

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05551

研究課題名(和文)次世代型高解像度逆遺伝学を駆使した歯牙形成異常関連遺伝子の構造機能相関の解明

研究課題名(英文)Elucidation of structural-functional relationships of genes related to teeth agenesis using reverse genetics

研究代表者

泰江 章博(YASUE, Akihiro)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：80380046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：Msx1は歯の発生初期に非常に重要で、古くから多数歯欠損症の原因遺伝子として知られている遺伝子であり、その各機能ドメインもよく研究されてきた。しかし、それらはすべて培養細胞レベルであり、生体における解析は技術ならびに費用の問題も大きく立ちはだかっていたこともあり、ほぼ全くなされてこなかった。しかし、近年開発され発展著しいゲノム編集技術により、我々はマウスを対象に、生体レベルにおけるMsx1遺伝子各ドメインの機能解析を行ってきた。その結果、ホメオドメインより下流のMH5、MH6ドメインが歯牙ならびに骨形成に重要であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織・器官の発生過程における遺伝子機能の解析は、培養細胞系では困難な場合が多く、特に発生学研究の主役である転写因子の生体での解析には一定の歯止めがかかって来たのが現状である。これに伴い、ヒトで遺伝子変異が検出された場合も、本当に疾患責任変異かどうかの判定も困難な場合が多い。しかし、今回、動物を用いて検出変異の疾患責任性を検証することが可能とわかり、正しい遺伝子診断への展開も期待できるようになった。

研究成果の概要(英文)：Msx1 is known as a causative gene for tooth agenesis and is also important for tooth development in mice. Its functional domains have been well studied using cultured cells, on the other hand, the analysis using mice has not been performed because the problem of the gene disruption technology and the cost. Then, we have tried functional analysis of each domain of the Msx1 gene in mice using the genome editing technology that has been developed in recent years. We found that the MH5 and MH6 domains downstream of the homeodomain are important for tooth and bone formation.

研究分野：歯の発生

キーワード：歯の発生 ゲノム編集

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯や毛、乳腺、肺、四肢といった、形態形成を上皮・間葉相互作用に依存する組織・器官の発生過程における遺伝子機能の解析は、単一細胞成分で通常検討される培養細胞系では困難で、特に、発生学研究の主役である転写因子の *in vivo* での解析には一定の歯止めがかかって来たのが現状であった。

一方、我々は、歯牙欠損症家系の疾患原因遺伝子探索において、歯の発生過程初期の間葉で発現する転写因子 **MSX1** の C 末端領域の高度に保存された **Msx Homology 6 (MH6)** ドメインに **frameshift (FS)** を生じる変異を検出し、**CRISPR/Cas** システムで同領域を破壊したホモ接合体マウスを作製したところ、上顎第 3 臼歯、下顎第 2・第 3 臼歯ならびに下顎切歯を欠失するものの口蓋裂を発症せずに生存するという、従来のノックアウトマウスとは異なる表現型を得た。このことは、既知の疾患原因遺伝子の変異が、変異の種類により、機能獲得・変化・喪失や局在変化など様々な機能変化を介して多彩な表現型を示し得ることを示し、遺伝疾患の病態から表現型を理解し病歴を予測していくには、各原因遺伝子について **KO** マウスのような遺伝子無効化ではなく、*in vivo* での各ドメインレベルの変異による機能変化と表現型との関連の詳細な解明が必要であることを強く示唆した。

