

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293436

研究課題名(和文) 頭蓋顎顔面領域高頻度疾患の原因究明から病態発症機序解明への最先端研究戦略

研究課題名(英文) Research strategy for identification of the pathogenesis of the common structural abnormalities in craniomaxillofacial region

研究代表者

田中 栄二 (TANAKA, Eiji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：40273693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：非症候性多数歯欠損症を呈す家系の疾患関連遺伝子を探索したところ、既知原因遺伝子であるMsx1の3'末端近傍にフレームシフト変異が検出された。そこで、CRISPR/Casシステムを利用してマウスでC末端領域を欠失させたところ、従来のノックアウトマウスで見られた歯の完全欠損や口蓋裂に起因する生後すぐの致死とは異なる表現型、すなわち上顎第2臼歯の低形成ならびに第3臼歯欠損、下顎第2・第3臼歯、さらには下顎切歯の欠損が認められた。本表現型は、検出変異が疾患関連変異であることの妥当性を裏付けるものであった。

研究成果の概要(英文)：Non-syndromic tooth agenesis has been associated with mutation in a variety of genes involved in tooth morphogenesis. We identified a novel frameshift mutation of the highly conserved C-terminal domain of MSX1, known as Msx homology domain 6 (MH6), in a Japanese family with non-syndromic tooth agenesis. To investigate the importance of MH6 in tooth development, Msx1 was targeted in mice with a CRISPR/Cas system. Although heterozygous MH6 disruption did not alter normal craniofacial development, homozygous mice exhibited agenesis of lower incisors with or without cleft palate at E16.5. In addition, agenesis of the upper third molars and the lower second and third molars were observed in 4-week-old mutant mice. Although the upper second molars were present, they were abnormally small. These results suggest that the C-terminal domain of MSX1 is important for tooth and palate development.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ゲノム編集 遺伝子疾患 CRISPR/Cas 非症候性多数歯欠損

1. 研究開始当初の背景

頭蓋顎顔面領域における先天性疾患は、審美・機能面の他、発達面でも精神的・社会的問題を有することから、臨床的に治療法の改良が試みられてきた。このような先天性疾患の中でも非常に高頻度なものとして、口唇裂・口蓋裂(0.1~0.2%)と歯牙欠損症(7~8%)が挙げられる。前者の抱える様々な問題点は言うに及ばないが、歯の先天欠如も、歯科においては齲蝕・歯周病に次ぐ臨床で多く遭遇する疾患の1つであり、欠損が6歯以上に亘る場合には、口唇裂・口蓋裂同様、平成24年4月の健康保健改訂において、その矯正治療に健康保険が適用されるなど重要な疾患と位置付けられた。

一方、近年の次世代シーケンサーを用いたエクソームシーケンシングにより、従来の連鎖解析~サンガー法といった解析では到底困難であった原因遺伝子探索が一転、新規疾患原因遺伝子が続々と同定されてきている。ところが、上記疾患は高頻度であるにも関わらず、その原因の探索は未だ足踏みをしている。

歯牙欠損症は従来の解析法より、症候性も含めた家族例の連鎖解析から *Msx1*、*Pax9*、*EDA* 等いくつかの原因遺伝子が同定されてきた。しかし、未だに原因遺伝子不明の歯牙欠損症を有する家系あるいは散発例は非常に多い。このため、未知の原因遺伝子の同定と機能解析は、疾患の診断、クライアントによる受容や予後、次世代への伝達についての理解の助けとなるのみならず、遺伝子機能を修飾する分子標的治療の開発にもつながる喫緊の課題である。

我々は以前より徳島大学病院内における観察研究として、歯牙欠損症を有する家系を多数収集してきており、そのうち10家系において、非症候性で頻度の多い *Msx1*、*Pax9*、*Axin2*、*Wnt10a* 遺伝子の全エクソン配列をサンガー法にて解析したが、*Msx1* と *Pax9* に新規変異を各2家系ずつ検出したのみで、他は依然原因不明であり、歯牙欠損パターンの相同する他の責任遺伝子の報告も見当たらない。近年、Zinc Finger Nuclease (ZFN) や Transcriptional Activator-like Effector Nuclease (TALEN) といった人工ヌクレアーゼが開発されたことで、ゲノムDNAを任意の部位で意のままに編集可能となりつつあり、遺伝子ノックアウトから1塩基置換ノックインに至る網羅的 *in vivo* 機能解析にも光明を投じていた。

