

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10227

研究課題名(和文) In vivo assayを用いたWnt変異における歯牙欠損症発症機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of oligodontia caused by Wnt mutation using in vivo assay

研究代表者

泰江 章博 (YASUE, Akihiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・徳島大学専門研究員

研究者番号：80380046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Wnt10AとWnt10Bはヒトの歯牙欠損症の原因遺伝子として多くの報告があるものの、それぞれのノックアウト(KO)マウスでは歯数減少を生じない。そこで、ゲノム編集技術を用いWnt10aとWnt10bのダブルKOマウスを作製したところ、単独欠失変異体と異なり、上顎切歯・第三臼歯が欠失した。上顎第二臼歯・下顎切歯も矮小化しており、また、歯冠形態はWnt10a-/-同様平坦でタウロドントを呈し、さらに各々の変異体では認められなかった体長の減少も生じた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Wnt10aとWnt10bそれぞれのシングルノックアウトマウスでは歯数減少を示さなかったが、ダブル変異体では歯数の様々なバリエーションが示された。ダブルKOマウスを作製したところ、単独欠失変異体と異なり、上顎切歯・第三臼歯が欠失した。上顎第二臼歯・下顎切歯も矮小化しており、また、歯冠形態はWnt10a-/-同様平坦でタウロドントを呈し、さらに各々の変異体では認められなかった体長の減少も生じた。この結果は、Wnt10aとWnt10bのパラログ間での機能の重複・補完を示唆するものでもある。

研究成果の概要(英文)：Although Wnt10A and Wnt10B have been reported as causative genes of human dentition, knockout (KO) mice do not cause tooth loss. When created, unlike the original deletion mutant, the maxillary incisors and third molars were deleted. The maxillary second molars and mandibular incisors were also dwarfed, and the crown morphology was flat and taurodont-like in Wnt10a-/- . This result also suggests functional overlap/complementation between Wnt10a and Wnt10b paralogues.

研究分野：歯の発生

キーワード：歯の発生 ゲノム編集 歯牙欠損症 Wnt10a

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非症候性の歯牙欠損症の原因遺伝子としては、古くから PAX9、MSX1、EDA 遺伝子が知られているが、その欠損パターンには特徴がある。主として、PAX9 は大臼歯部、MSX1 は小臼歯部、EDA は前歯部の欠損を引き起こすことが報告されている。また、それぞれのノックアウトマウスも報告されており、Pax9 と Msx1 の KO マウスでは蕾状期において歯の発生が停止することが知られており、また口蓋裂も呈し、生後まもなく致死となる。EDA に関しては、自然発症の変異体があり、やはり歯数減少や歯冠形態の異常を生じる。このように、ヒトでは非症候性の歯牙欠損症を引き起こすこれらの遺伝子は、そのノックアウトマウスにおいても歯の発生に異常を来す。

Wnt は古くより良く知られた遺伝子で、種を超えて多くの family member が保存されており、ヒトおよびマウスではいくつかのパラログも含め合計 19 種類存在する。その中の Wnt10a と Wnt10b はお互いにパラログで、その発現パターンも、マウス胎生期において、ともに歯胚、鰓弓、四肢に強く認める。

WNT10A も非症候性歯牙欠損症の原因遺伝子として多数報告がなされている遺伝子であるが、前述の PAX9、MSX1、EDA とは異なり、特徴的な欠損パターンが認められていない。また、Wnt10a^{-/-}では、歯冠形態が丸みを帯びておりタウロドントを呈すると報告されている。また、歯数減少ではなく、下顎第三臼歯後方に第四臼歯が出現し、毛や汗腺等の外胚葉系器官に異常を来したり、骨密度の減少も認められるという報告がある。このように WNT10A の変異はヒトにおいて歯牙欠損症を引き起こすものの、そのノックアウトマウスにおいては歯数減少を認めない。