2. 研究の目的

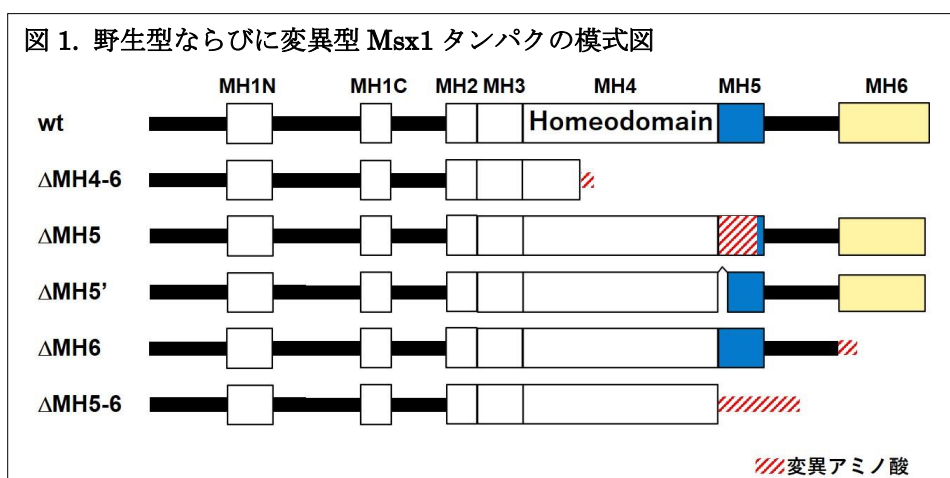
以上のような背景から、本課題では、歯の発生初期に発現しその変異が顎顔面疾患形成に関与する転写因子を中心に、各機能ドメインや **isoform** 別のプロモーター領域などの重要構造領域の網羅的 *in vivo* deletion 変異マウスを作製し、表現型を確認するとともに、経時的に摘出歯胚など生理的発生組織より **RNA** を抽出し次世代シーケンサーを用いた **RNA-seq** で解析することで中間表現型としての遺伝子発現の経時変化パターンを検出して比較し、今後機能ゲノミクスでの重要課題となる *in vivo* での遺伝子内構造毎の機能アノテーション付けを行うことを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) ゲノム編集技術を用い、機能領域欠失変異体を網羅的に作製する。交配による様々な組合わせのホモ・ヘテロ接合体も作製する。
- (2) 表現型の詳細な評価を行い、比較検討する。
- (3) 網羅的遺伝子発現を対象遺伝子の発現組織から発現時期にあわせて継時的に解析し、パターンを確認すると共に、*in vitro* へのフィードバックも含め validation を行い、比較検討する。
- (4) 上記結果を統合し歯の発生過程における重要転写因子分子機能のアノテーション付けを行う。

4. 研究成果

多数歯欠損症の原因遺伝子で変異の報告も多く、また機能ドメインも複数あり、*in vitro* 系で古くより良く研究されている **Msx1** 遺伝子を対象とし、**CRISPR/Cas** システムを利用し、ホメオドメインである **MH4** より下流のドメインを標的として、配列破壊を行った結果、【図 1】に示すような変異型を得た。



