

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09776

研究課題名(和文)口蓋裂発症過程における遺伝-環境相互作用の解析

研究課題名(英文)Analysis of genetic-environmental interactions during the onset of cleft palate

研究代表者

笹栗 正明 (Sasaguri, Masaaki)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：00225898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：研究目的は遺伝子環境相互作用と口蓋裂発生の関連を明らかにすることである。方法：遺伝的要因はMsx1変異(Msx1+/-)、環境要因は胎仔低酸素環境(妊娠中マウスにフェニトイン(PHT)を投与)とした。胎齢13、17日の口蓋を肉眼的、組織学的に検索した。結果：PHT投与で野生型、Msx1+/-ともに口蓋突起の細胞増殖が抑制された。Bmp4発現はMsx1+/-の口蓋突起で減少した。Msx1+/-は通常は口蓋裂を発生しないが、PHT投与により口蓋裂が発生し、野生型より口蓋裂発生率が高かった。結論：低酸素環境下での細胞増殖抑制とMsx1変異の相加的効果による口蓋裂発生の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

本研究結果から、通常の状態ではMsx1遺伝子に変異があったとしても、口蓋裂を発生しないが、胎仔が低酸素環境下におかれた状態にMsx1遺伝子変異が加わると口蓋裂が発生し、野生型より口蓋裂発生率が高いことがわかった。以上のことから、低酸素環境下での細胞増殖抑制とMsx1変異の相加的効果による口蓋裂発生の可能性が示唆された。遺伝子検査が可能となれば、MSX1変異がある場合は、妊娠中は環境リスクへの暴露を避けるように指導することで、口蓋裂発生の危険性を下げることが可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify whether gene-environment interaction can cause cleft palate. Msx1 heterozygosity in mice (Msx1+/-) was selected as a genetic factor. As an environmental factor, hypoxic stress was induced in pregnant mice by administration of the antiepileptic drug phenytoin (PHT) during palatal development from embryonic day (E) 11 to E14. Embryos were dissected at E13 for histological analysis or at E17 for recording of the palate. PHT administration downregulated cell proliferation in palatal processes in both wild-type and Msx1+/- embryos. Bone morphogenetic protein4 (Bmp4) expression was downregulated in the anterior palatal process of Msx1+/- embryos. Although Msx1+/- embryos do not show cleft palate under normal conditions, PHT administration induced a significantly higher incidence of cleft palate in Msx1+/- embryos compared to wild-type. Our data suggest that cleft palate may occur because of the additive effects of Msx1 heterozygosity and hypoxic stress.

研究分野：口腔外科

キーワード：Msx1 低酸素環境 口蓋裂 フェニトイン 遺伝環境相互作用

1. 研究開始当初の背景

口蓋裂は顎顔面の先天異常の中で最も高頻度に起こり、その効果的な予防法の開発の為に口蓋裂発症メカニズムの正確な理解が不可欠であるが、未解明な点が多く残されている。マウスを用いた実験は有効な手段であるものの、ヒトの口蓋裂患者の遺伝子解析によって得られた原因遺伝子についてノックアウトマウスを作成しても胎仔が口蓋裂を呈さない事がある (*Grhl3* 遺伝子: Ting *et al.*, *Nat Med*, 2003 等)。この相違を生じる原因として、マウスは動物実験施設の極めて安定した環境で飼育されているが、実際のヒトは妊娠中に様々な環境因子に曝露されており、遺伝 - 環境相互作用が影響して先天異常を生じる可能性が考えられる。そこで遺伝要因と環境要因を組み合わせる新規実験系を開発する事で、「遺伝子変異が環境因子の催奇形性作用を増強する」という仮説を検証できると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では環境要因による催奇形性作用を遺伝要因が増強させるという仮説のもと、環境要因としてフェニトイン薬物投与による胎生期の低酸素ストレスを用い、遺伝要因としてヒトの口蓋裂の原因遺伝子として知られている *Msx1* 変異マウスを組み合わせ、口蓋裂発症過程における遺伝 - 環境相互作用について組織学的・分子生物学的に詳細な解析を行う。

