

研究者：小西有希子

(所属：広島大学大学院医歯薬保健学研究院統合健康科学部門小児歯科学研究室)

研究題目：遺伝性エナメル質形成不全症の早期介入を目指した分子機構の 解明

目的：

小児歯科臨床では頻繁にエナメル質形成不全症の患児に遭遇する。そのうち局所的原因以外を占める遺伝性エナメル質形成不全症（AI）は、未だ原因遺伝子が解明されていないものが数多く存在している。AIは、遺伝様式とエナメル質の病的な所見によって分類されている。その発症頻度は700人～14,000人に1人の発生率である。形成不全は歯の形成途中に何らかの原因で起こり、重症の場合は萌出後、咬合崩壊などQOLに関わる可能性がある。本研究では、AIを持つ小児を対象として、原因遺伝子を同定することを目的とする。

対象および方法：

広島大学病院小児歯科外来を受診したAIを認める小児を対象とし、本人ならびに保護者の同意を得たうえで、以下の方法で実験を行った。

1. 研磨標本，脱灰標本の作製

抜歯した歯を用い、研磨標本は40%エタノールにて固定、洗浄、脱水を行い、キシレンで中間処理を行った。その後、樹脂浸透を行ったうえで歯牙をオステオレジン包埋Kitを用いて包埋し、薄切、封入剤を用いて標本作製を行った。脱灰標本は10%ホルマリンにて固定、EDTAを用いて脱灰、脱水、中間処理を経てパラフィン浸透を行いパラフィンに包埋した。その後、薄切、スライドガラス上の切片を脱パラフィンし、ヘマトキシリン・エオシン染色を行い、再び脱水、透徹し封入剤を用いて標本作製を行った。その後光学顕微鏡下にて観察を行った。

2. シークエンス解析

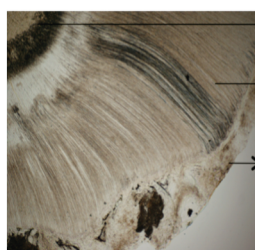
患児より全血を採取し、採取より1時間以内の全血からゲノムDNAの抽出をGenra Puregene Blood Kitを用いて行った。解析候補遺伝子の鋳型用プライマーとシークエンス用プライマーの設計をそれぞれ、鋳型用プライマーは最大1Kbpまでの長さに設計し、シークエンス用はエクソン部位を含む一方向のみで80bp前後として作製した。

得られたゲノムDNAを用いて、PrimeSTAR CXL DNA Polymeraseで解析候補遺伝子のPCR増幅を行った。iCycler 170-8724 JAを用いてそれぞれの設計プライマーに応じた最適なアニリング温度をgradient機能を用い設定し、増幅させた。その後、PCR反応液の一部を用いて1%アガロースゲルで電気泳動を行い、特異的な増幅を確認。DNAをNucleoSpinGelandPCR Clean-upにて精製。精製後、一部を1%アガロースゲルにて電気泳動しテンプレートDNAの濃度を測定し、テンプレートDNAを60～150ng、シークエンス用プライマー9.6pmolを混合し、ダイレクトシークエンスを行った。得られた塩基配列の変異部分をNCBIデータなどと比較し、変異の有無を確認。また、4Peaksソフトウェアを用いて検討を行った。

結果および考察：

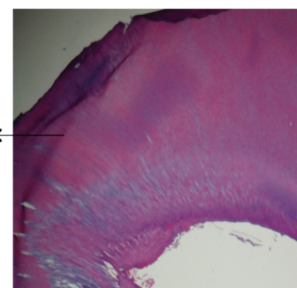


口腔内写真（19y8m）



→ Pulp
→ Dentin
→ Enamel
エナメル質が薄く、
構造が不規則である

研磨標本



Dentin ←
象牙質構造に異常は
認められない

脱灰標本

AIの重度な症例においては萌出直後、あるいは萌出以前に歯髄感染を起こし、抜歯を余儀なくされ、咬合崩壊が起こるものも存在する。しかしそういった重度のエナメル質形成不全症の報告はいまだ少ない。今回、AIが疑われる患児の埋伏下顎智歯を抜歯し研磨標本を作成した。その結果、エナメル質が薄く、構造が不規則で、部分的に形成されていない部位があることが認められた。また、脱灰標本からは、象牙質の形成には異常が認められなかったことからエナメル質形成不全であると判断した。本症例は、乳歯列、永久歯列ともにエナメル質形成不全を認め、歯冠色は黄色～茶色を示し、歯質が柔らかく欠け易いため歯質崩壊が著しく、萌出直後に歯髄感染を起こし、歯髄処置が必要になる歯が多数であった。また、家族歴は不明瞭であり、両親の問診からは同一家系内にエナメル質形成不全を有すると思われるものは認めなかった。そのため、表現型や家族歴からは Witkop の分類に当てはめるのが難しく、過去に報告された臨床所見に当てはまるものは見当たらなかった。

そこで、本症例のAIの原因遺伝子を同定するため、シーケンスを行った。その結果、Amelogenin (AMELX), Enamelin (ENAM), Kallikrein 4 (KLK4), Family with sequence similarity 83 member H (FAM83H), Distal less homeobox 3 (DLX3), や Ameloblastin (AMBN) の関連遺伝子については変異が認められなかった。今後は、Enamelysin (MMP20), WD repeat domain 72 (WDR72), Family with sequence similarity 20 member A (FAM20A) や、最近変異が報告されている Solute carrier family 24, member 4 (SLC24A4) などの、AI 既知変異遺伝子についても解析を行う予定である。今回遺伝子診断を行った AI 患児の表現型は、過去に報告された表現型と一致せず、既知の原因遺伝子で変異が確認できなかった場合には、変異の可能性があるエナメル質形成関連遺伝子 Tuftelin (TUFT), Amelotin (AMTN), Solute carrier family 4, Sodium bicarbonate cotransporter, member 4 (SLC4A4), Solute carrier family 4, anion exchanger member 2 (SLC4A2), Odontogenic ameloblast-

associated protein (ODAM) などの遺伝子も解析し、新規の AI の責任遺伝子の同定を行う。さらに、解析候補遺伝子に変異が認められなかった場合は転写因子の網羅的解析を行い、患児だけでなく保護者や兄弟からも遺伝子提供を受ける事で次世代シーケンスを行うことも検討している。

成果発表：(予定を含めて口頭発表，学術雑誌など)

今後，上記内容を含めて学術雑誌に投稿予定。