そこで、これらのホモ接合体を作製したところ、一例ではあるが、【図 2】に示すような非常に多岐にわたる歯数や歯牙形態における表現型が得られた。

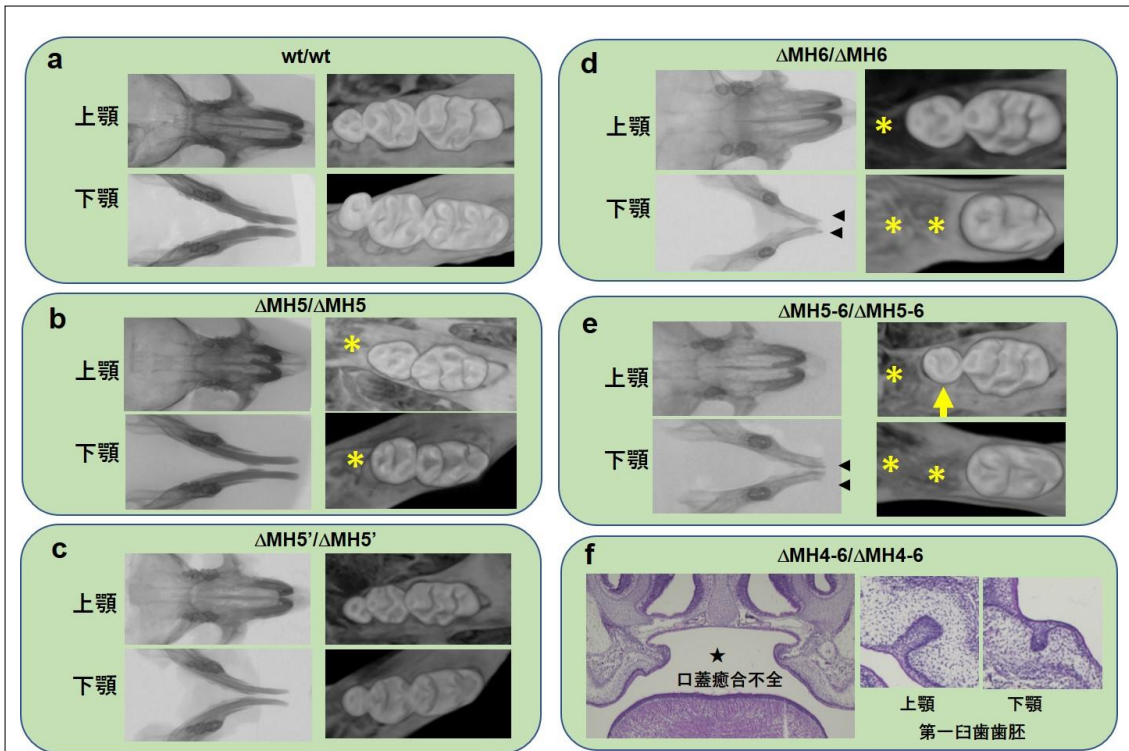


図 2. 各 *Msx1* 変異型のホモ接合体における歯数・歯冠形態変化

- a: wt/wt: 野生型。上下顎それぞれに切歯ならびに第一・第二・第三臼歯が存在する。
- b: Δ MH5/ Δ MH5: 上下顎第三臼歯の欠損。
- c: Δ MH5'/ Δ MH5': 歯牙欠損を認めない。
- d: Δ MH6/ Δ MH6: 上顎第三臼歯、下顎切歯・第二・第三臼歯の欠損（上顎第二臼歯の矮小化）。約 3 割に口蓋癒合不全。
- e: Δ MH5-6/ Δ MH5-6: 上顎第三臼歯、下顎切歯・第二・第三臼歯の欠損（上顎第二臼歯の矮小化）。約 7 割に口蓋癒合不全。
- f: Δ MH4-6/ Δ MH4-6: 従来のホメオドメインを破壊した KO マウス同様、蕾状期での歯の発生停止ならびに口蓋の癒合不全が認められる。

また、【図 3】に示すよう、*Msx1* 遺伝子 C 末端領域欠失のホモ接合体において、歯への影響だけでなく、頭蓋骨前後径の短縮や鼻彎曲、頭蓋骨の部分的な閉鎖不全等、骨形成における影響が認められた。

