

平成21年 5月28日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390528

研究課題名（和文） 常染色体エナメル質形成不全症家系の原因遺伝子の同定と遺伝子診断

研究課題名（英文） Identification and genetic testing of responsible genes inherited in family members affected with amelogenesis imperfecta.

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：典型的な遺伝性疾患である常染色体性エナメル質形成不全症 (AI) 患者家系に関して遺伝子突然変異の探査を行い、新発見した情報をその遺伝子診断や治療に役立てることを目標としている。我々は常染色体優性タウロント併発性低形成-低成熟 AI (タイプIV) 患者兄妹から DLX3 遺伝子の点突然変異を発見した。DLX3 遺伝子には、これまでに点突然変異の報告はなく、今回が初めての報告となる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	11,400,000	3,420,000	14,820,000
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

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) 遺伝子 (3) アメロブラスチン (4) エナメルリン (5) カリクレイン4 (6) エナメライン (7) DLX3

## 1. 研究開始当初の背景

小児歯科領域では歯の形成不全を主訴とする患者は比較的多く、なかでもエナメル質形成不全症(AI)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様々で重篤な不利益をもたらす。AIは遺伝性疾患であり、本研究開始までに、アメロジェニン (AMEL) 遺伝子の突然変異が X 連鎖 AI を引き起こすこと、エナメルリン (ENAM) 遺伝子や distal-less homeobox 3 (DLX3) 遺伝子の突然変異が常染色体優性 AI の原因の一つであること、エナメライン (MMP20) 遺伝

子あるいはカリクレイン 4 (KLK4) 遺伝子の突然変異がそれぞれ常染色体劣性 AI の原因の一つであることがわかっていた。AMEL, 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、AMEL, 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 は下流に多くの支配をもつ調節遺伝子である。X 連鎖性と常染色体性 AI のうち、前者の原因は AMEL 遺伝子の突然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 AI 全体の 5%未満に過ぎない。ま

た、それまでに判明している常染色体性 AI の原因となる遺伝子突然変異は優性低形成型 (ENAM 遺伝子), 劣性低成熟型 (MMP20, KLK4 遺伝子), 優性タウロドンティズム併発性低形成-低成熟型 (DLX3 遺伝子) のみであり, その他の AI に関しての報告は存在しなかった。この疾患の多岐にわたる表現型を考慮すると, AI 全体の 95%以上を占める常染色体性 AI の原因の大部分は未だ何の解明も為されていないと考えられた。

## 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基質タンパク質に関するものも当てはまり, 新しいエナメル質基質タンパク質の同定がなされている。我々はこれまでに AMBN 遺伝子の全塩基配列と遺伝子構造の決定に成功した。また, 日本人ゲノムから, 日本人に特有と考えられる塩基配列とアミノ酸配列のポリモルフィズム (多型) を発見し, 日本人における両者の関係を探査するための基礎データを得た。AMBN 遺伝子ノックアウトマウスは明らかな AI 症状を呈し, ヒトにおいても AMBN 遺伝子の突然変異によって発症する AI 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 をはじめとするエナメル質基質タンパク質遺伝子の探査を上記の家系で行うことによって, AI の遺伝子診断法の確立に向けて常染色体性遺伝型 AI の研究はさらに発展させることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### 1) 調査対象患者について

5 人のエナメル形成不全症患者において, AMBN, ENAM, MMP20, KLK4, DLX3 遺伝子翻訳領域とスプライス部位およびアメリロ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

患者には大阪大学歯学部倫理委員会および東京歯科大学倫理委員会において承認された規約に基づき, 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, サンプル採取用のスワブを患者の頬粘膜に擦りつけ, 採取後 15 分間室温にて乾燥させた。このスワブに付着した細胞片から BuccalAmp DNA Extraction Kit® (EPICENTRE, WI, USA) 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  $\mu$ l になるように調整し, 抽出したゲノム DNA (<1  $\mu$ l) を増幅した。この増幅は GeneAmp 2400 thermal cycler® (Applied Biosystems, Mishima, Japan) 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乗っ取って行った。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 Centricon 100 spin column® (Millipore, Bedford, Mass, USA) を用いて精製し, DNA シーケンシングのテンプレートとした。DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing kit® (Amersham Biosciences) を用いて, GeneAmp 2400 thermal cycler® でジデオキシダイターミネーション反応を行った。この精製物を automated DNA sequencer® model 373 (Applied Biosystems) を用いてダイレクトシーケンスした。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