3. 研究の方法

(1) *Msx1* 遺伝子の変異マウス作製

Msx1 遺伝子の2つのエクソン領域のうち、エクソン2をノックダウンさせ、*LacZ* 遺伝子を組み込み、*Msx1* 遺伝子変異マウスを作製する。

(2) 正常口蓋突起の発生の観察

野生型胎仔マウスの正常口蓋突起の発生について観察し、*Msx1* 発現部位を *in situ* hybridization 法により観察する。*Msx1* ヘテロでは、X-gal 染色を行い、欠損遺伝子内に組み込まれている *LacZ* 遺伝子の検出を行う。*Msx1* ヘテロの *Msx1* および *Bmp4* の発現の違いについて *in situ* hybridization 法を用いて観察する。

(3) 低酸素負荷実験

Msx1 ヘテロマウスでは通常口蓋裂は発症しない。*Msx1* ヘテロ雄マウスと交配させた野生型妊娠マウスに以下2通りの方法で低酸素負荷を与え、胎齢17日目の胎仔における口蓋裂発症の有無について観察する。

妊娠マウスへのフェニトイン(PHT)投与群: 妊娠マウスへPHT(腹腔内投与、70mg/kg、1回/日)を投与する。PHT投与時期は、口蓋形成期の胎齢11-12日、胎齢12-13日、胎齢13-14日の3群とする。

低酸素チェンバーでの妊娠マウス飼育群: 胎齢11~15日の間、低酸素チェンバー(酸素濃度調節機能付き飼育装置)内で、10%低酸素環境下で妊娠マウスを飼育する。

(4) 低酸素環境下での *Msx1* 変異マウスの口蓋突起組織における低酸素状態の検討

胎齢13日の妊娠マウスより胎仔を摘出し、野生型、*Msx1* ヘテロ、*Msx1* ホモ胎仔マウスの口蓋突起切片にて低酸素マーカーの免疫化学染色を行い、低酸素負荷に対する組織内変化を観察する。

低酸素マーカー: HP(Hypoxyprobe: 低酸素負荷マーカー)、VEGF(Vascular endothelial

factor、血管内皮細胞増殖因子) HIF1 (Hypoxiainducible factor 1、低酸素誘導因子)

(5) 低酸素環境下での *Msx1* 変異マウスの口蓋突起組織における細胞増殖能の検討
胎齢 13 日の妊娠マウスより胎仔を摘出し、野生型、*Msx1* ヘテロ、*Msx1* ホモ胎仔マウスの口蓋突起切片を用いて BrdU 染色により細胞増殖能を検討する。胎仔摘出の 1 時間前に、BrdU を腹腔内投与する。口蓋突起の間葉組織と上皮組織のそれぞれにおける BrdU 強陽性細胞をカウントする。

4. 研究成果

(1) *Msx1* 遺伝子の変異マウス作製

Msx1 遺伝子の 2 つのエクソン領域のうち、エクソン 2 をノックダウンさせ、*LacZ* 遺伝子を組み込み、*Msx1* 遺伝子変異マウスを作製した。

(2) 正常口蓋突起の発生の観察

胎齢 12 日に左右の上顎突起より口蓋突起が発生、胎齢 13 日には両側口蓋突起は舌の側方で内下方への伸長を認めた。胎齢 15 日には両側口蓋突起は水平位へ挙上し、中央へ向かって伸長、胎齢 17 日には一次口蓋、二次口蓋の形成を認めた。

Msx1 の発現：胎齢 12,13 日野生型胎仔マウスの頭部前頭断におけるセクション in situ 法では *Msx1* は口蓋突起の間葉組織で強く発現していた。一方、上皮組織では *Msx1* の発現をほとんど確認できなかった。マウス胚における口蓋の形態および *Msx1* 発現パターンの結果より、本実験では免疫組織化学的分析は胎齢 13 日で行うこととした。

Msx1 ヘテロ胎仔では、野生型胎仔と比較し、*Msx1* の発現強度が減弱していた。

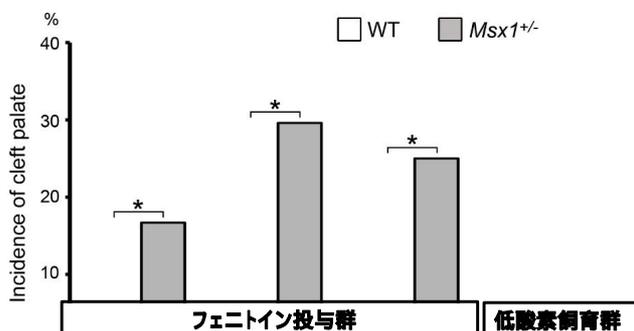
Bmp4 の発現：*Msx1* 発現部位である口蓋突起前方部では *Msx1* ヘテロで Bmp4 の発現が減弱していた。免疫染色結果より、口蓋突起前方部で *Msx1* 発現と Bmp4 発現の関連性が示唆された。

