

令和元年6月26日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11773

研究課題名(和文) 口蓋裂発生に関与する口蓋突起基底膜の動態およびヒト筋関連遺伝子の影響

研究課題名(英文) Influence of human muscle related genes and dynamics of palatine basement membrane involved in cleft palate development

研究代表者

井村 英人 (Imura, Hideto)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：10513187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：胎仔口蓋部前頭断切片を用いてHematoxylin-Eosin(H-E)染色および免疫染色を行い、口蓋形成期の口蓋を前方から後方にかけて観察し、対照群とTCDD投与群との比較を行ったところ、TCDD投与マウスの口蓋癒合部において、細胞が疎な部位と、口蓋の断裂を認めた。また、口蓋棚狭窄部において細胞の脱落や細胞の欠損を認めたことから、細胞間接着の低下やアポトーシスによる組織強度の不足が、癒合した口蓋が離開する要因となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、「胎生期に左右の口蓋突起が癒合し、口蓋が一旦形成された後に、癒合部が解離して口蓋裂が発症する」という、従来の概念とは異なる口蓋裂の発症機構を見出し、その口蓋裂発生原因および一旦癒合した口蓋突起が解離するという新しい口蓋裂発生のメカニズムの要因を解明することから学術的意義がある。また、口蓋裂発生原因の解明は、口蓋裂発症予防の見地からも重要な社会的意義を持つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We observed the fetal palate frontal sections by Hematoxylin-Eosin (H-E) staining and immunostaining. We observed the process of the palatal formation from anterior to the posterior. TCDD-exposed palatal shelves were observed to be thin in the middle region. In this area, mesenchymal cells were sparse, and several palatal cells were dispersed or defective in certain sections. Therefore, decreased intercellular adhesion or a reduction in the tissue strength of the palatal shelves due to apoptosis may be involved in the development of cleft palate after palatal fusion, although few TCDD-exposed embryos had a fused palate at a stage prior to cleft palate observation.

研究分野：口唇口蓋裂

キーワード：口蓋裂 TCDD 離開 発生 機序 基底膜

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂はヒトの先天異常疾患において最も多く発生する外表奇形である。口唇口蓋裂の日本人における発生頻度は約 500~600 人に 1 人と報告されており、口唇口蓋裂のうち口蓋裂の発生頻度は約 30%とされている。しかしながら、その発生機序の詳細については明らかにされていない点が多い。

口蓋の形成過程は、1) 舌側方において垂直位に形成された 2 つの口蓋突起が挙上して水平位をとる挙上期、2) 水平位となった口蓋突起の伸長により互いに接触する接触期、3) 接触部の上皮細胞の接着とアポトーシスが起り、両側口蓋突起の間葉組織が結合する癒合期となり、4) 上皮索の消失により癒合が完了し、口蓋が形成される。したがって、口蓋の形成過程のこれらのどこかが障害されると口蓋裂が発生すると考えられている。従来からの口蓋裂の発生メカニズムは、口蓋突起の癒合時における programmed cell death の不調によるとする報告が一般的であるが、それに相反する報告 (Int. J. Dev. Biol. 48:39-46, 2004) も出されており、口蓋裂の発症メカニズムについての明確な解答は出されていない。

これまでわれわれは、臨界濃度の TCDD を投与した妊娠マウスから胎生 18 日に胎仔を取り出すと 100%口蓋裂を発生していたが、胎生 14、15、16 日に胎仔を取り出した場合はそれぞれ 4%、17%、13%の胎仔で口蓋の癒合が認められたことから、口蓋癒合後に口蓋突起が離開したことにより口蓋裂が発生する可能性があることを報告している。Kitamura の研究において、癒合した組織が離開したことを示した報告がある。Kitamura は、中絶した 500 例のヒト胎児の口唇および口蓋組織を観察したところ 80 例に口唇・口蓋裂胎児を認め、口蓋裂胎児では口蓋突起先端付近の口蓋組織に上皮真珠が存在しており、この上皮真珠は一度癒合した口蓋が離開して口蓋裂を発症したために形成されたと報告している。従って、ヒト胎児においても起こっている現象であることから、口蓋癒合後に口蓋が離開して口蓋裂の発生に至る機序を明らかにすることは口蓋裂発症原因を知る上で重要であると考えられる。

