

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390394

研究課題名（和文） 遺伝性エナメル質形成不全症の原因探査と遺伝子診断法の企画

研究課題名（英文） Investigation of the cause of the hereditary amelogenesis imperfecta and planning of the genetic diagnosis.

研究代表者

新谷 誠康 (SHINTANI SEIKOU)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：90273698

研究成果の概要（和文）：我々は7つのエナメル質形成不全症原因候補遺伝子および2つの疑わしい遺伝子のコード領域、それに隣接したイントロンおよびプロモーター領域の塩基変異を分析した。その結果、12か所の変異を確認するに至った。ENAM 遺伝子に見つかったアミノ酸残基が Pro から Leu に置換する変異 (P724L) 以外の変異は同義置換や過去に報告された遺伝子多型であった。ENAM 遺伝子に見つかった P724L 変異はエナメル質形成不全症の原因となる変異である可能性があり、さらに詳しい調査が必要である。

研究成果の概要（英文）：We performed nucleotide mutation analyses covering the coding exons, adjoining intron and the promoter region sequences for the seven proven amelogenesis imperfecta candidate genes and for two suspected candidate genes. Mutations were identified in twelve. Except for the mutation that causes the amino acid substitution from Pro to Leu (P724L) in the ENAM gene, no disease-causing mutations were found because some of them were synonymous mutation and the others were non-synonymous mutations previously reported as polymorphisms. The P724L mutation in the ENAM gene may be a new candidate and it is necessary to investigate details.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2012年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：(1) 遺伝性エナメル質形成不全症 (2) アメロブラスチン (3) エナメルリン (4) エナメライシン (5) DLX3 (6) FAM83H (7) KLK4 (8) WDR72

1. 研究開始当初の背景

小児歯科に来院する患者には歯の形成不全を有する患者は比較的多く、なかでも遺伝性エナメル質形成不全症は全顎的にエナメル質形成が損なわれ、審美的な障害はもちろん、重篤な知覚過敏や咬合の崩壊など罹患患者

に大きな不利益をもたらす。エナメル質形成不全症は遺伝性疾患であり、これまでの様々な研究により、研究開始当初、アメロジェニン (AMELX) 遺伝子の変異が X 連鎖エナメル質形成不全症の原因であること、エナメルリン (ENAM) 遺伝子が常染色体優性低形成型エナ

メル質形成不全症を、distal-less homeobox 3 (DLX3) 遺伝子の変異が常染色体優性タウロドント併発性エナメル質形成不全症を引き起こすことがわかってきた。また、エナメラシリン(MMP20)遺伝子あるいはカリクレイン 4 (KLK4) 遺伝子の変異がそれぞれ常染色体劣性低成熟型エナメル質形成不全症の原因の一つであることもわかってきており、2008 年には family with sequence similarity 83 member H (FAM83H) 遺伝子が常染色体優性低石灰化型エナメル質形成不全症をもたらすことが報告された。

AMELX、ENAM および MMP20 はアメロブラスチン (AMBN) とともに歯にのみ発現する分子であり、AMELX、ENAM および AMBN は細胞外基質タンパク質である。一方で MMP20 や KLK4 はエナメル質の成熟には欠かせないタンパク分解酵素であり、DLX3 遺伝子は下流に多くの支配をもつ調節遺伝子である。また、FAM83H は転写因子の 1 つと考えられており、エナメル質形成に重要な遺伝子の転写を制御していると予測されている。X 連鎖性と常染色体性エナメル質形成不全症のうち、前者の原因は AMELX 遺伝子の変異がほぼ原因のすべてであると考えてよいが、その発生頻度はエナメル質形成不全症全体の 5%未満に過ぎない。また、これまでに判明している常染色体性エナメル質形成不全症の原因となる遺伝子変異も、エナメル質形成不全症全体の 95%以上を占めるこの疾患の多岐にわたる表現型を考慮すると、大部分は未だ闇の中であった。

