

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10173

研究課題名（和文）日本人に多い癒合歯の原因遺伝子を全エクソンシーケンスで網羅的に探索する

研究課題名（英文）Comprehensive analysis for responsible gene of fused teeth using exome sequencing

研究代表者

山口 徹太郎（Yamaguchi, Tetsutaro）

神奈川歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：40384193

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）：癒合歯は、顎顔面領域に見られる不正咬合を惹起する頻度の高い疾患の一つであるにもかかわらず、原因は全く分かっていない。興味深いことに日本人に多く、家族性を認めることから、遺伝的関与は明らかである。一方、“全エクソンシーケンス（Exome sequencing）”により、家族性稀少疾患の原因遺伝子同定の成功例が数多く報告されるに至っている。本申請課題では、不正咬合の原因ともなる癒合歯について、下顎癒合永久歯前歯の家族性を呈する2家系、ならびにsporadicな対象者について、次世代シーケンサーによる全エクソンシーケンスにより、候補遺伝子を抽出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癒合歯はヒトの顎が進化の過程で短縮してきたことにより、歯胚同士の間隔が狭くなったために隣り合う歯胚が癒合するとする人類の歯の退化の1つの現象とする考え方もあることからその遺伝因子の解明は歯科にとどまらない人類学・人類遺伝学、人類進化学、分子生物学においても大きな学術的波及効果が期待できる。さらに、不正咬合の病態理解や次世代に向けた新しい治療方法の足掛かりとする。

研究成果の概要（英文）：Despite the fact that fused teeth are one of the most frequent malocclusions seen in the maxillofacial region, the cause of this disease is completely unknown. Interestingly, it is more common in the Japanese population, and the familial nature of the disease makes a genetic involvement obvious. On the other hand, “whole exome sequencing” has led to many reports of successful identification of causative genes for rare familial diseases. Understanding the mechanism of tooth formation is an important issue for understanding the pathogenesis of malocclusion and for establishing new methods of prevention and treatment of malocclusion. In this project, candidate genes for fused teeth, which are also the cause of malocclusion, were extracted by whole exome sequencing using a next-generation sequencer in two families with a familial history of mandibular fused permanent anterior teeth and in sporadic subjects.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：癒合歯 遺伝子 ゲノム exome シークエンス

1. 研究開始当初の背景

癒合歯は、隣り合う2つの歯胚が顎の中で成長する過程で癒合し、2本の歯が癒合した状態で萌出したものである。共通の歯髄と象牙質を持つものを癒合歯、歯根表層のセメント質が肥厚する過程で癒着したものを癒着歯と表現する(歯の比較解剖学。第2版。医歯薬出版、2014)。癒合歯は乳歯にみられることが多く、1番多いのが下顎の乳側切歯と乳犬歯、2番目が下顎の乳中切歯と乳側切歯で、3番目は上顎の乳中切歯と乳側切歯である。永久歯でもみられる。乳歯では2~3%、永久歯では0.3%の頻度とされている(小児歯科学 第5版・医歯薬出版、東京、2017: 62-90)。歯の大きさが不揃いとなり不正咬合を惹起する。

顎顔面領域に見られる不正咬合を惹起する頻度の高い疾患の一つであるにもかかわらず、原因は全く分かっていない。癒合歯は母親の栄養不良など全身状態の異常や、病気、薬物などとの関連も考えられている。一方、ヒトの顎が進化の過程で短縮してきたことにより、歯胚同士の間隔が狭くなったために隣り合う歯胚が癒合するとする人類の歯の退化の1つの現象とする考え方もある(歯の比較解剖学。第2版。医歯薬出版、2014)(表1)。第3大臼歯(親知らず)も同様の議論があることは有名である(研究業績: J Hum Genet, 58:799-803, 2013)。コーカソイドの女性に3世代にわたって下顎乳切歯に癒合歯がみられたという報告(J Am Dent Assoc, 133:734-737, 2002)や、常染色体優性遺伝とする報告(Muskusick VA. Mendelian Inheritance in Man. 8th ed. Johns Hopkins University Press, 1986, p1-425)がある。興味深いことに日本人はコーカソイドの6倍もの癒合歯がみられる(歯基礎医学会誌, 36:636-643, 1994)。出現頻度に集団(人種)間差が存在し、家族性を認めることから、遺伝的関与は明らかである。これまでに癒合歯に関する原因遺伝子の探索はなされていない。この理由は、特定の集団(人種)に頻度が偏ると罹患者を収集することが難しいので探索が遅れるということであろう。