(3) 低酸素環境下での口蓋裂マウスの発生

妊娠マウスへのフェニトイン(PHT)投与群：胎齢 11-12 投与でヘテロ胎仔 24 匹中 4 匹に、12-13 投与で 27 匹中 8 匹に、13-14 投与で 24 匹中 6 匹に口蓋裂マウスを認めた。

低酸素チェンバーでの妊娠マウスの飼育群：10%酸素濃度飼育群では、口蓋裂マウスの発生はなかった。

Figure 1
The incidence rate of phenyl-induced cleft palate in cleft palate mice



(4) 低酸素環境下での *Msx1* 変異マウスの口蓋突起組織における低酸素状態の検討

低酸素マーカーである HP、VEGF、HIF1 に対して組織切片の免疫組織化学染色を行い、

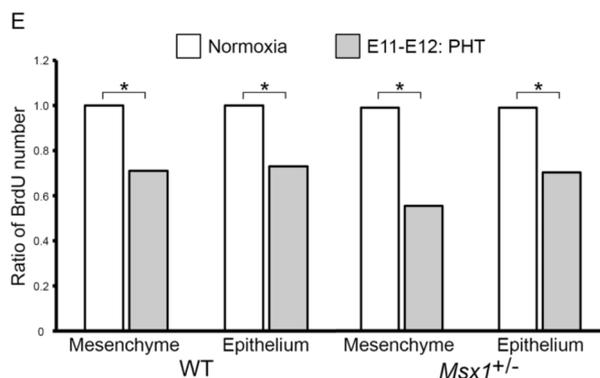
胎齡 13 日野生型および *Msx1* ヘテロ胎仔、*Msx1* ホモ胎仔口蓋突起の低酸素負荷に対する組織内変化について検証を行った。野生型群、*Msx1* ヘテロ群では各抗体での染色強度に、各群間で明らかな違いが認められなかった。*Msx1* ホモマウス群ではフェニトイン(PHT)投与を行った低酸素環境下のマウスの口蓋突起先端で、Hypoxyprobe(HP)の強発現を認めた。フェニトイン(PHT)投与によって口蓋突起末端が低酸素環境となり、またその差がホモの場合、*Msx1* 変異による影響が顕著に表れたと考えられた。

(5) 低酸素環境下での *Msx1* 変異マウスの口蓋突起組織における細胞増殖能の検討

野生型群、*Msx1* ヘテロ群、*Msx1* ホモ群それぞれ胎齡 13 日の BrdU 染色結果。

フェニトイン(PHT)投与群では、野生型群、*Msx1* ヘテロ群、*Msx1* ホモ群すべての群において、対照群と比較して間葉組織、上皮組織ともに BrdU 陽性細胞が減少していた。

以上の結果より遺伝子型に関わらず、フェニトイン投与により、胎仔が低酸素環境下に置かれた場合、細胞増殖が抑制されることが示された。



(6) まとめ

Msx1 ヘテロ胎仔では *Msx1* 遺伝子の発現が減弱しており、またその関連遺伝子である *Bmp4* の発現が減弱していることが示唆された。

Msx1、*Bmp4* ともに口蓋突起の発生初期で不可欠な遺伝子であり、*Msx1* ヘテロ胎仔ではこの遺伝子間でのネットワークにエラーがあると考えられた。

フェニトイン投与による低酸素負荷の結果、*Msx1* ホモ口蓋突起の先端では Hypoxyprobe (HP) の強発現が認められたこと、また BrdU 強陽性細胞数の減弱が認め胎仔マウス口蓋突起で細胞増殖の抑制が示された。