2. 研究の目的

本実験計画では、これまでの研究成果を発展させることも含め、主として収集しやすい口唇裂・口蓋裂ならびに歯牙欠損症の家系・散発例に対して、次世代シーケンサーによる解析を柱とした原因遺伝子探索により、新規

遺伝子異常を同定するとともに、人工ヌクレアーゼを用いた *in vivo* における機能解析から病態形成機序を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究計画では、頭蓋顎顔面領域の先天異常の原因となる新規遺伝子異常とその機能解析、さらに変異ごとのアノテーション付けによる診断を、以下のアプローチにより行う。最終的に、変異ごとのアノテーション付けによる正しい診断の新体系を構築する。

(1) 検体ならびに臨床情報収集

本研究において主な解析対象とする口唇裂・口蓋裂、歯牙欠損症は家系例、散発例とも口腔内所見から臨床症状を確認し、パノラマレントゲン撮影などにより詳細が把握され表現型の担保されたものを使用する。また、ゲノムDNAは患者ならびに家族より唾液約5mlを採取後、抽出する。

本過程では、これまでの準備期間に既知遺伝子異常の見つからない口唇裂・口蓋裂散発例8例ならびに4家系の歯牙欠損症と6例の散発例の検体を収集しており、それらの解析を先行させつつ随時検体数を増加させていく。年間見込み患者数は口唇裂・口蓋裂、歯牙欠損症ともこれまでの傾向から50例ずつである。なお、各検体から抽出されるゲノムDNAは速やかに凍結保存され、臨床情報とともに連結可能匿名化により管理される。

(2) 次世代シーケンサーを用いた疾患関連変異の検証

ターゲットシーケンスによるスクリーニング、エクソームシーケンス

表現型を有する例(家系であれば発端者)を対象に、既知ならびに過去の報告から候補と推測される約30遺伝子のターゲットシーケンスを行い、これらに変異を持たない症例をスクリーニング後、エクソーム解析の対象とする。家系・散発例ともに両親、同胞を含め、あらかじめタグを付け、まとめてエクソンキャプチャーした後に、徳島大学内のHiSeq1000を用いてエクソーム解析を行い、表現型に関連して検出され一般集団で認められない非同義変異、挿入・欠失、スプライシング acceptor/donor 領域の異常を同定する。

ターゲットゲノムシーケンスによる疾患関連変異の検証

のエクソームシーケンスにて原因同定されなかった検体に対しては、得られたSNPs情報から連鎖解析による染色体上での候補領域を限定後、同領域をキャプチャーするターゲットゲノムシーケンスにより疾患関連変異を検証する。

(3) *In vitro* 解析

候補となる遺伝子の原因遺伝子としての妥当性に関して、遺伝子クローニング後、in situ hybridization 法により発生過程における発現時期・部位を確認する。また、転写因子の場合はデータベースから結合領域ならびに標的遺伝子を予測後、それらの発現パターン解析を行う。

一方、これまでに検出した既知遺伝子(Msx1、Pax9)新規変異に関しては、関与するWnt/ β -catenin系との機能的関連をタンパク間相互作用、標的遺伝子(Bmp4等)プロモーターに対するリポーターアッセイ、強制発現系による候補標的遺伝子の発現変化、核内移行といった細胞内動態の変化、mRNAの安定性など、従来の手法から検討する。

(4) In vivo 機能解析 人工ヌクレアーゼ(TALEN)を利用したゲノム編集マウス作製

検出変異について、マウス発生工学的手法を駆使し、以下の手順に従い疾患原因遺伝子であることの妥当性を検証する。

新規遺伝子、または既知遺伝子であるが過去にノックアウトマウスの報告が見られない遺伝子の場合、当該遺伝子のTALEN RNAマイクロインジェクションにより、ノックアウトマウスを作製する。

