

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

足立 潤哉

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的に永久歯を欠損する疾患である。本疾患は外胚葉異形成症などの症候群性と、永久歯欠損のみを認める非症候群性に大別される。永久歯欠損症は、ヒトに発生する最も頻度の高い先天異常疾患とされている。先天性永久歯欠損症の発症には、歯胚発生期における環境要因と遺伝的要因の関連が示唆されている。歯の発達は、歯胚形成開始期に口腔外胚葉上皮組織細胞から、fibroblast growth factor (*FGF*) 遺伝子、bone morphogenetic protein (*BMP*) 遺伝子、wingless-type MMTV integration site family (*WNT*) 遺伝子などシグナル伝達系因子を介してシグナルが外胚葉間葉細胞に伝達される。そして、muscle segment homeobox 1 (*MSX1*) 遺伝子やpaired box 9 (*PAX9*) 遺伝子、runt-related transcription factor 2 (*RUNX2*) 遺伝子などの転写制御因子の発現が活性化され、骨形成因子であるbone morphogenic protein 4 (*BMP4*) 遺伝子が誘導され、歯の発達が進行する。

ヒト先天性永久歯欠損は、*MSX1* 遺伝子の他にも、*PAX9* 遺伝子、*axis inhibition protein2* (*AXIN2*) 遺伝子、wingless-type MMTV integration site family member 10A (*WNT10A*) 遺伝子の変異により発症することが報告されている。

そこで、本研究は新規の病因遺伝子変異を検出するために、また既知の候補遺伝子を含めた解析をするために、*oligodontia* 症例を対象に全エクソ-

ム解析を行った。今回これらの遺伝子解析とその遺伝産物の機能解析を行った。

II. 対象および方法

1. 対象

愛知学院大学歯学部附属病院口腔外科第二診療部および関連病院を受診した非症候群性の先天性永久歯欠損症の患者のうち、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. 94) に基づきインフォームド・コンセントが得られた中で、歯の欠損を多く認めた oligodontia の 18 家系を対象とした。

2. 遺伝子変異の検索

DNA は末梢血液および唾液から抽出し、全エクソーム解析の上、変異検索を行った。

得られた結果の確認のため、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) にて DNA 断片の増幅を行い、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. MSX1変異タンパクの機能解析

1) 変異型MSX1タンパク発現ベクターの構築

変異型 *MSX1* より得られた異常タンパクの機能解析を行うことを目的として、*MSX1* タンパク発現ベクターを構築した。*MSX1* 野生型遺伝子及び *MSX1* 変異型遺伝子を FLAG タグで標識して、サイトメガロウイルス由来のプロモーターを有する哺乳類発現ベクター(pcDNA3; Plasmid Cyclic DNA, Invitrogen)に遺伝子導入し、*MSX1* タンパクを発現させた。

2) 核局在性の解析

同定した変異が *MSX1* タンパクの核の局在性に影響を与えるかどうか、蛍光免疫染色を用い、細胞内局在性の比較を行った。24時間培養後の細胞の固定、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 標識抗マウス IgG ヤギ・モノクローナル抗体、DAPI を添加、反応させ、蛍光顕微鏡で観察し、野生型 *MSX1* タンパクと比較した。また同一視野で得られた画像を画像解析ソフト(Photo Shop CS6 Adobe)を用い重ね合わせを行い、核の局在性を検討した。

4. WNT10A タンパク質 3Dモデル機能解析

RCSB PDB より WNT signaling complex 6AHY を用いて変異タンパクによる構造変化について評価した。WNT ファミリーの配列は類似していることから過去に報告のある *WNT 3* と *Frizzled 8* を用いて、構造変化を予測した。

III. 結果

1. 遺伝子変異検索について

先天性永久歯欠損症家系の全エクソーム解析において、1家系より *MSX1* エクソン1領域から c.433_449del (p.W145fs) を認め、もう1家系より *WNT10A* のエクソン4に c.1090A>T (p.K364*) を認めた。

1) *MSX1* 変異症例について

MSX1 変異家系の発端者は、初診時5歳の女兒で8歯の欠損を認めた。また、発端者の父にも歯の欠損を認め、智歯を除く6歯の欠損を認めた。その他の異常は認めず、歯数欠損を生じる症候群を疑う徴候はなかった。

