

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05539

研究課題名(和文)p53遺伝子欠損コンソミックマウスを用いた口蓋裂発症メカニズム解析

研究課題名(英文)Analysis of cleft palate mechanism using p53 gene-deficient consomic mice

研究代表者

高木 律男(Takagi, Ritsuo)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：20143795

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 9,700,000円

研究成果の概要(和文):今回、CL/Fr 系統マウスを用いて、primary cleft palate とsecondary cleft palateに分子レベルでの違いが存在するか解析したところ、primary cleft palateでは、ShhとWntのシグナルの低下が確認されたが、secondary cleft palate領域では、それらのシグナルに変化は認められなかった。以上のことより、primary cleft palateとsecondary cleft palateは、別々のメカニズムでひき起こる可能性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口蓋裂は、一次口蓋と二次口蓋の間の口蓋裂(primary cleft palate)と、二次口蓋における口蓋裂(secondary cleft palate)に大別され、primary cleft palateとsecondary cleft palateが同じメカニズムで生じているかは不明である。本研究の結果から、primary cleft palateとsecondary cleft palateは、別々のメカニズムでひき起こる可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文):CL / Fr strain mice, which are inbred mice, include mice having both a primary cleft palate and a secondary cleft palate. This time, using CL / Fr strain mice, we analyzed whether there is a difference at the molecular level between primary cleft palate and secondary cleft palate. No change was observed in those signals in the secondary cleft palate region.

研究分野：口腔外科

キーワード：口蓋裂 p53

1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂は、最も頻度の高いヒトの先天異常であるため、多くの患者が存在する。多くの優れた臨床研究により治療成績が向上し、良好な顎発育と言語発達を獲得できる水準が維持されている一方で、その病因については複雑さゆえに大きな進展はなく、環境因子と遺伝因子の議論に止まって久しい。患者本人は、外科的な治療に加え、成長に伴う言語治療、歯科治療など長い治療を強いられる。患者本人だけでなく、その家族も多くの負担を強いられる。口唇口蓋裂に対する臨床的な将来像は、生前における口唇口蓋裂診断と、投薬による生前での治療にある。しかし、そのために必要な口唇と口蓋の正常な形成における分子レベルでの制御メカニズムが明らかとなっていない。

2. 研究の目的

1990年の分子生物学の著しい進展によりマウスの遺伝子改変が可能になって以降、様々な遺伝子組み換えマウスを用いた口唇口蓋裂の実験が数多く行われている。しかし、それらの遺伝子改変マウスのほとんどは、口蓋裂のみを有しており、口唇裂を有している遺伝子改変マウスの報告は極めて少ない。口唇裂を有している場合でも、著しい顔面の形成異常を伴っている場合が多く、ヒトにおける口唇裂を反映しているとは言い難い。さらに、口蓋裂は、一次口蓋と二次口蓋の間の口蓋裂(primary cleft palate)と、二次口蓋間の口蓋裂(secondary cleft palate)に大別できるが、遺伝子改変マウスでは secondary cleft palate を示すものがほとんどであり、primary cleft palate に関する報告はほとんどない。これらのことが、口唇裂研究の遅延の原因となっている。つまり、口唇口蓋裂研究には、ヒトの口唇口蓋裂に類似した口蓋裂や口唇裂が認められるマウスラインを用いることが望ましい。近交系マウスである CL/Fr 系統マウスは、通常環境で維持可能なマウスであることに加え、数%の確率で口唇裂と口蓋裂の両方が認められる。つまり、遺伝子的なバックグラウンドがほぼ同一に関わらず(平均して僅か 0.01 のヘテロ接合性しか残っていない)口唇裂と口蓋裂が認められるマウスラインであり、口唇口蓋裂研究には非常に有用なラインと言える。予備実験や過去の報告により、CL/Fr 系統マウスには、口蓋裂のみを有するマウスと、口唇裂と口蓋裂の両方を有するマウスが認められる。さらに primary cleft palate は、口唇裂に付随して生じることが多いため、口唇裂を有する CL/Fr 系統マウスには、primary cleft palate が認められる可能性は高い。そこで、本研究では L/Fr 系統マウスを用いて、primary cleft palate と secondary cleft palate で分子レベルでの違いが存在するか検索した。

