

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861996

研究課題名(和文) 遺伝性非症候性多数歯欠損症の責任遺伝子同定および関連遺伝子の網羅的解析

研究課題名(英文) Exhaustive analysis of nonsyndromic Oligodontia in multiple Japanese families

研究代表者

貴田 みゆき (KIDA, MIYUKI)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：80507442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：永久歯先天欠如は日常臨床で遭遇する機会が多い症例であるが、その中でも第三大臼歯を除く6歯以上の永久歯欠損が確認された場合、遺伝的要因が強く疑われる。現在まで血縁関係のない3家系の遺伝性を疑う多数歯欠損症例を検出し、いずれの発症者も永久歯10歯以上先天欠如を有していた。このような症例では、審美的・機能的障害を伴うため患者のQOL維持を目的とした早期の診断・治療方針の決定が重要である。本研究では原因遺伝子同定を目的とした遺伝子解析に加え、疾患特異的なSNPが存在するか否かの検討も加えた。

研究成果の概要(英文)：Oligodontia designates the congenital absence of 6 or more permanent teeth, excluding the third molar. I investigated three Japanese families with nonsyndromic Oligodontia. All affected members in three families were revealed very severe Oligodontia phenotype clinically, number of missing teeth of them were over 10. The early diagnosis and decision on courses of treatment are very important for patients with nonsyndromic Oligodontia to maintain their quality of life. The aim of the present study revealed the candidate gene of nonsyndromic Oligodontia and unique SNPs

研究分野：医歯薬学

キーワード：遺伝性非症候性多数歯欠損症 網羅的解析 遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

一般歯科臨床においても遺伝性を疑う症例に遭遇することは稀ではないものの口腔内の遺伝性疾患についての情報不足から原因不明の全身的・局所的要因によるものとして対処されることが非常に多い。永久歯の先天欠如は、顎口腔領域における発達異常の1つであり、欠損歯数や発現部位によって歯列咬合異常を誘発するだけでなく、審美的障害を伴うため患者のQOL維持を目的とした早期の診断・治療方針の決定が重要である。しかしながら、歯科領域においては、遺伝子学的な研究・病態の解明はまだ端緒を開いたばかりである。また、遺伝的要因を疑う症例であっても、設備不足や遺伝子解析可能な施設との連携がとれず、確定診断に至らないケースが多かった。

永久歯先天欠如と遺伝学的関連として、2001年のオックスフォード出版の頭頸部疾患に関する教科書には「6歯以上の欠損が認められた場合、遺伝学的なバックグラウンドがある可能性が高い」と記載されている。デンマークで2001年に報告されたデータでは、2319人を調査対象としたところ0.17%に6歯異常の永久歯先天欠如を有することが報告されている。本邦においては永久歯多数歯欠損に関する大規模な疫学調査が日本小児歯科学会学術委員会を中心として行われ小児歯科学雑誌(第48巻・第1号平成22年3月25日発行)で報告された。それによると、調査人数15,544人の10.09%に永久歯の先天欠如が確認されている。その中で5歯以上の先天欠如が0.87%に確認され、本邦においても遺伝性多数歯欠損症例を疑う例は少なからず存在することが想定された。しかしながら、調査対象は「小児」に限局しており本邦での幅広い年齢層における多数歯欠損症患者における疫学調査は不十分で、その有症率は明らかになっていない。

2. 研究の目的

歯数調整遺伝子として現在まで14番染色体上PAX9と4番染色体上MSX1の解析が世界的にすすめられているが、本邦では疫学調査にとどまり遺伝学的検索は行われていないのが現状である。歯の欠損様式により、小臼歯部が主たる欠損部位である場合MSX1解析を行い、大臼歯部が主たる欠損部位である場合PAX9解析が行われている。

口腔遺伝性疾患の発症パターンと原因遺伝子の相関が明らかになれば、発症機序の解明や新しい診断システムの開発が可能になる。また、歯胚発生から歯の石灰化に至る過程での原因遺伝子の発現パターンから、治療法の選択について有用な情報を得られることが期待される。従来臨床像による分類から、原因遺伝子に基づく分類への再編成を視野に入れて検討している。さらに、分子レベルでの歯の発生メカニズムの解明、発症前診断をふまえた予防的治療を当面の課題とし、将来的には遺伝子治療を含めた病態治療への応用を目標としている。このように本研究は歯学領域において先駆的なものであり、口腔領域における遺伝性疾患の原因究明を進めることで、今後更なる歯学の発展に貢献できる研究と考える。

3. 研究の方法

本研究に先立ち、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得た(「口腔遺伝性疾患(遺伝性多数歯欠損症・遺伝性歯牙形成不全症)の原因遺伝子同定および解析に関する臨床研究」)。

インフォームドコンセントののち口腔内写真撮影およびオルソパントモX線写真等から永久歯欠損歯数・部位の確認を行った。罹患家系から約5ccの採血を行い、有核細胞よりDNAを抽出し候補遺伝子に対する遺伝子解析を行った。解析対象遺伝子は14番染色体上PAX9と4番染色体上MSX1とし遺伝子のゲ