核酸配列および予測されるアミノ酸配列アライメント作製には SeqPup コンピュータープログラムおよび Fortran コンピュータープログラムを用いた。また, シーケンスホモロジー等は GENETYX-MAC 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

5 人のエナメル質形成不全症患者の AMBN, ENAM, MMP20, KLK4, DLX3 遺伝子翻訳領域とスプライス部位およびアメリロラスチン遺伝子のプロモーター領域の検索を行ったところ, そのうちの兄妹 2 人に DLX3 遺伝子の突然変異が存在することが判明した。

患者は大阪大学歯学部附属病院小児歯科に 10 年前より通院する 15 歳男子と 10 歳女

兄の兄妹であり、互いに多くの共通する症状を呈していた。歯には激しい咬耗と知覚過敏が認められ、萌出した前歯のエナメル質は極めて薄く、粗造感を認め、黄褐色を呈していた。大白歯にはエナメル質がほとんど存在せず、萌出後の前歯および小白歯はすべて microdontia であった (図 1)。また、パノラマエックス線写真所見では乳歯および永久歯前歯、小白歯には菲薄でエックス線透過性の高いエナメル質が存在していた。また、大白歯はタウロドント様形態を示し、エナメル質がほとんど存在していなかった (図 2)。全身所見は細く縮れた毛髪を有するが、骨や爪を含む他の器官に医科的異常所見を認めなかった。またこれらの症状は家族性に現れており、遺伝は常染色体性優性遺伝様式を呈していた (図 3)。以上の所見から AIIIV 型 (常染色体優性タウロドント併発性低形成-低成熟型) と診断した。



図 1 兄、初診時 (5 歳 5 か月) の口腔内写真

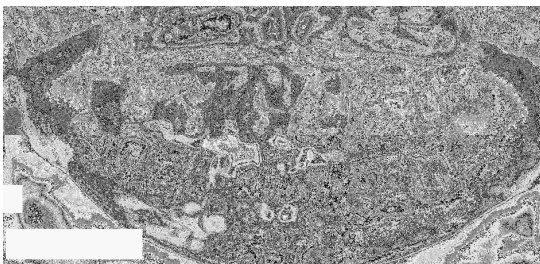


図 2 兄、初診時のパノラマエックス線写真

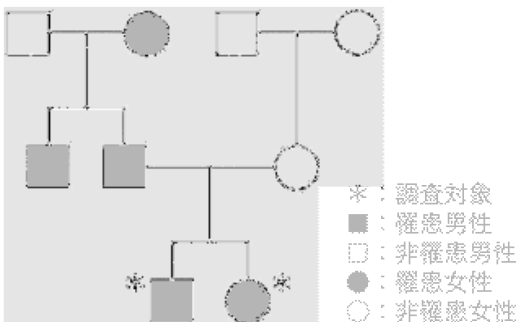


図 3 対象患者の家系図

この兄妹の AMBN, ENAM, MMP20, KLK4, DLX3 遺伝子翻訳領域とスプライス部位およびアトロラスチン遺伝子のプロモーター領域の調査を行ったところ、DLX3 遺伝子の翻訳領域に点突然変異を発見した。用いたプライマーはエクソン 1 の増幅に、DLXH1 (5' - CCT TCGCCTTCTGGACACACA-3' ) および DLXH2 (5' - TTTCTTAGAAGTTTTCTAGATTTTGGC -3' )、エクソン 2 は DLXH3 (5' - CTGGAGGGTCGCAGGAGTC G-3' ) および DLXH4 (5' -ATCCCAAAGGCAAGA GTTCCAG-3' )、エクソン 3 は DLXH5 (5' -CTA GGTCTCTCCAGGGTGTGTTTAG -3' ) および DLXH (5' -ATCCCAAAGGCAAGAGTTCAG-3' ) を用いた。兄妹ともに DLX3 遺伝子のエクソン 3 の塩基配列にシトシンがグアニンに置換される点突然変異 (c. 525C>G) が確認された。この突然変異によりコードするイソロイシンからメチオニンに置換 (p. I175M) されていると考えられる (図 4)。