本研究では、口蓋癒合後の離開について、口蓋形成期の TCDD への暴露により口蓋組織構造に異常が生じ、その異常が一旦癒合した口蓋の離開に関与しているのではないかという仮説を立て、実験を行ったので報告する。

2. 研究の目的

私たちは「胎生期に左右の口蓋突起が癒合し、口蓋が一旦形成された後に、癒合部が解離して口蓋裂が発症する」という、従来の概念とは異なる口蓋裂の発症機構を見出し、報告してきた。本研究では、口蓋裂発症の因果関係を見出すとともに口蓋癒合期および離解時の上皮基底膜動態を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) 実験動物および胎仔摘出

8-10 週齢の ICR 系雌マウス (CLEA, Tokyo, Japan) を購入し、室温 $22 \pm 1^\circ \text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、定期的な 12 時間ごとの明暗サイクル下、標準固形試料と飲料水を制限なく摂取できる環境で飼育した。未経産雌マウスを同系の成熟雄マウスと終夜交配させ、翌朝膣栓形成が確認できたものを、当日の午前 0 時に妊娠したと想定し、胎生 1 日とした。胎生 12 日に、対照群にはトルエン含有オリーブ油 0.4ml、TCDD 投与群には口蓋裂を 100%発症する濃度である $40 \mu\text{g}/\text{kg}$ の TCDD (Accu Standard Inc., New Haven, CT, USA) をトルエン含有オリーブ油 0.4ml に溶解し、それぞれ胃管にて単回経口投与した。口蓋形成期の口蓋部の観察を行うため、帝王切開により摘出した胎仔を使用した。TCDD 投与群は先行研究²¹⁾において最も高い頻度で口蓋が癒合していた胎生 15 日にマウス胎仔を摘出し、実体顕微鏡下に前方の口蓋の癒合および後方の口蓋の離開

を認めた胎仔を使用した。TCDD 投与群は対照群に比べ口蓋形成期のステージが約 1 日遅れることから、対照群は胎生 14 日のマウス胎仔を使用した。

2) 組織固定および切片作製

摘出した胎仔頭部を 4%パラホルムアルデヒド (PFA) 0.1M リン酸緩衝液 (PBS) 溶液 (pH7.4) を用いて、24 時間浸漬固定を行った。上昇エタノール系列及びキシレンによる脱水・脱脂処理後、パラフィン包埋した。回転式マイクロトームを用いて、厚さ 6 μm の胎仔頭部前頭断切片を作製した。

3) 組織学的観察

胎仔口蓋部前頭断切片を用いて Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色を行い、口蓋形成期の口蓋を前方から後方にかけて観察し、対照群と TCDD 投与群との比較を行った。

4) 免疫組織学的観察

(1) 蛍光免疫組織染色による上皮組織、上皮細胞間接着因子および基底膜組織の観察

免疫組織染色は、胎仔口蓋部前頭断切片を脱パラフィン後、抗原賦活化処理、ブロッキングを行い、一次抗体を各々の希釈条件下で、室温で 1 時間振盪し、さらに 4°C で一晩反応させた。一次抗体は、マウスモノクローナル抗 cytokeratin 抗体 (1:200, #ab7753, Abcam, UK)、ウサギモノクローナル抗 vimentin 抗体 (1:2000, #ab92547, Abcam, UK)、ウサギポリクローナル抗 laminin 抗体 (1:500, #L9393, Sigma, St. Louis, MO, USA) を使用した。翌日、一次抗体に対応した標識ポリマーを室温で 30 分反応させ、ペルオキシダーゼ染色キット (Nova RED Substrate Kit, #SK-4800, Vector, USA) を用いて、室温で 5-10 分反応させて染色した。水洗後、脱水を行い、封入し、口蓋形成期における口蓋の癒合から離開にかけてのステージにおける細胞の局在および基底膜動態を観察した H-E 染色、免疫組織染色を行ったすべての組織切片は、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X710, Keyence、大阪) を使用して検鏡、撮影を行った。