2. 研究の目的

最近の分子生物学の発展は目覚ましく、これまでに未知であった機能遺伝子の発見が日々なされている。このことはエナメル質の基質タンパク質に関しても当てはまり、研究開始直前にアメロチン (AMTN) および FAM83H が同定され、研究開始後には WD repeat-containing protein 72 (WDR72) なる新しい原因遺伝子が発見されている。また、我々がクローニングした AMBN 遺伝子が原因で発症するエナメル質形成不全症はこれまでに発見されていないが、近年作成された AMBN 遺伝子ノックアウトマウスは明らかなエナメル質形成不全症症状を呈し、ヒトにおいても AMBN 遺伝子の変異によって発症するエナメル質形成不全症が存在することは十分に予測することができる。従って、AMBN、AMELX、AMTN、DLX3、ENAM、FAM83H、KLK4、MMP20 および WDR72 遺伝子の探査をエナメル質形成不全症患者が存在する家系で行うことによって、この疾患の研究はさらに発展し、幅が広がるに相違ないと考えられるものである。また、これらの研究は遺伝子変異とエナメル質形成不全症の表現形の関係の解明のみな

らず、原因となるタンパクの機能ドメインの解明にも繋がり、さらに、これらの知見をもとにエナメル質形成不全症の遺伝子診断法の確立に結びつくものと考えられる。

3. 研究の方法

1) 調査対象患者について

6 人のエナメル形成不全症患者において、AMBN、AMELX、AMTN、DLX3、ENAM、FAM83H、KLK4、MMP20 および WDR72 遺伝子翻訳領域とスプライス部位およびアメロブラスチン遺伝子のプロモーター領域の調査を行った。

2) エナメル質形成不全症患者からのゲノム DNA の抽出

研究開始前に東京歯科大学倫理委員会において承認を受け (承認番号 252)、その規約に基づき、患者に研究の主旨と目的、方法および得られた結果の発表方法など、十分な説明を行ったのち、その同意のもとに粘膜からの DNA を増幅する方法を採用した。すなわち、サンプル採取用のコーンを患者の頬粘膜に擦りつけ、スワブ資料を採取した。このスワブに付着した細胞片から Puregene® Kit C (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてゲノム DNA の抽出を行った。抽出された微量 DNA は PCR を行って増幅し、ダイレクトシーケンスに供した。

3) ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR) による DNA の増幅

PCR キット (TaKaRa LA PCR kit version 2.1®: TAKARA, Otsu, Shiga, Japan) を用いて PCR バッファーが 50 µl になるように調整し、抽出したゲノム DNA (<1 µl) を増幅した。この増幅は TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Standard (TaKaRa) を用いて行った。全てのプライマーは翻訳領域とスプライス部位の増幅の際はイントロンおよびエクソンの非翻訳領域 (untranslated region: UTR) 上に、プロモーター領域の翻訳の際はそのフランキング領域に設計した。PCR は最初に 95°C で 3 分間変性を行い、続いて 95°C、30 秒間の変性、60°C、30 秒間のアニーリング、72°C、1 分間の伸展を 35 サイクル行い、最後に 72°C、10 分間の伸展を行うプログラムに則って行った。PCR によって得られたサンプルは 1.5% のアガロースゲルにて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した後、紫外線照射下において評価した。

4) シーケンシング

シーケンスは以下の手順で進めた。アガロースゲルより採取した PCR サンプルを NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up Kit (Takara) を用いて精製し、DNA シーケンシングのテンプレートとしダイレクトシーケ

ンスした。ダイレクトシーケンスのプライマーはそれぞれをPCRにて増幅した際に用いたものと同じものを用いた。決定した塩基配列を比較、検討することによって各遺伝子のミューテーションを検索した。

5) データ分析

核酸配列の読み取り、確認および修正には4Peaks コンピュータープログラムを用いた。核酸配列および予測されるアミノ酸配列アライメント作製およびシーケンスホモロジー等はGENETYX-MAC Ver. 16 遺伝情報ソフトウェア (SOFTWARE DEVELOPMENT Co, 東京) を用いて検討を行った。

