

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007-2008 年度

課題番号：19592358

研究課題名 (和文) 口唇口蓋裂自然発症胎児マウスにおける口蓋裂発症機序の解明

研究課題名 (英文) Study on cleft palate morphogenesis in spontaneous cleft lip and palate

研究代表者 佐々木 康成 (SASAKI YASUNORI)

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：70332848

研究成果の概要：

口唇口蓋裂は、成長発育を通しての様々な理解と支援が必要な先天疾患の一つである。その成長機序解明のため、口唇口蓋裂発症動物 (CL/Fr マウス) を用いて、口蓋棚細胞の増殖能を調べたところ、CL/Fr の細胞増殖は低かった。口蓋棚 mRNA 量の比較 (マイクロアレイ解析) を行ったところ、罹患胎児と正常胎児の群間に差がある 243 分子が絞られた。口唇裂に続く口蓋裂の発症への細胞および分子の関わりが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
平成 20 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 ・矯正・小児系歯学

キーワード：口唇口蓋裂,二次口蓋,成長発育,ヒト,モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

口唇裂に続く口蓋裂発症は、遺伝要因と環境要因の関与、すなわち、口蓋の成長そのものにおける障害と、口唇裂の発生に続く 2 次的な要因の組み合わせに基づくことが分かってきた。研究代表者らは、口唇裂発症自然発症マウス CL/Fr の口蓋棚の *in vivo* での細胞増殖が、正常胎児と比較して低下しているこ

とを明らかにした (Sasaki et al., 2004)。

しかしながら、口蓋裂の発症に関与する、*in vitro* での細胞増殖とそれに関わる分子の関与は分かっていない。

2. 研究の目的

(1) CL/Fr 口唇裂自然発症に続く口蓋裂発症に関わる *in vitro* 細胞増殖の関与を明らか

にした。

(2) 次に、その細胞増殖に影響を及ぼす分子の関与を明らかにするため、mRNA についてマイクロアレイ解析を行った。

3. 研究の方法

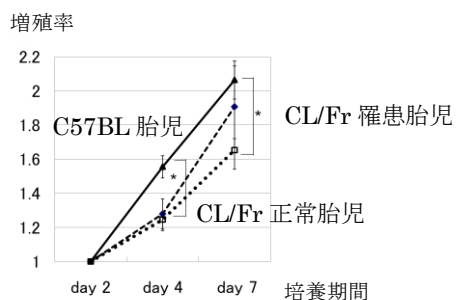
(1) 口蓋棚挙上期 (E13.5) の CL/Fr 自然発症口唇裂胎児 (CL/Fr 罹患胎児)、正常胎児 (CL/Fr 正常胎児) および対象の C57BL 胎児 (C57BL 胎児) の 3 群を準備し、口蓋棚を摘出・間葉細胞を消化・培養し、7 日間における *in vitro* 細胞増殖を群間および左右の口蓋棚の間で比較・検討した。

(2) E13.5 の CL/Fr 罹患胎児および CL/Fr 正常胎児の 2 群の胎児を準備し、口蓋棚から mRNA を抽出し、マイクロアレイ解析を用いて比較した (Biomatrix 社)。

(3) CL/Fr 罹患胎児と CL/Fr 正常胎児との差がある分子について、GO 分類, CytoScape 等により、その分子機能および signaling pathway を解析した。

4. 研究成果

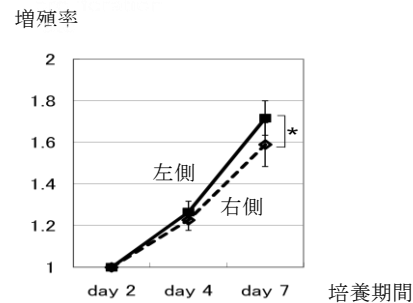
(1) CL/Fr 罹患胎児, CL/Fr 正常胎児および C57BL 胎児の 3 群の口蓋棚間葉細胞の *in vitro* 増殖は、C57BL 胎児と比較して CL/Fr 正常胎児が有意に小さかった。



系統間に違いがあるという点で、過去の *in vivo* 細胞増殖の結果と一致していた。

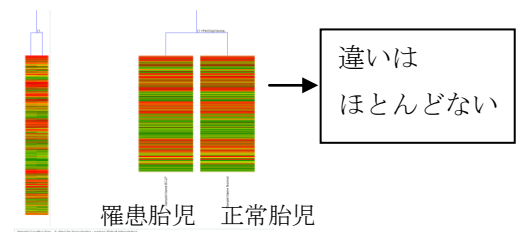
(2) 左右の口蓋棚の間葉細胞の増殖の比較においては、CL/Fr 正常胎児の 7 日培養において、

左側の口蓋棚が右側と比較して有意に高かった。



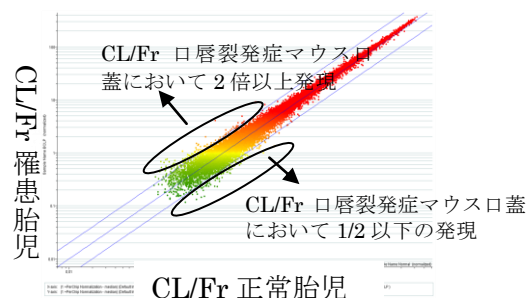
ヒトや動物において、左右の口唇口蓋裂の重症度に違いがあることが分かっているが、本結果は、この左右差が細胞の増殖に基づくことを示唆している。

