

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

立松 忠

論文題目

ヒト先天性永久歯部分無歯症の分子遺伝学的解析

I. 緒言

先天性永久歯部分無歯症は永久歯の先天性欠如を認める、発生頻度の高い先天異常である。本疾患は多因子性の要因で生じ、歯胚発生期の環境要因と、遺伝的要因が関与していると考えられている。ヒトにおいては、これまでに*muscle segment homeobox 1 (MSX1)*、*paired box 9 (PAX9)*遺伝子、*axis inhibition protein2 (AXIN2)* 遺伝子、*wingless-type MMTV integration site family member 10A (WNT10A)* 遺伝子などの変異により発症することが報告されている。我々は本疾患に対し、既知遺伝子のエクソン領域を中心に変異検索を行ってきたが、この範囲では、原因が不明な症例を多く認めている。そこで、これらの症例に対し、全エクソーム解析を導入して、新規の病因遺伝子変異を検出する試みを行ってきた。今回これらの遺伝子解析とその遺伝子産物の機能解析を行ったので報告する。

II. 症例および方法

1. 症例

非症候群性の先天性永久歯部分無歯症の患者のうち、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. 58)に基づきインフォームド・コンセントが得られた家系を対象とした。既知の病因遺伝子

(*MSX1*, *PAX9*, *AXIN2*, *WNT10A*) の変異検索を行い、エクソンに変異を認めず病因が明らかに出来なかった症例の中でも、特に歯数欠損を多く認めた

15症例（家族性症例8家系、孤発性症例7家系）について更なる遺伝学的検討を行った。

2. 遺伝子変異の検索

1) 全エクソーム解析

ゲノムDNAを鋳型として、HiSeq2000 sequencer (Illumina)を使用してシーケンス反応を行った。塩基置換を検出した後、データのフィルタリングを行い、新規の配列であるが、罹患者に共通で、かつ非罹患者に存在しない塩基置換を抽出した。この抽出されたイントロン領域の塩基置換から、スプライス変異が生じる可能性が高い塩基置換を抽出した。これらで抽出された塩基置換を文献的に比較し、本疾患の原因となり得る候補遺伝子の塩基置換を検出した。更に、家系内の世代間における表現型に差を生じさせる遺伝的要因を明らかにする為に、非罹患者の遺伝的な要因が作用している可能性についても同様に評価した。

2) ダイレクトシーケンス法による塩基置換の確認

検出されたMSX1の塩基置換領域を増幅範囲に含めるように設計したプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行った。そしてシーケンス反応により塩基配列を決定して、GenBankデータベースと比較を行った。

3. 哺乳類間における塩基置換部のDNA配列の比較

塩基置換部の MSX1 塩基配列を哺乳類間で比較した。

4. MSX1変異に伴うスプライス異常の確認

該当患者の末梢血由来のリンパ芽球様細胞株より、total RNAを抽出した。そしてRNAを解析してスプライス異常を確認した。

5. 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作製

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作製した。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、哺乳類発現ベクター(pcDNA3)に組み込んだ。FLAGタグ標識したMSX1遺伝子(患者由来の野生型アレル、患者由来の変異型アレル、野生型のcDNA、変異型W139XのcDNA)をアフリカミドリザル腎細胞(COS7)へ遺伝子導入し、MSX1タンパクを発現させた。野生型MSX1のcDNAと変異型MSX1(W139X)のcDNAはコントロール群として使用した(図1)。

2) 核局在性の解析

蛍光免疫染色より、野生型MSX1タンパクと変異型MSX1タンパクの細胞内局在性の比較を行った。蛍光免疫染色は抗FLAG・M2モノクローナル抗体を一次抗体として添加し、二次抗体としてCy3標識抗マウスIgGヤギ・モノクローナル抗体を使用した。さらに核染色としてDAPIを添加し、

蛍光顕微鏡で観察した。

3) ウェスタンブロッティング

変異型 MSX1 タンパクの核内における発現及び、生成されたタンパクの相対分子量を野生型 MSX1 タンパクと比較する為にウェスタンブロット解析を行った。細胞質タンパク及び核タンパクを抽出し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。そして抗 FLAG・M2 モノクローナル抗体を使用して一次抗体反応を行った後、HRP 含有の二次抗体と反応させた。ウェスタンブロット検出用化学反応試薬と反応後、感光フィルムに露光しバンドを検出した。