一方、“全エクソンシーケンス(Exome sequencing)”により、家族性稀少疾患の原因遺伝子の同定におよぶ成功例が報告されている。Freeman-Sheldon症候群を対象として手法の有効性が始めて実証された(Nature, 461:272-276, 2009)。さらに、Miller症候群の罹患者4名について全エクソンシーケンスとフィルタリング法を用い、エクソンにおける非同義置換、スプライス部位および挿入欠失をリスト化し、健常人8名との比較、dbSNP情報に基づくcommonな変異の除去、といったフィルターをかけることで候補遺伝子を絞り込みに成功している(Nat Genet, 42:30-35, 2010)。エクソンのみをシーケンスすることは疾患に関与する多様性(多型)を網羅的に解析する手法のなかでは安価であり、情報解析の負荷も小さい。

2. 研究の目的

本申請課題の目的は不正咬合の原因ともなる癒合歯について、下顎癒合永久歯前歯の家族性を呈する2家系から次世代シーケンサーによる全エクソンシーケンスにより、候補遺伝子を抽出するのに加え、別の約20罹患者からその原因遺伝子変異を同定することにある。歯牙の形成機序を理解することは不正咬合の病態を理解し、不正咬合の新たな予防法・治療法を確立するための重要な課題である。

3. 研究の方法

本申請課題は既に関連倫理委員会の承認を得ていた。対象者は罹患者頻度の高い集団である日本人、韓国人成人から収集されている(韓国釜山国立大学との国際共同研究)。

DNAの調整: 非症候群の癒合歯、特に下顎癒合永久歯前歯罹患者を含む家系のうち罹患者および非罹患者のDNAを厳密に測定した。

エクソンキャプチャー: DNAからDNAライブラリーを作成し、エクソン配列のDNA断片のみを濃縮する。エクソンキャプチャーにはSure Select Human All Exon Kit(Agilent)を用いた。この方法の利点は安価で、サンプルDNA必要量も少なくすむことにある。この手法の採用によりわずか数日で全エクソン領域のDNAを得ることができる。

シーケンス: Genome Analyzer IIx(Illumina)にて100bpのペアエンドにて行った。

シーケンスデータの解析: 得られたシーケンスデータ(read)はUCSC hg19を標準ゲノム配列として、bwaおよびsamtoolsによってマッピングおよび変異リスト化する。Readの信頼性となるcoverage depth、変異のコールはsamtoolsによるpileupファイルを独自に研究協力者らと開発したプログラムにより解析し、信頼性も評価した変異リストをDNAプールのアリル頻度とともに出力し、この変異リストをフィルタリングすることで、候補となる変異を絞り込んだ。

フィルタリング: (1)連鎖解析の高LOD領域に存在する、(2)変異アリルの出現頻度(0.4~0.6)、(3)新規かつアミノ酸置換を伴う、ことにより行った。ヘテロ接合となることが予測され、頻度が0.4~0.6となるものを選択した。

4. 研究成果

本申請課題研究代表者所属機関における過剰歯の家系内罹患について調査し、家族性を呈する4家系を見出した。これら非症候群の過剰歯、特に上顎正中埋伏過剰歯の罹患者について原因遺伝子変異を探索した結果、複数の候補遺伝子変異を同定することに成功した。同じ研究ストラテジーにより下顎前歯のみの先天性欠如罹患者についても、新規の候補遺伝子変異を同定することにも成功している。

過剰歯を好発する鎖骨頭蓋異形成症が、染色体6p21に存在する runt-related transcription factor 2 遺伝子変異に起因することが報告されている (Cell, 89:773-779, 1997)。さらに、過剰歯を合併する頭蓋縫合早期癒合症家系で9p13.3の Interleukin 11 Receptor Subunit Alpha 遺伝子のホモ接合体変異が原因であることが明らかになっている (Am J Hum Genet, 89:67-81, 2011)。また、非症候群においても家族性を呈する家系が報告されている (J Oral Pathol Med, 34:621-625, 2005)。これらの関心領域との関連は見出されなかった。