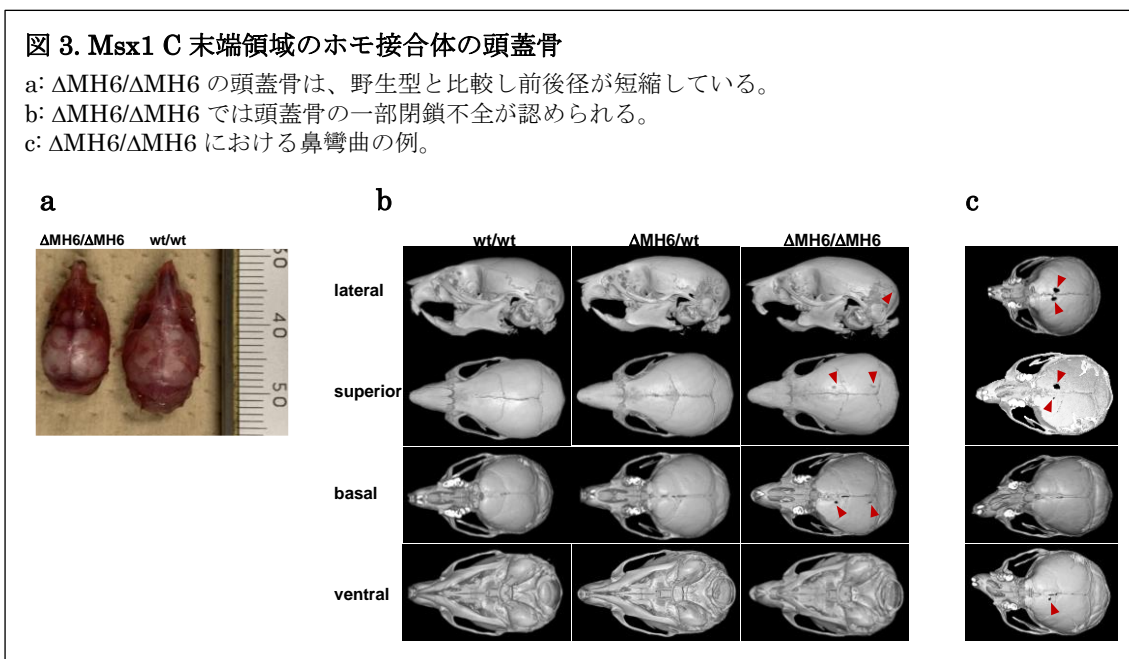


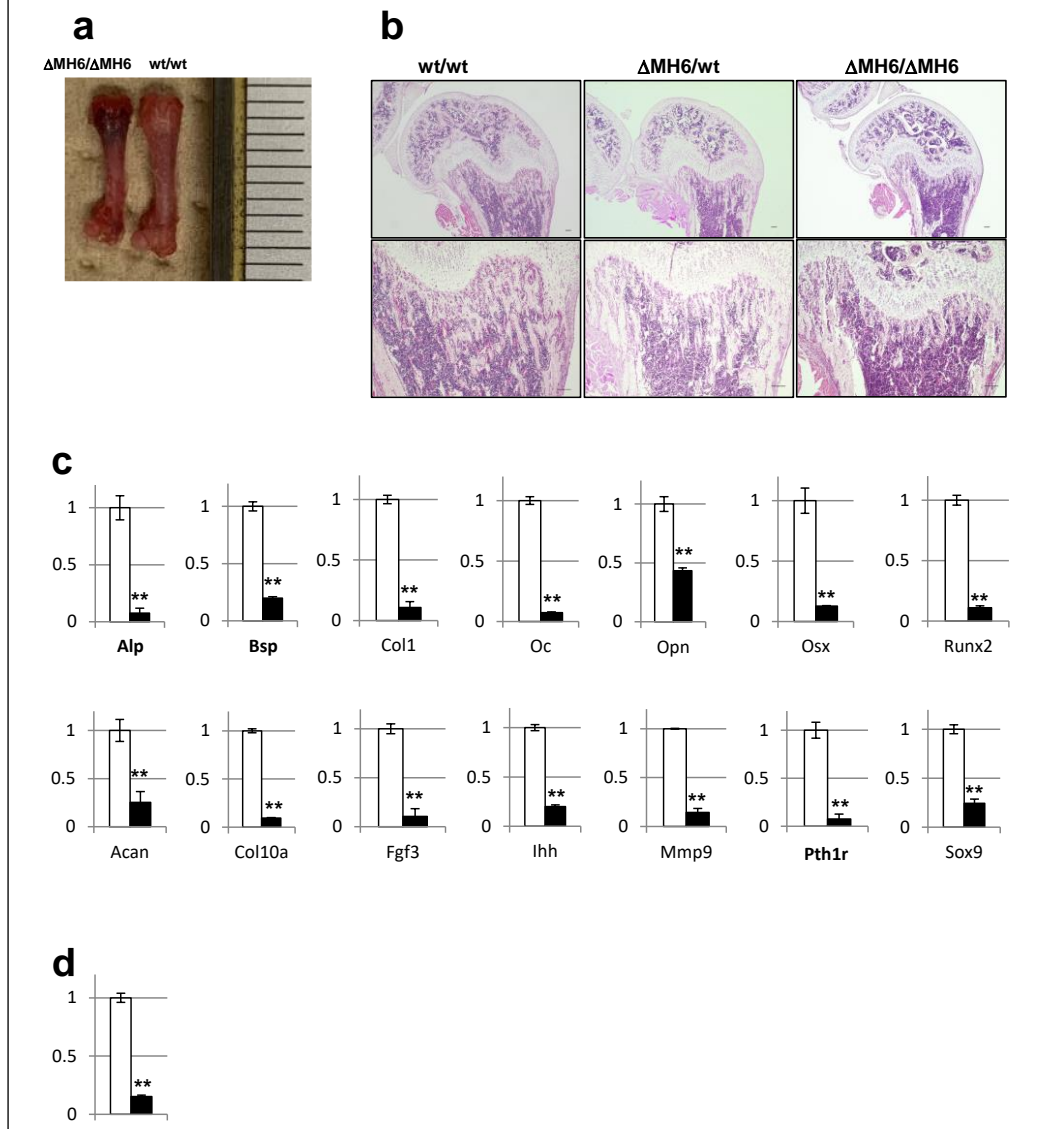
図 3. *Msx1* C 末端領域のホモ接合体の頭蓋骨

- a: Δ MH6/ Δ MH6 の頭蓋骨は、野生型と比較し前後径が短縮している。
- b: Δ MH6/ Δ MH6 では頭蓋骨の一部閉鎖不全が認められる。
- c: Δ MH6/ Δ MH6 における鼻彎曲の例。

さらに、【図 4】に示すよう、*Msx1* 遺伝子 C 末端領域欠失のホモ接合体では、大腿骨長が野生型と比較し短小かつ骨密度も低下していた。さらに、骨形成関連マーカーも全体的に発現低下を見せるだけでなく、*Msx1* 自体の発現も低下していた。

図 4. *Msx1* C 末端領域のホモ接合体の大腿骨

- a: Δ MH6/ Δ MH6 の大腿骨長は、野生型と比較し短縮している。
 b: Δ MH6/ Δ MH6 では大腿骨頭における骨密度低下が認められる。
 c: 野生型と比較し、 Δ MH6/ Δ MH6 では大腿骨頭における各骨分化マーカーの発現低下が認められる。
 d: *Msx1* 遺伝子発現自体も Δ MH6/ Δ MH6 において、野生型と比較し発現低下している。



