

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463167

研究課題名(和文) RNAプログラムの破綻に起因する歯根形成異常に関する分子遺伝学的研究

研究課題名(英文) Molecular genetic study on root abnormality due to the failure of the RNA program

研究代表者

小川 卓也 (OGAWA, TAKUYA)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：50401360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Oculofaciocardiodental (OFCD) syndromeはX連鎖性優性遺伝形式の女性のみ発症するまれな疾患で、特異的顔貌、心臓および眼の異常、ならびに長い歯根といった特徴を認める。本課題では、患者由来の培養歯根膜細胞において認められたナンセンス変異依存mRNA分解機構が歯根長に異常を生じる原因となっている可能性を認め、さらに原因遺伝子であるBCOR(encoding BCL-6-interacting corepressor)の変異蛋白の機能解析を行い、古典的核移行シグナルを2カ所同定することができた。希少遺伝性疾患患者から得られる情報の有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Oculofaciocardiodental (OFCD) syndrome is a rare X-linked dominant condition. Mutations in BCOR have been described as causal in OFCD syndrome. Almost all BCOR mutations result in premature termination codons (PTCs); therefore, nonsense-mediated mRNA decay (NMD) might have an important role in pathogenesis. In this study, the nonsense and frameshift mutations, which introduce PTCs, were found to contribute to OFCD syndrome in our two patients. Furthermore, in PDL cells, the mutation resulting in a PTC corresponded to greater NMD, unstable mutant transcripts and increased cell proliferation, which may contribute to hyperactive root formation. In addition, we investigated the localization of the classical nuclear localization signals (NLSs) of BCOR gene using the reported human BCOR mutations with comparable phenotypes. The genotype-phenotype correlation among the mutations could not be clearly explained; however, the two classical NLSs were identified at two possible sites.

研究分野：医歯薬学

キーワード：OFCD症候群 BCOR 歯根 核移行シグナル ナンセンス変異依存mRNA分解機構

1. 研究開始当初の背景

Oculofaciocardiodental (OFCD) syndrome はX連鎖性優性遺伝形式の女性のみを発症するまれな疾患で、特異的顔貌、心臓および眼の異常、ならびに長い歯根といった臨床的特徴を認める。近年、BCL-6 co-repressor (BCOR)の変異により、OFCD syndrome を引き起こすことが報告されたが、歯根形成における BCOR の機能は明らかにされていない。

2. 研究の目的

(1) 当分野を受診した OFCD 患者 2 例において、原因遺伝子である BCOR の新規変異を同定し、うち一例から得られた歯髄・歯根膜細胞を用い、歯根長に異常を来すメカニズムを、分子遺伝学的手法を用いて明らかにすることを目的とする。

(2) OFCD syndrome において既に報告されている変異を含む BCOR の機能解析を行い、核移行シグナル (nuclear localization signal: NLS) を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 当分野を受診した OFCD 患者 2 名より、頬粘膜よりゲノム DNA を抽出し、ダイレクトシークエンス法で BCOR 遺伝子の全翻訳領域とエクソン/イントロン境界の塩基配列を決定した。また、うち 1 名の OFCD 患者ならびに歯に異常を認めない患者より便宜抜歯された下顎第一小臼歯から歯髄細胞・歯根膜細胞を単離・培養し、培養細胞における BCOR の mRNA の発現量を検討した。さらに、患者由来の培養歯髄細胞に、シクロヘキシミド (CHX) を添加し、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (NMD) の関与の可能性について検討した。また、mRNA の安定性ならびに細胞増殖能を検討した。

(2) Site-directed mutagenesis を用い、変異蛋白発現ベクターを作製し、COS7 細胞に遺伝子導入し、細胞内における変異蛋白の局在を免疫染色により検討した。さらに、NLS プログラム解析 (NLS mapper ならびに PSORT II) により、古典的核移行シグナルを同定することとした。

4. 研究成果

(1) 症例 1 にスプライシングに関与しないと思われるイントロンに 1 塩基置換 (IVS3-55G > A) ならびにナンセンス変異 (c.4794G > A, p.W1598\*) を、症例 2 にフレームシフト変異 (c.3668delC, p.S1223Wfs\*14) をそれぞれヘテロ接合性に認めた。症例 1、2 ともに発端者以外に家系内に同疾患に罹患している患者を認めなかった。また、症例 2 より歯科矯正治療のため便宜抜歯された下顎第一小臼歯から得られた培養歯髄・歯根膜細胞において、BCOR の

mRNA の発現量を正常コントロールと比較したところ、歯根膜細胞においては有意な減少を認めた。さらにシクロヘキシミドを添加し、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (NMD) の関与の可能性について検討したところ、患者由来の培養歯根膜細胞において、BCOR の発現量に有意な増加を認めた。また、患者由来の培養歯髄細胞において正常コントロールと比較して、mRNA の安定性ならびに細胞増殖能に有意な差を認めなかったが、患者由来の培養歯根膜細胞においては mRNA の不安定性ならびに細胞増殖能の増加を認めた (図 1, 2)。

