

学位論文題名

Autosomal-dominant hypoplastic form of amelogenesis imperfecta caused by an enamelin gene mutation at the exon-intron boundary

(エナメルリン遺伝子エクソン-イントロン境界部で変異が確認された
常染色体優性遺伝性エナメル質形成不全症)

学位論文内容の要旨

遺伝性エナメル質形成不全症 (amelogenesis imperfecta: AI) は、遺伝的な要因により乳歯、永久歯ともすべての歯にエナメル質の形成障害を生ずる疾患である。AI は北米白人で 1/14,000、スウェーデン北部住民で 1/700 の発生頻度と報告されているが、日本では AI の包括的な報告がなく、正確な発生頻度は不明である。遺伝様式から AI は、常染色体性優性、常染色体性劣性および X 連鎖優性遺伝性の 3 型が知られている。一方、臨床所見から AI は、エナメル質の薄い低形成型、エナメル質の石灰化不全を呈する低石灰化型およびエナメル質の成熟不全を伴う低成熟型の 3 型に大別される。しかし、その病因遺伝子とその変異の検出に関しては、限られた症例でしか報告されていない。そこで本研究では臨床症状より AI を疑った一家系を対象とし、4 種類の AI 責任候補遺伝子に対し遺伝子解析を行って、その責任遺伝子・変異の検出を目的とした。なお、本研究に先立ち本学歯学研究科倫理委員会の承認および遺伝子解析対象者からインフォームドコンセントを得た。

本学歯学部附属病院小児専門外来を受診し、同程度のエナメル質形成不全が認められた兄弟とその血縁者 7 名、コントロールとして 100 名の正常人を研究対象とした。発症者は、患児兄弟と父親のみで、父方の血縁者にエナメル質の形成不全は確認されなかった。その臨床像は、患児兄弟では、乳歯・永久歯とも全歯にわたり黄色みを帯びた色調で、外形が小さく、接触点が確認されない低形成・滑面性型のエナメル質の形成不全を認めた。一方、父親の口腔内所見は頬側面に線上に陥凹が見られたものの、歯牙外形は正常とほぼ一致し低形成・局所性の形成不全が確認され、親子でその臨床像が異なっていた。

方法はまず、解析対象者から約 5cc 採血を行い、有核細胞より DNA を抽出した。

次に解析する対象遺伝子を決定し、それぞれの遺伝子のゲノム配列から各エクソンを挟むように primer 設計を行った。そして被験者の DNA を鋳型として PCR 法により目的の遺伝子の各エクソンを含むフラグメントを増幅し、PCR-SSCP 法による遺伝子変異のスクリーニング及び、シークエンス解析を行って変異の検出を行った。解析する遺伝子として、エナメル質形成に関与する X/Y 両染色体上のアメロジェニン、常染色体上のアメロプラスチン、エナメルリンおよびエナメリシンを対象とした。

PCR 解析では、各解析遺伝子上でコントロールと異なるサイズのフラグメントは確認されなかった。しかしながら、PCR-SSCP 解析およびシークエンス解析の結果、アメロプラスチンで 2 か所、Y 染色体上アメロジェニンで 1 か所、エナメルリンで 1 か所、アミノ酸の変化を伴う塩基置換/塩基欠損が確認された。アメロプラスチンで確認された塩基置換 (Ala²⁵⁵→Val, Leu³⁵⁴→Pro) は過去に一塩基多型 (single nucleotide polymorphism : SNP) の報告があり、病因とは考えられなかった。しかし、Y 染色体上のアメロジェニン、4 番染色体上のエナメルリンで確認された塩基置換/塩基欠損は SNP としての報告がなかったため、AI 発症との関係を検討した。Y 染色体上アメロジェニンでは男性コントロール 84 名との比較検討を行った。PCR-SSCP 解析・制限酵素処理・シークエンス解析で、84 名中 14 名に発症者と同様の塩基置換 (Arg¹⁶⁶→Glu) を検出し、この塩基置換は病因ではなく、これまでに報告のない SNP であることが判明した。エナメルリンで確認された塩基欠損は、PCR-SSCP 解析・シークエンス解析から、エクソン 9 とイントロン 9 の境界部にある 7 つの連続した G (グアニン) の部位での 1 塩基グアニン欠損で、同じ欠損が兄弟・父親で確認された。発症している 3 人のエナメルリン遺伝子の他の部位では正常者との間に違いは認められなかった。一方、無症状である他の家族、正常人 100 人で PCR-SSCP 解析・シークエンス解析を実施したが、同じ欠損は検出されなかった。以上の結果から、本症例はエナメルリン遺伝子の変異により発症した常染色体優性遺伝性 AI (ADAI) と診断された。