これらの結果より、*Msx1* 遺伝子 C 末端領域は歯ならびに骨形成に重要であることが示唆されただけでなく、ゲノム編集技術を用いることで、in vivo DNA deletion を行うことが可能であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Nagai T, Trakanant S, Kawasaki M, Kawasaki K, Yamada Y, Watanabe M, Blackburn J, Otsuka-Tanaka Y, Hishinuma M, Kitatmura A, Meguro F, Yamada A, Kodama Y, Maeda T, Zhou Q, Saijo Y, Yasue A, Sharpe PT, Hindges R, Takagi R, Ohazama A.	4. 巻 248
2. 論文標題 MicroRNAs control eyelid development through regulating Wnt signaling.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dev Dyn	6. 最初と最後の頁 201-210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.10. Epub 2019 Feb 4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 市原 亜起, 堀内 信也, 小笠原 直子, 森 浩喜, 天知 良太, 渡邊 佳一郎, 木内 奈央, 泰江 章博, 田中 栄二	4. 巻 30
2. 論文標題 徳島大学病院矯正歯科における口唇裂・口蓋裂患者の永久歯の歯数異常に関する調査	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 中四国矯正歯科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 51-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小笠原 直子, 岩浅 亮彦, 堀内 信也, 市原 亜起, 泰江 章博, 川合 暢彦, 井澤 俊, 田中 栄二	4. 巻 30
2. 論文標題 矯正患者における永久歯の先天性欠如に関する臨床統計調査	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 中四国矯正歯科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 59-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwasa A, Horiuchi S, Kinouchi N, Izawa T, Hiasa M, Kawai N, Yasue A, Hassan AH, Tanaka E.	4. 巻 6
2. 論文標題 Skeletal anchorage for intrusion of bimaxillary molars in a patient with skeletal open bite and temporomandibular disorders.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Orthod Sci	6. 最初と最後の頁 152-158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/jos.JOS_63_17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fischer C, Seki T, Lim S, Nakamura M, Andersson P, Yang Y, Honek J, Wang Y, Gao Y, Chen F, Samani NJ, Zhang J, Miyake M, Oyadomari S, Yasue A, Li X, Zhang Y, Liu Y, Cao Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 A miR-327-FGF10-FGFR2-mediated autocrine signaling mechanism controls white fat browning.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 2079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-02158-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kinouchi N, Horiuchi S, Yasue A, Kuroda Y, Kawai N, Watanabe K, Izawa T, Hashimoto I, Hassan AH, Tanaka E.	4. 巻 39
2. 論文標題 Effectiveness of presurgical nasoalveolar molding therapy on unilateral cleft lip nasal deformity.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Saudi Med J	6. 最初と最後の頁 169-178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15537/smj.2018.2.21020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanihara F, Takemoto T, Kitagawa E, Rao S, Do LT, Onishi A, Yamashita Y, Kosugi C, Suzuki H, Sembon S, Suzuki S, Nakai M, Hashimoto M, Yasue A, Matsuhisa M, Noji S, Fujimura T, Fuchimoto D, Otoi T.	4. 巻 14
2. 論文標題 Somatic cell reprogramming-free generation of genetically modified pigs.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Sci Adv	6. 最初と最後の頁 e1600803
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.1600803	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mitsui SN, Yasue A, Masuda K, Naruto T, Minegishi Y, Oyadomari S, Noji S, Imoto I, Tanaka E.	4. 巻 5
2. 論文標題 Novel human mutation and CRISPR/Cas genome-edited mice reveal the importance of C-terminal domain of MSX1 in tooth and palate development.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 38398
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep38398	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yasue A, Kono H, Habuta M, Bando T, Sato K, Inoue J, Oyadomari S, Noji S, Tanaka E, Ohuchi H.	4. 巻 7
2. 論文標題 Relationship between somatic mosaicism of Pax6 mutation and variable developmental eye abnormalities-an analysis of CRISPR genome-edited mouse embryos.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-00088-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ichihara A, Yasue A, Mitsui SN, Arai D, Minegishi Y, Oyadomari S, Imoto I, Tanaka E	4. 巻 526