低酸素環境と *Msx1* 遺伝子変異の相加的な効果によって、通常低酸素環境下のみでは口蓋裂を発症しないヘテロ胎仔マウスでも口蓋裂を発症したと考えられる。

Msx1 ヘテロ胎仔では *Msx1* 変異ならびに下流遺伝子である *Bmp4* 発現の低下が認められたが *Msx1* ヘテロ胎仔に口蓋裂の発症は認めなかった。しかし、妊娠マウスへのフェニトイン投与で胎仔を低酸素環境下におくことによって細胞増殖が抑制され、*Msx1* ヘテロ胎仔でも口蓋裂発症のしきい値を超え、口蓋裂を発症したと考えられた。

口蓋形成に関与する遺伝子の変異を有すると、低酸素ストレスなどの環境リスク因子に対して耐性能力が低下し、口蓋裂の発症する可能性が示唆された。

遺伝-環境相互作用による多因子しきい説を実証できたと考えられた。

<引用文献>

Alappat S, Zhang ZY, Chen YP. *Msx* homeobox gene family and craniofacial development. *Cell Res.* 2003;13(6):429-442.

- Ducsay CA, Goyal R, Pearce WJ, Wilson S, Hu XQ, Zhang L. Gestational hypoxia and developmental plasticity. *Physiol Rev.* 2018; 98(3):1241-1334.
- Fajersztajn L, Veras MM. Hypoxia: from placental development to fetal programming. *Birth Defects Res.* 2017;109(17):1377-1385.
- Nakatomi M, Ida-Yonemochi H, Nakatomi C, Saito K, Kenmotsu S, Maas RL, Ohshima H. Msx2 prevents stratified squamous epithelium formation in the enamel organ. *J Dent Res.* 2018;97(12): 1355-1364.
- Nakatomi M, Ludwig KU, Knapp M, Kist R, Lisgo S, Ohshima H, Mangold E, Peters H. Msx1 deficiency interacts with hypoxia and induces a morphogenetic regulation during mouse lip development. *Development.* 2020;147(21):dev189175.
- Satokata I, Maas R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet.* 1994;6(4):348-356.
- Smith TM, Lozanoff S, Iyyanar PP, Nazarali AJ. Molecular signaling along the anterior-posterior axis of early palate development. *Front Physiol.* 2013;3(488):488.
- van den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA, van Amstel HK. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nat Genet.* 2000;24:342
- Webster WS, Abela D. The effect of hypoxia in development. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2007;81(3):215-228.
- Zhang Z, Song Y, Zhao X, Zhang X, Fermin C, Chen Y. Rescue of cleft palate in Msx1-deficient mice by transgenic Bmp4 reveals a network of BMP and Shh signaling in the regulations of mammalian palatogenesis. *Development.* 2002;129(17):4135-4146.

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 Jinsil Park, Mitsushiro Nakatomi, Masaaki Sasaguri, Manabu Habu, Osamu Takahashi, Daigo Yoshida, Kae Matsuyama, Shinji Kattoka, Takeshi Toyono, Yuji Seta, Keiko Peter, Kazuhiro Tomonaga	4. 巻 58(6)
2. 論文標題 Msx1 Heterozygosity in Mice Enhances Susceptibility to Phenytoin-induced Hypoxic Stress Causing Cleft Palate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Cleft Palate-Craniofacial Journal	6. 最初と最後の頁 697-706
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/055665620962690	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 朴真実、笹栗正明、中富満城、吉賀大午、富永和宏
2. 発表標題 Msx1遺伝子変異と低酸素負荷の複合作用による口蓋裂発症機構の解析
3. 学会等名 日本口腔科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 朴真実、中富満城、笹栗正明、吉賀大午、富永和宏
2. 発表標題 Msx1遺伝子変異と低酸素負荷の複合作用による口蓋裂発症機構の解析
3. 学会等名 九州歯科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 朴真実、笹栗正明、中富満城、吉賀大午、富永和宏
2. 発表標題 Msx1遺伝子変異と低酸素負荷の複合作用による口蓋裂発症機構の解析
3. 学会等名 日本口腔科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 朴真実、中富満城、笹栗正明、吉賀大午、富永和宏
2. 発表標題 Msx1遺伝子変異と低酸素負荷の複合作用による口蓋裂発症機構の解析
3. 学会等名 九州歯科学会
4. 発表年 2018年

〔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	吉賀 大午 (Yoshiga Daigo) (10507784)	九州歯科大学・歯学部・准教授 (27102)	
研究 分担者	中富 満城 (Nakatomi Mitsushiro) (10571771)	九州歯科大学・歯学部・講師 (27102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------