本解析では患児の父には変異を検出したが父方祖父母には変異は認められなかった。従って、変異は父親のレベルにおいて *de novo* で発生したと考えられ、患児兄弟と父親の表現型の違いとの関連が示唆された。父親の変異の由来は両親の生殖細胞の一部に変異が生じたことも考えられる。しかし、受精卵の卵割時に正確な複製が行われず一部の細胞にエナメルリン遺伝子変異がおき、父親の身体はこれら二群の細胞から構成していることもあり得る。その場合、この父親に正常なエナメル芽細胞と遺伝子異常をもったエナメル芽細胞が混在し、それが父親と患者の臨床像の違いに関連する可能性がある。しかし、他の要因が関与している可能性も否定できなかった。

本症例で変異が確認されたエクソンとイントロンの境界部位は、正常配列でもグアニンが 7 つ並んだまれな構造であるが、グアニン一塩基の欠失がエクソン、イントロンのどちらとして認識されるかによって、mRNA レベル以降の影響が異なってくる。

イントロン側のグアニンの欠失と認識された場合、スプライシング機構に重要な役割を担っている GT-AG ルールが崩れ、高率に直前エクソンのスキップが起きることが予想される。この場合はエクソン 9 に含まれる 54 塩基に相当する 18 アミノ酸が正常なエナメルタンパクから欠損することになり、非常に不安定な、あるいは機能異常のエナメル分子となる可能性がある。一方、エクソン側のグアニンの欠失と認識された場合は 195 番目のアミノ酸からフレームシフトが生じ、276 番目がストップコドンとなることが予想される。正常のエナメルは 1142 個のアミノ酸から構成されるが、変異分子は途中から全く異なったアミノ酸配列でしかも短いものとなり、正常なエナメル分子の機能を持つとは思われない。エナメルを発現している細胞を患者から採取することが困難であるため、実際にどちらの仮説の可能性が高いかを Web 上の intron-exon junction 構造を認識するプログラムで検討を加えた。このプログラム上にグアニンが一塩基欠失したシークエンスを入力したところ、この欠失がエクソン側と認識される可能性が示唆された。以上の機序により本症例が発症したと考察された。

国内においてこれまでに AI における遺伝子解析を行った報告が数例あるものの、病因遺伝子同定の報告は一例もなく、本症例は国内では病因遺伝子と責任変異が検出された初めての AI 症例である。またエナメル遺伝子変異による ADAI としても本家系は世界で 2 例目の症例である。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	小 口 春 久
副 査	教 授	田 村 正 人
副 査	教 授	向 後 隆 男
副 査	教 授	崎 山 幸 雄

学 位 論 文 題 名

Autosomal-dominant hypoplastic form of amelogenesis imperfecta caused by an enamelin gene mutation at the exon-intron boundary

(エナメルリン遺伝子エクソン-イントロン境界部で変異が確認された
常染色体優性遺伝性エナメル質形成不全症)

審査は、向後、田村、崎山および小口審査委員それぞれ個別に実施し、学位申請者に対して提出論文の内容とそれに関連する学科目について口頭試問の形式によって行われた。以下に、提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

