

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2007~2008

課題番号： 19590181

研究課題名 (和文) 口蓋裂における CYP26B1 (レチノイン酸不活化酵素) の役割

研究課題名 (英文) Role of CYP26B1, a retinoic acid inactivating enzyme, in cleft palate formation

研究代表者 坂井 靖夫 (SAKAI YASUO)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号： 50272315

研究成果の概要：口唇口蓋裂は、約500人に1人の割合で生じる、最も頻度の高い先天異常の1つである。従来からレチノイン酸と口蓋形成の関連が指摘されてきたが、Cyp26b1 (レチノイン酸不活化酵素) ノックアウト (KO) マウスには、100%の割合で口蓋裂と舌の形成異常が生じる。本研究の目的は、口蓋裂発生におけるレチノイン酸の役割をCyp26b1-KOマウスを用いて解析することである。本研究は、京大大学生体構造医学講座・塩田浩平教授および岡野純子研究員との共同研究として行った。

まずCyp26b1-KOにみられる舌形態異常は、レチノイン酸濃度上昇により、DiGeorge症候群の原因遺伝子であるTbx1の発現が抑制され惹起されることが判明した。更にKOマウスの舌筋群では、Tbx1の標的遺伝子であるMyoD、Myf5の発現が消失していた。結果的に舌筋の走行が乱れて上方変位しており、舌形態異常が口蓋裂誘発の外的要因である可能性を示唆した。正常な口蓋発生では、口蓋突起が水平挙上、伸長して中央部で癒合する。KOマウスの口蓋突起は、水平挙上が不完全であった。Cyp26b1は口蓋の挙上に先立ち、挙上の支点となる部位 (bend region) に発現している。この部位でのCyp26b1の発現が消失すると同時にFgf10が発現する。Fgf10-KOマウスでは、同じく口蓋裂があり、口蓋の水平挙上が妨げられている。Cyp26b1-KOでは、bend regionのFgf10の発現が抑制されており、レチノイン酸がFgf10の発現制御に重要な役割を果たしていると思われる。更に口蓋突起の上皮にはTbx1も発現しており、舌と同様にその発現が抑制されている。Fgf10の変化が、レチノイン酸による直接的なものか、Tbx1を介した間接的なものかを現在探索している。

また、岡野らが行った RA 投与実験 (胎生 11.5 日の母体に 100mg/kg のレチノイン酸投与) でも、口蓋裂と舌形態異常が見られた。これらの表現型は Cyp26b1-KO マウスのものと同様であり、CYP26B1 は内在性のレチノイン酸濃度の制御に必須であると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,400,000	420,000	1,820,000

研究分野：解剖学一般（含組織学・発生学）

科研費の分科・細目：発生

キーワード：口蓋裂、レチノイン酸、CYP26、遺伝子改変マウス、発生、舌

1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂は、約 500 人に 1 人の割合で生じる、最も頻度の高い先天異常の 1 つである。研究代表者は藤田保健衛生大学・唇顎口蓋裂センターの一員として臨床に従事するとともに口蓋裂の発生原因の探求にも精力を注いでいる。研究代表者が作製した CYP26B1（レチノイン酸不活化酵素）ノックアウト (KO) マウスには、100%の割合で口蓋裂が認められる。従来からレチノイン酸と口蓋形成の関連が指摘されてきたが、初めて内在性のレチノイン酸濃度を局所的に変化させたモデルが得られた。

2. 研究の目的

本研究は、口蓋裂発生におけるレチノイン酸の影響を探索することである。人の正常な口蓋は、胎生 8 週から 12 週にかけて、左右の口蓋突起が隆起して癒合することにより形成される。その過程で何らかの原因により癒合不全が生じると、口蓋裂が引き起こされる。従来から口蓋形成に関する研究は、ラットやマウスなどのげっ歯類を用いて行われているが、発生原因に関するメカニズムに関してはまだ不明な点が多い。

マウスにおいては、胎生 11.5 日より口蓋突起の隆起が始まり、14.5 日に突起が癒合する。口蓋の癒合不全は、1) 小顎または巨舌などで口蓋の伸長に十分な空間が欠如するため、2) 口蓋の伸長やその方向を制御する物質が不適切であるため、3) 2 つの混合的問題、にて生じる。げっ歯類はヒトと同じく哺乳類であり、発生のサイクルが比較的早いことから口蓋裂発生機序の研究には最適のモデル動物と言える。