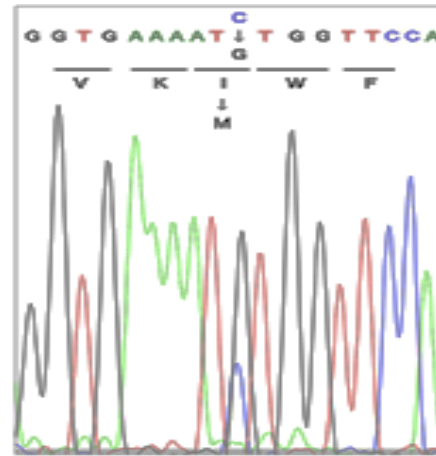


図 4 兄、DLX3 遺伝子の DNA シーケンシング

DLX3 遺伝子は Distal-less (Dlx) ファミリーの一員であり、ホメオボックス遺伝子として機能している。ホメオボックス遺伝子は、器官を作る際にその器官を作るのに必要なすべての遺伝子を支配し、カスケード状に流れていく命令系統のスイッチをオンにする上位遺伝子で、DNA に結合し命令を発するタンパク質部位 (ホメオドメイン) をコードする遺伝子である。Dlx ファミリーは発生中のショウジョウバエの頭と脚で発現する遺伝子である Distal-less (D11) の相同遺伝子として発見された。DLX3 遺伝子は第 17 番染色体長腕 (17q21.3-q22) に位置する。

ヒト以外の動物に見つかる相同遺伝子 Dlx3 推定アミノ酸配列のマルチプルアライメントを図 5 に示す。今回発見した点突然変異はホメオボックス遺伝子の最も重要な働きを成すホメオドメインをコードする領域の塩基配列に生じており、結果としてホメオドメインのアミノ酸配列に突然変異を引き起こしていた。また、Dlx ファミリー遺伝子

におけるホメオドメインの推定アミノ酸配列によるマルチプルアライメント (図6) を作製したところ、今回発見された突然変異は DLx3 遺伝子のみならず DLx ファミリー遺伝子全てにおいて、哺乳類から昆虫に至るまで高度に保存された部位に生じていることが明らかとなった。このことはこの点突然変異の生じた部位が DLx 遺伝子が機能するためにいかに重要で、必要不可欠な部位であることを示すのみならず、この突然変異が生体に与える影響の大きさをも表している。



図5 DLX3 推定アミノ酸配列のマルチプルアライメントおよび点突然変異部位の位置関係

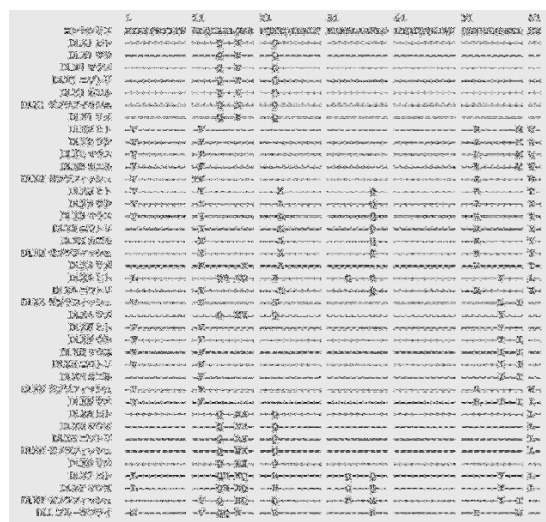


図6 DLx ファミリーホメオドメイン推定アミノ酸配列のマルチプルアライメント

これまでに AI タイプIV と DLX3 遺伝子の突然変異に関する報告は存在するが、塩基の欠失 (c.561-562delCT) が原因でフレームシフト (p.Y188fs200X) を起こした例であり、点突然変異が原因で発症する AI タイプIV の報告はこれが最初である。今回確認した点突然変異はホメオドメインをコードする部位に

位置していた。従って、DLX3 遺伝子が機能を果たす上で重要な役割を担っているアミノ酸残基が点突然変異したことが本症例の原因であると考えられ、同点突然変異はこの兄妹の家系で代々受け継がれているものと推察される。

ところで、DLX3 遺伝子はその突然変異 (c.571-574delGGGG, p.Y191fs258X) が別の病気をもたらすことが報告されている。毛髪・歯・骨症候群と呼ばれるもので、その主症状はエナメル質形成不全症、タウロドント、骨硬化、爪症状 (爪が脆い)、巻き毛であり、常染色体性優性遺伝形式を示す。それゆえ、AI タイプIV型と毛髪・歯・骨症候群が実際には一つの病気 (原因が同じ病気) ではないかと以前から考えられてきた。近年、DLX3 遺伝子の突然変異 c.561-562delCT, p.Y188fs200X) によって起こるエナメル質形成不全症であるにも関わらず、タウロドントと骨症状を併発せずに巻き毛と爪症状を併発する症例が報告されている。今回の症例は今まで未発見であった DLX3 遺伝子の突然変異を有し、エナメル質形成不全症とともにタウロドントと巻き毛を症状とするものの、爪症状と骨症状を併発しないものであった。従って、やはり AI タイプIV と毛髪・歯・骨症候群は DLX3 遺伝子の突然変異の形態や場所あるいは環境因子が異なるために起こる症状のバリエーションであると考えられ (図7)、いずれは一つの病気のサブタイプとしての再分類を行う必要があると考えられる。

