鎖不全、学習障害、腎奇形など様々な臨床症状を呈する。歯の形態形成に関してはエナメル質形成不全、歯牙欠損が挙げられ、22q11.2 欠失症候群罹患者の約 66% でエナメル質形成不全がみられるという報告がある。その症状は罹患者個々で異なり、重篤な場合は、多歯にわたり象牙質が露出することで冷温刺激に対し過敏になることや、多歯にわたる咬耗により咬合が不安定となることで日常生活に大きな支障をきたす。以前は 22q11.2 欠失症候群の患者でエナメル質形成不全の起こる原因が、副甲状腺低形成による低カルシウム血症に起因すると考えられていたが、現在ではそれを否定する根拠も示されている。さらに、発生中の歯胚の上皮に *Tbx1* が発現するが、*Tbx1* の遺伝子発現量を変化させた組換えマウスの表現型解析から、*Tbx1* がエナメル芽細胞の増殖、分化、成熟を制御するということがも示されている。つまり、22q11.2 欠失症候群の患者に見られる歯の石灰化異常は、全身的なミネラル調節異常に起因するのではなく、歯を構成する細胞自律的に起こっていると考えられる。

22q11.2 欠失症候群罹患者にはエナメル質形成不全を有さない人もおり、有していても形成不全の程度はさまざまである。また、以前我々の教室から DiGeorge 症候群罹患者の乳歯において象牙質の石灰化が逆に亢進している症例も報告をしている (Fukui et al, 2000)。これらの事からエナメル質形成不全の重症度が *TBX1* 単独ではなく欠失領域に含まれる他の遺伝子との組み合わせで制御されているという仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

上記の仮説に基づくと、*TBX1* 以外にも歯の硬組織形成異常の発症を制御する遺伝子の存在が考えられる。それらの遺伝子の同定、発現解析、および歯の発生・成熟における機能解析を本研究の目的とする。

3. 研究の方法

1) 欠失領域にコードされる遺伝子の探索

ヒト染色体 22q11.2 領域中の 19~22Mb 間の約 3Mb は Common 22q11.2 deletion 領域と呼ばれ、22q11.2 欠失症候群の患者で高い頻度で同様の欠失が見られる。同領域にコードされる遺伝子をヒトゲノムのデータベース (Ensemble Genome Browser) を用い、網羅的に調べた。

2) PCRによる遺伝子発現解析

1) で探索した遺伝子から機能解析の報告が比較的少ない 15 種類 (*DGCR6*, *DGCR2*, *GSC2*, *SLC25A1*, *HIRA*, *C22orf39*, *MRPL40*, *CDC45*, *SEPT5*, *GP1BB*, *TXNRD2*, *COMT*, *ARVCF*, *TANGO2*, *DGCR8*) を選択し、*TBX1* を加えた 16 種類の遺伝子特異的なプライマーを設計した。生後 2 日齢 ICR マウスから採取した歯胚 (切歯、臼歯) からそれぞれ調整した total RNA を逆転写した cDNA を用いて PCR による発現解析を行った。

3) in situ hybridizationによる遺伝子発現局在解析

PCR によって発現が検出された遺伝子に対して、その遺伝子断片をクローニングし、その断片を鋳型としたプローブを作製、マウス下顎切片を用いて in situ hybridization により歯胚における発現の局在を確認した。

