

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670880

研究課題名(和文)永久歯先天性欠如の空間的制御機構を解明するための変異タンパク質立体構造解析

研究課題名(英文) Exome sequencing identifies mutations as a cause of selective tooth agenesis

研究代表者

榎 宏太郎 (Maki, Koutaro)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：80219295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：非症候群性永久歯先天性欠如は、顎口腔領域に見られる最も頻度の高い疾患の一つであるが、日本人に多く認められる下顎前歯先天性欠如など少数歯欠損例の原因は不明である。第3大臼歯を除く下顎前歯のみに先天欠如を有する1家系32孤発例を対象者として全エクソンシーケンスを実施した。アミノ酸変異がタンパク質の機能に及ぼす影響を予測するプログラムPolyPhen2による検索から12候補変異が抽出された。6例にカルシウム依存性の細胞接着分子をコードするこれまで先天欠如に関与することが知られていない新規遺伝子内変異が同定された。

研究成果の概要(英文)：Tooth agenesis is one of the most common human developmental anomalies. Molecular analyses have previously successfully elucidated the genetic background of severe forms of selective tooth agenesis. Here, we report on the genomic analysis of the selective agenesis of one or two mandibular incisors using exome sequencing. Patients with nonsyndromic mandibular incisor(s) agenesis were found to harbor mutations in cadherin-related 23 (CDH23) after excluding genetic mutations previously associated with the nonsyndromic agenesis of multiple teeth, including those in MSX1, PAX9, AXIN2, EDA, EDAR, EDARADD, and WNT10A. Mutations in CDH23 are known to cause both Usher syndrome type 1D (USH1D) and nonsyndromic hearing loss (DFNB12). The present data indicate that dominant CDH23 mutations cause a nonsyndromic phenotype affecting tooth development.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：永久歯先天性欠如 エクソンシーケンス 下顎前歯

## 1. 研究開始当初の背景

歯科矯正治療を受診する外来患者 3683 名について永久歯先天性欠如と全身疾患、ならびにその家族性について検討した (Eur J Orthodont, 30:641-4, 2008)。その結果、アレルギーが先天欠如の発現に關与する可能性を明らかにした。また、家族性についても調査した結果、永久歯先天性欠如を有する数家系を見出すとともに、下顎前歯のみに限局した先天欠如を有する家系の存在を確認した。

歯は骨や軟組織と異なり、環境の影響を受けにくく、きわめて遺伝的に安定した形質である。ectodysplasin A receptor gene (EDAR) は毛髪、歯、爪、汗腺、皮脂腺に形成異常を呈する Ectodermal dysplasia の原因遺伝子の一つとして知られている。EDAR 遺伝子多型と健常日本人における歯の形態との関連を検討し、EDAR 多型が上顎切歯におけるシャベル型の切歯の程度、上顎中切歯近遠心幅径に關与することを明らかにした (Am J Hum Genet, 85:528-35, 2009)。

一方、近年 “Exome sequencing (全エクソンシーケンス)” により、家族性稀少疾患の原因遺伝子同定の成功例が報告されている。“Exome” とはヒトゲノムにおけるすべてのエクソン領域を示し、その配列に含まれる変異が疾患原因の約 85% を説明すると推定されている。エクソンのみをシーケンスすることは形質に關与する多様性 (多型) を網羅的に解析する手法のなかでは安価で、情報解析の負荷も小さい。永久歯萌出不全は罹患した歯牙が臼歯部開咬を呈し咀嚼機能に障害をきたす極めて稀な疾患である。申請者と研究協力者は優性遺伝形式を呈するわずか 2 家系から、家系内プールを用いた Exome sequencing により、その原因因子が parathyroid hormone 1 receptor gene であることを発見した (J Bone Miner Res, 26:1655-61, 2011)。興味深いことに、本申請課題対象疾患である下顎前歯に限局する先天欠如は日本人に多く、欧米人に少ないとする人種差が存在する可能性が示唆されているとともに、今現在、その原因遺伝子探索結果の報告はなされていない。

