

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10413

研究課題名(和文) 上顎正中過剰歯の発症を予測可能な遺伝子マーカーの検出

研究課題名(英文) Search for genetic markers associated with susceptibility to mesiodens formation

研究代表者

清水 武彦 (SHIMIZU, Takehiko)

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：40328761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：上顎正中過剰歯の発症頻度や治療に関する報告は多いが、その成因は未知である。本研究の目的は、上顎正中過剰歯発症に関わる遺伝子マーカーを検出することである。被検者は、正中過剰歯群24名とコントロール群24名である。げっ歯類の切歯部過剰歯発生に関与するSOSTDC1、LRP4、PAX6遺伝子の一塩基多型(SNPs)において、遺伝子型とアレル頻度を過剰歯群と対象群間で比較した。二群間で統計学的に有意に差のあるSNPsは検出されなかった。しかしながら、二群間で示唆的な差がLRP4のエクソン内SNPであるrs6485702において検出された。LRP4が上顎正中過剰歯発症に関与する可能性が示唆的に示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上顎正中過剰歯が原因となり、永久前歯の位置異常や萌出障害を生じ、歯列不正が重篤化することがある。従って、小児の健全な歯列発育を誘導する上で、上顎正中過剰歯の早期発見、治療が重要となる。本研究において、上顎正中過剰歯群とコントロール群間で、LRP4遺伝子のエクソン内のrs6485702の遺伝子型・アレル頻度において示唆的な差が認められた。LRP4遺伝子の上顎正中過剰歯発症への関与の可能性を示唆する結果であり、今後同遺伝子のさらなる分析の必要性を示すものであった。本研究の成果は、今後上顎正中過剰歯発症に関わる遺伝子マーカーの検出に繋がる可能性があり、歯科臨床に大きく貢献できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A mesiodens is the most common supernumerary tooth present in the maxillary incisor area. There have been many reports regarding the prevalence and treatment for supernumerary teeth; however, the etiology of the condition is still unknown. This study aimed to identify genetic markers associated with susceptibility to mesiodens formation. The study population comprised 24 patients with mesiodens and 24 controls. Genomic DNA was obtained from the soft tissue of extracted supernumerary teeth or saliva samples. Genotypes and allele frequencies of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes associated with supernumerary incisor formation in rodents, including SOSTDC1, LRP4 and PAX6 were compared between mesiodens group and controls using chi-squared tests. No positive polymorphisms were found in the tested SNPs between the two groups. However, rs6485702 which is one of the exon SNPs in LRP4 was detected with suggestive difference between the two groups.

研究分野：小児歯科学

キーワード：上顎正中過剰歯 遺伝子マーカー 遺伝要因 一塩基多型

1. 研究開始当初の背景

歯科臨床において、上顎正中過剰歯が原因となり、永久前歯の萌出障害や発育障害がみられる。従って、小児の健全な歯列発育を誘導する上で、正中過剰歯発症の原因を探求することは臨床的意義が大きい。上顎正中過剰歯は家族性に発症することがあり、遺伝要因が関与していると考えられている¹⁾。正中過剰歯が一卵性双生児の両者に発症している症例報告が多数みられ、遺伝要因の関与を示唆している²⁾。しかし、ヒトにおいて正中過剰歯の遺伝学的研究は少なく、詳細な遺伝子解析は世界的にみても少なく、原因は未知である。

様々な疾患の発症には、遺伝要因と環境要因が関与する。それぞれの疾患によって、遺伝要因と環境要因の関与の頻度は異なる。遺伝要因が関与する疾患では、SNP (Single Nucleotide Polymorphism: 一塩基多型) を始めとする遺伝子の DNA 配列の違いによって生じている場合が多いとされる。遺伝性疾患の原因遺伝子を同定するための手法として、SNP を用いたゲノムワイドスクリーンにより候補遺伝子を検出したり、特定の遺伝子の SNP 解析を行ったりすることで疾患の原因と結びつける手法が行われている。

2. 研究の目的

本研究では、上顎正中過剰歯発症に関わる遺伝子マーカーを検出するために、過去のげっ歯類を用いた研究において、上顎切歯部過剰歯発症の原因であることが示唆されている遺伝子について SNP 解析を行い、上顎正中過剰歯発症に関わる遺伝子を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 被検者および試料