一方、WNT10B も WNT10A 同様、非症候性歯牙欠損症の原因遺伝子として報告があるものの、WNT10A と同様、欠損部位のパターンには特徴がない。また、ノックアウトマウスは 2010 年に報告があるが、歯数に関する言及がない一方、骨への影響が解析されており、体長に変化はないものの、骨小柱ならびに骨密度の減少を認め、骨恒常性に重要であることが示唆されている。

2. 研究の目的

このように、WNT10A と WNT10B は歯牙欠損症の原因遺伝子として多数報告があるものの、疑わしいものも散見され、一方でそれら KO マウスにおいて歯数減少の表現型が認められない。これには両遺伝子がパラログ且つ、類似の発現パターンを示しており、発生過程において双方の機能を補完している可能性も示唆される、判然としない。

そこで、本研究では、両遺伝子を同時破壊することで、歯の発生に及ぼす影響について検討を行った。

3. 研究の方法

- (1) ゲノム編集技術を用い、機能領域欠失変異体を網羅的に作製する。交配による様々な組合せのホモ・ヘテロ接合体も作製する。
- (2) 表現型の詳細な評価を行い、比較検討する。
- (3) 各変異体の歯の発生における他の重要遺伝子の発現動態変化を観察する。

4. 研究成果

機能補完の予想される Wnt10a と Wnt10b のダブル変異体を作製するため、CRISPR/Cas システムを利用し、それぞれの配列破壊を行った。

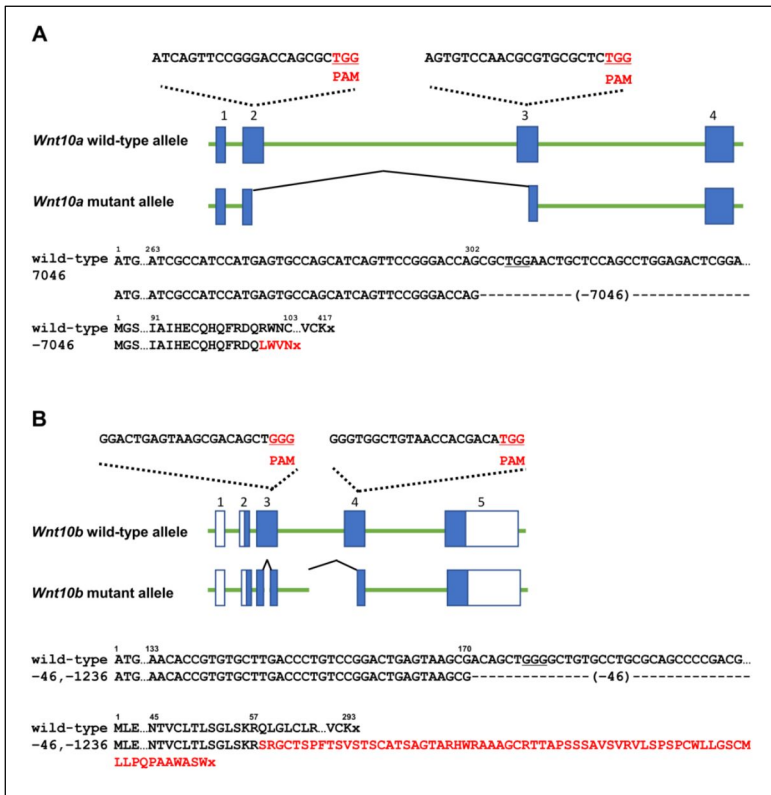


図 1. CRISPR/Cas システムを用いた Wnt10a と Wnt10b のターゲティング

A, B: Wnt10a においては Exon2 の内部と Exon3 の内部に標的配列を設定し、Exon2 から Exon3 にかけて 7046bp の deletion が生じた。Wnt10b においては Exon3 の内部と Exon4 の内部にそれぞれ PAM 配列を設計した結果、エクソン 3 内部で 46 塩基の deletion、イントロン 3 からエキソン 4 にかけて 1236 塩基の deletion が生じた。これら deletion 後の予測アミノ酸配列からそれぞれのタンパク質の機能を欠失していると考えられ、本研究において使用した。