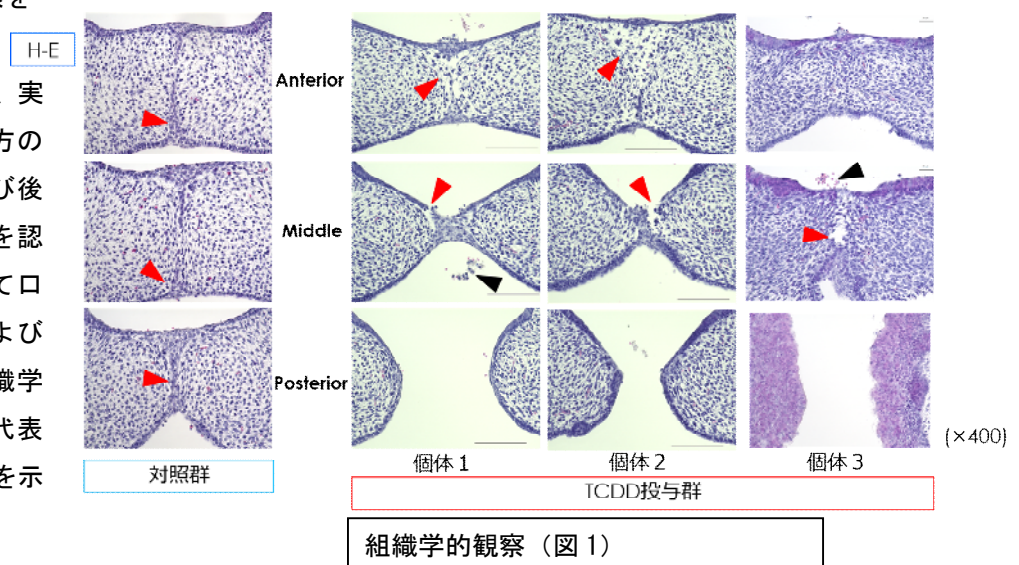
4. 研究成果

1) 組織学的観察 (図 1)

対照群において H-E 染色を行ったところ、口蓋は前方から後方まで癒合しており、口蓋棚の正中部には上皮索を

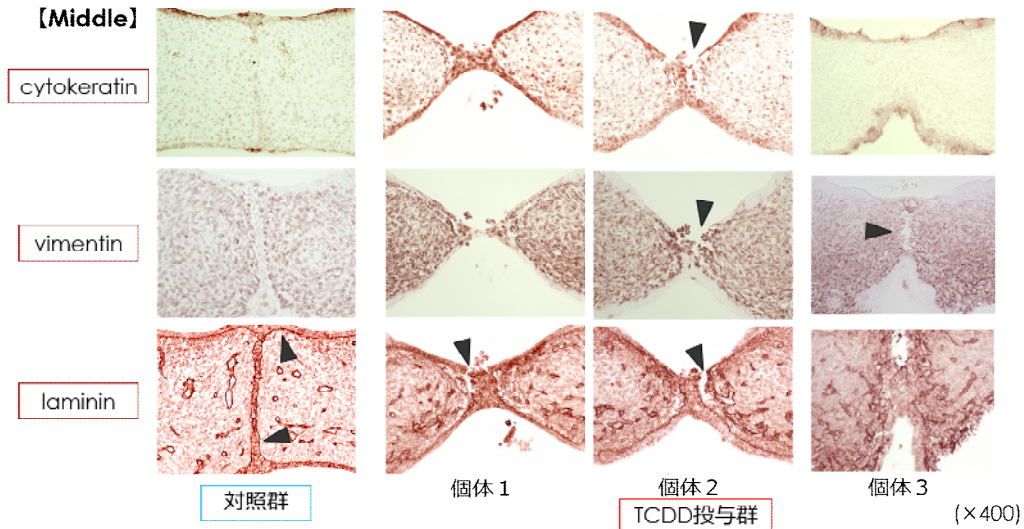
認めた (図 1)。

TCDD 投与群は、実
体顕微鏡下に前方の
口蓋の癒合および後
方の口蓋の離開を認
めた胎仔において口
蓋前方の癒合および
後方の離開が組織学
的に確認され、代表
的な H-E 染色像を示
した。



対照群では、前方の口蓋癒合部において口蓋棚全体に細胞を認めたが、TCDD 投与群では鼻腔側粘膜下の細胞密度が疎になっていた。また、口蓋後方部において、口腔側からの口蓋の離開を認めた。

2) 上皮および上皮細胞間接着因子、基底膜の観察 (図 2)