ヒト疾患原因遺伝子のほとんどは点突然変異であるが、同遺伝子のヘテロマウスでは表現型として現れない場合が大多数のため、病態解析には同様の変異のノックインマウス作製が必要不可欠である。このため、ノックアウトマウス表現型の確認後、検出変異のノックインマウス作製を施行する。人工ヌクレアーゼを併用するノックインの場合、ベクターの相同領域は500bpで十分であるため、ゲノムDNAライブラリーは不要となり、PCRと通常の大腸菌を利用した遺伝子組換えにてノックインベクターが構築可能であるため、ノックアウトマウス作製による表現型確認後、速やかにノックインマウス作製に移行できると予想される。

これらにより獲得されたマウス胚の形態学的・組織学的観察を行い野生型と比較する。

4. 研究成果

検体ならびに臨床情報収集と次世代シーケンサーを用いた疾患関連変異の検証については、8例のエクソーム解析に加えて、16例の孤発例(新生突然変異やX連鎖性劣性遺伝などの遺伝形式を想定)に対する既知病原性遺伝子に特化したターゲットリシーケンスを行い、計24症例から5例で、疾患に関連すると考えられる責任遺伝子変異候補を検出できた。

また、多数歯欠損症を呈す家系の疾患関連遺伝子を探索したところ、既知原因遺伝子であるMsx1にフレームシフト変異が検出された。しかし、転写因子であるMsx1遺伝子変異の過去における報告は、全てDNA結合領

域であるホメオドメイン内かその上流で、今回検出されたフレームシフト変異は3'末端近傍であった。そこで、疾患関連変異を検証するため、それにより機能を失うMsx1タンパク質中最もC末端に存在する機能領域であるMH6に影響を及ぼすようgRNAを設定し、CRISPR/Casシステムをマウス1細胞期にて適用した。結果、Msx1ノックアウトマウス同様、口蓋裂ならびに歯の発生異常を認め、シーケンスによりMH6領域に影響を及ぼす変異が導入されていることも確認され、患者より検出された変異は疾患関連変異であることが示唆された。これは、疾患関連変異であることの証明のみならず、CRISPR/Casシステムを用いることで、in vitroでの機能解析が困難な場合、in vivoにて検証可能であることを示している。

非症候性多数歯欠損症家系の唾液サンプルからゲノムDNAを抽出し、歯牙欠損症の原因遺伝子の全てのエクソンのシーケンスをサンガー法にて行ったところ、Msx1遺伝子のエクソン2にフレームシフト変異を検出した。マウスMsx1遺伝子配列中、変異検出部位近傍に標的配列を設定し、マウス1細胞期胚においてマイクロインジェクションにてCRISPR/Casシステムを適用した。胎生16.5日に胚を摘出し、Msx1ノックインマウス様表現型の確認、ならびにゲノムDNAを抽出し、標的配列のシーケンスを行った結果、歯牙欠損症を有する家系に、過去に報告のないフレームシフト変異がMsx1の3'末端領域に検出された。本変異はMsx1遺伝子最下流のMH6領域に影響を与えるため、同領域の5'側にgRNA標的配列を設定し、マイクロインジェクション法によるCRISPR/Casシステムを適用し、胎生16.5日に胚を摘出したところ、12胚中6胚で口蓋裂ならびに歯の発生異常を認めた。

さらに、多数歯欠損症患者より検出した、既知遺伝子(Msx1遺伝子)内の新規フレームシフト変異の疾患原因変異としての妥当性の検証実験を行った。当科における多数歯欠損症患者から検出された新規変異の原因変異としての真偽を検証するため、同変異により欠失するC末端領域をCRISPR/Casシステムを利用してマウスで欠失させたところ、従来のノックアウトマウスで見られた歯の完全欠損や口蓋裂に起因する生後すぐの致死とは異なる表現型が得られた。すなわち、上顎第2臼歯の低形成ならびに第3臼歯欠損、下顎第2・第3臼歯、さらには下顎切歯の欠損が認められた(Mitsui et al., 2016 in Scientific Reports)。本表現型は、検出変異が疾患関連変異であることの妥当性を裏付けるばかりでなく、従来、in vitroの系でしか検討されてこなかったDNA deletion assayのin vivoへの発展性が示唆された。