そこで、次にこれらのダブル変異体を作製したところ、【図 2】に示すような非常に多岐にわたる歯数や歯牙形態における表現型が得られた。

態における表現型が得られた。

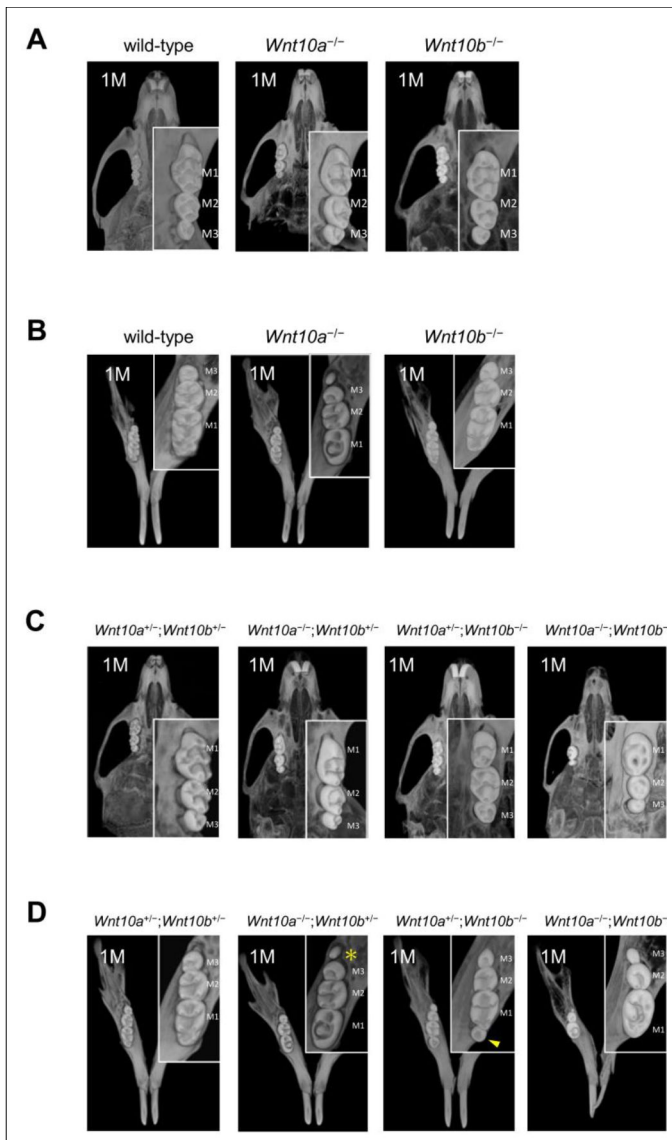


図 2. 各 Wnt10a, Wnt10b ダブル変異体における歯数・歯冠形態変化(4 週齢)

A, B: 野生型、Wnt10a^{-/-}、Wnt10b^{-/-}の上下顎骨。

Wnt10a^{-/-}の歯は野生型と比べ丸みを帯びていた。また、歯数減少は認めない一方、下顎第三臼歯後方の第四臼歯の存在が認められた。Wnt10b^{-/-}では歯に関しては野生型と違いを認めなかった。

C, D: Wnt10a^{+/-}; Wnt10b^{+/-}、Wnt10a^{-/-}; Wnt10b^{+/-}、Wnt10a^{+/-}; Wnt10b^{-/-}、Wnt10a^{-/-}; Wnt10b^{-/-}の上下顎骨。

Wnt10a^{+/-}; Wnt10b^{+/-}では歯の数や形態は野生型と比較して変化が見られなかった。

Wnt10a^{-/-}; Wnt10b^{+/-}は、Wnt10a single KOマウスと同様、上下顎とも丸みを帯びた歯冠形態を呈しており、下顎第三臼歯後方に第四臼歯の出現を認めた(米印)。

