

令和元年5月13日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20561

研究課題名(和文)低酸素環境から解析する唇裂の発症機序

研究課題名(英文)Analyzing of lip cleft caused by hypoxic environment

研究代表者

長岡 亮介(NAGAOKA, Ryosuke)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・特任助教

研究者番号：30760805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：口唇口蓋裂はヒトにおいて最も多くみられる体表の先天異常である。原因は遺伝子的要因、環境的要因と多数挙げられており、発症の機序は不明瞭である。一方、低酸素状態は睡眠時無呼吸症候群やニコチン等の薬剤により生じ得る。我々は過去に動物実験モデルにより低酸素環境でのマウス胎子の培養を行うと口唇口蓋裂の類型である唇裂の誘発が明らかとなった。本研究では妊娠マウス自身を低酸素環境に曝露させ、その影響を調べた。結果、胎内のマウス胎子は過去の我々の研究と同様に唇裂が誘発され、母体の低酸素状態が胎仔へ影響す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

口唇口蓋裂はヒトにおいて発症頻度が高い先天異常であり、顎顔面に生じることから治療における物理的な負担もさることながら、本人および近親者の心理的な負担も大きい。本研究は複数ある原因の内、環境的要因としての低酸素状態に着目した。マウスを用いた実験においては妊娠中に低酸素状態に曝露されることでマウス胎子の顎顔面形成に影響することが明らかとなった。発症に関するメカニズムは他にも多数あるが、一つ一つを解明することで予防法や治療法の開発への手がかりとなり、社会的に非常に有意義であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cleft lip and palate are the most common maxillofacial congenital anomalies in humans. The causes are often mentioned as genetic factors and/or environmental factors, and the mechanism of onset is unclear. On the other hand, hypoxic conditions can be caused by sleep apnea and vasoconstrictor drugs such as nicotine. We previously revealed that mouse embryos' lip formation were inhibited by whole embryo culture system with hypoxic condition. The inhibition induced cleft lip, one of the type of cleft lip and palate. In this our new study, pregnant mice were exposed to hypoxic environment and the effects were examined. By the examination, it was suggested that cleft lip was induced by maternal hypoxia.

研究分野：外科系歯学

キーワード：唇裂 口唇口蓋裂 マウス 動物実験 低酸素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

唇顎口蓋裂(以下、CLP)はヒトにおいて最も高頻度で見られる先天異常で、唇裂はCLPの類型の一つである。複数の顔面突起の癒合不全により生じるとされ、特に日本人を含めるモンゴロイドは他の人種と比較し有意に発生率が高い。癒合不全の原因は遺伝子的要因、環境的要因ともに多数挙げられているが未だ全容は不明である。

CLPは顔面部に生じるため、罹患者、その家族ともに心理的な負担も大きい先天異常であるため、原因解明および予防法、治療法を確率できることは社会的にも非常に有意義であると考えられるが、原因は多岐にわたるため、環境的要因からのアプローチを行う計画とした。

2. 研究の目的

CLP、唇裂の発症は環境的要因として胎児期の低酸素状態の曝露が影響するとされている。マウスを用いた動物実験では血管収縮作用のある薬剤投与により唇裂が発症されることは既報で示唆されていた。

本研究計画では環境的要因としての低酸素状態で妊娠マウスを飼育することにより、唇裂の原因探索を目的とした。

3. 研究の方法

野生型マウス(C57BL/6N)の胎子を用いた動物実験では、胎齢10.5日のマウス胎子を摘出し、全胚培養法にて通常で培養する対照群と、供給酸素量を減量する低酸素群で比較を行った。全身の発育評価として体節数は双方に有意差はなかった。

全胚培養法での低酸素群では唇裂の発症が有意に多かった。また、全胚培養12時間時点でのマウス胎子に対して *in situ* hybridization 法で mRNA の発現を評価した結果、顔面形成に関わる *Msx1*、*Pax7* の発現が著明に減少を認めた。(図1: Nagaoka R. et al; Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2012より抜粋)

しかしながら、全胚培養法はマウス胎子の摘出をはじめ、非生理的な刺激や侵襲を伴うため、影響を検討すべきと考えられた。

マウス胎子の顔面突起の発達は胎齢9.5日以降に顕著となり、特に顔面突起の癒合は胎齢10.5日以降に生じることより、顔面突起の癒合への影響が観察しやすい胎齢10.5日の妊娠マウスを用いることとした。

妊娠マウス(C57BL/6N,胎齢10.5日)を母獣ごと酸素供給濃度のコントロールが可能な器材(ProOX 110(Biospherix Ltd, USA)および専用チャンバー)で飼育することで、マウス胎子への低酸素曝露の影響を分析した。