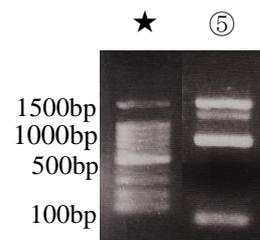
4. 研究成果

1) 欠失領域にコードされる遺伝子の探索

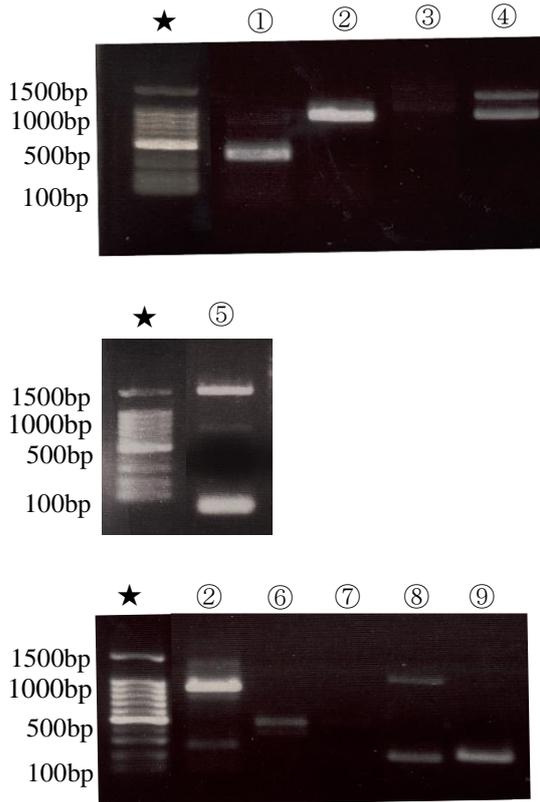
22q11.2 に位置する *DGCR6* 遺伝子から約 3Mb 離れた *MAPK1* 遺伝子まで microRNA を含めて約 140 個の遺伝子がコードされていた。

2) PCRによる遺伝子発現解析

I) 切歯



II) 臼歯



★100bp DNA Ladder

- ① *Tbx1* ② *Dgcr2* ③ *Dgcr6* ④ *Dgcr8*
 ⑤ *Slc25a1* ⑥ *Sept5* ⑦ *Comt* ⑧ *Mrpl40*
 ⑨ *C22orf39*

	<i>Dgcr6</i>	<i>Dgcr2</i>	<i>Gsc2</i>	<i>Slc25a1</i>
切歯	×	○	×	○
臼歯	×	○	×	weak

<i>Hira</i>	<i>C22orf39</i>	<i>Mrpl40</i>	<i>Cdc45</i>
×	○	○	○
×	○	○	○

<i>Sept5</i>	<i>Gp1bb</i>	<i>Tbx1</i>	<i>Txnrd2</i>
weak	×	○	×
weak	×	○	○

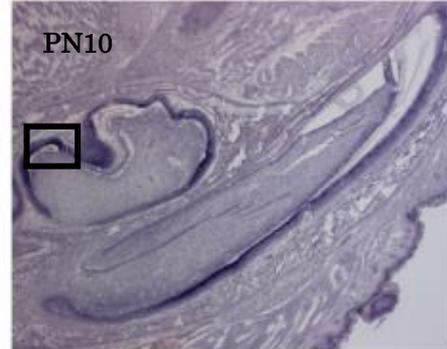
<i>Comt</i>	<i>Arvcf</i>	<i>Tango2</i>	<i>Dgcr8</i>
×	×	×	weak
×	×	×	○

Dgcr2, *Slc25a1*, *C22orf39*, *Mrpl40*, *Cdc45*, *Sept5*, *Tbx1*, *Txnrd2*, *Dgcr8* は切歯、臼歯ともに発現を認めた。また、*Slc25a1*、*Dgcr8* では切歯、臼歯で発現の違いが見られた。

3) in situ hybridizationによる遺伝子発現局在解析

① *Dgcr2*

生後10日野生型マウス歯胚のエナメル芽細胞に*Dgcr2*の発現を認めた。



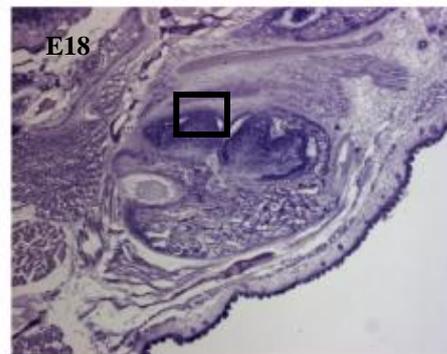
[×25]