Wnt10a^{+/-}; Wnt10b^{-/-}では上顎臼

歯の大きさに違いがあり、野生型では上顎第一臼歯、第二臼歯、第三臼歯の順に小さくなるが、*Wnt10a*^{+/-};*Wnt10b*^{-/-}では上顎第二臼歯に比べて第一臼歯の方が小さかった。また下顎では、下顎第一臼歯前方のdiastemaに過剰歯の出現を認めた(矢頭)。*Wnt10a*^{+/-};*Wnt10b*^{-/-}では歯数の減少が見られ、上顎切歯および上下顎第三臼歯の欠損もしくは矮小化が見られた。M1: 第1臼歯、M2: 第2臼歯、M3: 第3臼歯。

Table 1. ダブル変異体の表現型とその出現率

遺伝子型	表現型	出現率
<i>Wnt10a</i> ^{-/-}	第4臼歯出現	3/5
<i>Wnt10b</i> ^{-/-}	変化なし	5/5
<i>Wnt10a</i> ^{+/-} ; <i>Wnt10b</i> ^{+/-}	変化なし	10/10
<i>Wnt10a</i> ^{-/-} ; <i>Wnt10b</i> ^{+/-}	M4第4臼歯出現	4/8
<i>Wnt10a</i> ^{+/-} ; <i>Wnt10b</i> ^{-/-}	過剰歯の出現	8/10
<i>Wnt10a</i> ^{-/-} ; <i>Wnt10b</i> ^{-/-}	第3臼歯欠損	3/5