学位申請者は、臨床症状より遺伝性エナメル質形成不全症 (amelogenesis imperfecta: AI) を疑った一家系を対象とし、4 種類の AI 責任候補遺伝子に対し遺伝子解析を行って、その責任遺伝子・変異の検出を行った。本学歯学部附属病院小児専門外来を受診し、同程度のエナメル質形成不全が認められた兄弟とその血縁者 7 名、コントロールとして正常人 100 名を研究対象とした。発症者は、患児兄弟と父親のみで、父方の血縁者にエナメル質の形成不全は確認されなかった。その臨床像は、患児兄弟では、低形成・滑面性型のエナメル質の形成不全、一方、父親は低形成・局所性の形成不全が確認され親子でその臨床像が異なっていた。

方法はまず、解析対象者から採血を行い、有核細胞より DNA を抽出した。次に解析する対象遺伝子を、エナメル質形成に関与する X/Y 両染色体上のアメロジェニン、常染色体上のアメロプラスチン、エナメルリンおよびエナメリシンと決定し、それぞれの遺伝子の primer 設計を行った。そして PCR 法により目的の遺伝子の各エクソンを含むフラグメントを増幅し、PCR-SSCP 法による遺伝子変異のスクリーニング及び、シーケンス解析を行って変異の検出を行った。

以上の方法によって得られた結果は次のとおりである。PCR 解析では、各解析遺

伝子上でコントロールと異なるサイズのフラグメントは確認されなかった。しかしながら、PCR-SSCP 解析およびシーケンス解析の結果、アメロプラスチンで2か所、Y染色体上アメロジェニンで1か所、エナメルリンで1か所、アミノ酸の変化を伴う塩基置換/塩基欠損が確認された。アメロプラスチンおよびY染色体上のアメロジェニンで確認された塩基置換は検討の結果、一塩基多型であることが判明し病因変異ではないことがわかった。一方、エナメルリンで確認された塩基欠損は、エクソン9とイントロン9の境界部にある7つの連続したG（グアニン）の部位での1塩基グアニン欠損で、同じ欠損が兄弟・父親で確認された。また、無症状である他の家族、正常人100人では同じ欠損は検出されなかった。以上の結果から、本症例はエナメルリン遺伝子の変異により発症した常染色体優性遺伝性 AI (ADAI) と診断された。

本解析では患児の父には変異を検出したが父方祖父母には変異は認められなかった。したがって、変異は父親のレベルにおいて *de novo* で発生したと考えられ、それが父親と患者の臨床像の違いに関連する可能性がある。

本症例で変異が確認されたエクソンとイントロンの境界部位は、正常配列でもグアニンが7つ並んだまれな構造であるが、グアニン一塩基の欠失がエクソン、イントロンのどちらとして認識されるかによって、mRNA レベル以降の影響が異なってくる。実際にどちらの仮説の可能性が高いかを intron-exon junction 構造を認識するプログラムで検討を加えた。このプログラム上にグアニンが一塩基欠失したシーケンスを入力したところ、この欠失がエクソン側と認識され、早期にストップコドンの出現をきたし、正常なエナメルタンパクの合成が行われないという可能性が示唆された。以上の機序により本症例が発症した、としている。

学位申請者に対して論文内容に関連する質問が行われた。質問の主な項目は下記のとおりであった。

- 1) 遺伝性エナメル質形成不全症の発症とエナメルリン変異の関係について
- 2) エナメルタンパクのエナメル質発生期における役割について
- 3) エナメル質形成に関与するタンパクとその遺伝子変異報告について

これらの質問に対し、学位申請者からそれぞれ適切な回答が得られた。国内においてこれまでに AI における遺伝子解析を行った報告が数例あるものの、病因遺伝子同定の報告は一例もなく、本症例は国内では病因遺伝子と責任変異が検出された初めての AI 症例である。またエナメルリン遺伝子変異による ADAI としても本家系は世界で2例目の症例であることが評価された。さらに、AI 発症の原因を追求するため、タンパクレベルでの機能解析を行うなど、さらに詳細な解析の準備を進めており、将来の展望についても評価された。

したがって、学位申請者は博士（歯学）の学位授与に相応しい者と認められた。