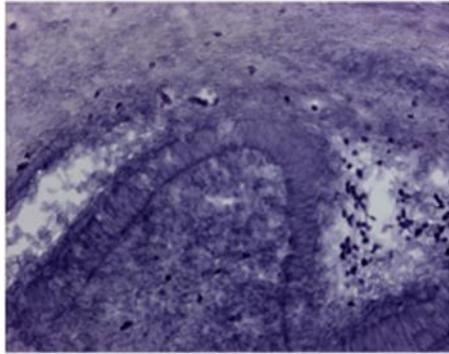
[×250]

② *Slc25a1*:

胎生18日野生型マウス歯胚のエナメル芽細胞および象牙芽細胞で*Slc25a1*の発現を認めた。



[×25]



[×250]

これらの結果より、*Dgcr2*、*Slc25a1* はエナメル芽細胞、象牙芽細胞に発現を認め、これらの遺伝子がエナメル芽細胞ならびに象牙芽細胞の分化段階において特異的に作用する可能性が示唆された。上記以外にも歯胚培養を用いた機能解析も試みたが結果が伴わず、今後に課題を残すこととなった。当初の目的であった *TBX1* 以外の歯の硬組織形成異常の発症を制御する遺伝子の同定、発現解析、および歯の発生・成熟における機能解析までは至らなかったが、*TBX1* 以外にも歯胚を構成する細胞の分化段階特異的に発現する因子が **Common 22q11.2 deletion** 領域内に存在することは本研究により示された。

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 1 件)

Nomir A., Takeuti Y., Fujikawa J., El Sharaby AA., Wakisaka S., Abe M. (2016) Fate mapping of *Trps1* daughter cells during cardiac development using novel *Trps1*-Cre mice. *Genesis* (有) 54:379-388 DOI : 10.1002/dvg.22951

[学会発表] (計 6 件)

- ① Nomir A., Takeuti Y., Fujikawa J., Abe M., Wakisaka S. 「Understanding the case of pleiotropic congenital cardiac defects in patients with TRPS.」 第 122 回大阪大学歯学会例会 (2016 年 7 月 14 日 大阪府吹田市)
- ② 竹内優斗、藤川順司、Nomir Ahemed、鬼頭昭吉、阿部真土、脇坂聡 「骨格パターンニングに異常を示す新規変異マウスの原因遺伝子座の探索」 第 122 回大阪大学歯学会例会 (2016 年 7 月 14 日 大阪府吹田市)
- ③ 藤川順司、Nomir Ahemed、竹内優斗、鬼頭昭吉、阿部真土、脇坂聡 「*Klf4* 遺伝子欠損マウスは頭部、四肢の骨格発生異常を示す」 第 58 回歯科基礎医学学術大会 (2016 年 8 月 24 日～2016 年 8 月 26 日 北海道札幌市)
- ④ Nomir Ahemed、竹内優斗、藤川順司、阿部真土、脇坂聡 「新規 Cre マウスを用い

た TRPS において多彩な先天性心奇形がみられる原因解析」 第 58 回歯科基礎医学学術大会 (2016 年 8 月 24 日～2016 年 8 月 26 日 北海道札幌市)

- ⑤ 藤川順司、鬼頭昭吉、村上旬平、関根伸一、田中健司、杉田英之、谷口あや、秋山茂久 「自然発生変異マウスは顔面頭蓋ならびに中軸骨格に異常を有する」 第 33 回日本障害者歯科学会総会および学術大会 (2016 年 9 月 30 日～2016 年 10 月 02 日 埼玉県さいたま市)
- ⑥ 藤川順司、村上旬平、関根伸一、杉田英之、鬼頭昭吉、秋山茂久 「**22q11.2** 欠失症候群における歯の形成に参与する因子の探索」 第 32 回日本障害者歯科学会総会および学術大会 (2015 年 11 月 06 日～2015 年 11 月 08 日 愛知県名古屋市)

[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

藤川 順司 (Fujikawa Junji)
大阪大学歯学部附属病院・医員
研究者番号：40760377