本申請は次世代シーケンサーによる全エクソンシーケンスにより永久歯先天性欠如、特に日本人に多い下顎前歯先天性欠如家族性症例においてその原因遺伝子を同定するとともに臨床的多様性について考察を加えることにある。

これまでの永久歯先天性欠如の原因遺伝子同定に関する最初の報告はすべて欧米の研究グループからである。これは技術的な優位性のみならず、発現頻度でも人種差の小さい病態に対する解析であったためと考えられる。これまでの原因因子同定というポジショナルクローニングにおいて最も重要な点は家系収集にあった。しかし、“Exome

sequencing (全エクソンシーケンス)” は、エクソンのみをシーケンスすることにより形質に關与する多様性 (多型) を網羅的に解析する手法のなかでは安価であり、情報解析の負荷も小さく、決して大きくない家系から原因遺伝子変異同定の可能性を高めることができる。

本申請課題は日本人に多いとされる下顎前歯先天欠如の原因遺伝子について、次世代シーケンサーによる全エクソンシーケンスという先進的手法により世界で始めて挑戦するものである。下顎前歯に限局する先天欠如は日本人に多く、欧米人に少ないとする人種差が存在する可能性が示唆されているとともに、今現在、その原因遺伝子探索結果の報告はなされていない。日本人における発症率・出現頻度が高いことは、本研究結果が国民に還元できるところが大きく、その解明は急務と考えられる。

## 2. 研究の目的

永久歯先天欠如は、顎顔面領域に見られる最も頻度の高い疾患の一つである。その原因に複数の転写因子の変異によって優性遺伝形式を呈する家族性に引き起こされることが知られている。一方、近年 “Exome sequencing (全エクソンシーケンス)” により、家族性稀少疾患の原因遺伝子同定の成功例が報告されている。“Exome” とはヒトゲノムにおけるすべてのエクソン領域を示し、その配列に含まれる変異が疾患原因の約 85% を説明すると推定されている。本申請課題の目的は次世代シーケンサーによる全エクソンシーケンスにより永久歯先天性欠如、特に日本人に多い下顎前歯先天性欠如家族性症例においてその原因遺伝子を同定するとともに臨床的多様性について考察を加えることにある。

## 3. 研究の方法

本申請課題は既に関連倫理委員会の承認を得ている。対象者は日本人成人から収集する。平成 24 年 3 月末までに本申請課題が実施しうる検体収集が完了する。平成 24 年度において対象者の臨床情報の収集、解析と並行してゲノム解析を行う。ゲノム解析は検体からの DNA 抽出 エクソンキャプチャー (Sure Select Human All Exon Kit) シーケンス (Genome Analyzer IIx) シーケンスデータ解析 (bwa および samtools) 変異リストの抽出 変異リストのフィルタリング (条件 高 LOD 領域 変異アリルの出現頻度 (0.4~0.6) 新規かつアミノ酸置換) 変異同定。変異同定を経た後、弧発例についても疾患遺伝子のリシーケンスを実施する。

このような工程を経て、永久歯先天欠如の原因遺伝子変異を同定する。

家族性疾患や表現型を規定する遺伝子を同定する手法（ポジショナルクローニング）はこれまでゲノムを網羅する多型マーカー（以前はマイクロサテライト、近年では Single nucleotide polymorphism; SNP が用いられる）を用い多型タイピング情報から、Mendel 疾患遺伝子同定の方法であるパラメトリック連鎖解析、非メンデル疾患に対応するノンパラメトリック連鎖解析により試みられてきた。ポジショナルクローニングにおける候補領域の絞込みにおいては候補領域が複数かつ広いことや、検出力が弱いこと、家系収集が困難であることなどによって原因変異の同定にまで至らないこともしばしばであった。全エクソンシーケンスは、これらの問題点を解決する SNP アレイでは検出できなかったまれな原因となる変異を検出することが可能な最も有効な方法である。