被検者を過剰歯群と過剰歯のないコントロール群の2群に分けた。過剰歯群は、口腔内診査、エックス線検査により上顎正中過剰歯が認められる者、また問診により過去に上顎正中過剰歯の抜去経験がある者で、かつ診査・問診により両親・兄弟姉妹のいずれかに上顎正中過剰歯が認められた者の計24名を過剰歯群とした。コントロール群は、口腔内診査、エックス線検査により上顎正中過剰歯が無く、かつ問診により過剰歯の家族歴がない者24人とした。過剰歯群では、治療の一環として抜去された過剰歯に付着する軟組織の2mm³を採取し、DNeasy® Blood & Tissue kit (QIAGEN) を用いて、約1µgのDNAを抽出した。また、過去に上顎正中過剰歯を抜去した既往のある過剰歯群者については、唾液2mlをDNA self-collection Kit (Oragene®•DNA (株) 共同インターナショナル) に採取し、唾液から約1µgのDNAを抽出した。コントロール群からは、同様に唾液2mlを採取し、約1µgのDNAを抽出した。本研究は本学部倫理委員会の承認 (EC16-15-012-1) を受けて実施した。

(2) ゲノムDNA増幅と定量

上顎正中過剰歯群、コントロール群それぞれからゲノムDNAを抽出した後、illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社) を用いて、ゲノムDNAを一塩基多型分析に必要なDNA量に増幅した。増幅したDNAの吸光度測定を微量分光光度計NanoDrop2000 (Thermo) を用いて行った。

(3) SNPジェノタイプング解析

SOSTDC1 (*sclerostin domain containing 1*)、*LRP4* (*low density lipoprotein receptor-related protein 4*)、*PAX6* (*paired box 6*) 遺伝子から、NCBI データベース上で日本人頻度20%以上の高頻度のSNPを選択し、解析対象とした。過去の研究において、*Sostdc1*、*Lrp4* 欠損マウスならびに *Pax6* 変異ラットにおいて、切歯領域に正中過剰歯が生じている。特定の遺伝子変異によって切歯部過剰歯が発症するため、これらの遺伝子が切歯部過剰歯発症に関与することが明らかとなっている。*SOSTDC1* では rs17619858、rs1981596 (表1)、*LRP4* では rs10838623、rs2306033、rs6485702、rs898604 (表2)、*PAX6* では rs3026401、rs3026390、rs3026354 (表3) を選択した。これらのSNPについて、過剰歯群とコントロール群から得たDNAを用いて Taqman® SNP genotyping Assay Human SM (Thermo Fisher Scientific) と QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR Systems (applied biosystems) を用いて、遺伝子型を判定した。SNPジェノタイプング解析により遺伝子型を判定し、カイ二乗検定を用いて正中過剰歯群とコントロール群のアレル頻度および遺伝子型頻度の統計分析を行い、両者間で差のあるSNPを検出した。

表1 *SOSTDC1* のSNPs

遺伝子	SNP	ポジション	領域	アレル	日本人頻度
<i>SOSTDC1</i>	rs17619858	Chr.7,16,464099	イントロン	G/T	G: 77.0%
<i>SOSTDC1</i>	rs1981596	Chr.7,16,469461	遠位領域	G/T	G: 75.0%

G: グアニン, T: チミン

NCBIより

表2 *LRP4*のSNPs

遺伝子	SNP	ポジション(塩基対)	領域	アレル	日本人頻度
<i>LRP4</i>	rs10838623	Chr.7, 46857966	3'-UTR	G/A	G:68.2%
<i>LRP5</i>	rs2306033	Chr.7, 46875895	エクソン	G/A	G:38.3%
<i>LRP6</i>	rs6485702	Chr.7, 46877220	エクソン	G/A	G:28.3%
<i>LRP7</i>	rs898604	Chr.7, 46896432	イントロン	G/A	G:62.7%

