

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的萌芽

研究期間：2012～2012

課題番号：24659917

研究課題名（和文）全エクソンシーケンス（EXOME）による永久歯先天欠如の原因遺伝子同定

研究課題名（英文） Identification of causal genes in tooth agenesis by exome sequencing.

研究代表者

榎 宏太郎 (MAKI KOUTARO)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：80219295

研究成果の概要（和文）：

永久歯先天欠如は、顎顔面領域に見られる最も頻度の高い疾患の一つである。その原因に複数の転写因子の変異によって優性遺伝形式を呈する家族性に引き起こされることが知られている。一方、近年“Exome sequencing（全エクソンシーケンス）”により、家族性稀少疾患の原因遺伝子同定の成功例が報告されている。“Exome”とはヒトゲノムにおけるすべてのエクソン領域を示し、その配列に含まれる変異が疾患原因の約85%を説明すると推定されている。本申請課題において、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下顎前歯先天性欠如の原因と考えられる興味深い候補3遺伝子変異を同定した。

研究成果の概要（英文）：

Permanent tooth agenesis is among the most common developmental anomalies. Molecular studies have shown that many genes are involved in tooth morphogenesis, and many transcription factors and signaling molecules are regulating gene expression. Dominant loss-of-function mutations in MSX1, PAX9, and AXIN2 have been implicated in familial forms of non-syndromic tooth agenesis. On the other hand, Exome sequencing has proven to be an elegant genetic tool for dissecting the molecular basis of diseases and traits. Using whole-exome sequencing, we identified novel mutations in patients with tooth agenesis of lower incisors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：先天性欠如、永久歯、エクソンシーケンス

## 1. 研究開始当初の背景

永久歯先天欠如は、顎顔面領域に見られる最も頻度の高い疾患の一つである。今年の日小児歯科学会の全国調査によれば約10%の児童に認められるとされる。すべての原因が明らかになっているわけではないが、優性遺伝形式を呈する家系では転写因子である msh homeobox 1 gene (MSX1) や paired box gene 9 (PAX9) の変異によるものが存在することが知られている (Nature Genet, 2000; Nature

Genet, 2000)。また、TGF $\beta$  binding protein 3 をコードする遺伝子 LTBP3 の突然変異が原因とする家系が報告されている (Am J Hum Genet, 2009)。一方、近年“Exome sequencing（全エクソンシーケンス）”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, 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、健康人 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 (Nature Genet, 2010)。申請者らは永久歯萌出不全を優性遺伝形式に有するわずか 2 家系から、その原因因子が parathyroid hormone 1 receptor gene であることを明らかにした (J Bone Miner Res, 26:1655-61, 2011)。エクソンのみをシーケンスすることは形質に関与する多様性 (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

永久歯先天欠如は、顎顔面領域に見られる最も頻度の高い疾患の一つである。その原因に複数の転写因子の変異によって優性遺伝形式を呈する家族性に引き起こされることが知られている。一方、近年“Exome sequencing (全エクソンシーケンス)”により、家族性稀少疾患の原因遺伝子同定の成功例が報告されている。“Exome”とはヒトゲノムにおけるすべてのエクソン領域を示し、その配列に含まれる変異が疾患原因の約 85% を説明すると推定されている。本申請課題の目的は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永久歯先天欠如、特に日本人に多い下顎前歯先天欠如家族性症例においてその原因遺伝子を同定するとともに臨床的多様性について考察を加えることにある。

## 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る。対象者は日本人成人から収集する。平成 24 年 3 月末までに本申請課題が実施しうる検体収集が完了する。平成 24 年度において対象者の臨床情報の収集、解析と並行してゲノム解析を行う。ゲノム解析は検体からの DNA 抽出 → エクソンキャプチャー (Sure Select Human All Exon Kit) → シーケンス (Genome Analyzer IIx) → シーケンスデータ解析 (bwa および samtools) → 変異リストの抽出 → 変異リストのフィルタリング (条件 ①高 LOD 領域 ②変異アリの出現頻度 (0.4~0.6) ③新規かつアミノ酸置換) → 変異同定。変異同定を経た後、弧発例についても疾患遺伝子のリシーケンスを実施した。

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 (以前はマイクロサテライト、近年では Single nucleotide polymorphism; SNP が用いられ

る) 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。

①DNA の調整：先天性欠如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。

②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。エクソンキャプチャー法はヒトゲノムの全エクソン領域を選択的に濃縮する技術であり、本申請課題で使用する SureSelect Human All Exon Kit (Agilent) の場合、ベイトとよばれる 120bp のビオチン化 RNA オリゴを DNA ライブラリーとハイブリダイズし、結合した RNA-DNA をストレプトアビジン結合マグネットビーズで回収、RNA ベイトを消化することで、シーケンスするためのターゲット DNA を濃縮した。