DNA の調整：先天性欠如罹患者を含む家系のうち罹患者および非罹患者の DNA を厳密に測定する。

エクソンキャプチャー：DNA から DNA ライブラリーを作成し、エクソン配列の DNA 断片のみを濃縮する。エクソンキャプチャーには Sure Select Human All Exon Kit (Agilent) を用いる。エクソンキャプチャー法はヒトゲノムの全エクソン領域を選択的に濃縮する技術であり、本申請課題で使用する SureSelect Human All Exon Kit (Agilent) の場合、ベイトとよばれる 120bp のビオチン化 RNA オリゴを DNA ライブラリーとハイブリダイズし、結合した RNA-DNA をストレプトアビジン結合マグネットビーズで回収、RNA ベイトを消化することで、シーケンスするためのターゲット DNA を濃縮する。この方法の利点は安価で、サンプル DNA 必要量も少なくすむことにある。この手法の採用によりわずか数日で全エクソン領域の DNA を得ることができる。また、この手法は全エクソンのみならず、カスタムデザインの特定制ゲノム領域を回収するための手法としても利用可能となる。

シーケンス：Genome Analyzer IIx (Illumina) にて 100bp のペアエンドにて行う。

シーケンスデータの解析：得られたシーケンスデータ (read) は UCSC hg19 を標準ゲノム配列として、bwa および samtools によってマッピングおよび変異リスト化する。Read の信頼性となる coverage depth、変異のコールは samtools による pileup ファイルを独自に研究協力者らが開発したプログラムにより解析し、信頼性も評価した変異リストを DNA プールのアレル頻度とともに出力し、この変異リストをフィルタリングすることで、候補となる変異を絞り込む。

フィルタリング： 1) 連鎖解析の高 LOD 領域に存在する 2) 変異アレルの出現頻度 (0.4~0.6) 3) 新規かつアミノ酸置換を伴う ことにより行う。申請者の有する候補

家系は優性遺伝が想定されることから、プールした検体すべてがヘテロ接合となることが予測されることから、頻度が 0.4~0.6 となるものを選択する。

原因変異の同定から、他の罹患者家系、孤発例について疾患遺伝子のリシーケンスを行う。候補遺伝子についてすべてのエクソンとプロモーター領域 (1kb) を PCR 増幅し、次世代シーケンサー (GA II) でリシーケンスを行う。

各々の症例における変異と臨床的多様性について考察する。

#### 4. 研究成果

アミノ酸変異がタンパク質の機能にあたる影響を予測するプログラム SIFT、PolyPhen2 による検索から 12 候補変異が抽出された。これまで永久歯先天欠如を惹起することが既に知られている候補遺伝子内変異の有無を確認した。32 例中 5 例が AXIN2 に変異を認め、一方、6 例にカルシウム依存性の細胞接着分子をコードするこれまで先天欠如に関与することが知られていない新規遺伝子内変異が同定された。

これまで非症候群永久歯先天欠如の罹患者に関与することが知られていない新規の遺伝子は、先天欠如の歯数、部位多様性を部分的に説明する可能性が示唆される。

#### 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 8 件)

Identification of gene expression profile of neural crest-derived cells isolated from submandibular glands of adult mice. Takahashi M, Suzawa T, Yamada A, Yamaguchi T, Mishima K, Osumi N, Maki K, Kamijo R. Biochem Biophys Res Commun 446:481-486, 2014

Genome-wide association study of degenerative bony changes of temporomandibular joint in East Asian populations. Yamaguchi T, Nakaoka H, Yamamoto K, Fujikawa T, Kim YI, Yano K, Haga S, Katayama K, Shibusawa T, Park SB, Maki K Kimura R, Inoue I. Oral Dis 20(4):409-15, 2014

Measurement of unerupted permanent teeth using cone beam computed tomography. Futaki K, Yamaguchi T, Katayama K, Haga S, Hasebe A, Maki K. Hosp Dent Oral-Maxillofac Surg 26(1):7-10, 2014

Comparison of two-jaw surgery outcomes between patients with skeletal class III open bite and those with skeletal class III maxillofacial deviation. Tsutsui S, Yamaguchi T, Atarashi M,

Furuya R, Yoshida S, Shirota T, Maki K. Hosp Dent Oral-Maxillofac Surg 26(1):11-16,2014

The skeletal maturation status estimated by statistical shape analysis: Axial images of Japanese cervical vertebra. Shin SM, Kim YI, Choi YS, Yamaguchi T, Maki K, Cho BH, Park SB. Dentomaxillofac Radiol 2014 Nov 20:20140323.