TCDD 投与群の

図 2 上皮および上皮細胞間接着因子、基底膜の観察

口蓋棚狭窄部では、上皮の断裂、および正中部の間葉組織の、細胞の欠損を認めた。

対照群では基底膜の連続性は保たれていたが、TCDD 投与群では、口蓋棚狭窄部において、基底膜の断裂を認めた。

したがって、TCDD 投与マウスの口蓋癒合部において、細胞が疎になっている部分を認め、また、口蓋棚狭窄部において細胞の脱落や細胞の欠損を認めたことから、細胞間接着の低下やアポトーシスによる組織強度の不足が、癒合した口蓋が離開する要因となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1) Duy L. Tran, Imura H., Mori A, Suzuki S, Niimi T, Ono M, Sakuma C, Nakahara S, Tham T.H. Nguyen, Phoung T. Pham, Viet Hoang, Van T. T. Tran, Minh D. Nguyen, Natsume N : Association of MEOX2 polymorphism with nonsyndromic cleft palate only in a Vietnamese population. *Conjunit Anom* 58(4): 124-129, 2018.
- 2) Sakuma C, Imura H., Yamada T, Sugahara T, Hirata A, Ikeda Y, Natsume N.: Cleft palate formation after palatal fusion occurs due to the rupture of epithelial basement membranes. *J Craniomaxillofac Surg.* 2018 Dec;46(12):2027-2031.

[学会発表] (計 6 件)

- 1) 佐久間千里, 井村英人, 山田朋弘, 池田やよい, 菅原利夫, 夏目長門: 口唇口蓋裂に関する実験的研究 (第 128 報) 口蓋突起癒合後の離解による口蓋裂発生について. *日本口蓋裂学会雑誌* 42(2): 163, 2017.
- 2) 森 明弘, 井村英人, 鈴木 聡, 大野磨弥, 古川博雄, 新美照幸, 佐久間千里, 伊東雅哲, 南克浩, 早川統子, 夏目長門: 非症候性口蓋裂患者における MEOX2 遺伝子多型解析. *日本口蓋裂学会雑誌* 42(2): 165, 2017.
- 3) Sakuma C, Imura H., Yamada T, Ikeda Y, Sugahara T, Natsume N: Experimental study of cleft lip and/ or palate (No. 129): A morphological study of cleft palate mice after palatal fusion. *Congenital Anomalies* 57(5): A9, 2017.

4) 森 明弘, 井村英人, 鈴木 聡, 吉田磨弥, 古川博雄, 新美照幸, 佐久間千里, 伊東雅哲, 南 克浩, 秋山泰範, 早川統子, 夏目長門: 日本人非症候性口唇口蓋裂における BMP4 遺伝子の一塩基多型 (rs4444235) 遺伝子多型解析. 日本口蓋裂学会雑誌 43(2): 185, 2017.

5) 森 明弘, 井村英人, 鈴木 聡, 大野磨弥, 佐久間千里, 伊東雅哲, 古川博雄, 新美照幸, 南克浩, 夏目長門: 非症候性口唇口蓋裂患者における MEOX2 遺伝子多型解析. 第 61 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会 (千葉) 2016.11.25

6) Imura H, Sakuma C, Yamada T, Ikeda Y, Sugahara T, Natsume N: Morphological observation of cleft palate after palatal fusion in mice. 12th World Congress of the International Cleft Lip and Palate Foundation (Leipzig, Germany) 2019.4.19.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 菅原 利夫

ローマ字氏名: Toshio Sugahara

所属研究機関名: 愛知学院大学

部局名: 歯学部口腔先天異常学研究室

職名: 客員教授

研究者番号 (8 桁): 10116048

研究分担者氏名: 鈴木 聡

ローマ字氏名: Satoshi Suzuki

所属研究機関名: 愛知学院大学

部局名: 歯学部口腔先天異常学研究室

職名：非常勤講師
研究者番号（8桁）：30468996

研究分担者氏名：鈴木 聡
ローマ字氏名：Satoshi Suzuki
所属研究機関名：愛知学院大学
部局名：歯学部口腔先天異常学研究室
職名：非常勤講師
研究者番号（8桁）：30468996

研究分担者氏名：平田 あずみ
ローマ字氏名：Azumi Hirata
所属研究機関名：大阪医科大学
部局名：解剖学教室
職名：准教授
研究者番号（8桁）：40263587

研究分担者氏名：南 克浩
ローマ字氏名：Katsuhiko Minami
所属研究機関名：愛知学院大学
部局名：歯学部口腔先天異常学研究室
職名：講師
研究者番号（8桁）：70346162
(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。