

令和元年6月14日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11813

研究課題名(和文) 正中過剰歯発症に関わる遺伝要因の解明

研究課題名(英文) Analysis of the genetic factor for mesiodens formation

研究代表者

清水 武彦 (SHIMIZU, Takehiko)

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：40328761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、上顎正中過剰歯発症に関与する遺伝子の解明である。上顎正中過剰歯群と対照群の一塩基多型(SNP)ジェノタイピングアレイ解析を行い、アレル頻度で19番染色体、X染色体、2番染色体上に両群間で示唆的な差を示すSNPが検出されたことから、これらの染色体上に上顎正中過剰歯発症に関わる遺伝要因が存在する可能性が示唆された。また、げっ歯類において上顎切歯部過剰歯発症と関連が報告されている5遺伝子、および歯の初期発生に関与する16遺伝子中の高頻度SNPのアレルの頻度を両群間で調査したが、有意な差は検出されず、他の多型が原因である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上顎正中過剰歯は、永久前歯の位置異常や発育障害の原因となるため、治療の原則は過剰歯の早期診断と抜去である。本研究の成果は、上顎正中過剰歯発症の早期診断を行うために、遺伝子マーカーを用いた遺伝子検査確立のための新たな方略、方向性を示すものであり、今後の歯科臨床の発展に大きく寄与するものと考えられる。本研究の成果は、今後19、X、2番染色体上の遺伝子のさらなる調査の可能性を示したとともに、上顎正中過剰歯発症に関与する歯の初期発生関連遺伝子の多型マーカーは、高頻度の一塩基多型の箇所ではなく、より稀な頻度で現れる他の多型の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：A mesiodens is the most common supernumerary tooth present in the maxillary incisor area. This study aimed to identify genes associated with susceptibility to mesiodens formation. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) genotyping array analysis revealed that suggestive differences between mesiodens group and controls in allele frequencies of SNPs on chromosome 19, X and 2.

Allele frequencies of 5 SNPs in genes associated with supernumerary incisor formation in rodents were compared between the two groups. In addition, SNPs in 16 genes associated with the initiation of odontogenesis were tested. No positive polymorphisms were found in the tested SNPs between the two groups. These results suggest that these SNPs might not be candidates of genetic marker for mesiodens formation.

研究分野：小児歯科学

キーワード：正中過剰歯 遺伝要因 一塩基多型 SNP

1. 研究開始当初の背景

過剰歯は、何らかの原因により歯胚が過剰に形成され歯数の過剰をきたす硬組織疾患であり、小児歯科臨床において、過剰歯症例に遭遇することは少なくない。Brook¹⁾は、乳歯列で0.8%、永久歯列で2.1%の過剰歯の発現率を報告している。歯科臨床の場で上顎正中過剰歯が原因となり永久前歯の萌出障害や位置異常を認める症例に頻繁に遭遇する。正中過剰歯は逆生に埋伏していることが多く、永久前歯の重度発育障害の原因にもなり、歯列不正が重篤化し治療が困難になることがある。従って、小児の健全な歯列発育を誘導する上で、正中過剰歯発症の原因を探求することは大変意義深い。

正中過剰歯が家族性に発症しているケースに遭遇することがあり、その発症には遺伝要因の影響が強いと考えられている²⁾。また、過去の正中過剰歯の疫学研究の大部分において男性に多く発症することが報告されており、このことから遺伝要因の影響が強いと考えられる。さらに、一卵性双生児の両者に正中過剰歯が発症している症例報告は、遺伝要因の関与を裏付けている³⁾。しかし、ヒトにおいて正中過剰歯の遺伝学的研究は疫学研究に留まっており、詳細なゲノム解析や遺伝子解析は世界的にみても殆ど行われておらず原因は未知である。

疾患感受性は環境要因の影響は受けるものの、SNP (Single Nucleotide Polymorphism: 一塩基多型) を始めとする遺伝子のDNA配列の違いによって生じている場合が多い。遺伝性疾患の原因遺伝子を同定するための手法として、SNPを用いたゲノムワイドスクランにより候補遺伝子を検出し、特定の遺伝子のSNP解析を行うことで疾患の原因と結びつける手法が世界的に行われている。