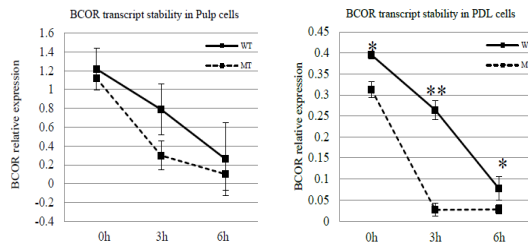


図 1 RNA stability

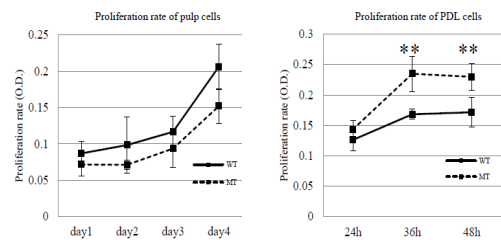


図 2 Cell proliferation

培養歯根膜細胞において認められた NMD が歯根長に異常を生じる原因となっている可能性が示唆された。

(2) 遺伝子型と表現型の明らかな関連性は認められなかったものの、免疫染色ならびに NLS プログラム解析により、BCOR のアミノ酸配列中に古典的核移行シグナルを 2 カ所 ( RVDKRKRVSGD, aa1131-1141 (NLS1) ; LKAKRRRVSK, aa1158-1167 (NLS2) ) 同定することができた。(図 3, 4, 5)

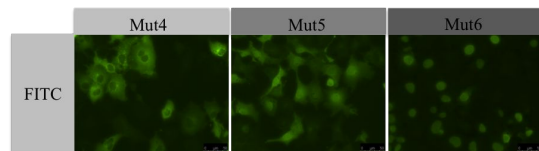


図 3 Subcellular localization of the mutant proteins

NLS Mapper			PSORT	
Predicted NLSs in query sequence			Predicted monopartite NLS	
CEYVGNKRDYDIPADPDELFLVETVTEGQVPEPAPDQAGAGWVPT 50	Pos.	Score	Pos.	Score
LAVRDKRVYDGGSHETATLRFVPEPLLAKKRRRVSKDPPKSDGHS 100	52	8	RVDKRKRVSGD	8
SHLDFRFRHLLVLCVLLGLLRFVQKLLLELRERDQVHAGDQK 150	79	8.5	LKAKRRRVSKDW	8.5
QKLRKRVYDQVYALVQKVTETDQKALAKRERKSHLRFK 200			LKAKRRRVSK	7
NR 203				

図 4 In silico analysis

Mut5

```

Homo sapiens:      PHSPTLAVDRRRKVSQSSHTTAEVPEPDLKARRRVSDDWPERF
Pan troglodytes:   PHSPTLAVDRRRKVSQSSHTTAEVPEPDLKARRRVSDDWPERF
Gorilla gorilla gorilla: PHSPTLAVDRRRKVSQSSHTTAEVPEPDLKARRRVSDDWPERF
Nomascus leucogenys: PHSPTLAVDRRRKVSQSSHTTAEVPEPDLKARRRVSDDWPERF
Callithrix jacchus: PHSPTLAVDRRRKVSQSSHTTAEVPEPDLKARRRVSDDWPERF
Pongo abelii:      PHSPTLAVDRRRKVSQSSHTTAEVPEPDLKARRRVSDDWPERF
Macaca mulatta:    PHSPTLAVDRRRKVSQSSHTTAEVPEPDLKARRRVSDDWPERF
Canis lupus familiaris: PHSPTLAVDRRRKVSQSSHTTAEVPEPDLKARRRVSDDWPERF
Felis catus:       PHSPTLAVDRRRKVSQSSHTTAEVPEPDLKARRRVSDDWPERF
Mus musculus:      PHSPTLAVDRRRKVSQSSHTTAEVPEPDLKARRRVSDDWPERF
Rattus norvegicus: PHSPTLAVDRRRKVSQSSHTTAEVPEPDLKARRRVSDDWPERF