また一方で、脊椎動物におけるヒト疾患モデル動物の作製については、CRISPR/Cas切断領域前後の相同配列と疾患関連変異を含

む一本鎖オリゴヌクレオチドの共導入により、ロックインマウス作製の系を構築した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Yasue A, Kono H, Habuta M, Bando T, Sato K, Inoue J, Oyadomari S, Noji S, Tanaka E, Ohuchi H (2017). Relationship between somatic mosaicism of *Pax6* mutation and variable developmental eye abnormalities—an analysis of CRISPR genome-edited mouse embryos. *Scientific Reports* 7(1):53, doi: 10.1038/s41598-017-00088-w, March. (査読有)
 2. Mino-Oka A, Izawa T, Shinohara T, Mori H, Yasue A, Tomita S, Tanaka E (2017). The role of hypoxia-induced transcriptopn factor-1 α on the development of temporomandibular joint osteoarthritis. *Archives of Oral Biology* 73(1): 274-281, doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.10.028, Jan. (査読有)
 3. Mitsui SN, Yasue A, Masuda K, Naruto T, Minegishi Y, Oyadomari S, Noji S, Imoto I, Tanaka E (2016). Biological validation of tooth agenesis-causing mutation using CRISPR/Cas system in mice. *Scientific Reports* 6:38398 doi: 10.1038/srep38398, Dec. (査読有)
 4. Izawa T, Arakaki R, Mori H, Tsunematsu T, Kudo Y, Tanaka E, Ishimaru N (2016). The nuclear receptor AhR controls bone homeostasis by regulating osteoclast differentiation via the RANK/c-Fos signaling axis. *Journal of Immunology* 197(12):4639-4650, Dec. (査読有)
 5. Shinohara T, Izawa T, Mino-Oka A, Mori H, Iwasa A, Inubushi T, Yamaguchi Y, Tanaka E* (2016). Hyaluronan metabolism in overloaded temporomandibular joint. *Journal of Oral Rehabilitation* 43(12): 921-928, doi: 10.1111/joor.12443, Dec. (査読有)
 6. Mansjur KQ, Kuroda S, Izawa T, Maeda Y, Sato M, Khariunaa G, Watanabe K, Horiuchi S, Tanaka E (2016). The effectiveness of human parathyroid hormone and low-intensity pulsed ultrasound treatments for the healing of farctures in osteoporotic bones. *Annals of Biomedical Engineering* 44(8):2480-2488, doi: 10.1007/s10439-015-1533-y, Aug. (査読有)
 7. Barrientos E, Pelayo F, Tanaka E, Lamela-Rey MJ, Fernández-Canteli A (2016). Dynamic and stress relaxation properties of the whole porcine temporomandibular joint disc under compression. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 57:109-115, doi:10.1016/j.jmbbm, April. (査読有)
 8. Sato M, Kuroda S, Mansjur KQ, Ganzorig K, Nagata K, Horiuchi S, Inubushi T, Yamamura Y, Azuma M, Tanaka E (2015). Low-intensity pulsed ultrasound rescues insufficient salivary secretion in autoimmune sialadenitis. *Arthritis Res Ther* 17:278, Oct. (査読有)
 9. Mori H, Izawa T, Tanaka E (2015). Smad3 decifiency leads to mandibular condyle degradation via the Sphingosine 1-phosphate (S1P) / S1P₃ signaling axis. *Am J Pathol* 185(10): 2742-2756, Oct. (査読有)
 10. Hichijo N, Tanaka E, Kawai N, van Euijven LJ, Langenbach GEJ (2015). Effects of decreased occlusal loading on the mandibular bone characteristics. *PLoS One* 10(6):e0129290, March. (査読有)
 11. Yasue A, Mitsui SN, Watanabe T, Sakuma T, Oyadomari S, Yamamoto T, Noji S, Mito T, Tanaka E (2014). Highly efficient targeted mutagenesis in one-cell mouse embryos mediated by TALEN and CRISPR/Cas systems. *Scientific Reports* 4: 5705, doi: 10.1038/srep05705, July.(査読有)
- 〔学会発表〕(計 11 件)
1. Mitsui SN, Yasue A, Horiuchi S, Oyadomari S, Tanaka E. Rogdi Disrupted Mice Showed Amelogenesis Imperfecta-like Phenotype. 95th IADR, March 23, 2017, San Francisco, CA, USA.
 2. Mitsui SN, Yasue A, Imoto I, Oyadomari S, Tanaka E: Biological validation of tooth agenesis causing mutation using CRISPR/Cas system in mice. 第 75 回日本矯正歯科学会大会、平成 28 年 11 月 8-9 日、アスティとくしま(徳島県徳島市)
 3. 岡 彰子、井澤 俊、篠原丈裕、森 浩喜、田中栄二: HIF-1^{+/+}マウスを用いた変形性顎関節症における HIF-1 の機能解析. 第 29 回日本顎関節学会総会・学術大会、平成 28 年 7 月 17-18 日、湯本富士屋ホテル(神奈川県足柄下郡)
 4. Sato M, Fujita M, Mansjur KQ, Horiuchi S, Inubushi T, Yamamura Y,