A:アデニン, G:グアニン

NOBIより

表3 *PAX6*のSNPs

遺伝子	SNP	ポジション	領域	アレル	日本人頻度
<i>PAX6</i>	rs3026401	Chr.11, 31785976	3'-UTR	C/T	C: 51.6%
<i>PAX6</i>	rs3026390	Chr.11, 31791961	イントロン	A/G	A: 54.1%
<i>PAX6</i>	rs3026354	Chr.11, 31809109	イントロン	T/C	T: 63.8%

A:アデニン, G:グアニン, C: シトシン, T: チミン

NOBIより

4. 研究成果

(1) *SOSTDC1*のSNPにおけるアレル頻度および遺伝子型頻度

SOSTDC1 の 2 SNP のアレル頻度において、正中過剰歯群とコントロール群の間に統計学的な有意差は認められなかった (rs17618958, $P=0.13$, rs1981596, $P=0.58$) , (表4)。また、遺伝子型頻度においても、正中過剰歯群とコントロール群の間に統計学的な有意差は認められなかった (rs17618958, $P=0.11$, rs1981596, $P=0.47$) , (表5)。従って、本研究で調査した *SOSTDC1* の 3 SNP と上顎正中過剰歯発症との関連がない可能性が示唆された。

表4 *SOSTDC1*のSNPsにおけるアレル頻度

遺伝子	SNP	アレル	過剰歯群		コントロール群		P値
<i>SOSTDC1</i>	rs17618958	G/T	G:29	T:19	G:36	T:12	0.13
<i>SOSTDC1</i>	rs1981596	G/T	G:39	T:9	G:41	T:7	0.58

表5 *SOSTDC1*のSNPsにおける遺伝子型頻度

遺伝子	SNP	アレル	過剰歯群			コントロール群			P値
<i>SOSTDC1</i>	rs17618958	G/T	GG:7	TG:15	TT:2	GG:14	TG:8	TT:2	0.11
<i>SOSTDC1</i>	rs1981596	G/T	GG:16	TG:7	TT:1	GG:17	TG:7	TT:0	0.47

(2) *LRP4*のSNPにおけるアレル頻度および遺伝子型頻度

LRP4 の 4 SNP のアレル頻度において、正中過剰歯群とコントロール群の間に統計学的な有意差は認められなかった (rs10838623, $P=0.13$, rs2306033, $P=0.06$, rs6485702, $P=0.06$, rs898604, $P=0.13$) , (表6)。また、遺伝子型頻度においても、正中過剰歯群とコントロール群の間に統計学的な有意差は認められなかった (rs10838623, $P=0.25$, rs2306033, $P=0.24$, rs6485702, $P=0.06$, rs898604, $P=0.33$) , (表7)。しかしながら、rs6485702においては、アレル頻度、遺伝子型頻度ともに示唆的な差 ($P=0.06$) を示した。

Sostdc1 は歯の発生に関与しており、過去のマウスを用いた研究において、*Lrp4* が *Bmp* のアンタゴニストである *Sostdc1* に結合することで、歯の発生過程で *Bmp* と *Wnt* シグナルを調節することが報告されており、*Sostdc1* 変異マウスは上顎切歯部に過剰歯を発症することが報告されている³⁾。また、*Lrp4* 遺伝子変異マウスにおいても、上顎切歯部に過剰歯が発症する⁴⁾。*LRP4* のエクソン内にある rs6485702 において、二群間でアレル頻度、遺伝子型頻度ともに示唆的な差を示したことにより、上顎正中過剰歯発症に *LRP4* が関与する可能性が示唆され、今後さらなる *LRP4* 遺伝子の分析の必要性が示唆された。

表6 LRP4のSNPsにおけるアレル頻度

遺伝子	SNP	アレル	過剰歯群		コントロール群		P値
Lrp4	rs10838623	G/A	G:42	A:4	G:37	A:9	0.13
Lrp4	rs2306033	G/A	G:23	A:23	G:14	A:32	0.06
Lrp4	rs6485702	G/A	G:17	A:29	G:9	A:37	0.06
Lrp4	rs898604	G/A	G:25	A:21	G:32	A:14	0.13

