

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09794

研究課題名(和文) MAPK経路を介した口蓋裂発症機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the palatal formation system via MAPK pathway

研究代表者

松村 香織 (Matsumura, Kaori)

九州大学・歯学研究院・共同研究員

研究者番号：20615794

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)：口蓋裂の疾患感受性遺伝子を同定するために、本研究では癒合課程の口蓋組織を用いてマウスの口蓋組織形成時における遺伝子発現の変化に着目した。口蓋形成時期前後の硬口蓋および軟口蓋組織を取り出し、遺伝子発現をDNAマイクロアレイを用いて解析した。口蓋形成には多くの遺伝子が関与しており、さらに硬口蓋と軟口蓋では遺伝子発現パターンが異なっていた。このことから、裂型によりそれぞれ異なるメカニズムで発症していることが改めて考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口唇裂・口蓋裂はヒトの先天奇形の中で最も頻度の高い疾患のひとつであり、日本人では新生児約500人に1人の確率で発生する。現在の治療の主体は外科的治療であり、未だに根本的解決法が存在しない。その原因の一つとして口蓋裂発生時の分子メカニズムが解明されていないことがあげられる。従来の口蓋裂発症機序に関する研究は癒合期の口蓋上皮に着目したものが大半であり、口蓋間葉に着目した研究は少ない。本研究では口蓋突起挙上障害に関連する遺伝子群の同定を行い、将来的な疾患感受性遺伝子の同定につながる成果を得た。

研究成果の概要(英文)：We examined about gene expression pattern on palate elevation to identify the susceptiblily genes of cleft palate. Palate tissues during development period were taken out and genetic manifestation was analyzed using DNA microarray. Many genes participated in the palate development, and moreover the genetic manifested pattern was different in hard palate and soft palate. It was considered to develop the symptoms by different mechanisms inch pattern of cleft.

研究分野：外科系歯学

キーワード：口唇口蓋裂 疾患感受性遺伝子 MAPK

## 1. 研究開始当初の背景

口唇裂・口蓋裂は口唇、歯槽部、口蓋などの口腔顎顔面領域に裂を生じる先天異常である。ヒトの先天奇形の中で最も頻度の高い疾患のひとつであり、日本人では新生児約 500 人に 1 人の確率で発生する。口唇裂治療は乳児期の口唇形成術で終了するのに対し、口蓋裂治療は幼児期の口蓋形成術より学童期の言語治療および矯正治療まで一貫した長期にわたる治療が必要である。現在の治療の主体は外科的治療であり、未だに根本的解決法が存在しない。その原因の一つとして口蓋裂発生時の分子メカニズムが解明されていないことがあげられる。発症要因に関しては遺伝的要因と環境的要因からなる多因子閾説が有力である。環境的要因としてはこれまでに胎生期の葉酸不足や母親の年齢が指摘されているが、ヒト口蓋裂の遺伝的要因に関しては現在も発症の直接的要因となる因子については明らかになっていないのが現状である。胎生期の口蓋は左右の上顎突起より発生した口蓋突起が舌側方で伸長した後に舌の上方へ挙上し、水平転移、接合を経て癒合することで完成する。この口蓋発生段階のいずれかで障害が起こり、癒合が不完全となることで口蓋裂を発症する。

従来口蓋裂発症機序に関する研究は癒合期の口蓋上皮に着目したものが大半であり、口蓋間葉に着目した研究は少ない。しかしながら、口蓋裂患者の口蓋は短く、口蓋突起形成不全や挙上障害といった口蓋間葉における異常も深く関与しているのではないかと考えられる。我々はこれまでの研究で、FGF シグナリングを介した MAPK 経路の負の制御因子である Sprouty2 に着目し、Sprouty2 遺伝子欠損マウスにおいて口蓋突起挙上障害により口蓋裂が発生することを発見した。しかしながら Sprouty2 遺伝子欠損マウスの口蓋裂発症頻度は低く、口蓋突起挙上への関与は間接的なものと考えられ、口蓋突起挙上の分子メカニズムの解明はいまだ不十分である。

## 2. 研究の目的

これまでの研究成果より口蓋突起挙上障害が口蓋裂発症への関与することが強く疑われるが、これまでの口蓋裂研究においては口蓋突起癒合時期の口蓋上皮に着目した研究がほとんどであり、口蓋突起挙上のメカニズムに関しては解明されていない。

本研究では口蓋突起挙上前後の間葉組織における網羅的遺伝子発現解析を行い、口蓋突起挙上のメカニズムの解明を目指す。また、口蓋突起挙上時期の口蓋間葉での細胞内シグナル伝達における Sprouty2 の役割についても明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 口蓋突起挙上に関わる遺伝子のスクリーニング