ノム配列から各エクソンを挟むように primer 設計を独自に行った。そして被験者の DNA を鋳型として PCR 法により目的の遺伝子の各エクソンを含むフラグメントを増幅し、PCR-SSCP 法による遺伝子変異のスクリーニング及びシーケンス解析を行って変異の同定を行った。患者において同定された変異が病因変異であることを確認するため、正常人コントロールを 100 人以上にわたり上記同様の方法でサンプル収集し、検出した塩基の変化がポリモルフィズムではないことの検討も行った。

4. 研究成果

下記に本解析に用いた MSX1/PAX9 の本研究独自の primer を示す。Primer の設計には Primer Express® を使用した。

<MSX1 primer sequences>

Primer name(5' → 3')	Primer Sequence
MSX1-1F	CCCGGAGCCCATGCCCGGCGGCTG
MSX1-1R	CTCCCTCTGCGCCTGGTTCTGGCT
MSX1-2F	AGGCACTTGGCGGCACTCA
MSX1-2R	CACTTTTTGGCAGGGATCAGACTTC

<PAX9 primer sequences>

Primer name (5' → 3')	Primer Sequence
PAX9-ex1F	GCGGTGCGGAAAGTTTCTGT
PAX9-ex1R	TGTAGGAACACGAGCAAAGT
PAX9-ex2(1)F	GTTCAAGGACCATATGGTTT
PAX9-ex2(1)R	TTGTAGGTCCGGATGTGTTT
PAX9-ex2(2)F	AAGATCCTGGCGGATACAA
PAX9-ex2(2)R	ATGTCGGTGACGGAGTGCGA
PAX9-ex2(3)F	ACATCTACTCGTACCCAGC
PAX9-ex2(3)R	AGCCTCAGGTGGTGGGAAAG
PAX9-ex3F	AAGCCCTCCAGCTCTCCGTC
PAX9-ex3R	AGAAAGGGACCCATCACAA
PAX9-ex4F	ATTGCTGGCTTACTCAGACT
PAX9-ex4R	TGGGATGTGAGACCTGGGAA

<症例>

患児 初診時年齢 11 歳 4 ヶ月 女児
多数の永久歯欠損にて近医より日本大学歯学部附属病院小児歯科を紹介受診

既往歴 なし

家族歴 患児の父親に永久歯多数歯欠損あり



<本症例家系図>

<患児パノラマエックス線写真>

	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38
父	X	X		X	X	X	X				X	X	X		X	X
	X	X			X			X	X	X				X		X
患児	X			X	X	X	X			X	X		X			X
	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X	X		X	X

<口腔内所見 (x: 欠損歯) >

同一家系内の発症者 / 非発症者を対象とした PAX9 ならびに MSX1 解析から、病因との関連を疑う変異は検出されなかった。

しかしながら、PAX9 に発症者のみに共通して Exon2 を挟む両 Intron に (-41A G, +41G A)、Exon3 に (239CAC(His) CAT(His)) が検出され、さらに本家系全員に

Exon3(240GCG(Ala) CCG(Pro)) も確認された。本症例に検出された塩基置換は本研究症例1で検出された PAX9 (c.591delC, S197fsX211) を有する血縁関係のない遺伝性多数歯欠損家系内の発症者にも共通して検出された。PAX9 Exon3(239CAC(His) CAT(His)) は報告のある SNP であったが、Exon2(-41A G, +41G A) の報告はなく、100 人のコントロールでも検出されなかった。この塩基置換による DNA 転写時の影響の有無に関し、スプライス異常が生じるか否かを検討するため Splice Site

Prediction program by Neural Network presented by The Berkeley Drosophila Genome

Project(<http://www.fruitfly.org/index.html>)にて解析を行った。その結果、本解析ではいずれのSNPsもスプライスに影響を与えることは少ないことが示唆された。しかしながら血縁関係のない発症者に共通して検出されたことは興味深く、疾患との関連を疑う塩基置換である可能性も否めないため、今後新たな症例を検出した際は今回検出されたSNPに関しても検討を加える予定である。

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1件)

Otsu M, Yamada M, Nakajima S, Kida M, Maeyama Y, Hatano N, Toita N, Takezaki S, Okura Y, Kobayashi R, Matsumoto Y, Tatsuzawa O, Tsuchiya F, Kato S, Kitagawa M, Mineno J, Hershfield MS, Bali P, Candotti F, Onodera M, Kawamura N, Sakiyama Y, Ariga T.

“ Outcomes in two Japanese adenosine deaminase-deficiency patients treated by stem cell gene therapy with no cytoreductive conditioning ”

Journal of Clinical Immunology 2015 35(4) 384-398 (査読有)

DOI: 10.1007/s10875-015-0157-1

[学会発表](計1件)

園みゆき, 片倉麻里子, 白川哲夫

遺伝性を疑う非症候性多数歯欠損症例における *PAX9* / *MSX1* 解析 (Sequence analysis of *PAX9* and *MSX1* in a family with nonsyndromic oligodontia)

第52回日本小児歯科学会大会 品川区立総合区民会館(東京都・品川区) 2014年5月16-17日

[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

貴田 みゆき (KIDA MIYUKI)

北海道大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号: 80577442

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号：