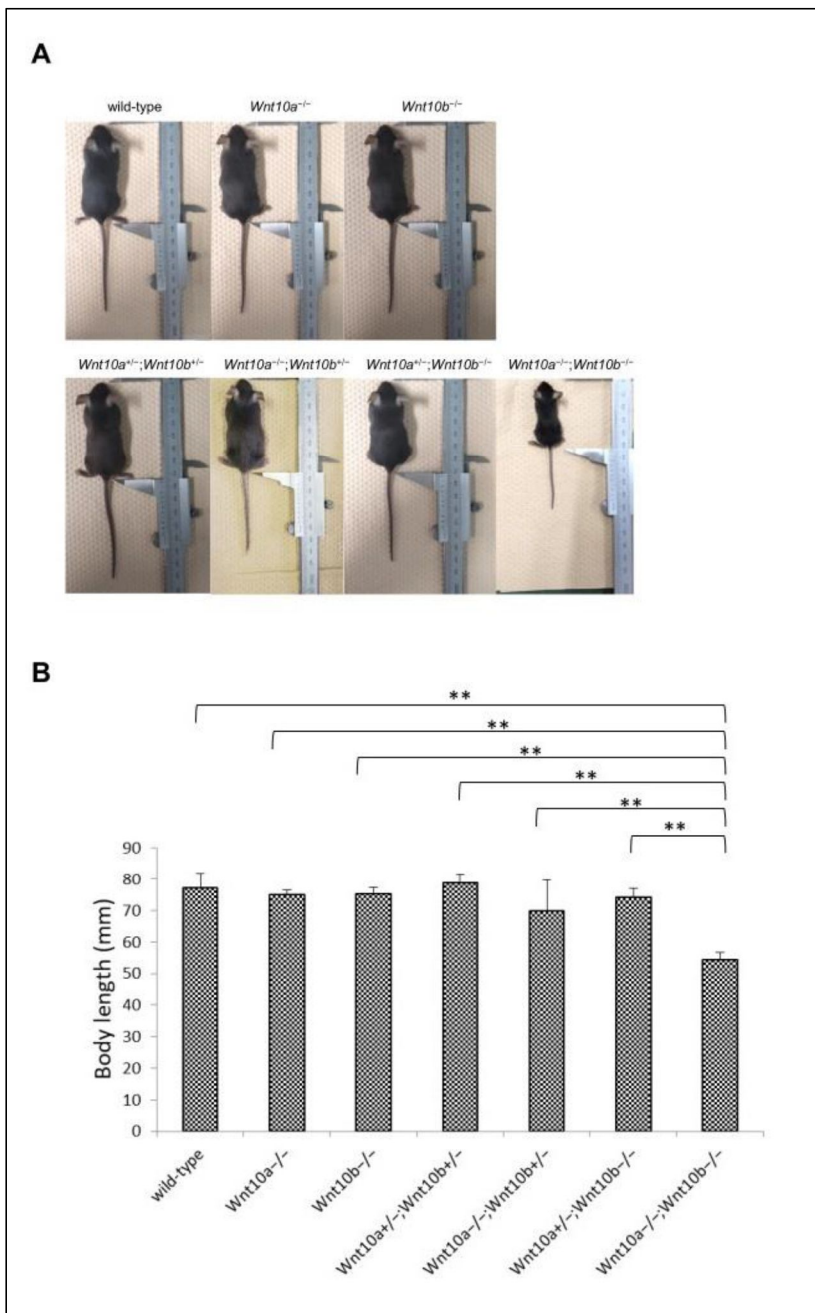


図3. *Wnt10a*と*Wnt10b*のダブル変異体の成長比率(4週齢)

A, B

Wnt10a^{-/-};*Wnt10b*^{-/-}のみ低い成長率を示したが、他は有意差を認めなかった。

** means $p < 0.01$.

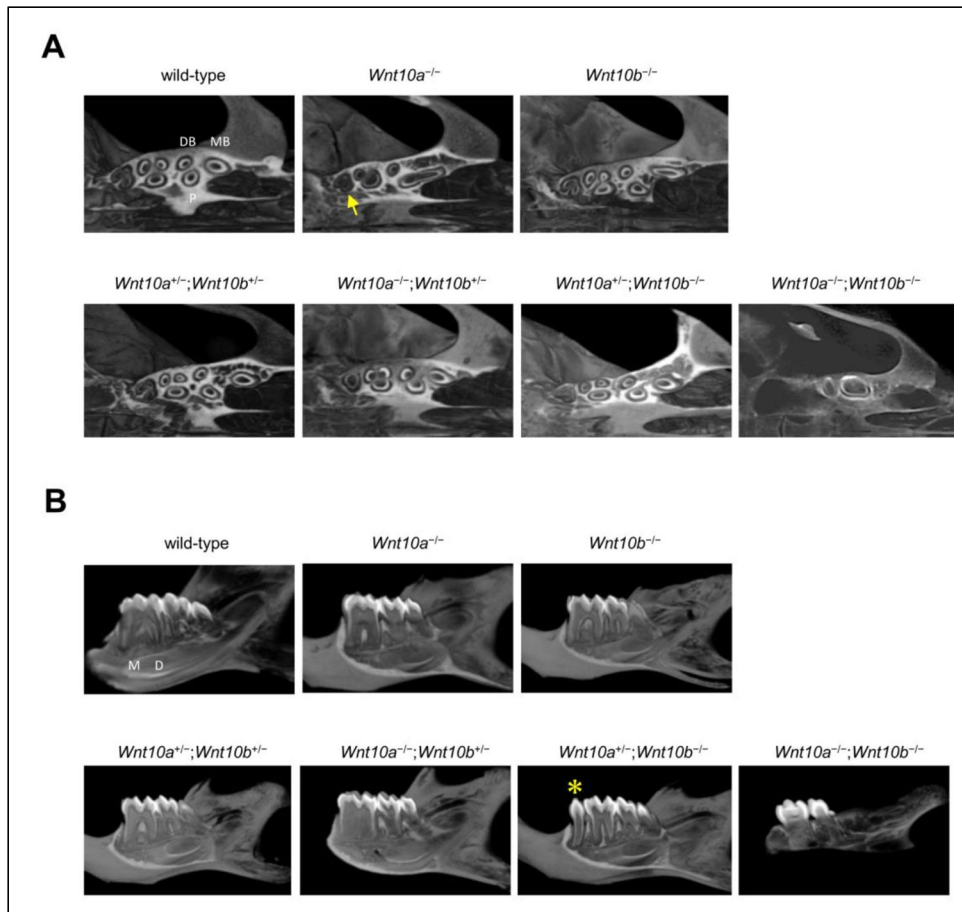


図 4. *Wnt10a*, *Wnt10b* のダブル変異体の歯根形態 (4 週齢)