4. 研究成果

6人のエナメル質形成不全症患者の AMBN、AMELX、AMTN、DLX3、ENAM、FAM83H、KLK4、MMP20 および WDR72 遺伝子翻訳領域とスプライス部位の検索を行ったところ、AMBN 遺伝子に1か所、DLX3 遺伝子に1か所、ENAM 遺伝子に2か所、KLK4 遺伝子に2か所、MMP20 遺伝子に4か所、WDR72 遺伝子に2か所の塩基配列の変異が見つかった。

(1) AMBN 遺伝子の変異箇所

①エクソン13

コード領域 1323 番目塩基 A → G
(GCA → GCG)

441 番目アミノ酸残基 Ala → Ala
同義置換

(2) DLX3 遺伝子の変異箇所

①エクソン1

コード領域 138 番目塩基 C → T (CCC → CCT)

46 番目アミノ酸残基 Pro → Pro
同義置換

(3) ENAM 遺伝子の変異箇所

①エクソン10

コード領域 2171 番目塩基 C → T
(CCG → CTG)

724 番目アミノ酸残基 Pro → Leu
非同義置換

②エクソン10

コード領域 2787 番目塩基 A → C
(CTA → CTC)

929 番目アミノ酸残基 Leu → Leu
同義置換

(4) KLK4 遺伝子の変異箇所

①エクソン2

コード領域 64 番目塩基 T → G (TCG → GCT)

33 番目アミノ酸残基 Ser → Ala
非同義置換

②エクソン2

コード領域 66 番目塩基 G → T (TCG → TCT)

33 番目アミノ酸残基 Ser → Ser
同義置換

(5) MMP20 遺伝子の変異箇所

①エクソン1

コード領域 53 番目塩基 A → C (AAG → ACG)

18 番目アミノ酸残基 Lys → Thr
非同義置換

②エクソン6

コード領域 824 番目塩基 T → C (GTA → GCA)

275 番目アミノ酸残基 Val → Ala
非同義置換

③エクソン6

コード領域 842 番目塩基 C → A (ACT → AAT)

281 番目アミノ酸残基 Thr → Asn
非同義置換

④エクソン9

コード領域 1248 番目塩基 T → C
(AGT → AGC)

416 番目アミノ酸残基 Ser → Ser
同義置換

(6) WDR72 遺伝子の変異箇所

①エクソン9

コード領域 917 番目塩基 C → T (CCT → CTT)

306 番目アミノ酸残基 Pro → Leu
非同義置換

②エクソン12

コード領域 1407 番目塩基 T → C
(TAT → TAC)

469 番目アミノ酸残基 Tyr → Tyr
同義置換

タンパク質をコードする遺伝子の翻訳領域における変異はコードするアミノ酸が変化しない同義置換と、コードするアミノ酸に変化をもたらす非同義置換が存在する。

今回の研究で探知し得た変異のうち、(1) ①は Shintani ら (2005) によって明らかにされた日本人に特有の AMBN 遺伝子 (遺伝子座: 常染色体 4q13.3) の遺伝子多型である。また、(2) ①、(3) ②、(4) ②、(5) ④および (6) ②は塩基配列の変化がアミノ酸配列に影響しない同義置換であるため、エナメル質形成不全症の原因とはなり得ない。したがって、遺伝子多型であると判断するのが妥当である。

