

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

木村 将士

論文題目

ヒト先天性永久歯欠損症の分子遺伝学的解析

I. 緒 言

ヒト先天性永久歯欠損症は先天性に永久歯の欠損を認める疾患であり、症候群の一症状として発症するものと、歯の欠損のみを認める非症候群性のものに分けられる。非症候群性の先天性永久歯欠損症は、ヒトで最も発生頻度の高い先天異常の一つであり、欠損歯数により、智歯を除いた 5 歯以下の欠損を Hypodontia、6 歯以上のものを Oligodontia と分類する。

近年、これらの先天性永久歯欠損症は muscle segment homeobox 1 (MSX1) や paired box 9 (PAX9)、axis inhibition protein 2 (AXIN2) の遺伝子変異により発症することが報告された。MSX1 および PAX9 はともに歯胚形成初期に発現する転写因子であり、他の分子と協調しながら歯胚の形成に関与する。また、AXIN2 は Wnt シグナル経路の抑制調節分子であり、永久歯欠損と大腸癌を合併する家系から原因遺伝子として同定された。その後、本遺伝子の多型が非症候群性の永久歯欠損症にも関連すると報告された。このように、本症に関与する遺伝学的要因は徐々に明らかになっているが、その発症に関与する分子作用機序はいまだ不明な点が多い。そこで、今回われわれは本症を有する 13 家系を対象とし、原因遺伝子の検索と発症機構に関する分子生物学的な解析を行ったので報告する。

II. 対象および方法

1. 症例

口腔外科第二診療部およびその関連病院施設を受診した先天性永久歯欠

損症を有する 13 家系を対象とした。内訳は Oligodontia が 8 家系、Hypodontia が 5 家系であった。尚、全ての症例は愛知学院大学歯学部ヒト細胞組織遺伝子疫学情報倫理委員会の承認 (No. 37) に基づき、同意が得られている。

2. 遺伝子変異検索

本症の原因遺伝子として報告のある *MSX1*、*PAX9*、*AXIN2* 遺伝子を対象とし変異検索を行った。DNA は末梢血液より抽出し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) にて DNA 断片の増幅後、ダイレクト・シーケンス法にて塩基配列を決定し、GenBank データベースと比較した。

3. 変異タンパクの機能解析

1) 変異 *MSX1* タンパク発現ベクターの構築と培養細胞への導入

同定した *MSX1* の遺伝子変異について、変異タンパクの機能解析を行うことを目的に、*MSX1* タンパク発現ベクターを構築した。野生型および変異 *MSX1* 遺伝子を FLAG タグにて標識し、ヒト胎児腎細胞 (HEK293) へ遺伝子導入し、*MSX1* タンパクを発現させた。

2) ウェスタンブロッティング

変異 *MSX1* タンパクの培養細胞内での発現量および安定性を評価する事を目的にウェスタンブロット解析にて野生型 *MSX1* タンパクとの比較を行った。24 時間培養後の細胞から可溶性分子を回収し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、ニトロセルロース膜に転写した。転写後、一次抗体反

応として抗 FLAG 抗体、二次抗体として HRP 標識マウス IgG 抗体を添加し反応させた。その後、検出用化学発光試薬を用い、X 線フィルムに露光しバンドを検出した。

3) 共免疫沈降法

MSX1 はヒストン H3 の 27 番目のリジンをメチル化する酵素である enhancer of zeste 2 (EZH2) と複合体を形成し、細胞分化抑制機能を示す。そこで、MSX1 の遺伝子変異が EZH2 との結合に与える影響を共免疫沈降法にて評価した。

FLAG タグにて標識した野生型および変異 *MSX1* 遺伝子と、Myc タグにて標識した *EZH2* 遺伝子を HEK293 細胞に導入した。24 時間培養した細胞から可溶性分子を回収し、抗体精製用アフィニティー担体および抗 FLAG 抗体と反応させた。反応後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、ニトロセルロース膜に転写した。一次抗体は抗 Myc 抗体、二次抗体は HRP 標識マウス IgG 抗体を使用した。その後、検出用化学発光試薬を用い、X 線フィルムに露光しバンドを検出した。

4) 細胞内局在解析

同定した変異が MSX1 タンパクの細胞内での局在性に与える影響を検討するため、蛍光免疫染色を用いて局在性の評価を行った。24 時間培養後の細胞を固定、透過処理し、一次抗体として抗 FLAG 抗体を添加した。その後、Cy3 標識ヤギ抗マウス抗体、Alexa-488 phalloidin、DAPI と反応させ、蛍

光顕微鏡にて細胞を観察し、野生型 MSX1 タンパクと比較した。

III. 結 果

1. 遺伝子変異検索

家族性の Oligodontia の 1 家系より *MSX1* 遺伝子に Trp139X (W139X) の新規ナンセンス変異を同定した。加えて、家系内で永久歯欠損を認める母、妹からも同様の変異を認めた。その他の 12 家系からはいずれの遺伝子にも変異は同定されなかった。