2) *WNT10A* 変異症例について

WNT10A 変異家系の発端者は、初診時21歳の女性で9歯の欠損を認めた。その他の家族に特記事項は認められなかった。

2. 変異型 *MSX1* タンパクの機能解析

患者由来の野生型 *MSX1* アレルより生成された *MSX1* タンパクは、核内に優位な局在を示した。一方、*MSX1* 変異 c.433_449del により生成されたタンパク (p.W145Lfs*24) は、細胞質にび慢性に存在しており、核内には認められなかった。

3. 変異型 *WNT10A* タンパクの3Dモデル解析

WNT10A タンパクの3D解析において、通常 *WNT* は受容体である *Frizzled* を2つの結合領域から挟み込むように把持しているような構造を持つ。今回

はすでに報告されている *WNT3* と *Frizzled8* を用いて自験例の *WNT10A* のタンパク構造の変化について予測した。 *WNT10A* 変異 c.1090A>T (p.K364*) によってC末端が欠失し、それによりWNTがFrizzledと結合できなくなることが判明した。

IV. 考察

1. 新規 *MSX1* 変異 c.433_449del について

MSX1 遺伝子は、303のアミノ酸からなり、遺伝子発現を調節する転写因子をコードしている。*MSX1* 遺伝子は、神経系の発達のみならず、四肢の形成様式、頭蓋顔面の形成にも関与しており、ヘテロ変異では唇顎口蓋裂の発症、また爪の低形成と hypodontia を併発する Witkop 症候群の原因として報告されている。*MSX1* 遺伝子は、歯胚形成初期に歯乳頭の外胚葉間葉組織に発現し、転写因子として作用し *PAX9* との相互作用により *BMP4* を誘導することで、歯胚の分化が進行すると考えられている。*MSX1* は核内に移行した後に、転写因子としてDNA結合能を有することが報告されている。この機能は *MSX1* エクソン2のホメオドメインと呼ばれる機能領域が深く関与し、この領域は60のアミノ酸から構成され、多種間で高度に保存された領域を有している。本症例における新規遺伝子変異 (c.433_449del) は、途中で終止コドンが形成されることでホメオドメインを完全に欠失し、*MSX1* タンパクの核内への移行が障害されている。このこ

とから *MSX1* 遺伝子のホメオドメインは核移行性に関与することを支持し、本症の原因となることが明らかになった。

2. 新規 *WNT10A* 変異 c.1090A>T (p.K364*) について

WNT10A 遺伝子は、初期の歯の発生に関与している。また *WNT10A* は、odontoonychodermal dysplasia (OODD) や Schöpf–Schulz–Passarge 症候群 (SPSS) などの重度の外胚葉異形成にも関与している。変異を持つ *WNT10A* 遺伝子の多くはタンパクの機能に影響を与え、WNT シグナルを阻害することが報告されている。一方で c.337C>T (p.R113C)、c.433G>A (p.V145M)、c.511C>T (p.R171C)、c.1135C>T (p.R379C) の *WNT10A* 遺伝子変異ではタンパクの機能を維持できる野生型に近い活性を一部保持しているとの報告があることから、その構造の維持が重要であると考えられる。*WNT10A* 遺伝子は N 末端と C 末端によって Frizzled と結合し、さらに LRP5/6 と結合することによって複合体構造を形成し、細胞内へ WNT シグナルを伝達する。今回の c.1090A>T (p.K364*) では、タンパクの 3D モデル解析より C 末端が欠失することで、Frizzled 8 受容体との結合が出来なくなることが予想される。このことから、*WNT10A* の変異によって WNT シグナルが停止することが、本症の原因となることが強く示唆された。

3. 原因遺伝子を同定できなかった家系について

次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析は、タンパク翻訳領域である遺伝子を効率的に解析できる方法である。一方でエクソーム解析を用いた方法は、成功率が25%と限られており、本研究でも18症例中16症例については、原因の同定には至らなかった。近年では、バイオインフォマティクスの発展により遺伝分野での解析が進められているが、本症のように未だ解明されていない疾患は多く、CNV、Enhancer-promoter領域などの検索・解析が必要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* 変異 c.433_449del を同定した。変異タンパクの機能解析の結果、変異型 *MSX1* タンパク (p.W145Lfs*24) は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ことが示された。さらに oligodontia の1家系より *WNT10A* のエクソン4領域に新規 *WNT10A* 変異 c.1090A>T (p.K364*) を同定した。*WNT10A* の変異によるC末端の欠失により、変異型 *WNT10A* タンパクの WNT は Frizzled との結合が出来なくなり、その結果、永久歯欠損症の原因となることが考えられた。