2. 論文標題 The C-terminal Region Including the MH6 Domain of Msx1 Regulates Skeletal Development.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 62-69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitahara A, Ran Q, Oda K, Yasue A, Abe M, Ye X, Sasaoka T, Tsuchida M, Sakimura K, Ajioka Y, Saijo Y, Zhou Q	4. 巻 31
2. 論文標題 Generation of Lungs by Blastocyst Complementation in Apneumic Fgf10-Deficient Mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 107626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.107626.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 泰江 章博, 白井 愛実, 古谷 昌弘, 田中 栄二
2. 発表標題 二分割Le Fort I型骨切り術併用による上下顎移動術を行った下顎側方偏位例
3. 学会等名 第28回 日本顎変形症学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasue A, Arai D, Mitsui SN, Oyadomari S, Tanaka E
2. 発表標題 Functional verification of each Msx homology domain of Msx1 gene for tooth morphogenesis using CRISPR/Cas system
3. 学会等名 第50回日本発生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasue A, Mitsui SN, Arai D, Tanaka E
2. 発表標題 In vivo functional analysis of MSX1 conserved domains in mice using CRISPR/Cas system
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasue A, Arai D, Mitsui SN, Oyadomari S, Tanaka E
2. 発表標題 In vivo deletion assay of mouse MSX1 gene using CRISPR/Cas system
3. 学会等名 第65回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 泰江章博、荒井大志、三井シルビアなおみ、親泊政一、田中栄二
2. 発表標題 CRISPR/Casシステムを用いたマウスMsx1遺伝子in vivo DNA deletion assay
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akihiro Yasue, Takuya Naruto, Silvia Naomi Mitsui, Tomohiro Kohmoto, Issei Imoto, Eiji Tanaka
2. 発表標題 Detection of small deletion in PAX9 gene in a Japanese family with oligodontia by combined targeted resequencing and quantitative PCR analysis
3. 学会等名 12th International Conference on Tooth Morphogenesis and Morphogenesis (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 泰江章博
2. 発表標題 多数歯欠損症 一原因遺伝子探索とin vivo機能解析一
3. 学会等名 第75回日本矯正歯科学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Akihiro Yasue, Silvia Naomi Mitsui, Daishi Arai, Seiichi Oyadomari, Eiji Tanaka
2. 発表標題 In vivo DNA deletion assay of Msx1 gene in mice using CRISPR/Cas system
3. 学会等名 Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Habuta M, Yasue A, Suzuki K, Fujita H, Bando T, Sato K, Oyadomari S, Tanaka E, Ohuchi H
2. 発表標題 Higher amount of the Fgf10 gene product is required for the accessory lobe formation and type 2 alveolar cell differentiation in the mouse lung as revealed by Fgf10-mosaic mutants generated by genome-editing.
3. 学会等名 第59回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsui SN, Yasue A, Horiuchi S, Oyadomari S, Tanaka E
2. 発表標題 Rogdi plays an important role during enamel mineralization.
3. 学会等名 第59回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsui SN, Yasue A, Horiuchi S, Oyadomari S, Tanaka E
2. 発表標題 Rogdi plays an important role during bone and enamel development.
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Arai D, Yasue A, Mitsui SN, Ichihara A, Sawada M, Oyadomari S, Tanaka E
2. 発表標題 Functional verification of C-terminal domain of Msx1 gene in mice for craniofacial development.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市原亜起, 泰江章博, 三井なおみ, 荒井大志, 沢田正樹, 親泊政一, 田中栄二
2. 発表標題 骨形成に関するMsx1遺伝子C末端領域の機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Arai D, Yasue A, Mitsui SN, Oyadomari S, Tanaka E
2. 発表標題 In vivo functional analysis of C-terminal domain of Msx1 gene in mice for craniofacial development.
3. 学会等名 European Developmental Biology Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市原亜起、泰江章博、荒井大志、沢田正樹、三井なおみ、親泊政一、田中栄二
2. 発表標題 多数歯欠損症の原因遺伝子Msx1のC末端領域は骨形成において重要である
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒井大志、泰江章博、三井なおみ、親泊政一、田中栄二
2. 発表標題 歯の形態形成におけるMsx1遺伝子MH6ドメインの機能検証
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田中 栄二 (TANAKA Eiji) (40273693)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授 (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	大内 淑代 (OHUCHI Hideyo) (00253229)	岡山大学・医歯（薬）学研究部・教授 (15301)	
連携研究者	井本 逸勢 (IMOTO Issei) (30258610)	愛知県がんセンター（研究所）・分子遺伝学分野・分野長 (83901)	