実験条件の設定として、通常の酸素濃度(約21%)に対し、酸素濃度7%の環境で妊娠マウスを飼育した場合、マウス胎子が生存できないことは既報で明らかであった。また、酸素濃度8%の場合、マウス胎子は生存し、かつ、心筋の菲薄化が生じることが示されていた(Ream, et al; Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008)。以上より酸素濃度は安全域を付与し9%(窒素バランス)とし、対照群として胎齢が同一の妊娠マウスを通常の状態(Room air)で飼育した(図2)。

実験開始から24時間後(胎齢11.5日)にマウス胎子の摘出を行い、肉眼的な形態および免疫組織化学染色によるタンパク発現量の比較を行った。

4. 研究成果

低酸素環境で飼育した妊娠マウスより摘出されたマウス胎子(胎齢11.5日)は低酸素群で肉眼的な形態異常を生じた(図1: *in vivo* hypoxia)。これは、過去の研究での全胚培養法(図1: *in vitro* hypoxia)の結果とも近似したものと考えられた。加えて、図2で示す免疫組織化学染色においては、本実験の低酸素群では低酸素環境下で安定するHIF1の発現増強、細胞増殖の減少(リン酸化ヒストン)、細胞死の増加(Caspase3)が確認された。これらの反応は、いずれ

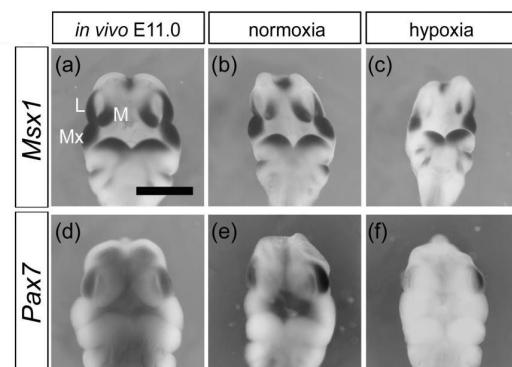


図1: 全胚培養法での mRNA 発現変化

より生理的な状態で低酸素環境に曝露させた

Normoxia : O₂ 21%
Hypoxia : O₂ 9%
上記酸素条件のチャンバー内にて
胎齢9.5日以降の妊娠マウス母獣
飼育を開始



図2: 本研究での飼育条件

も低酸素に関する既報やシグナル伝達と矛盾しないものであった。

ヒトにおいては左側に多く発症部位に左右差が存在するが、マウス胎仔の場合は本法および過去の全胚培養法ともに右側での発症や免疫組織化学染色の変化が大きかった。

同様の飼育方法で妊娠マウスを低酸素環境へ曝露させて胎仔への影響を見た報告は過去に存在するが、顎顔面領域の解析は未だされていない。低酸素環境が及ぼす顎顔面への影響については世界的にも珍しい結果と考えられる。

今後は遺伝子の変異を伴わない表現型の変化であることや、発症に左右差が生じる機序について、エピジェネティクス解析を交えてより詳細な分析を行い、広く発表を行いたいと考えている。

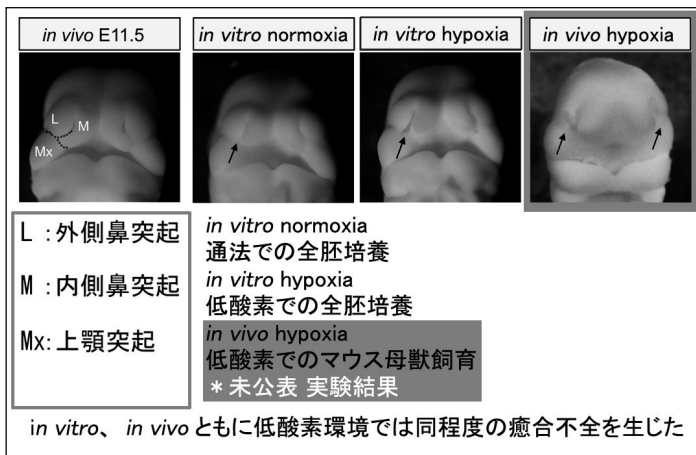


図 1 : 低酸素曝露による顎顔面への影響

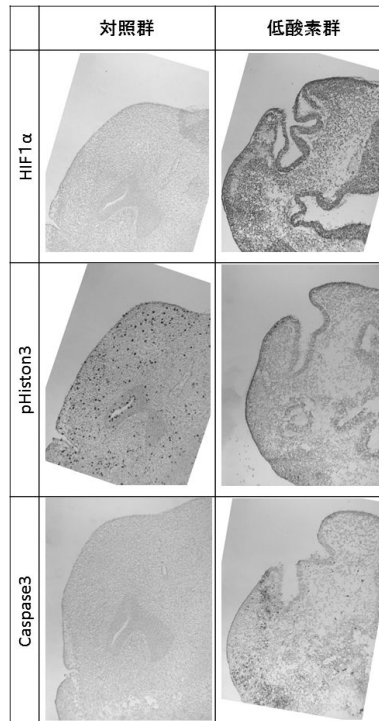


図 2 : 顔面突起における発現変化

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(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。