MSX1 遺伝子はホメオドメインと呼ばれる DNA との結合や、他の分子との相互作用に重要な領域が存在する。今回同定した変異は、139 番目のトリプトファンをストップコドンへと置換し、以降のホメオドメインを含む C 末端側を欠失した変異 MSX1 タンパクを生成する変異であった。

2. *MSX1* W139X 変異を認めた家系の臨床所見

発端者は初診時 13 歳の男性で、11 本の永久歯欠損を認めた。同様に、母、妹、母方の祖母にも永久歯欠損を認めた。欠損歯数は母親が 18 本、妹は 7 本であり、母方の祖母は過去に永久歯の抜歯処置を受けており、欠損歯数の把握は出来なかった。

3. 変異型 *MSX1* タンパクの発現量および安定性の評価

野生型および W139X 変異型 *MSX1* タンパクの培養細胞内での発現量および安定性の比較では両者に差は認めなかった。さらに、ホメオドメインのみを欠失した *MSX1* タンパク (以下 delHD 変異型 *MSX1* タンパク) においても野

生型 MSX1 タンパクとの差は認めなかった。

4. 変異型 MSX1 タンパクと EZH2 タンパクとの結合性の評価

野生型 MSX1 タンパクは EZH2 タンパクと複合体を形成し、バンドが検出された。一方、W139X 変異型 MSX1 では、バンドは検出されず、変異により EZH2 タンパクとの結合性が消失することが示された。

5. 変異型 MSX1 タンパクの細胞内局在性の評価

野生型 MSX1 タンパクは主に核内の核膜部に局在を認めた。一方で、W139X 変異型 MSX1 タンパクによる解析では、核内への移行障害を認め、細胞質に局在を認めた。また、delHD 変異型 MSX1 タンパクにおいても核内への移行障害を認めた。

IV. 考 察

1. *MSX1* 遺伝子と先天性永久歯欠損症について

MSX1 は、歯胚形成初期に歯乳頭の間葉組織に発現する転写因子の一つであり歯胚の分化において重要な役割を担い、本遺伝子の変異が、先天性永久歯欠損症を引き起こす事が知られている。また本遺伝子の特徴として、生物種間で高度に保存されたホメオドメインと呼ばれる領域を有し、この領域が DNA との結合や、他の分子との相互作用に重要な役割を担う。過去に報告された *MSX1* 遺伝子の変異は 88.8% がホメオドメイン内のミスセンス変異か、ホメオドメインの一部または全長を欠失するナンセンス変異であることから、この領域が特に歯胚形成と関連が深い事が示唆される。今回

同定した W139X もホメオドメイン全長を欠失する変異であり、これらの報告を裏付ける結果であった。

2. 新規 *MSX1* 変異 W139X について

1) タンパク発現量および安定性への影響

今回の解析では、いずれの変異型 *MSX1* タンパクにおいても発現量および安定性に変化は認められなかった。このことから、W139X の変異およびホメオドメインの欠失は *MSX1* タンパクの安定性に直接影響が無い事が示された。

2) 核内移行への影響

MSX1 遺伝子は転写、翻訳の過程を経た後、核内へと移行し、核膜部分に局在する。今回の解析では W139X 変異型 *MSX1* タンパクの核内への移行が障害されており、本家系における永久歯欠損は *MSX1* タンパクの核内移行障害に起因する可能性が示された。さらに、delHD 変異型 *MSX1* タンパクにおいても核内への移行障害を認めたことから、核内への移行にはホメオドメインが関与する事が示された。

3) EZH2 タンパクとの結合性への影響

EZH2 は *MSX1* との結合により活性化されるヒストンメチル化酵素であり、間葉系細胞の筋分化に関与する遺伝子群の発現を抑制し細胞増殖能を維持する。今回の結果より、W139X 変異型 *MSX1* タンパクは EZH2 タンパクと結合できないため、ヒストンにメチル基の修飾を誘導できないと考えられる。従って、本症例の歯胚形成異常は、*MSX1* の量的減少が間葉系細胞の分化抑

制能を低下させたことに起因することが示唆される。

3. まとめと今後の展望

本研究では、先天性永久歯欠損症を認める家系より、MSX1 のホメオドメインを欠失する新規遺伝子変異を同定した。変異タンパクの機能解析により、本変異は MSX1 の核内への移行障害を生じ、ヒストンメチル化酵素 EZH2 と結合できないことが示された。その一方で、解析を行ったその他の 12 家系からは対象遺伝子に変異を認めず、新たな責任遺伝子の存在が強く示唆された。今後、全エクソーム解析法等の新たな解析法を用いた新規の責任遺伝子の同定も検討課題であると考えられる。

V. 結 語

家族性の Oligodontia の 1 家系より新規 MSX1 ナンセンス変異 W139X を同定した。変異タンパクの機能解析の結果では、W139X 変異型 MSX1 タンパクの核内への移行障害を認め、先天性永久歯欠損症の原因となる事を示した。