3. 研究の方法

CL/Fr 系統マウスを使用して、その口蓋裂の分子レベルでの解析を行った。

4. 研究成果

口蓋裂のみを有するマウスと、口唇裂と口蓋裂の両方を有するマウスの口蓋裂の形態を比較した。口唇裂を伴っているマウスにおける一次口蓋付近の形態は、鼻中隔が著しく低位であった(図1)。二次口蓋形成は、近心部、遠心部、その間の中間部で、制御分子機構が違ふとされている。口蓋裂のみを有する CL/Fr マウスの近心側では、口蓋突起が舌上に挙上し、正中への進展を見せているものの、癒合にまで至っていなかった(図2)。中央部、遠心部でも似たような表現型を認めたが、口蓋突起間の距離は、近心部より大きかった(図2)。一方、口唇裂と口蓋裂の両方を有する CL/Fr マウスでは、近心部で口蓋突起の舌上への挙上が不完全であった(図2)。中間部では、口蓋裂のみの CL/Fr マウスと異なり、口蓋突起の舌上への挙上は確認できなかった。遠心部での口蓋突起の形態的表現型は、口蓋裂のみの CL/Fr マウスと類似したものであった(図2)。顔面形成には様々なシグナル経路が関わりとされているが、その中でも、Bmp、Fgf、Wnt、Shh が主な経路として見出されている。そこで、口唇裂と口蓋裂両方を有する CL/Fr マウスの一次口蓋部におけるそれらのシグナル経路の変化を、それぞれのマーカーで確認した。Bmp シグナルのマーカーである Smad1/5/9 や、Fgf シグナルの Etv5 に大きな変化は認められなかった(図3)。一方、Shh シグナルのマーカーである Gli1、Wnt シグナルのマーカーである Axin2 の発現が著しく低下していた(図3)。一方、口蓋裂のみを有する CL/Fr マウスにおける二次口蓋部のシグナル経路の変化を確認したところ、一次口蓋部で認められたような Shh や Wnt シグナルの変化は認められなかった(図4)。Bmp シグナルのマーカーである Smad1/5/9 や、Fgf シグナルの Etv5 にも大きな変化は認められなかった(図4)。これらの結果から、口蓋裂のみを有する CL/Fr マウスと、口唇裂と口蓋裂の両方を有する CL/Fr マウスで、口蓋裂の表現型や分子変化の違いがあることが明らかとなった。それは、口蓋裂の近

心側でより顕著であった。このように、primary cleft palateとsecondary cleft palateで、その発症機序は、異なる可能性が示唆された。