3. 研究の方法

CYP26B1 KO 胚とともに、胎生 11.5 日の母体にレチノイン酸 (100mg/kg) を投与して口蓋裂を誘発させた胎仔を比較検討することにより解析を行った。なお本研究は、研究代表者の計画に賛同した、京都大学生体構造医学講座・塩田浩平教授および岡野純子研究員との共同研究として行った。

CYP26B1 KO マウスは出生直後致死であるため、CYP26B1 (+/-) の型で維持し交配によって (-/-) 胎仔を得た。胚の解析は、病理切片や電顕切片による組織学的検査、レチノイン酸

のレポーター遺伝子として、RARE-lacZ（レチノイン酸応答配列 lacZ）遺伝子導入マウスによるレチノイン酸濃度測定、in situ hybridization、免疫組織化学法などを用いて行った。

4. 研究成果

Cyp26b1-KO にみられる舌形態異常は、レチノイン酸濃度上昇により、DiGeorge 症候群の原因遺伝子である Tbx1 の発現が抑制され惹起されることが判明した。更に KO マウスの舌筋群では、Tbx1 の標的遺伝子である MyoD、Myf5 の発現が消失していた。結果的に舌筋の走行が乱れて上方変位しており、舌形態異常が口蓋裂誘発の外的要因である可能性を示唆した。正常な口蓋発生では、口蓋突起が水平挙上、伸長して中央部で癒合する。KO マウスの口蓋突起は、水平挙上が不完全であった。Cyp26b1 は口蓋の挙上に先立ち、挙上の支点となる部位 (bend region) に発現している。この部位での Cyp26b1 の発現が消失すると同時に Fgf10 が発現する。Fgf10-KO マウスでは、同じく口蓋裂があり、口蓋の水平挙上が妨げられている。Cyp26b1-KO では、bend region の Fgf10 の発現が抑制されており、レチノイン酸が Fgf10 の発現制御に重要な役割を果たしていると思われた。更に口蓋突起の上皮には Tbx1 も発現しており、舌と同様にその発現が抑制されている。Fgf10 の変化が、レチノイン酸による直接的なものか、Tbx1 を介した間接的なものを現在探索している。また、岡野らが行った RA 投与実験 (胎生 11.5 日の母体に 100mg/kg のレチノイン酸投与) でも、口蓋裂と舌形態異常が見られた。これらの表現型は Cyp26b1-KO マウスのもと同様であり、CYP26B1 は内在性のレチノイン酸濃度の制御に必須であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Okano J, Sakai Y, Shiota K. (2008) Retinoic acid down-regulates Tbx1 expression and induces abnormal differentiation of tongue muscles in fetal mice. Dev Dyn.

[学会発表] (計 4件)

- ① Okano J, Sakai Y, Shiota K
Retinoic acid causes down-
regulation of Tbx1 expression and
aberrant morphogenesis in the
fetal mouse tongue. Plastic
Surgery 2008 (全米形成外科学会)、
2008年10月31日、Chicago (USA)
- ② 坂井靖夫、岡野純子、塩田浩平、大
杉育子、小池 学、吉村陽子：
CYP26B1 (レチノイン酸不活化酵素)
は正常な舌発生に必須である、第17
回日本形成外科学会基礎学術集会、
2008年10月3日、東京
- ③ 小池 学、大杉育子、吉村陽子、坂
井靖夫：毛包発生におけるCYP26B1
(レチノイン酸不活化酵素) の役割
-第1報-、第17回日本形成外科学
会基礎学術集会、2008年10月2日、
東京
- ④ 岡野純子、坂井靖夫、塩田浩平：
Roles of retinoic acid in tongue
development in mice. 第48回日本
先天異常学会、2008年6月28日、
東京

[図書] (計 1件)

- ① Sakai Y, Drager UC. (2009) Dete
ction of Retinic Acid Catabolis
m with Reporter Systems and by
In Situ Hybridization for CYP26
Enzymes. Methods in Molecular
Biology, Hamana Press Inc. (Tot
owa, NJ, USA), in press

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂井 靖夫 (SAKAI YASUO)
藤田保健衛生大学・医学部・准教授
研究者番号：50272315

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし