

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19293

研究課題名(和文) 永久歯先天性欠如の要因となる新たな遺伝子変異の探索と歯牙形成に与える影響の解明

研究課題名(英文) To identify genetic mutations and to investigate their influence on the odontogenesis in oligodontia patients.

研究代表者

星島 光博(Hoshijima, Mitsuhiro)

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：30736567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：永久歯の先天性欠如の要因となる新たな分子、遺伝子変異をゲノム解析により探索し、それらが歯の形成に及ぼす影響を解明することを目的として研究を行っている。同意の得られた先天性部分無歯症患者(症例群)と、永久歯の先天性欠如のない患者(対照群)を対象として血液試料を採取し、全遺伝子のエクソン解析を行うことでKCNK15、WNK1 および RAB38に症例群特異的な変異を同定した。これらの変異が、細胞の基質産生などの生理作用に及ぼす影響、タンパク質の細胞内局在について検証を行っている。また、岡山大学病院における先天欠如歯の状況について、歯種別や特殊疾患との関係を調査した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らがこれまでの全エクソン解析を通じて検出した症例群特異的なKCNK15、WNK1およびRAB38等の遺伝子変異については、歯を含む硬組織形成への関与を示す報告はなく、国内外でも類を見ない新規性の高い研究である。歯牙形成の研究に一石を投じる内容であり、学術的意義は大きい。

また、先欠歯を伴う症例群と対照群間の網羅的なゲノム解析によって、多くのさらに多くの新規の遺伝子変異が特定されれば、遺伝子診断による重度不正咬合の予防的回避や、歯牙再生等の歯科治療への応用につながる可能性があり、その社会的意義は非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：To identify genetic mutations and to elucidate their influence on the odontogenesis in oligodontia patients, we investigated the specific mutations for the oligodontia group in comparison with control group using all exome sequencing. As the results, some novel mutations, KCNK15, WNK1 and RAB38, were identified in the oligodontia group.

Furthermore, to study the influence of these genetic mutations on the physiological function, secretion of extracellular matrices, in odontoblasts. We analyzed the expression of mRNA and the subcellular localization of these proteins in the various cells.

In addition, we investigated of hypodontia in Department of Orthodontics, Okayama University Hospital and reported to a journal.

研究分野：矯正・小児系歯学

キーワード：先天性部分無歯症 全エクソン解析 KCNK15 WNK1 Rab38 PLA法

### 1. 研究開始当初の背景

分泌タンパク質である CCN ファミリータンパク質 2/結合組織成長因子(CCN2/CTGF)は、内軟骨性骨化で重要な役割を演ずる軟骨細胞、および骨形成を行う骨芽細胞の増殖・分化を共に促進する。CCN2 は様々な因子と相互作用し、多様な情報伝達系を介することで細胞の機能を制御しており、歯牙形成への関与も示唆されている。これまでに申請者は、Yeast two-hybrid screening により CCN2 と結合する多数の因子を同定し、これらの分子が軟骨細胞に及ぼす影響を明らかにしてきた。また、同定した CCN2 の結合因子を分類すると、その多くが分泌性の細胞外マトリクス関連因子であった(図 1)。これらのことは、CCN2 とその結合タンパク質が、硬組織の形成に強く関与していることを示唆しており、これらの因子は、骨・軟骨組織のみならず、歯の形成にも深く関わっているのではないかと考えられる。

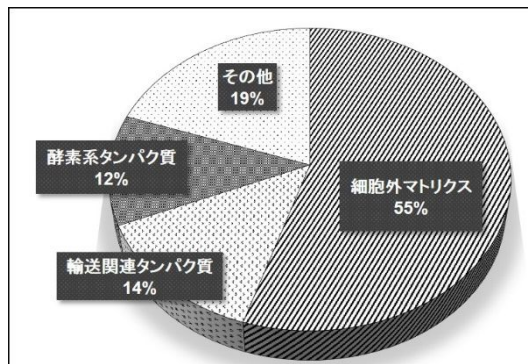


図1 同定したCCN2結合タンパク質の分類

一方、先天性多数歯欠如の患者は重篤な不正咬合を呈し、矯正歯科治療において難症例となっている。その原因遺伝子としては、*Msx1* や *Pax9* などをはじめ、いくつかの遺伝子が同定されている。しかしながら、原因遺伝子不明の永久歯先天性欠如を有する家系や散発例も非常に多く、これまでに示されている遺伝的变化から欠如歯数や部位を特定するのは困難である。また、既知遺伝子であっても、その変異の疾患責任性が検証された報告は少なく、小規模家系での検出変異では単なる多型の可能性もあるなど、真偽不明の報告も散見される現状である。

永久歯の先天欠如(先欠歯)は、対合歯の挺出や隣在歯の傾斜を引き起こし、継時的に重篤な不正咬合を誘発していく。そのため、先欠歯を出生後、早い段階で正確に診断できれば、成長期の歯科治療を有利に進めることができる。特に永久歯の先天欠如歯数や部位を遺伝子レベルで診断することで、予防的な乳歯の保存や矯正治療による歯列空隙の調整等を早期に行うことが可能となり、多くの患者で将来的な歯列不正を回避できる。歯の形成にかかわる遺伝子変異が特定できれば、将来的には欠損歯の自家再生にも応用できる。このように、遺伝子の変異を実際の歯科治療に応用する点から、新たな先欠歯に関与する原因遺伝子変異の解明が期待される。

### 2. 研究の目的

先欠歯の要因となる新たな分子、遺伝子変異を CCN2 やその結合因子、あるいは先欠歯を伴う症候群の原因遺伝子等を候補として探索し、それらが歯の形成に及ぼす影響を解明する。また、当院を受診する患者について、様々な部位、歯数の永久歯先天性欠如症例を解析することで、先欠部位や歯数と遺伝子変異の関連を検証する。先欠歯の原因となる遺伝子変異を特定、解析し、得られた知見を歯科治療へ臨床応用することが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

- (1) 当研究における患者の血液試料採得について、本学の生命倫理審査委員会に申請し承認を得た。
- (2) 岡山大学矯正歯科を受診した永久歯の非症候群性先天欠如を有する患者(症例群)と、永久歯の先天欠如のない患者や血縁者(対照群)を対象として、血液試料を採取した。インフォームドコンセントを行い、同意の得られた患者を被験者とした。採取した血液試料は岡大バイオバンクにて保管した。
- (3) 症例群と対照群について、それぞれの血液試料を採取し、全遺伝子のエクソンを行った。全解析の結果から、対照群と比較して症例群特異的な変異を同定した。
- (4) 変異を同定した遺伝子について、ヒト歯髄、歯根膜細胞等で発現を確認した後、遺伝子の全長をクローニングした。変異を導入した発現ベクター及びノックダウンに用いる siRNA を作成し、同定された遺伝子変異が細胞の遺伝子発現に及ぼす影響を検証する。
- (5) 遺伝子変異を含むタンパク質を歯原性細胞で発現させる。PLA 法によりそれらの相互作用や局在の変化を調べる。

- (6) 当院を受診した患者において、先欠歯の発生率を発生部位、歯種別に調査、分析することでその特徴を評価し、遺伝子変異との関連を検証する。

#### 4. 研究成果

- (1) 多数歯先天性欠如を伴う症例群および先欠歯を伴わない対照群について、患者から血液試料を採取し、岡山大学病院バイオバンクに保管した。患者から検体を採取するため、研究倫理審査を申請し昨年中に承認を得た上で、岡山大学病院矯正歯科を受診した患者にインフォームドコンセントを行い、同意の得られた患者を被験者とした。非症候群性の先天性部分無歯症患者(症例群)と、永久歯の先天性欠如のない患者(対照群)を対象として血液試料を採取した。症例群として多数歯にわたる先天性部分無歯症の患者および対照群から、12 症例の検体を採得できた。
- (2) 症例群と対照群それぞれの全遺伝子のエクソン解析を行うことで、症例群特異的な変異を探索した。これらの解析から、症例群特異的な遺伝子変異を *KCNK15*、*WNK1* および *RAB38* をはじめ、複数の遺伝子で同定することができた。しかしながら、*CCN2* を含む *CCN* ファミリーおよびその結合因子においては、症例群特異的な遺伝子変異を同定できず、上述の変異を含む遺伝子を中心に検討を進めることとした。

- (3) カリウムチャンネルの遺伝子をコードする *KCNK15* に症例群特異的な 3 か所の変異を同定した。次いで、ヒト由来の *KCNK15* 遺伝子全長をクローニングし、変異を導入したベクターを象牙芽細胞で発現させることで、細胞の基質産生や細胞内外のイオンバランスの変化を確認中である。また、偽性低アルデステロン症の原因遺伝子である *WNK1* ではミスセンス変異が生じており、酵素活性に影響を与える可能性が示唆された。