その他の変異は、コードするアミノ酸に変化をもたらす非同義置換であった。このうち、(3) ②は ENAM 遺伝子 (遺伝子座: 常染色体

4q13.3)のこれまでに報告のない変異であるChanら;2011、Urzúaら;2011)。ENAM 遺伝子の変異が引き起こすエナメル質形成不全症はいずれもヘテロな状態で確認され、ホモで見つかった場合にはより重篤な症状を示すことが知られている。それゆえ、今回確認された変異はそれに該当する。また、変異の認められたコドンがコードするアミノ酸は図1に示すように哺乳類のエナメルリンアミノ酸配列の中では保存されたアミノ酸残基であり、このアミノ酸置換がエナメルタンパク質の機能に何らかの影響を与えることは十分に考えられる。しかし、これらの遺伝子変異がもたらすエナメル質形成不全症は常染色体性優性遺伝形式で遺伝するのが常であるが、被験者の家族に同様の症状を有する血族がない。今後は *de novo* の可能性も含めて、検討を要するものと考えられる。

```

CONSENSUS> EDFPYSYFYP WNEDENFPSY NTAPTIIAPPV
□ヒト      ---Y----- -S□----- ---S-MP---I
□ブタ      ---L-G---- -E----- ---VSS--
□ウシ      -Y---G---- -S----- ---PLL-
□ラット    -----H-T--I- -PG-----
□マウス    -----Q-T--I- -PG-----

```

図1 変異が認められたアミノ酸のフラック領域のエナメルリンアミノ酸配列アライメント。最初の行にコンセンサス配列を、それ以下の配列はコンセンサス配列と一致するアミノ酸残基をダッシュで表している。□で囲んだ部分は今回置換の認められたアミノ酸である。

また、同様な非同義置換は(4)①に示す KLK4 遺伝子 (遺伝子座: 常染色体 19q13.41)、(5)①②③に示す MMP20 遺伝子 (遺伝子座: 常染色体 11q22.2)、(6)①に示す WDR72 遺伝子 (遺伝子座: 常染色体 15q21.3) において認められたが、すべてヘテロな状態で確認された。KLK4、MMP20 および WDR72 遺伝子における変異のうち、エナメル質形成不全症を引き起こすと報告された変異はいずれもホモの状態を確認されている (Chanら;2011、Urzúaら;2011)。そのため、これらの遺伝子変異がもたらすエナメル質形成不全症は常染色体性劣性遺伝形式で遺伝するのが常であり、今回確認された変異のいずれもがこれに当てはまらない。さらに5)①②③に示す MMP20 遺伝子はいずれも遺伝子多型であることが過去に報告されている (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/50234982>)。

参考文献

Shintani S, Kobata M, Toyosawa S, Tanaka Y, Takeuchi C, Ooshima T, Ameloblastin gene polymorphisms in healthy Japanese. *Ped Dent J*, 15(1): 58-63, 2005.
Chan HC, Estrella NM, Milkovich RN, Kim JW, Simmer JP, Hu JC., Target gene analyses of

39 amelogenesis imperfecta kindreds. *Eur J Oral Sci*, 119 Suppl: 311-323, 2011.
Urzúa B, Ortega-Pinto A, Morales-Bozo I, Rojas-Alcayaga G, Cifuentes V, Defining a new candidate gene for amelogenesis imperfecta: from molecular genetics to biochemistry. *Biochem Genet*, 49: 104-121, 2011.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

1. Sekiguchi H, Senzui S, Yamashita H, Shintani S, Sawada T, Yanagisawa T, Missense mutation of EDAl gene in Japanese family with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia., *Ped. Dent. J.* 22: 188-192, 2012 (査読有り)
2. 新谷誠康, う蝕と見誤っていませんか? 見えてきたエナメル質形成不全症の実態, *歯科衛生士*, 36 (12), 56-61, 2012 (査読無し)
3. 新谷誠康, 知っておいて頂きたい小児歯科, *千葉小児科医会雑誌* 43, 3-8, 2012 (査読無し)
4. 新谷誠康, 歯質の形成異常 (日本小児歯科学会 50 周年記念特集 小児歯科研究最前線), *小児歯科臨床*, 17:18-24, 2012 (査読無し)
5. 新谷誠康, 歯質の形成異常 (日本小児歯科学会 50 周年記念特集 小児歯科研究最前線), *小児歯誌 (創立 50 周年記念誌)* 48-49, 2012
6. Sawada T, Sekiguchi H, Uchida T, Yamashita H, Shintani S, Yanagisawa T., Histological and immunohistochemical analysis of molar tooth germ in amelogenin-deficient mouse., *Acta Histochem*, 113:542-546, 2011. (査読有り)
7. 新谷誠康, 歯科医師の身近な先天異常 - エナメル質の形成障害, *日本ヘルスケア歯科学会誌*, 12: 18-24, 2011
8. 新谷誠康, 小児歯科は育成医療へ 06. 口腔領域の異常「歯質の異常」, *デンタルダイヤモンド増刊号*, 3: 110, 2011
9. 新谷誠康, 歯の形成不全 -成長のフライントレコーダー- 別冊「知っておきたい小児歯科」, *小児科臨床*, 63:2241-2246, 2010