- Azuma M, Tanaka E. Low-intensity pulsed ultrasound rescues insufficient salivary secretion in Sjogren syndrome. 2016 AADR/CADR Annual Meeting & Exhibition, March 16-19, 2016, Los Angeles, CA, USA.
5. Mansjur KQ, Sato M, Izawa T, Horiuchi S, Tanaka E. Combined therapeutic effects of parathyroid hormone and low-intensity pulsed ultrasound enhance bone fracture healing in osteoporotic rats. 2016 AADR/CADR Annual Meeting & Exhibition, March 16-19, 2016, Los Angeles, CA, USA.
6. 泰江章博, 田中栄二: ゲノム編集技術を用いたマウス1細胞期胚における遺伝子変異導入. 平成27年度革新的特色研究シンポジウム「エピゲノムと臓器ネットワークで迫る次世代糖尿病研究」, 平成28年2月8日、藤井節郎記念ホール(徳島県徳島市)
7. Yasue A, Kono H, Bando T, Ishimaru Y, Inoue J, Watanabe T, Oyadomari S, Noji S, Mito T, Ohuchi H, Tanaka E: Study of *Pax6*-deficient mosaic mice generated by the CRISPR/Cas system. 第48回日本発生生物学会、平成27年6月2-5日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)
8. Mitsui SN, Yasue A, Tanaka E. Mutation affecting the C-terminal of *MSX1* causes non-syndromic tooth agenesis. 93rd IADR, 8-12th March, 2015, Boston, CA, USA.
9. Mitsui SN, Yasue A, Matsuda K, Watanabe K, Horiuchi S, Imoto I, Tanaka E. Sequence analysis and in vitro study of novel mutations identified in patients with tooth agenesis. The 3rd ASEAN Plus and Tokushima Joint International Conference, Dec 4-5, 2014, Makassar, Indonesia.
10. 河野仁美、泰江章博、石丸善康、井上順治、渡辺崇仁、板東哲哉、親泊政一、野地澄晴、三戸太郎、山本卓、田中栄二、大内淑代: CRISPR/Cas システムによる *Pax6* 遺伝子破壊マウスの解析. 第37回日本分子生物学会年会、平成26年11月25-27日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
11. Yasue A, Mitsui SN, Watanabe T, Sakuma T, Oyadomari S, Yamamoto T, Noji S, Mito T, Tanaka E. Highly efficient targeted mutagenesis in one-cell mouse embryos mediated by TALEN and CRISPR/Cas systems. X meeting for Spanish Society for Developmental Biology (SEBD), Oct

13-15, 2014, Madrid, Spain.

〔その他〕(計 2 件)

1. 医療 NEWS : 多数歯欠損症にかかわる *MSX1* 遺伝子を新規変異検出—徳島大学 <http://www.qlifepro.com/news/20170116/new-mutation-detection-of-msx1-gene-involved-in-multiple-tooth-defect.html>
2. @m3.com 臨床ダイジェスト: 臨床ニュース ドライマウスの新治療法を開発 <https://www.m3.com/clinical/news/369910?from=openClinicalNews>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 栄二 (TANAKA, Eiji)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号: 40273693

(2)研究分担者

泰江 章博 (YASUE, Akihiro)
徳島大学・病院・講師
研究者番号: 80380046

井本 逸勢 (IMOTO, Issei)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号: 30258610

(1) 研究協力者

三井 なおみ (MITSUI, Naomi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・ポスドク