```

**図 5 The orthologs of BCOR protein at aa1125-1175**

NLS1 および NLS2 を含む BCOR の局在は主に核内であったものの、NLS2 内のアミノ酸配列を変異させたところ、核内だけでなく細胞質にも局在を認めた。一方、NLS1 内のアミノ酸配列のみに変異を加えると、主に核内でその局在を認めた。

NLS2 が BCOR の核移行に重要な機能を果たしており、疾患原因遺伝子の機能解明に患者情報の有用性が示唆された。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Sato C, Ogawa T, Tsuge R, Shiga M, Tsuji M, Baba Y, Kosaki K, Moriyama K. Systemic and maxillofacial characteristics of eleven Japanese children with Russell-Silver syndrome. *Congenit Anom*. 2016 (in press) doi: 10.1111/cga.12162

Shiga M, Ogawa T, Ekprachayakoon I, Moriyama K. Orthodontic treatment and long-term management of a patient with Marfan syndrome. *Cleft Palate-Craniofacial J*. 2016 (in press) <http://www.cpcjournal.org/doi/abs/10.1597/15-068>

Surapornsawasd T, Ogawa T, Moriyama K. Identification of Nuclear Localization Signals within the human BCOR protein. *FEBS letters*. 589(21):3313-3320, 2015. doi: 10.1016/j.febslet.2015.05.046

Nakayama Y, Baba Y, Tsuji M, Fukuoka H, Ogawa T, Ohkuma M, Moriyama K. Dentomaxillofacial characteristics of ectodermal dysplasia. *Congenit Anom*. 55(1):42-48, 2015. doi: 10.1111/cga.12073

Ogawa T, Sato C, Kawakubo N, Moriyama K. Orthodontic treatment of a patient with hypoglossia. *Cleft Palate Craniofacial J*. 52(1):102-109, 2015. doi: 10.1597/13-061

池田倫世、辻美千子、大宅彩、小川卓也、森山啓司. Down 症候群患者の口腔顎顔面部における臨床的特徴 -骨格系ならびに永久歯の先天性欠如に関する検討-、*Orthodontic Waves-Japanese Edition*, 74(2):67-77, 2015.

Komazaki Y, Fujiwara T, Ogawa T, Sato M, Suzuki K, Yamagata Z, Moriyama K. Association between malocclusion and headache among 12- to 15-year-old adolescents: a population-based study. *Community Dent Oral Epidemiol*. 42(6):572-580, 2014. doi: 10.1111/cdoe.12111

Surapornsawasd T, Ogawa T, Tsuji M, Moriyama K. Oculofaciocardiodental Syndrome: Novel BCOR Mutation and Expression in Dental Cells. *J Hum Genet*. 59(6):314-320, 2014. doi: 10.1038/jhg.2014.24

(学会発表)(計 20 件)

上園将慶、小川卓也、原田清、森山啓司. 唇顎口蓋裂患者の矯正治療に影響を及ぼす因子の検討-下鼻甲介の垂直的位置と骨架橋形態の相関について- 第 74 回日本矯正歯科学会、福岡国際会議場(福岡県福岡市)、2015 年 11 月 18-20 日。中村留理子、荒木美祐、渡辺千穂、伊藤洋介、小笠原毅、辻幸佑、山形義紘、辻美千子、小川卓也、森山啓司. 筋原性疾患患者における頭蓋顎顔面形態の特徴について-先天性ミオパチーと筋ジストロフィーの比較- 第 74 回日本矯正歯科学会、福岡国際会議場(福岡県福岡市)、平成 27 年 11 月 18-20 日。

伴田みさと、伊藤洋介、渡辺千穂、辻美千子、小川卓也、森山啓司. 矯正歯科外来において長期管理を行った先天性ミオパチー 3 例。第 74 回日本矯正歯科学会、福岡(福岡国際会議場)、平成 27 年 11 月 18-20 日。

木下理恵、渡辺千穂、伊藤洋介、辻美千子、小川卓也、森山啓司. 矯正歯科外来を受診した福山型筋ジストロフィー 2 例の臨床的特徴について。第 74 回日本矯正歯科学会、福岡(福岡国際会議場)、平成 27 年 11 月 18-20 日。

トムルホー ツァサン、小川卓也、駒崎裕子、ガンブルゲド、ガンジャルガル、バザル、アマールサイハン、藤原武男、森山啓司. モンゴル人思春期児童における不正咬合と社会経済的状況との関連について。第 74 回日本矯正歯科学会、福岡国際会議場(福岡県福岡市)、平成 27 年 11 月 18-20 日。

小川卓也、スラポンサワッド、タンヤボン、森山啓司. Oculofaciocardiodental syndrome における変異 BCOR の機能解析による核移行シグナルの同定。第 50 回日本人類遺伝学会、京王プラザホテル(東京都新宿区)、平成 27 年 10 月 14 日-17 日。

Takada J, Ogawa T, Sato C, Uezono M, Morita K, Moriyama K. A Case of holoprosencephaly with unilateral cleft lip

and palate with maxillary distraction osteogenesis in adolescence. 8th International Orthodontic Congress. London (UK), September 27-30, 2015.