(A) 上顎臼歯の水平断。 *Wnt10a*^{-/-} では上顎第一臼歯と上顎第二臼歯において頰側近心根と口蓋根の癒合を認め、上顎第三臼歯は単一の歯根、すなわち単根となっていた (矢印)。 *Wnt10b*^{-/-} においては野生型と比較して変化は見られなかった。 *Wnt10a*^{+/-}; *Wnt10b*^{+/-} においては変化が見られず *Wnt10a*^{-/-}; *Wnt10b*^{+/-} においては上顎第三臼歯が単根を呈しており、 *Wnt10a*^{+/-}; *Wnt10b*^{-/-} では変化がなく、 *Wnt10a*^{-/-}; *Wnt10b*^{-/-} においては上顎第一臼歯と第二臼歯は単根を呈していた。

(B) 下顎臼歯の矢状断。過去の報告と同様、 *Wnt10a*^{-/-} マウスでは歯髓腔の拡大がみられ、根分岐部の位置が根尖よりに移動していた。 *Wnt10b*^{-/-} では下顎臼歯の歯根形態に変化は見られず、 *Wnt10a*^{+/-}; *Wnt10b*^{+/-} においても下顎臼歯の歯根形態に変化は見られなかった。 *Wnt10a*^{-/-}; *Wnt10b*^{+/-} では *Wnt10a*^{-/-} と比べるとよりシビアなタウロドントを呈しており、 *Wnt10a*^{+/-}; *Wnt10b*^{-/-} では下顎第一臼歯、第二臼歯、第三臼歯には歯根形態に変化は見られず、第一臼歯前方 diastema の過剰歯は単根を呈していた (米印)。また、 *Wnt10a*^{-/-}; *Wnt10b*^{-/-} では近心根と遠心根が癒合しており単根を呈していた。

これらの結果より、 *Wnt10a* と *Wnt10b* は歯の形態や歯数決定において、機能補完をしながら重要な役割を担っていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Miyake M, Zhang J, Yasue A, Hisanaga S, Tsugawa K, Sakaue H, Oyadomari M, Kiyonari H, Oyadomari S.	4. 巻 24
2. 論文標題 Integrated stress response regulates GDF15 secretion from adipocytes, preferentially suppresses appetite for a high-fat diet and improves obesity.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103448-103448
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.103448. eCollection 2021 Dec 17	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 Du Qiqiao, Wu Jieyu, Fischer Carina, Seki Takahiro, Jing Xu, Gao Juan, He Xingkang, Hosaka Kayoko, Tong Le, Yasue Akihiro, Miyake Masato, Sobajima Mitsuaki, Oyadomari Seiichi, Sun Xiaoting, Yang Yunlong, Zhou Qinjun, Ge Minghua, Tao Wei, Yao Shuzhong, Cao Yihai	4. 巻 119
2. 論文標題 Generation of mega brown adipose tissue in adults by controlling brown adipocyte differentiation in vivo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences USA	6. 最初と最後の頁 e2203307119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2203307119	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 該当する

1. 著者名 Yoshinaga Kaoru, Yasue Akihiro, Mitsui Silvia Naomi, Minegishi Yoshiyuki, Oyadomari Seiichi, Imoto Issei, Tanaka Eiji	4. 巻 14
2. 論文標題 Effects of Wnt10a and Wnt10b Double Mutations on Tooth Development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 340-340
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes14020340	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kaoru Yoshinata, Akihiro Yasue, Eiji Tanaka
2. 発表標題 In vivo elucidation of the effect on the number of teeth caused by double mutant of Wnt10a and Wnt10b
3. 学会等名 International Orthodontic Congress（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akihiro Yasue
2. 発表標題 Identification of causative gene mutations of oligodontia and in vivo functional analysis of Msx1 using genome editing technology
3. 学会等名 9th International Orthodontic Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020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			
スウェーデン	カロリンスカ研究所			