

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目： 若手研究（スタートアップ）

研究期間： 2008 ～ 2009

課題番号： 20890009

研究課題名（和文）

口腔遺伝性疾患の分子遺伝学解析およびヒトエナメルマトリックス蛋白の臨床応用

研究課題名（英文）

The study of molecular genetics for oral genetic disorder and clinical application about human enamel matrix

研究代表者

貴田 みゆき (KIDA MIYUKI)

北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員

研究者番号：80507442

研究成果の概要（和文）：

口腔領域における遺伝性疾患のなかで、特に遺伝性エナメル質形成不全症 (AI)・遺伝性象牙質形成不全症 (DGI)・多数歯欠損に注目し、責任遺伝子同定を目的とした遺伝子解析を行った。その結果、DGI 症例ならびに多数歯欠損で新奇の変異を同定し、本邦初となる貴重な症例を報告した。さらに、ヒト歯胚から合成ヒトアメロジェニン蛋白を合成し、臨床応用に向けた基礎研究を行った。

研究成果の概要（英文）：

I tried to detect responsible genes about oral hereditary diseases, in particular, amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and oligodontia. I detected de novo mutations of DGI and Oligodontia. These mutations were reported as first cases in Japan. And I tried to apply synthesized human amelogenin protein for new clinical technology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 矯正・小児系歯学

キーワード： 口腔遺伝性疾患 遺伝性エナメル質形成不全症 遺伝性象牙質形成不全症 遺伝子解析 ヒトエナメルマトリックス蛋白

## 1. 研究開始当初の背景

近年のヒトゲノム研究の急激な発展により、遺伝病の原因遺伝子が次々と同定されつつあるものの、歯科領域では、口腔内の遺伝性疾患についての情報不足から、歯の形成異常や先天欠如を原因不明の全身的・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。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。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く、審美的・機能的障害を伴う口腔領域の疾患は早期の診断・治療が重要となってくる。

口腔領域における遺伝性疾患のなかで、特に遺伝性エナメル質形成不全症 (AI)・遺伝性象牙質形成不全症 (DGI)・多数歯先欠に注目し口腔領域における遺伝性疾患の症例を全国より集積した。

## 2. 研究の目的

AI や DGI 患者では遺伝的要因により、乳歯・永久歯にエナメル質および象牙質に形成不全が認められる疾患である。全歯にわたり冷水痛などの知覚過敏、咬耗、審美障害等が高頻度に認められ、重篤な症例では歯の萌出後早期に歯髄感染を生ずることから、その治療は一般に困難であるとともに、早期の治療開始が望ましい。また多数歯先欠は口腔の機能障害が予測され、継続的な咬合育成が必要である。

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。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た。

## 3. 研究の方法

全国より集積された口腔遺伝性疾患を疑う症例を家系ごとに個別化し、その臨床所見や遺伝様式から解析候補遺伝子を選別する。罹患者系から血液サンプルの提供を受け、有核細胞より DNA を抽出する。次に解析する対象遺伝子のゲノム配列から各エクソンを挟むように primer 設計を行った。解析対象遺伝子は、以下の通りである。

- ・ 遺伝性エナメル質形成不全症
  - アメロジェニン (Xp22)
  - アメロプラスチン (4q21)
  - エナメルリン (4q21)
  - エナメリシン (11q22.3-q23)
  - DLX3 (11q21.3-q22)
  - カリクライン4 (19q13)
- ・ 遺伝性象牙質形成不全症
  - DSPP (4q21.3)
- ・ 多数歯欠損症

MSX1 (4p16)

PAX9 (14q12-q13)