Ogawa T, Sawada H, Kataoka K, Baba Y, Moriyama K. Measurement of distraction force in maxillary distraction osteogenesis for cleft lip and palate. 16th Congress of International Society of Craniofacial Surgery, Chiba (Japan), September 14-18, 2015.

Tumurkhuu T, Ogawa T, Komazaki Y, Ganburged G, Bazar A, Fujiwara T, Moriyama K. Association between Maternal Education and Malocclusion in Mongolian Adolescents. IADR-SEA, Bali (Indonesia), August 15, 2015.

庄司あゆみ、小川卓也、樺沢勇司、森山啓司 .当分野において長期管理を行った cleidocranial dysplasia の1例 .第39回日本口蓋裂学会、第39回日本口蓋裂学会、砂防会館(東京都千代田区) 平成27年5月21-22日 .

駒崎裕子、小川卓也、澤田紘美、松本静、森山啓司 .当分野における口唇裂・口蓋裂患者に対する上顎骨延長適応時期に関する臨床統計学的検討 .第39回日本口蓋裂学会、砂防会館(東京都千代田区) 平成27年5月21-22日 .

Surapornsawasd T, Ogawa T, Moriyama K. Identification of the classical nuclear localization signals of BCOR gene. 62th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, Osaka (Japan), December 4-5, 2014.

小川卓也、森山啓司 .X連鎖性ミオチューブラーミオパチー1例の顎顔面の成長様相に関する検討 .第54回日本先天異常学会 麻布大学(神奈川県相模原市) 平成26年7月26-27日 .

駒崎裕子、小川卓也、辻美千子、森山啓司 .当分野を受診した口蓋裂患者における合併症状に関する検討～母体の環境要因に関する臨床統計学的検討～ .第38回日本口蓋裂学会、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市) 平成26年5月29-30日 .

澤田紘美、小川卓也、駒崎裕子、鈴木尋之、辻美千子、原田清、森山啓司 .両側性唇顎口蓋裂を伴う Kallmann syndrome の1例 .第38回日本口蓋裂学会札幌コンベンションセンター(北海道札幌市) 平成26年5月29-30日 .

小川卓也、スラポンサワッド タンヤポン、辻美千子、森山啓司 .Oculofaciocardiodental syndrome: 新規 BCOR 遺伝子変異の同定とヒト歯由来細胞における発現. 第58回日本人類遺伝学会大会、江陽グランドホテル(宮城県仙台市) 平成25年11月20-23日 .

スラポンサワッド タンヤポン、小川卓也、辻美千子、森山啓司 .新規 BCOR 遺伝子変異を認めた眼・顔面・心臓・歯症候群の2例. 第72回日本矯正歯科学会大会、キッセイ文化ホール(長野県松本市) 平成25年10月7-9日 .

Surapornsawasd T, Ogawa T, Shimokawa H, Moriyama K. The novel BCOR mutations in oculofaciocardiodental syndrome: 2 case reports. 2nd Meeting of the International Association for Dental Research-Asia Pacific Region, Bangkok (Thailand), August 21-23, 2013.

澤田紘美、小川卓也、片岡恵一、阿彦希、小林起穂、馬場祥行、森山啓司 .口唇口蓋裂患者における創外型延長装置による上顎骨延長時の牽引力に関する検討. 第37回日本口蓋裂学会、佐賀市文化会館(佐賀県佐賀市) 平成25年5月30-31日 .

佐藤智美、小川卓也、高田潤一、上園将慶、森田圭一、小村 健、森山啓司 .思春期性成長後期に上顎骨延長法を適応した片側性口唇口蓋裂を伴う holoprosencephaly の一例. 第37回日本口蓋裂学会、佐賀市文化会館(佐賀県佐賀市) 平成25年5月30-31日 .

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕  
該当なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小川 卓也 (OGAWA, Takuya)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：50401360

### (2)研究分担者

森山 啓司 (MORIYAMA, Keiji)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：20262206

### (3)連携研究者

なし