[学会発表] (計2件)

1. 関口 浩, 新谷誠康, 村居幸夫, 征矢 亘, 森永和男, 遺伝性エナメル質形成不全症の原因遺伝子の解析, 第20回茨城県歯科医学会 水戸 2012.2.19
2. 関口 浩, 新谷誠康, 村居幸夫, 征矢 亘, 森永和男, 外胚葉異形成症の原因遺伝子の解析, 第20回茨城県歯科医学会 水戸

2012. 2. 19

[図書] (計 1 件)

1. 新谷誠康, 小児歯科の歯科治療 [診察・検査・診断], 永末書店, 編著代表: 下岡正八, 新谷誠康, II. 歯の異常 (形成障害) 17-42, 2010.

[その他]

招待講演

1. 新谷誠康: 遺伝性エナメル質形成不全症の注意点と予防的治療, 第 2 回臨床ゲノム医療学会, 名古屋, 2012. 12. 16
2. 新谷誠康: 小児科医に知っておいていただきたい小児歯科, 千葉県小児科医会 7 月例会, 千葉, 2012. 7. 21
3. 新谷誠康: 歯の遺伝性障害, エナメル質形成不全症と象牙質形成不全症, 第 12 回ゲノムドクター&キャスター東京セミナー, 東京 2012. 7. 8
4. 新谷誠康: 歯科医師の身近な先天異常-遺伝性エナメル質形成不全症, 第 293 回東京歯科大学学会例会特別講演, 千葉, 2012. 6. 2
5. 新谷誠康: 歯質の形成異常, 第 50 回日本小児歯科学会記念大会リレー講演 I 「小児歯科学研究最前線」, 第 50 回日本小児歯科学会 東京 2012. 5. 12 (2012. 5. 12-5. 13)
6. 新谷誠康: シンポジウム「我が国におけるゲノム診断と医療の将来」, 第 1 回 臨床ゲノム医学会, 東京, 2011. 12. 11 (シンポジウム)
7. 新谷誠康: 小児歯科における最近の話題, 東京歯科大学同窓会板橋地区学術講演会, 東京, 2011. 11. 18
8. 新谷誠康: 小児歯科診療の最近のトピックス 講演, 東京歯科大学理工懇談会, 東京, 2011. 7. 15
9. 新谷誠康: 最近の小児歯科の話題, 大阪大学同窓会関東東北支部主催講演会, 東京, 2011. 7. 3
10. 新谷誠康: 最近の小児歯科のトピックス, 千葉県歯科医師会地域歯科保健委員会主催講演会, 千葉, 2011. 2. 23
11. 新谷誠康: 最近の小児歯科治療の考え方, 東京歯科大学千葉県同窓会船橋支部 (船橋東歯会), 船橋, 2010. 11. 28
12. 新谷誠康: これからの小児歯科を想う-これからの小児歯科のトピックス-, 大阪, 第 54 回 OSP 研修会, 2010. 11. 7
13. 新谷誠康: 歯科医師の身近な先天異常 - エナメル質の形成障害 (エナメル質形成不全) -, 日本ヘルスケア研究会, 東京, 2010. 7. 19

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新谷 誠康 (SHINTANI SEIKOU)
東京歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 90273698

(2) 研究分担者

今井 裕樹 (IMAI HIROKI)
東京歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 30338850

井上 孝 (INOUE TAKASHI)
東京歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 20125008