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。

さらに、正常人歯胚から全長アメロジェニンcDNAをクローニングし、蛋白発現ベクターに組み込んだ。

#### 4. 研究成果

##### (1) 遺伝性象牙質形成不全症 (DGI)

本症例の家系図を図1に示す。

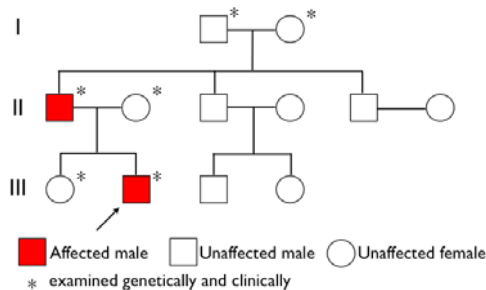


図1 本症例家系図

DGI家系の患児とその父に、形成不全を原因とする審美障害が確認された。患児は黄色半透明の歯を呈し、父親はエナメル質が剥げ落ち、その結果露呈した象牙質が急速な咬耗を生じたため歯冠が殆ど確認されなかった。シーケンス解析の結果DSPP遺伝子exon3にGTT → GAT (Val<sup>18</sup> → Asp)の変異が確認された(図2)。日本国内においてこれまでにDGIにおける病因遺伝子同定の報告は1例もない。また本症例は今までに報告のない変異

であり世界で25家系目の報告となった。

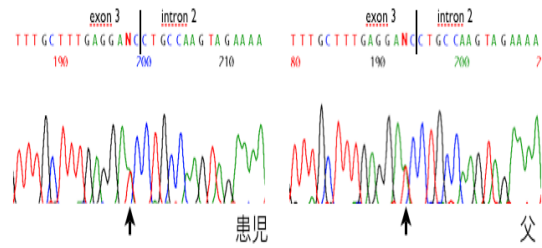


図2 DSPP遺伝子のシーケンス解析

##### (2) 多数歯欠損症

本性例の家系図を図1、患児エックス線写真を図2に示す。

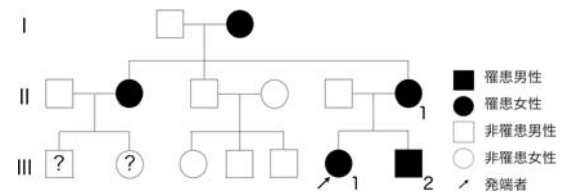


図1 本症例家系図



図2 16歳11ヶ月時エックス線写真

本家系における永久歯欠損数は患児16本、患児弟19本、患児母16本であり審美的・機能的障害も懸念された(図3)。

	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
II:1	X	X	X	X			p			p			X	X	X	X
II:1	X	X	X	X	X								X	X	X	X
III:2	X	X	X	X	X				f	f			X	X	X	X
	X	X	X	X	X				X	X			X	X	X	X

図3 口腔内所見 (X:欠損歯 p:円錐歯 f:癒合歯)

14番染色体上のPAX9遺伝子エクソン2に一塩基欠失を検出し(c.601delC, A198fsX211)病因変異と判定した(図4)。本例も本邦初の報告であり、現在のところ世界で19例目となるため、その報告準備を進めている。

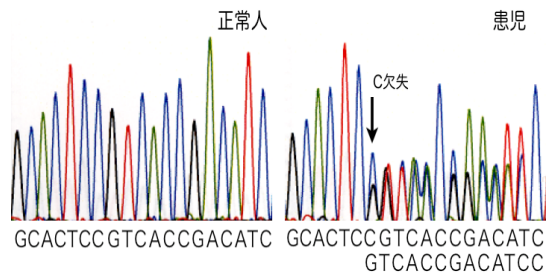


図4 PAX9 遺伝子のシーケンス解析

(3) 連携研究者

## 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2件)

1. Miyuki Kida, Tomonori Tsutsumi, Masanobu Shindoh, H Ikeda and Tadashi Ariga. “*De novo* mutation in the *DSPP* gene associated with dentinogenesis imperfecta type II in a Japanese family” *European journal of Oral Science* 2009 (117) 691-694 (査読有)
2. Miyuki Kida, Hirotaka Fujioka, Yoshiyuki Kosaka, Kouhei Hayashi, Yukio Sakiyama and Tadashi Ariga. “The first confirmed case with C3 deficiency caused by compound heterozygous mutations in the C3 gene; a new aspect of pathogenesis for C3 deficiency” *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2008 (40) 410-413 (査読有)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

貴田 みゆき (KIDA MIYUKI)

北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員

研究者番号：80577442

### (2) 研究分担者