(3) CL/Fr 罹患胎児と CL/Fr 正常胎児の口蓋棚 mRNA のマイクロアレイ比較解析において、condition tree の比較では、ほとんど違いが見られなかった。



このことは、自然発症の口唇口蓋裂が、だれにでも起こりうるありふれた病気であり、そのメカニズムが閾値説に基づいていることを裏付けているものである。

(4) 上記のわずかな違いを明らかにするために、gene chip で検出された 45,000 以上の gene のうち、CL/Fr 罹患胎児と CL/Fr 正常胎児の差が 2-fold 以上または、0.5-fold 以下のもの (p-Value < 0.5) は、243 分子に絞られた。



これらの分子は, transcription, cell cycle, apoptosis, cell adhesion, metabolic, development and morphogenesis, と関連しているものが含まれた。

このように, *in vitro* 細胞増殖の結果は, 過去の *in vivo* での結果を一部裏付けるように, 細胞増殖が口蓋裂の発生に関与していた。そして, 分子が相互に口蓋棚の成長に働き, 口蓋棚の細胞増殖を抑制し口蓋裂の発生につながっていることが明らかとなり, 口蓋裂の成長メカニズムの解明および診断や治療のための重要な基礎的データが得られた。これらの成果の一部は, 口唇口蓋裂に対する臨床的取り組みとともに, 2008 年度の小児歯科学会の学術賞受賞においても認められて, 論文発表も行われた。さらに成果を論文投稿中である。

今後は, 候補分子から, さらに細胞増殖と関連のある分子を絞りこみ, Real Time PCR により, CL/Fr 罹患胎児と CL/Fr 正常胎児の差を明らかに, その分子の役割を調べることを通して, 口唇裂に続く口蓋裂の発症に関わる分子メカニズムを明らかにする予定である。

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 5 件)

1. Sasaki, Y., Satoh, K., Hayasaki H., Fukumoto S, Fujiwara, T. and Nonaka K., The P561T polymorphism of the *GHR* gene has an inhibitory effect on mandibular growth in young children, *European Journal of Orthodontics*, 2009 (in press) (査読有)
2. 佐々木康成. 口唇口蓋裂発症における口蓋成長についての基礎および臨床学的研究. 日本小児歯科学会雑誌, 46: 505-510, 2008. (査読有)

3. Sasaki, Y. and Fujiwara, T., Presurgical growth guidance with naso-alveolar molding in infants with cleft lip and palate. *Dentistry in Japan*. 43:112-118, 2007. (査読有)

4. Sasaki Y, Kaida C, Saitoh I, Fujiwara T, Nonaka K, Craniofacial growth and functional change in oligodontia with ectodermal dysplasia: a case report. *Journal of Oral Rehabilitation* 34:228-235, 2007. (査読有)

5. Sasaki, Y., O' Kane, S., Dixon, J., Dixon, MJ., Ferguson, MWJ., Temporal and spatial expression of *Pax9* and *Sonic hedgehog* during development of normal mouse palates and cleft palates in *TGF-beta3* null embryos. *Archives of Oral Biology* 52:260-267, 2007. (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

1. 佐々木康成, 釜崎陽子, 日高 聖, 藤原 卓, 合併症を有するダウン症患児における出生後早期の歯科的管理の一症例. 第 26 回日本小児歯科学会九州地方会大会および総会, 宜野湾, 2008 年 11 月 22 日
2. 佐々木康成, 西口美由季, 和田英行, 南幸治, 江頭聡, 太田信知, 中村康司, 田口知義, 角町正勝, 藤原 卓. 長崎県下障害福祉施設における歯科的管理実態調査-協力歯科医や施設種との関連分析および対策研究-. 第 25 回日本障害者歯科学会, 東京, 2008 年 10 月 10 日
3. 日高聖, 佐々木康成, 釜崎陽子, 西口美由季, 藤原卓, 院内連携による生後 8 か月健診を通じた早期からの歯科的管理の取り組み, 第 46 回日本小児歯科学会総会・大会, 大宮, 2008 年 6 月 13 日
4. 佐々木康成, 口唇口蓋裂発症における口蓋成長についての基礎および臨床的研究,

日本小児歯科学会 Lion award 学術賞受賞講演 第46回日本小児歯科学会総会・大会, 大宮, 2008年6月12日

5. 和田英行, 佐々木康成, 南幸治, 江頭聡, 太田信知, 中村康司, 田口知義, 角町正勝, 西口美由季, 藤原 卓. 長崎県下障害児・者福祉施設等における 歯科的管理対策に関する調査研究. 第45回長崎県総合公衆衛生研究会, 2008年3月7日

6. 佐々木康成, 田口知義, 角町正勝, 太田信知, 西口美由季, 藤原 卓, 長崎県下障害児・者福祉施設等における歯科的管理実態調査. 第25回日本小児歯科学会九州地方会大会および総会, 長崎, 2007年11月25日

7. 佐々木康成, 齋藤 幹, 田谷雄二, 青葉孝昭, 藤原 卓, マウス口唇口蓋裂自然発症と口蓋棚間葉織の増殖との関係についての分子生物学的検索. 第45回日本小児歯科学会総会・大会, 東京, 2007年7月19日

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 康成 (SASAKI YASUNORI)

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号: 70332848

(2) 研究分担者

藤原 卓 (FUJIWARA TAKU)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 00228975

星野 倫範 (HOSHINO TOMONORI)

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号: 00359960

齋藤 幹 (SAITO KAN)

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号: 40380852

釜崎陽子 (KAMASAKI YOUKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 30253678

田谷雄二 (TAYA YUJI)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号: 30197587