Common polymorphisms in WNT10A affect tooth morphology as well as hair shape. Kimura R, Watanabe C, Kawaguchi A, Kim YI, Park SB, Maki K, Ishida H, Yamaguchi T. Hum Mol Genet 2015 May 1;24(9):2673-80.

Quantitative skeletal maturation estimation using cone-beam computed tomography-generated cervical vertebral images: a pilot study in 5- to 18-year-old Japanese children. Byun BR, Kim YI, Yamaguchi T, Maki K, Ko CC, Hwang DS, Park SB, Son WS. Clin Oral Investig 2015 Feb 12.

Quantitative assessment of cervical vertebra maturation using cone-beam computed tomography in Korean girls. Byun BR, Kim YI, Yamaguchi T, Maki K, Son WS. Comput Math Methods Med Volume 2015 (2015), Article ID 405912, 9 pages

〔学会発表〕(計7件)

第24回特定非営利活動法人日本顎変形症学会総会・学術大会 平成26年(2014年)6月10日(火)・11日(水)

福岡 自然立位と3次元顎椎形態との関連. 権佳奈、山口徹太郎、中島榮一郎、榎宏太郎

第24回特定非営利活動法人日本顎変形症学会総会・学術大会 平成26年(2014年)6月10日(火)・11日(水)

福岡 顎顔面外科手術前後の咀嚼効率変化 第1報. 常岡美里、山口徹太郎、中村道、榎宏太郎

第73回 東京矯正歯科学会 平成26年7月10日 東京 電動スライダーによるボタンプル計測と顎顔面形態との関係. 古谷亮子、木村仁、山口徹太郎、伊能教夫、榎宏太郎

第73回 日本矯正歯科学会大会 2014年10月20日~22日 千葉 永久歯先天欠如の新規原因遺伝子. 山口徹太郎、細道一善、矢野圭介、芳賀秀郷、方山光朱、中脇貴俊、富田大介、中村 雅典、上條竜太郎、井ノ上逸朗、榎宏太郎

第19回 日本顔学会大会 2014年10月25日~26日 東京 日本人における第三大臼歯4歯先天欠如の顔面形態の特徴. 芳賀 秀、山口徹太郎、榎宏太郎

International symposium on Genome Science 2015 January 20-21, 2015, Tokyo. A novel causative gene for permanent tooth agenesis. Yamaguchi T, Hosomichi K, Kim YI, Yano K, Haga S, Katayama K, Park SB, Maki K, Inoue I 昭和大学歯学部 文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成26年度シンポジウム「次世代型顎口腔組織再生医療の研究開発拠点形成」研究成果発表会 2015年3月28日 東京 非症候群性永久歯先天欠如の新規原因遺伝子の同定. 山口徹太郎、細道一善、芳賀秀郷、方山光朱、中脇貴俊、富田大介、大塚裕忠、野中直子、中村 雅典、井ノ上逸朗、榎宏太郎

〔図書〕(計1件)

新・歯科衛生士教育マニュアル 歯科矯正学 2015年1月10日 クインテッセンス出版株式会社 編者 葛西一貴、新井一仁、須田直人、三浦廣行

〔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:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等  
無

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
榎 宏太郎 (MAKI, Kouataro)  
昭和大学・歯学部・教授  
研究者番号: 80219295

(2)研究分担者  
山口 徹太郎 (YAMAGUCHI, Tetsutaro)  
昭和大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 40384193

(3)研究分担者

杉浦 茉美 (SUGIURA, Mami)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号： 10611741

(4)研究分担者

新 真紀子 (ATARASHI, Makiko)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号： 20585806

(5)研究分担者

筒井 佐和子 (TSUTSUI, Sawako)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号： 80644913