③シーケンス：Genome Analyzer IIx (Illumina) にて 100bp のペアエンドにて行った。

④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した。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が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。

⑤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。申請者の有する候補家系は優性遺伝が想定されることから、プールした検体すべてがヘテロ接合となることが予測されることから、頻度が 0.4~0.6 となるものを選択した。

⑥原因変異の同定から、他の罹患者家系、弧発例について疾患遺伝子のリシーケンスを行う。候補遺伝子についてすべてのエクソンとプロモーター領域 (1kb) を PCR 増幅し、次

世代シーケンサー(GA II)でリシーケンシングを行った。

#### 4. 研究成果

永久歯先天欠如は、顎顔面領域に見られる最も頻度の高い疾患の一つである。昨年の日本小児歯科学会の全国調査によれば約 10%の児童に認められるとされる。その内、下顎前歯先天性欠如は 1~2%で、日本人に多く認められる(Orthodontic Waves-Japanese Edition, 2011)。その原因の一部に遺伝的関与が知られている。これまでに MSX1 (Nat Genet, 1996)、PAX9 (Nat Genet, 2000) および LTBP3 (Am J Hum Genet, 2009) の変異が罹患者家系内で同定されている。注目すべきはこれまで報告されている原因変異は臼歯、特に第二小臼歯に欠損をもたらすものであることである。一方、近年、“Exome sequencing (全エクソンシーケンス)”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(Nature, 2009)。申請者らは全エクソンシーケンスにより永久歯萌出不全のわずか 2 家系から、その原因因子が parathyroid hormone 1 receptor gene (PTH1R) であることを発見した(研究業績: J Bone Miner Res, 2011)(研究業績: 2010 年日本矯正歯科学会大会優秀発表賞)。また、申請者らは歯科矯正治療を受診する外来患者 3683 名について永久歯先天性欠如と家族性について検討した。永久歯先天性欠如を有する数家系を見出すとともに、下顎前歯のみに限局した先天欠如を有する家系の存在を確認(研究業績: Eur J Orthodont, 2008)(研究業績: 2008 年日本矯正歯科学会大会優秀発表賞)、リストアップした。そして、下顎前歯に限局する先天性欠如 2 家系について全エクソンシーケンスにより原因遺伝子を探索した結果、候補 3 遺伝子変異を同定した。興味深いことにその内のひとつはエナメル質形成不全を伴う先天異常の原因遺伝子の一つであった。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

(1) Joshi V, Yamaguchi T, Matsuda Y, Kaneko N, Maki K, Okano T. Skeletal maturity assessment with the use of cone-beam computerized tomography. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 113:841-849, 2012

(2) Park JH, Yamaguchi T, Watanabe C, Kawaguchi A, Haneji K, Takeda M, Kim YI, Tomoyasu Y, Watanabe M, Oota H, Hanihara T, Ishida H, Maki K, Park SB, Kimura R. Effects of an Asian-specific nonsynonymous EDAR variant on multiple

dental traits. J Hum Genet, 57:508-514, 2012

(3) Lee WC, Yamaguchi T, Watanabe C, Kawaguchi A, Takeda M, Kim YI, Haga S, Tomoyasu Y, Ishida H, Maki K, Park SB, Kimura R. Association of common PAX9 variants with permanent tooth size variation in non-syndromic East Asian populations. J Hum Genet, 57:654-659, 2012

(4) 新真紀子、山口徹太郎、栗原祐史、古谷亮子、筒井佐和子、二木克嘉、大田真実、代田達夫、新谷悟、槇宏太郎。昭和大学歯科病院における 10 年間の顎変形症治療に関する検討。日顎変形会誌, 22:264-269, 2012

(5) Ohta M, Yamaguchi T, Katayama K, Funatsu T, Maki K. Evaluation of the epiglottis with cone beam x-ray CT. Hosp Dent Oral-Maxillofac Surg, 24:131-136, 2012

(6) Sugiura M, Yamaguchi T, Asama Y, Katayama K, Ota M, Maki K. Three-dimensional cone beam computed tomography evaluation of asymmetrical mandibles. Hosp Dent Oral-Maxillofac Surg, 24:137-141, 2012

[学会発表] (計 15 件)

8th International Bernd-Spissl-Symposium. 2012年6月14日-16日. Basel, Switzerland. Surgical orthodontic treatment of jaw deformities at the Showa University Dental Hospital: a retrospective analysis of 726 cases over 10 years. Yamaguchi T, Atarashi M, Shirota T, Shintani S, Maki K

8th International Bernd-Spissl-Symposium. 2012年6月14日-16日. Basel, Switzerland. Diagnosis and treatment of severe skeletal malocclusion using three dimensional model. Shirota S, Asama Y, Kurihara Y, Yamaguchi T, Kondo S, Maki K, Shintani S