2. 研究の目的

疾患感受性は環境要因の影響は受けるものの、一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) を始めとする遺伝子のDNA配列の違いによって生じていることが多いとされる。遺伝性疾患の原因遺伝子を同定するための手法として、SNPを用いたゲノムワイドスクランにより候補遺伝子を検出し、特定の遺伝子のSNP解析を行うことで疾患の原因と結びつける手法が世界的に行われている。本研究では正中過剰歯発症に関わる遺伝要因を解明するために、全染色体の一塩基多型 (SNP) 解析を行い、正中過剰歯発症に関わる遺伝子を検出することを目的とした。また、過去にげっ歯類において、上顎切歯部過剰歯の原因であることが示唆されている遺伝子および、歯の初期発生にかかわる遺伝子についてSNP解析を行い、上顎正中過剰歯発症に関わる遺伝子を検出することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 被検者および試料

被験者として、口腔内診査、エックス線検査および問診により家族性に上顎正中過剰歯を発症した者24人を上顎正中過剰歯群とし、コントロール群は、エックス線検査および問診により上顎正中過剰歯の家族歴が無い者24人とした。

正中過剰歯群では、小児歯科外来において診療行為の一環として抜去した過剰歯に付着する軟組織2mm³を1.5mlプラスチックチューブに採取し、DNeasy® Blood & Tissue kit (QIAGEN)を用いておよそ1µgのDNAを抽出した。また、過去に正中過剰歯を抜去した既往のある者については、唾液2mlをDNA self-collection Kit (Oragene®・DNA(株)共同インターナショナル)に採取し、およそ1µgのDNAを抽出した。コントロール群からは、同様に唾液2mlを採取し、およそ1µgのDNAを抽出した。本研究は本学部倫理委員会の承認 (EC14-001、EC16-15-012-1)を受けて実施した。

(2) ゲノムDNA増幅と定量

正中過剰歯群、コントロール群それぞれから抽出したゲノムDNAを一塩基多型分析に必要なDNA量に増幅するために、illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社)を用いた。超微量分光光度計NanoDrop2000 (Thermo)を用い、増幅したDNAの吸光度測定を行った。

(4) SNPジェノタイピング解析

家族性正中過剰歯群とコントロール群のDNAサンプルのクオリティーチェック及び、SNPジェノタイピングアレイによるジェノタイピングを行った。本解析では、いずれの操作もIllumina Infinium HTS Assay Manual Protocolに従い行った。なお、BeadChipにはHumamOmniExpress-24 v1.0(Illumina, Inc.)を用いた。得られた蛍光イメージからのSNPコールにはGenome Studio (Illumina, Inc.)を用いた。この結果から、カイ二乗検定を用いて正中過剰歯群とコントロール群のアレル頻度の統計分析を行い、両者間で差のあるSNPを検出した。

SNPジェノタイピングアレイ解析の結果から興味あるSNPを抽出し、SNPジェノタイピングアレイにより遺伝子型の判定がエラーとなったSNPについて、Taqman® SNP genotyping Assay Human SM (applied biosystems)とQuantStudio 6 Flex Real-Time PCR Systems (applied biosystems)を用いて、遺伝子型を判定した。

過去のげっ歯類を用いた研究報告において、Sostdc1, Lrp4, Cebpb, Apc欠損マウスならびにPax6変異ラットにおいて、切歯領域に正中過剰歯が生じ、これらの遺伝子が切歯部過剰歯発症に関与することが報告されている。従って、これらの遺伝子内から日本人で高頻度のSNPを選択し解析対象とした。また、上顎正中過剰歯の発症には、歯の初期発生に関わる遺伝子群が関与しているという仮説を立て、歯の初期発生に関与することが報告されている遺伝子群である、TP63、PITX2、LEF1、BMP2、BMP4、FGF9、FGF20、WNT10A、WNT10B、EDA、EDAR、MSX1、MSX2、PAX9、LHX6、RUNX2の16遺伝子に着目し、これらの遺伝子内から、日本人で高頻度のSNPを選択し解析対象とした。Taqman SNP ジェノタイピング解析により遺伝子型を判定し、カイ二乗検定を用いて正中過剰歯群とコントロール群のアレル頻度の統計分析を行い、両者間で差のあるSNPを検出した。

4. 研究成果

(1) 遺伝様式

本研究において、家族性正中過剰歯群の中には三世代にわたり正中過剰歯を発症した家族がみられた。また、正中過剰歯が兄弟姉妹間に認められたが、その両親には認められなかった家族が複数認められた。このことから、正中過剰歯の遺伝様式は不完全浸透率を有する優性遺伝性である可能性が示唆された。