III. 結果

1. *MSX1* 新規塩基置換を認めた家系の臨床的所見について

我々は、全エクソーム解析法を導入して、家族性の 1 家系より既知の病変遺伝子である *MSX1* のイントロン領域に新規遺伝子変異 c.452-9 G>A を検出した(c.451_452insCCCTCAG)。この家系の発端者は、初診時 28 歳の女性で 13 歯の歯牙欠損を認めた。発端者の母及び一卵性双生児の弟に歯牙欠損を認め、それぞれ 4 歯、10 歯、7 歯の欠損を認めた。また爪、皮膚、髪などの外胚葉より形成される組織に異常は認めず、また歯数欠損を生じる症候群を疑う徴候はなかった(図 2)。さらに、サンガーシーケンス法でも同様の変異を確認した(図 3)。

2. *MSX1* c.452-9G の哺乳類間の保存性について

MSX1 塩基置換を認めた部位 c.452-9G は、ほぼ全ての哺乳類で保存されていた(図 4)。

3. スプライス異常の確認について

変異アレルにおいてエクソン 1 とエクソン 2 との境界に 7 塩基の挿入を認め、スプライス異常が確認された(図 5)。

4. 変異 *MSX1* タンパクの機能解析

1) 核局在性の評価

MSX1 変異 c.452-9G>A により生成されたタンパク(p.R151fsX20)は、ホメオドメインが欠失した *MSX1* 変異タンパク(p.W139X)と同様に、細胞質にび慢性に局在しており、核内に局在を認めなかった(図 6 A)。

2) タンパク相対分子量の比較

本変異による *MSX1* タンパク(p.R151fsX20) では、核内にタンパク発現を認めなかった。さらに細胞質タンパクでは、相対分子量が低い変異タンパクを検出した(図 6 B)。

IV. 考察

1. 新規変異 *MSX1* c.452-9G>A

MSX1 遺伝子は、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(HD)と呼ばれる機能領域が深く関与している。これまでに HD が欠失するナンセンス変異の解析により、*MSX1* の核移行自体が障害されることで

本疾患が発症する事、そしてMSX1のHD内に核局在化に関与する領域が存在する事が明らかにされている。さらに、HD内に生じたミスセンス変異の解析によってMSX1は核に移行するものの、DNA結合性が抑制されることで本疾患が発症することが報告されている。今回我々は、家族性の先天性永久歯部分無歯症の患者より、新規遺伝子変異(c.452-9G>A)を見出した。この変異により、途中にストップコドンが形成されることでHDが完全に欠失し、核への移行が障害される。このことからMSX1のHD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. 家系内における表現型の差

この家系内では、罹患者世代間及び一卵性双生児間で表現型が大きく異なっていた。この世代間における表現型の差は、罹患者から次世代へMSX1変異が継承されている他に、歯牙欠損を促進させる別の遺伝的要因が非罹患者から継承されている可能性が考えられる。しかしながら我々は特定の遺伝子を同定するには至らなかった。一卵性双生児は遺伝子が完全に一致しているが、多因子遺伝疾患の場合、表現型が異なる事が知られている。環境因子やエピジェネティックな影響が関与している可能性が高い。今後はMSX1遺伝子の発現を調整しているプロモーター領域を含めた解析が必要となる。

3. 全エクソームと本疾患の関連

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%に限られており、本研究でも新規遺伝子の同定には至らなかった。このことから、候補遺伝子の解析において、より広範囲な解析の必要性が示唆された。

4. まとめと今後の展望

本研究では、先天性永久歯部分無歯症においてイントロンの塩基置換によってスプライス異常を起こすことで、HDが欠失する新規変異を同定した。また変異タンパクの機能解析により、HDの欠失が本疾患の主病因であることが解明された。

本家系では家系内、さらに一卵性双生児で表現型の違いがある事からエピジェネティックな影響が強く関与していると考えられた。この為、プロモーター領域やマイクロRNAを含めた解析が必要となることが示唆された。

V. 結語

家族性の1家系より新規MSX1変異c.452-9G>Aを同定した。変異タンパクの機能解析の結果では、変異型MSX1タンパク(R151fsX20)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が示された。