家族性疾患や表現型を規定する遺伝子を同定する手法(ポジショナルクローニング)はこれまでゲノムを網羅する多型マーカーを用い多型タイピング情報から、Mendel 疾患遺伝子同定の方法であるパラメトリック連鎖解析、非メンデル疾患に対応するノンパラメトリック連鎖解析により試みられてきた。ポジショナルクローニングにおける候補領域の絞り込みにおいては候補領域が複数かつ広いことや、検出力が弱いこと、家系収集が困難であることなどによって原因変異の同定にまで至らないこともしばしばであった。全エクソンシーケンスは、これらの問題点を解決する SNP アレイでは検出できなかったまれな原因となる変異を検出することが可能な最も有効な方法である。癒合歯はヒトの顎が進化の過程で短縮してきたことにより、歯胚同士の間隔が狭くなったために隣り合う歯胚が癒合するとする人類の歯の退化の1つの現象とする考え方もあることからその遺伝因子の解明は歯科にとどまらない人類学・人類遺伝学、人類進化学、分子生物学においても大きな学術的波及効果が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 6件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Ikenaka R, Koizumi S, Otsuka T, Yamaguchi T	4. 巻 64(3)
2. 論文標題 Effects of root contact length on the failure rate of anchor screw.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 232-235
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 Yuasa K, Otsuka T, Suginochi Y, Adel M, Kim Y-I, Hikita Y, Koizumi S, Hatanaka R, Maki K, Yamaguchi T	4. 巻 57(1)
2. 論文標題 Condylar asymmetry in patients with mandibular asymmetry assessed by cone-beam computed tomography.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 神奈川歯学	6. 最初と最後の頁 24-30
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 該当する
1. 著者名 Park H, Hosomichi K, Kim Y-I, Tajima A, Yamaguchi T	4. 巻 12(18)
2. 論文標題 Exploring the Genetic Basis of Dens Evaginatus Using Whole-Exome Sequencing.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 8962
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app12188962	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 Tsukinoki K, Yamamoto T, Saito J, Sakaguchi W, Iguchi K, Inoue Y, Ishii S, Sato C, Yokoyama M, Shiraishi Y, Kato N, Shimada H, Makabe A, Saito A, Tanji M, Nagaoka I, Saruta J, Yamaguchi T, Kimoto S, Yamaguchi H	4. 巻 66(8)
2. 論文標題 Prevalence of saliva immunoglobulin A antibodies reactive with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 among Japanese people unexposed to the virus.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol	6. 最初と最後の頁 403-410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.13011	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 Ariwa M, Koizumi S, Yamaguchi T	4. 巻 57(2)
2. 論文標題 Factors influencing the differences between three-dimensional measurement with cephalometric analysis and cone-beam computed tomography.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 神奈川歯学	6. 最初と最後の頁 98-103
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 Park H, Hosomichi K, Kim Y-I, Hikita Y, Tajima A, Yamaguchi T	4. 巻 12(23)
2. 論文標題 Comprehensive Genetic Exploration of Fused Teeth by Whole Exome Sequencing.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 11899
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app122311899	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 Iguchi K, Kim Y-I, Adel M, Nadim M, Hatanaka R, Koizumi S, Yamaguchi T	4. 巻 12(12)
2. 論文標題 Association of Mandibular Posterior Anatomic Limit with Skeletal Patterns and Root Morphology Using Three-Dimensional Cone Beam Computed Tomography Comprehensive Analysis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 3019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics12123019	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 Okumura Y, Koizumi S, Suginochi Y, Hikita Y, Kim Y-I, Adel M, Nadim M, Yamaguchi T	4. 巻 12(24)
2. 論文標題 Chin Morphology in Relation to the Skeletal Pattern, Age, Gender, and Ethnicity.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 12717
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app122412717	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 Muromachi K, Hosomichi K, Park H, Yamaguchi T, Tani-Ishii N.	4. 巻 49
2. 論文標題 Identification of candidate genes of familial multiple idiopathic cervical root resorption.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of endodontics	6. 最初と最後の頁 1537-1547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.joen.2023.09.008	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 Okuwaki S, Hosomichi K, Tajima A, Yamaguchi T.	4. 巻 13
2. 論文標題 An Observational Study on Changes in the Oral and Gut Microbiota through Professional Mechanical Tooth Cleaning, including Tooth-Brushing Instructions in Patients with Multi-Bracket Appliances.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 10843
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app131910843	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 Hikosaka Y, Koizumi S, Kim Y-I, Adel M, Nadim M, Hikita Y, Yamaguchi T	4. 巻 13
2. 論文標題 Comparison of Mandibular Volume and Linear Measurements in Patients with Mandibular Asymmetry	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 1331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics13071331	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 Ishii T, Koizumi S, Yamaguchi T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Factors Associated with the Proximity of the Incisive Canal to the Maxillary Central Incisor.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 6899
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app13126899	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 Kim E, Kuroda Y, Soeda Y, Koizumi S, Yamaguchi T	4. 巻 13
2. 論文標題 Validation of Machine Learning Models for Craniofacial Growth Prediction.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 3369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics13213369	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Park H, Hosomichi K, Kim Y-I, Tajima A, Yamaguchi T
2. 発表標題 Exploring genetic factors for dens evaginatus formation by whole exome sequencing.
3. 学会等名 Korean Association of Orthodontists (国際学会)
4. 発表年 2023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
研究分担者	高橋 正皓 (Takahashi Masahiro) (10736713)	神奈川歯科大学・歯学部・診療科准教授 (32703)	

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		
韓国	釜山大学		