表7 LRP4のSNPsにおける遺伝子型頻度

遺伝子	SNP	アレル	過剰歯群			コントロール群			P値
Lrp4	rs10838623	G/A	GG:19	AG:4	AA:0	GG:15	AG:7	AA:1	0.25
Lrp4	rs2306033	G/A	GG:6	AG:10	AA:7	GG:2	AG:10	AA:11	0.24
Lrp4	rs6485702	G/A	GG:3	AG:11	AA:9	GG:0	AG:9	AA:14	0.06
Lrp4	rs898604	G/A	GG:7	AG:11	AA:5	GG:11	AG:10	AA:2	0.33

(3) PAX6のSNPにおけるアレル頻度および遺伝子型頻度

Pax6 rSey2/rSey2変異ラットにおいて、胎生20日に本来の上顎切歯に隣接して過剰歯胚が発生することが報告されており⁵⁾、またヒトにおいてもPAX6内の多型が正中過剰歯発症へ関与する可能性が報告されている⁶⁾。PAX6の3SNPのアレル頻度において、正中過剰歯群とコントロール群の間に統計学的な有意差は認められなかった(rs3026401, P=0.36, rs3026390, P=0.15, rs3026354, P=0.28)、(表8)。また、遺伝子型頻度においても、正中過剰歯群とコントロール群の間に統計学的な有意差は認められなかった(rs3026401, P=0.61, rs3026390, P=0.34, rs3026354, P=0.51)、(表9)。従って、本研究で調査したPAX6の3SNPと上顎正中過剰歯発症との関連がない可能性が示唆された。

表8 PAX6のSNPsにおけるアレル頻度

遺伝子	SNP	アレル	過剰歯群		コントロール群		P値
PAX6	rs3026401	C/T	C:23	T:25	C:28	T:20	0.36
PAX6	rs3026390	A/G	A:24	G:24	A:31	G:17	0.15
PAX6	rs3026354	T/C	T:35	C:13	T:30	C:18	0.28

表9 PAX6のSNPsにおける遺伝子型頻度

遺伝子	SNP	アレル	過剰歯群			コントロール群			P値
PAX6	rs3026401	C/T	CC:7	CT:9	TT:8	CC:9	CT:10	TT:5	0.61
PAX6	rs3026390	A/G	AA:7	AG:10	GG:7	AA:12	AG:7	GG:5	0.34
PAX6	rs3026354	T/C	TT:14	TC:7	CC:3	TT:10	TC:10	CC:4	0.51

<引用文献>

- 1) Nakamura T, Fukumoto S: Genetics of supernumerary tooth formation, Journal of Oral Biosciences, 55:180-183, 2013.
- 2) Langowska-Adamczyk H, Karmańska B: Similar locations of impacted and supernumerary teeth in monozygotic twins: A report of 2 cases, Am J Orthod Dentofacial Orthop, 119:67-70, 2001.
- 3) Murashima-Suginami A, Takahashi K, Kawabata T, Sakata T, Tsukamoto H, Sugai M, Yanagita M, Shimizu A, Sakurai T, Slavkin HC, Bessho K.: Rudiment incisors survive and erupt as supernumerary teeth as a result of USAG-1 abrogation, Biochem Biophys Res Commun, 359: 549-555, 2007.
- 4) Ohazama A, Johnson EB, Ota MS, Choi HY, Porntaveetus T, Oommen S, Itoh N, Eto K,

Gritli-Linde A, Herz J, Sharpe PT: Lrp4 modulates extracellular integration of cell signaling pathways in development. PLoS One, 3: e4092, 2008.

5) Kriangkrai R, Chareonvit S, Yahagi K, Fujiwara M, Eto K, Iseki S: Study of Pax6 mutant rat revealed the association between upper incisor formation and midface formation. Dev Dyn, 235: 2134-2143, 2006.

6) Lei HH, Liu H, Ge LH.: PAX6 polymorphisms in 20 Chinese children with supernumerary teeth in the maxillary incisor area, Int J Paediatr Dent, 21:271-277, 2011.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田尚迪、渡邊千尋、木村奈緒、清水武彦
2. 発表標題 上顎正中過剰歯と一塩基多型ジェノタイピングの関連の検討
3. 学会等名 第57回日本小児歯科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊（岩崎）千尋，清水武彦
2. 発表標題 上顎正中過剰歯発症と一塩基多型頻度の関連の検討
3. 学会等名 日本小児歯科学会第36回関東地方会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------