口蓋突起癒合前 (E13.5) の Sprouty2 KO マウスおよび対照として C57BL/6J マウスの口蓋突起より Laser Capture Microdissection (LCM) 法を行い口蓋突起の間葉組織を選択的に採取し total RNA を抽出する。二本鎖 cDNA の合成を行い、ハイブリダイゼーション後データスキャンを行う。Sprouty2 KO マウスのマイクロアレイのデータ解析を行い、口蓋突起挙上前後の遺伝子発現変化の大きい遺伝子に関してデータベースを作成する。

### 標的遺伝子の同定

口蓋突起挙上時期に特異的に発現する遺伝子のうち、口蓋突起挙上前後 (E13.5~E14.5) で発現量の変動が大きく、さらに Sprouty2 KO マウスと野生型マウス間で発現量に大きな差がある遺伝子を標的遺伝子として設定する。Sprouty2 KO マウスにおける口蓋間葉細胞増殖異常は FGF シグナルを介することが過去の研究から明らかになっており、FGF シグナル関連分子にターゲットを絞っていく。マイクロアレイで得られたデータを網羅的に解析するため IPA などのソフトウェアを用いて bioinformatics 解析を行う。

### 口蓋間葉細胞内シグナル伝達における Sprouty2 の関与

口蓋突起挙上直前 (E13.5) のマウス口蓋を採取し、間葉細胞の初代培養を行う。Sprouty2 siRNA 導入群、control 群において細胞内シグナル伝達 (特に MAPK) について、western blotting 法や RT-PCR 法を用いて解析する。

## 4. 研究成果

### 口蓋突起挙上時期の網羅的遺伝子発現解析

マウスの挙上前および挙上後の口蓋組織 (硬口蓋および軟口蓋組織) より RNA を採取し、DNA マイクロアレイを行った。39429 遺伝子の発現を認め、カットオフ値を Z-score -2 以下、2 以上とし、2866 遺伝子を抽出した。口蓋突起挙上直前に発現が増強する遺伝子として硬口蓋では forkhead box N4 (Foxn4)、軟口蓋では keratin 20 などが検出された。クラスタリング施行後、口蓋突起挙上前後で発現増加した遺伝子群の Gene ontology (GO) 解析を行ったところ、軟口蓋では Cell adhesion、Regulation of cell proliferation 等の動きを持つ遺伝子群が発現減少し

ているが、硬口蓋では逆に発現増加しており口蓋突起挙上時期において硬口蓋および軟口蓋で遺伝子発現パターンは異なっていることが判明した。また、口蓋裂患者では高率に心臓や耳の奇形を合併するが、GO 解析にて口蓋突起挙上直前に心臓や耳の形成に関与する遺伝子群の発現上昇を認めた。

#### 口蓋突起挙上時期の口蓋間葉での細胞内シグナル伝達解析

口蓋由来間葉細胞において、FGF シグナルを介した MAPK(pERK1/2)は siRNA Sprouty2 群にて増強されるが、EGF 刺激下においては変化しないことを発見した。この知見は口蓋形成期の間葉細胞において、Sprouty2 が FGF シグナリングを特異的に抑制し、MAPK の調整を行っている可能性が示唆される。マイクロアレイによる解析においても FGF シグナリングが口蓋癒合時に特徴的に働いているという知見を得た。

今後他の遺伝子群も含めて、遺伝子改変マウスの解析も検討しながら、口蓋突起挙上への関与とそのメカニズムについて解析を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 松村香織	4. 巻 37
2. 論文標題 超高齢社会において急性期病院歯科口腔外科に求められる歯科診療について	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本老年歯科医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 234-238
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinsaku Arai, Ami Funada, Sachiyo Hasegawa, Kaori Matsumura, Takeshi Mitsuyasu, Masaaki Sasaguri, Nobuhiro Sato, Toshiro Umezaki, Seiji Nakamura	4. 巻 33
2. 論文標題 A case of bilateral cleft lip and palate requiring long-term cannulation: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 302-306
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajoms.2020.12.006	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 -

1. 著者名 Kubota K, Arai S, Mitsuyasu T, Matsumura K, Saijo H, Hoshi K, Nakamura S	4. 巻 32
2. 論文標題 Prader-Willi syndrome with a cleft palate: A case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 200-204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajoms.2019.11.006	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 -

〔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	中村 誠司  (Nakamura Seiji)  (60189040)	九州大学・歯学研究院・教授    (17102)	

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
---------	---------