(2) SNPジェノタイピングアレイ解析

有意水準をBonferroni法により $P < 7 \times 10^{-8}$ とした場合、SNPジェノタイピングアレイ解析より、統計学的に有意な差を示したSNPは検出できなかった。そこで、アレル頻度で $P < 1 \times 10^{-5}$ のSNPを示唆的に差があるとして抽出し、19番染色体上にrs354000、rs354009、rs354020、rs354021、rs354026、rs11669675を、X染色体上にrs5909017、rs6528850を、2番染色体上にrs2576789を検出した(表1)。

表1 SNP解析(アレル頻度)

19番染色体						
SNP	コントロール群	家族性正中過剰歯群	P値	ポジション (base pairs)	日本人のアレル頻度	
rs354000	G/T 42/2	G/T 23/25	0.000001	49,279,844 *1	C87% / T13% *2	
rs354009	A/G 6/42	A/G 27/21	0.000006	49,297,570	A16% / G84%	
rs354020	A/C 42/6	A/C 20/28	0.000003	49,335,634	A81% / C19%	
rs354021	T/C 6/42	T/C 28/20	0.000003	49,335,758	T19% / C81%	
rs354026	T/G 42/6	T/G 20/28	0.000003	49,337,797	T81% / G19%	
rs11669675	A/C 29/19	A/C 6/40	0.000002	49,421,951	A51% / C49%	

X染色体						
SNP	コントロール群	家族性正中過剰歯群	P値	ポジション (base pairs)	日本人のアレル頻度	
rs5909017	A/C 31/17	A/C 9/39	0.000005	140,099,776	A66% / C34%	
rs6528850	A/G 38/10	A/G 15/33	0.000002	141,409,951	A58% / G42%	

2番染色体						
SNP	コントロール群	家族性正中過剰歯群	P値	ポジション (base pairs)	日本人のアレル頻度	
rs2576789	G/A 20/28	G/A 41/7	0.000008	105,194,762	G60% / A40%	

*1 Ensembleデータベース

*2 Hapmapデータベース

19番染色体上に正中過剰歯群とコントロール群の間に示唆的な差を示すSNPが検出されたことから、19番染色体上に家族性正中過剰歯発症に関わる遺伝要因が存在する可能性が示唆された。また、X染色体上に興味あるSNPが検出された。この結果は、女性の発症率が低いことと関連がある可能性が考えられ、X染色体の不活性化が女性の発症率が低いことと関連を持っている可能性が示唆された。

(3) げっ歯類の切歯部過剰歯の原因遺伝子群のヒトにおけるSNP解析

過去の研究において、Sostdc1、Lrp4、Cebpb、Apc欠損マウスならびにPax6変異ラットで切歯領域に過剰歯が生じ、これらの遺伝子が切歯部過剰歯発症に関与することが報告されている。げっ歯類において切歯部過剰歯形成への関与が報告されているこれらの5遺伝子はヒトにおいても遺伝子の存在が確認されたため、各遺伝子の日本人高頻度のSNPsであるrs12699798、rs2306037、rs2431512、rs2239789、rs6095811を用いてジェノタイピング解析を行った。解析の結果から、SNPのアレル頻度と上顎正中過剰歯発症の関連の有無を解析した。本解析の結果、上顎正中過剰歯群とコントロール群間で、げっ歯類の切歯部過剰歯の形成に関与する5

遺伝子を対象として日本人に最も高い頻度で現れるSNPのアレル頻度について調査したが、有意な差は認められなかった（表2）。

表2 動物モデルにおいて切歯部過剰歯発症に関与する遺伝子内のSNPsのアレルの頻度の比較

遺伝子	SNP	アレル	上顎正中過剰歯群 (n=24)	コントロール群 (n=24)	P値	日本人頻度*
<i>CEBPB</i>	rs6095811	C	25	19	0.22	58%
		T	23	29		42%
<i>PAX6</i>	rs2239789	A	26	16	0.04	49%
		T	22	32		51%
<i>SOSTDC1</i>	rs12699798	A	23	26	0.54	46%
		G	25	22		54%
<i>APC</i>	rs2431512	C	11	14	0.49	29%
		T	37	34		71%
<i>LRP4</i>	rs2306037	C	28	33	0.29	53%
		G	20	15		47%