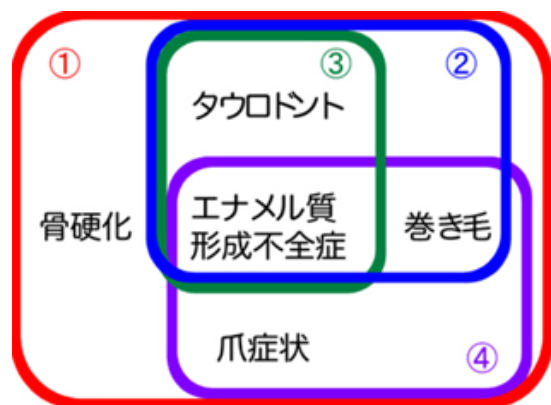


図8 DLX 遺伝子の突然変異で現れる症状  
①毛髪・歯・骨症候群 (1998)  
②エナメル質形成不全症タイプIV (本研究)  
③エナメル質形成不全症タイプIV (2005)  
④エナメル質形成不全症タイプIV (2008)

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 6 件)  
1. Shintan S, Kamakura N, Kobata M, Toyosawa S, Onishi T, Sato A, Kawasaki

- K, Weiss KM and Ooshima T, Identification and characterization of integrin-binding sialoprotein (IBSP) genes in reptile and amphibian., Gene, 2008, 424:11-17. (査読有り)
2. Onishi T, Shintani S, Wakisaka S, Ooshima T, Relationship of vitamin D with calbindin D9k and D28k expression in ameloblasts. Arch. Oral Biol., 2008, 53:117-123. (査読有り)
  3. Onishi T, Umemura S, Shintani S, Ooshima T, Phex mutation causes overexpression of FGF23 in teeth., Arch. Oral Biol., 2008 53:99-104. (査読有り)
  4. 新谷誠康, 遺伝性の歯の形成不全症 [第1回] 分子生物学・分子進化学からのアプローチ, 小児歯科臨床, 2008, 13:69-75. (査読無し)
  5. 新谷誠康, 遺伝性の歯の形成不全症 [第2回] 遺伝性エナメル質形成障害 (エナメル質形成不全症), 小児歯科臨床, 2008, 13:63-71. (査読無し)
  6. 新谷誠康, 遺伝性の歯の形成不全症 [第3回] 遺伝性象牙質形成障害 (象牙質形成不全症、象牙質異形成症), 小児歯科臨床, 2008, 13:67-75. (査読無し)

[学会発表] (計 3件)

1. エナメル質形成不全症タイプ IV に認められた DLX3 遺伝子の突然変異。小畑充彦、新谷誠康、大嶋隆, 第 50 回歯科基礎医学会 東京 2008. 9. 23 (2008. 9. 23-9. 25)
2. エナメルリン遺伝子機能不全マウスを用いた歯胚の組織学的観察, 織田進也、関口浩、新谷誠康、澤田 隆、柳澤孝彰、内田隆, 第 50 回歯科基礎医学会 東京 2008. 9. 23 (2008. 9. 23-9. 25)
3. 兄妹に発症したエナメル質形成不全症タイプ IVB の長期管理症例, 小畑充彦, 新谷誠康, 道上郁美, 小島あゆち, 大嶋隆, 第 46 回日本小児歯科学会大会 埼玉 2008. 6. 13 (2008. 6. 12-13)

[図書] (計 1件)

1. 新谷誠康, Topics! 歯の形成障害 「世代をつなぐ小児歯科-最新情報と子どもへの取り組み 45」, 編集:五十嵐清治, 吉田昊哲, 2008, 180-186.

## 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

大嶋 隆 (OOSHIMA TAKASHI)  
大阪大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号: 80116003

大西 智之 (ONISHI TOMOYUKI)  
大阪府立急性期・総合医療センター・障がい者歯科・副部長  
研究者番号: 30303978

岸野 万伸 (KISHINO MITSUNOBU)  
大阪大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号: 60346161

原 麻子 (HARA ASAKO)  
東京歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号: 10349540