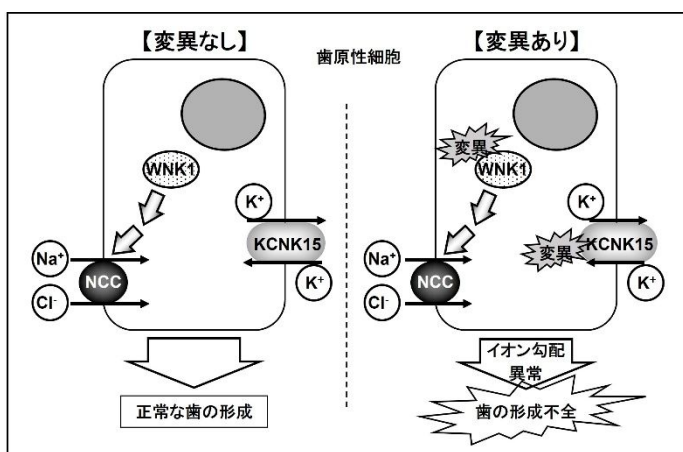


図2 *KCNK15*および*WNK1*の変異が細胞に与える影響について

- (4) *RAB38* がコードする低分子 G タンパク質は、申請者がこれまでに研究してきた Rab14 GTPase と同じファミリーに属しており、スプライシングに重要なドナーサイトに変異が生じていることが明らかとなった。*CCN2* と Rab14 の相互作用が細胞内輸送と基質産生に及ぼす影響については、当該期間中の 2020 年に *International Journal of Molecular Sciences* へ掲載された。同様の実験系を利用することで細胞レベルの検証を進めることが可能となった。

- (5) 症例群特異的な変異を有するこれらの遺伝子について、proximity ligation assay (PLA) を用いた局在の確認を行っている。PLA を用いたタンパク質の局在については、その手法について検証し、2022 年に国際誌である *Methods Mol Biol.* に掲載された (in Press)。

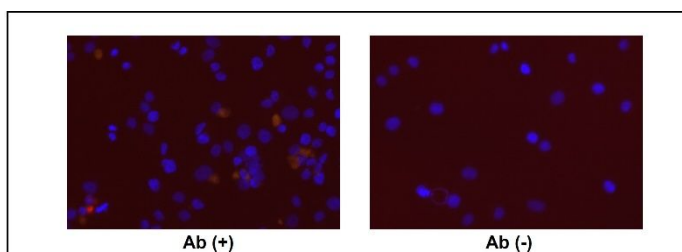


図3 The interaction between *CCN2* and Rab14 in HCS-2/8 cells is assessed by the PLA technology (red). Nuclei are visualized using DAPI (blue).

(6) 本研究に伴って岡山大学病院における先欠歯の状況について、その発症率や歯種別、特殊疾患との関係を統計的に調査した。その結果については、学会で報告し 2020 年と 2021 年に国内の論文に掲載された。

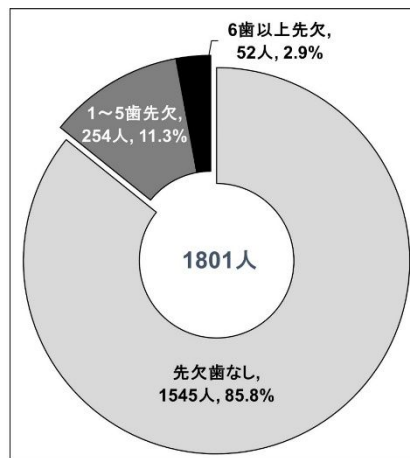


図4 当院における先欠歯を伴う患者の割合 (2012年~2019年)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hoshijima M, Hattori T, Aoyama E, Nishida T, Kubota S, Kamioka H, Takigawa M.	4. 巻 21
2. 論文標題 Roles of Interaction between CCN2 and Rab14 in Aggrecan Production by Chondrocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2769
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21082769.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 星島光博, 出射明美, 福井裕子, 鳥原秀美, 松田祐典, 上岡寛	4. 巻 39
2. 論文標題 岡山大学病院矯正歯科における永久歯先天性欠如に関する調査および矯正歯科治療症例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 岡山歯学会雑誌	6. 最初と最後の頁 19-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 太田 明美, 星島 光博, 中西 泰之, 植田 紘貴, 早野 暁, 上岡 寛	4. 巻 40
2. 論文標題 岡山大学病院矯正歯科における永久歯先天性欠如の歯種別発生率の調査	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 岡山歯学会雑誌	6. 最初と最後の頁 19-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 M. Hoshijima, E. Aoyama, H. Kamioka, and M. Takigawa	4. 巻 in Press
2. 論文標題 Imaging of molecular interaction between CCN protein and its binding partners: An in situ proximity ligation assay of interaction between CCN2 and Rab14 in chondrocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 in Press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 星島光博, 出射明美, 福井裕子, 上岡寛
2. 発表標題 岡山大学病院矯正歯科における永久歯先天性欠如に関する調査
3. 学会等名 第63回中・四国矯正歯科学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 星島光博, 岡直毅, 松村達志, 飯田征二, 山城隆, 上岡寛
2. 発表標題 重度叢生と歯根短小を伴う著しい骨格性開咬を上下顎外科的矯正治療により改善した症例
3. 学会等名 第29回特定非営利活動法人日本顎変形症学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星島 光博, 太田 明美, 中西 泰之, 植田 紘貴, 早野 暁, 上岡 寛
2. 発表標題 岡山大学病院矯正歯科における永久歯先天性欠如の調査
3. 学会等名 第2回せとうち臨床遺伝研究会
4. 発表年 2022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
---------	---------