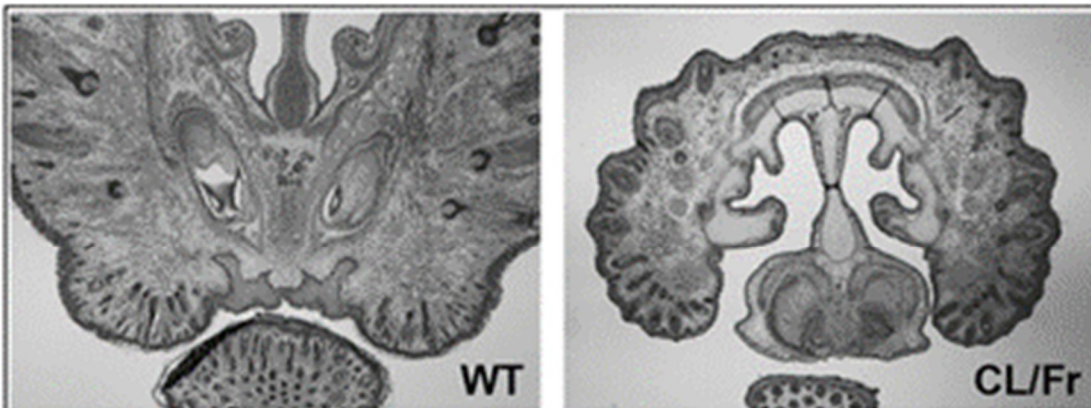


図1：鼻中隔の低位

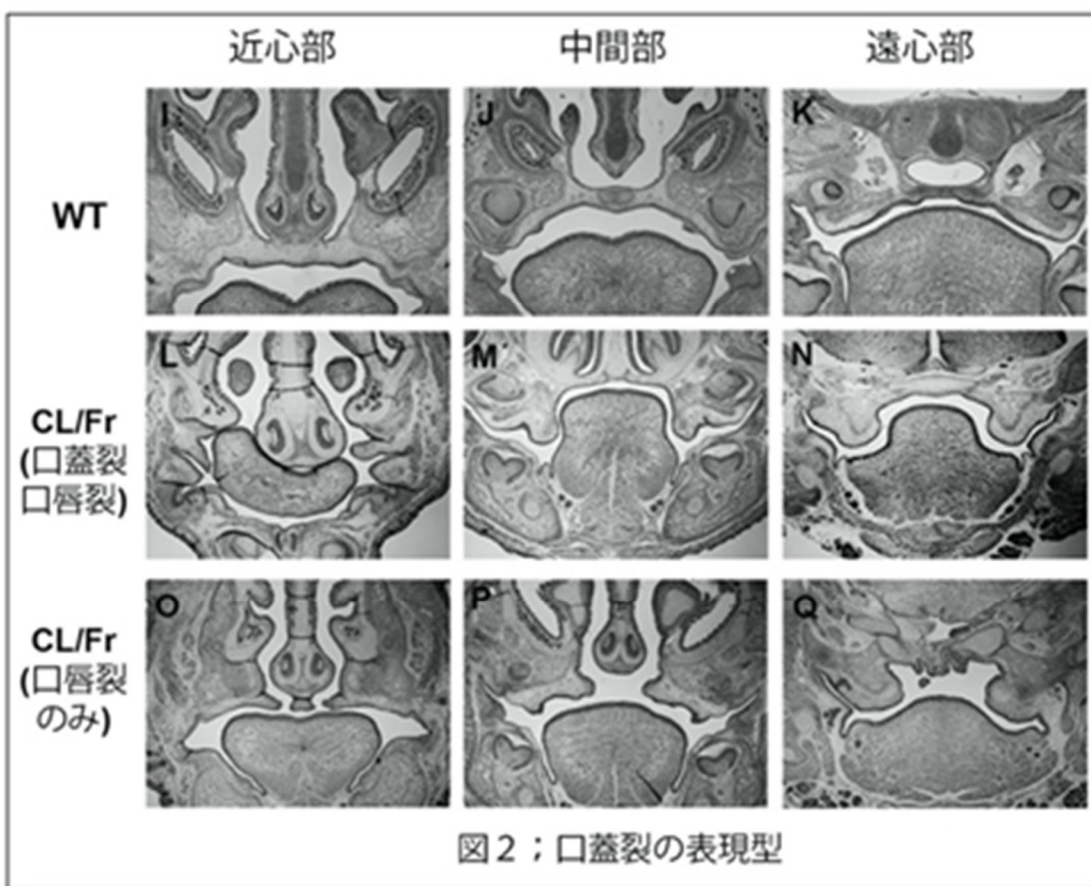
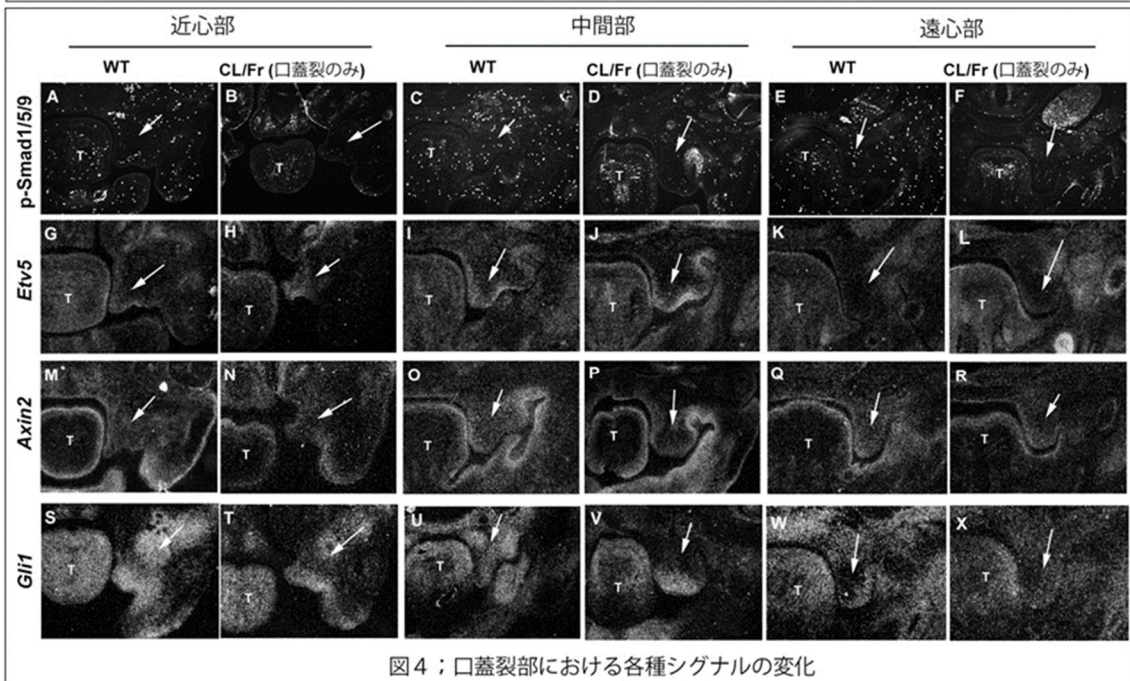
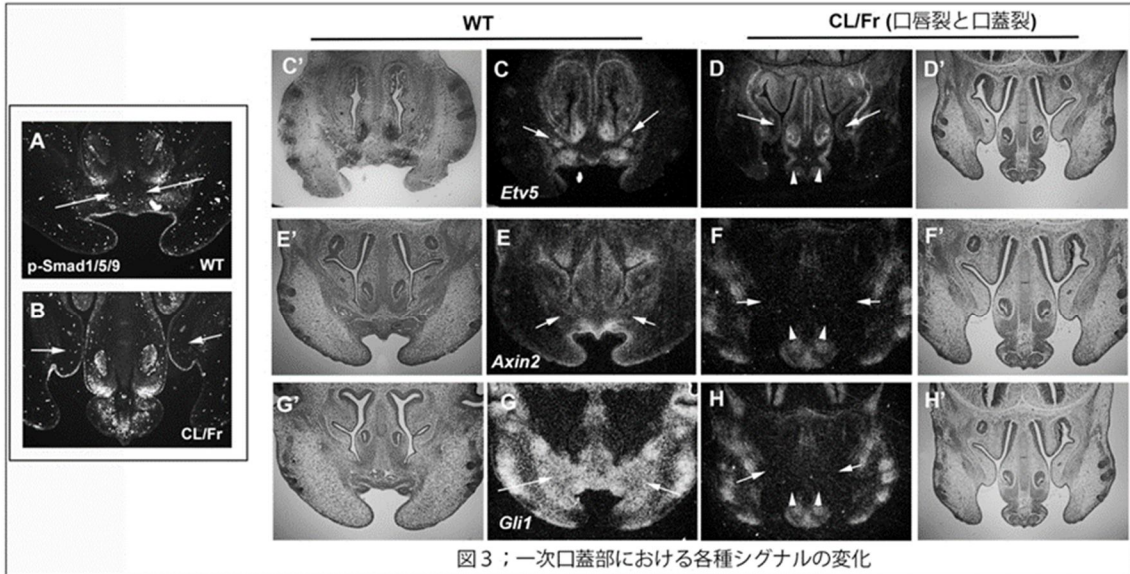


図2：口蓋裂の表現型



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamada A, Nagai T, Kitamura A, Kawasaki M, Kawasaki K, Kodama Y, Maeda T, Ohazama A, Takagi R	4. 巻 in press
2. 論文標題 Changes in signaling pathways in the palatal cleft in CL/Fr	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Oral Maxillofac Surg Med Pathol	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	大峽 淳 (Ohazama Atsushi) (40266169)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	児玉 泰光 (Kodama Yasumitsu) (90419276)	新潟大学・医歯学総合病院・講師 (13101)	