* International HapMap Project

(4) 歯の初期発生に関わる遺伝子群のSNP解析

上顎正中過剰歯の発症には、歯の初期発生に関わる遺伝子群が関与しているという仮説を立て、歯の初期発生に関与することが報告されている遺伝子である、TP63、PITX2、LEF1、BMP2、BMP4、FGF9、FGF20、WNT10A、WNT10B、EDA、EDAR、MSX1、MSX2、PAX9、LHX6、RUNX2の16遺伝子にあるSNPを調査した。これらの遺伝子で日本人において高頻度で出現する各1SNPを用いてTaqman PCR法にてジェノタイプ解析を行った。各SNPのアレル頻度と上顎正中過剰歯発症の関連の有無を解析した。上顎正中過剰歯群とコントロール群間で、日本人に高い頻度で現れるSNPのジェノタイプおよびアレルの頻度について調査したが、両群間で有意な差は認められなかった（表3, 4）。これらの結果から、上顎正中過剰歯発症に関与する遺伝子マーカーは、高頻度のSNP箇所ではなくより稀な頻度で現れる他の多型の可能性が示唆された。

表3 歯の初期発生に関与する遺伝子内のSNPsのアレルの頻度の比較

遺伝子	SNP	アレル	上顎正中過剰歯群 (n=24)	コントロール群 (n=24)	P値	日本人頻度*
<i>PITX2</i>	rs3796902	C	30	38	0.09	67%
		T	18	10		33%
<i>LEF1</i>	rs10022956	C	20	22	0.68	37%
		T	28	26		63%
<i>EDAR</i>	rs3827760	C	37	42	0.18	80%
		T	11	6		20%
<i>MSX1</i>	rs3775261	A	29	27	0.68	55%
		C	19	21		45%
<i>RUNX2</i>	rs1321081	G	15	20	0.29	35%
		A	33	28		65%
<i>FGF9</i>	rs4770190	C	23	30	0.15	61%
		A	25	18		39%
<i>FGF20</i>	rs10106536	C	28	24	0.41	47%
		T	20	24		53%
<i>WNT10A</i>	rs2385199	G	8	10	0.60	26%
		A	40	38		74%

* International HapMap Project

表4 歯の初期発生に関与する遺伝子内のSNPsのアレルの頻度の比較

遺伝子	SNP	アレル	上顎正中 過剰歯群 (n=24)	コントロー ル群 (n=24)	P値	日本人頻度*
<i>BMP4</i>	rs2071047	C	18	15	0.52	49%
		T	30	33		51%
<i>BMP2</i>	rs1005464	G	20	27	0.15	56%
		A	28	21		44%
<i>PAX9</i>	rs17176643	A	24	26	0.68	47%
		C	24	22		53%
<i>LHX6</i>	rs10818649	C	17	20	0.53	44%
		T	31	28		56%
<i>TP63</i>	rs11915751	C	18	16	0.67	44%
		T	30	32		56%
<i>MSX2</i>	rs4868442	G	34	42	0.04	74%
		A	14	6		26%
<i>WNT10B</i>	rs833843	C	25	23	0.68	41%
		T	23	25		59%
<i>EDA</i>	rs6625561	C	31	27	0.40	70%
		T	17	21		30%

* International HapMap Project

<引用文献>

- 1) Brook A: Dental Anomalies of number, form and their prevalence in British school children, J. Int. Assoc. Dent. Child., 5: 37-53, 1974
- 2) Nakamura T, Fukumoto S: Genetics of supernumerary tooth formation, Journal of Oral Biosciences, 55:180-183, 2013.
- 3) Langowska-Adamczyk H, Karman´ska B: Similar locations of impacted and supernumerary teeth in monozygotic twins: A report of 2 cases, Am J Orthod Dentofacial Orthop, 119:67-70, 2001.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① 清水武彦、歯科疾患の発症リスクを遺伝から考える、歯界展望、査読なし、132巻1号、2018、5-8.

[学会発表] (計3件)

- ① 清水武彦、口腔疾患の発症リスクを遺伝から考える、日本小児歯科学会関東地方会第32回大会、2017年10月1日、松戸市.
- ② Kimura N, Watanabe C, Shimizu T、Genetic Mapping of Supernumerary Teeth in the Maxillary Incisor Area、IADR、2017年3月23日、San Francisco、USA.
- ③ 木村奈緒、渡邊千尋、清水武彦、上顎正中過剰歯発症に関わる遺伝学的研究、第54回日本小児歯科学会、2016年5月25日、東京.

6. 研究組織

研究代表者ひとりで行った研究である。

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。