8th International Bernd-Spissl-Symposium. 2012年6月14日-16日. Basel, Switzerland. Usefulness of surgical simulation using actual models in which three dimensional dentition model and CT images are integrated. Asama Y, Shirota T, Yamaguchi T, Shintani S, Maki K

第 22 回日本顎変形症学会総会. 2012 年 6 月 18 日-19 日. 福岡. 昭和大学歯科病院における 10 年間の顎変形症治療に関する検討。

新真紀子、山口徹太郎、栗原祐史、古谷亮子、筒井佐和子、二木克嘉、代田達夫、新谷悟、榎宏太郎

第 22 回日本顎変形症学会総会。2012 年 6 月 18 日-19 日。福岡。上下顎移動術を施行した顎変形症患者における顎顔面形態の術後変化。葎葉清香、代田達夫、山口徹太郎、新真紀子、栗原祐史、榎宏太郎、新谷悟

第 32 回昭和歯学会総会。2012 年 7 月 7 日。東京。昭和大学歯科病院における顎変形症治療の臨床統計的検討。新真紀子、山口徹太郎、栗原祐史、古谷亮子、筒井佐和子、二木克嘉、代田達夫、新谷悟、榎宏太郎

第 32 回 昭和歯学会総会 2012 年 7 月 7 日。東京。当科における顎裂部骨移植に関する臨床統計的調査—最近の 7 年間について—。栗原清佳、代田達夫、栗原祐史、佐藤友紀、山口徹太郎、倉林仁美、榎宏太郎、新谷悟

第 71 回東京矯正歯科学会大会。2012 年 7 月 12 日。東京。コーンビーム CT による成人症例の下顎骨骨体体積評価。方山光朱、山口徹太郎、榎宏太郎

第 71 回日本矯正歯科学会大会。2012 年 9 月 26 日-28 日。盛岡。ゲノムワイド関連解析から同定される顎関節変形性関節症の新規感受性遺伝子座位。山口徹太郎、中岡博史、山本健、藤川泰成、澁澤龍之、芳賀秀郷、方山光朱、木村亮介、井ノ上逸朗、榎宏太郎

第 57 回日本人類遺伝学会。2012 年 10 月 24 日-27 日。東京。ゲノムワイド関連解析を用いた第三大臼歯（親知らず）先天欠如に関する遺伝学的背景の探索。芳賀秀郷、山口徹太郎、中岡博史、山本健、方山光朱、木村亮介、榎宏太郎、井ノ上逸朗

第 66 回日本人類学会。2012 年 11 月 2 日-4 日。東京。WNT10A の多型は歯冠サイズと関連する。木村亮介、渡辺千晶、山口徹太郎、榎宏太郎、武田麻耶子、川口亮、石田肇

第 66 回日本人類学会。2012 年 11 月 2 日-4 日。東京。コーンビーム CT による日本人成人下顎骨骨体体積評価。方山光朱、山口徹太郎、榎宏太郎

第 32 回 昭和歯学会例会 2012 年 12 月 1 日。東京。成人日本人症例におけるセファロ分析値と下顎骨体積の比較。方山光朱、山口徹太郎、榎宏太郎

第 32 回 昭和歯学会例会 2012 年 12 月 1

日。東京。コーンビーム CT による喉頭蓋のエクソ線学的評価。大田真実、山口徹太郎、方山光朱、榎宏太郎

昭和大学歯学部 文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成 24 年度シンポジウム 「次世代型顎口腔組織再生医療の研究開発拠点形成」研究成果発表会。2013 年 3 月 23 日。東京。永久歯欠如をもたらす遺伝因子の探索—第三大臼歯欠如における genome wide 関連解析からのアプローチ—。芳賀秀郷、山口徹太郎、方山光朱、榎宏太郎

〔図書〕（計 3 件）

クインテッセンス出版株式会社 別冊 臨床家のための矯正 YEAR BOOK '2012, p117. 日本人原発性萌出不全症例における全エクソシーケンスによる新規 PTH1R 遺伝子変異の同定。山口徹太郎、榎宏太郎

第一歯科出版 季刊 歯科医療。春号 2012 年 Vol. 26, No. 2, 50-62 歯の空間的要因：歯の傾斜、隣在歯との関連、歯槽間骨量の確保。山口徹太郎、鈴木一成、山本松男、榎宏太郎

T. Tachikawa (Ed). The New Frontiers in Research for Oral Cancer. Maruzen Planet (Tokyo) Pp. 197-209, 2012. The advantages of CBCT in various applications for an aid in evaluating the treatment of bone invasion in cancer of the maxillofacial and nasopharyngeal regions. Yamaguchi T, Takahashi M, Kurihara A, Fujikawa T, Asama Y, Shirota T, Maki K

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

榎 宏太郎 (MAKI KOUTARO)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：80219295

### (2) 研究分担者

山口 徹太郎 (YAMAGUCHI TETSUTARO)

昭和大学・歯学部・准教授

研究者番号：40384193

### (3) 連携研究者

なし