

機関番号：16401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592332

研究課題名 (和文) 口蓋癒合後の解離による口蓋裂発症メカニズムの解析

研究課題名 (英文) Analysis of cleft palate pathogenesis caused by post-fusional rupture

研究代表者

山田朋弘 (YAMADA TOMOHIRO)

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

研究者番号：60335619

研究成果の概要 (和文) : TCDD (2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo dioxin) 投与マウスは胎生期に一旦口蓋が癒合しても、その後解離し、口蓋裂となる。口蓋の解離に関わる因子として、組織強度の不足が考えられたため、細胞間接着分子、基底膜構成因子につき検討を行った。その結果、TCDD 群において発現低下が認められ、さらに形態的に TCDD 投与群では口蓋骨の形成不全が観察された。

以上より、TCDD 投与マウスにおける口蓋裂の発症機序は上皮系の強度不足のみならず口蓋骨や軟口蓋の筋群の発育不全も関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Mice treated with TCDD (2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo dioxin) develop cleft palate following disruption, regardless the palate once fused. Factors related to the disruption of the palate, were considered for the lack of physical strength of the tissues. Therefore, intercellular adhesion molecule and basement membrane components were analyzed in this study. As a result, TCDD decreased expression of these molecules. Furthermore, morphologically bony hypoplasia was observed in the palatal bone of TCDD-treated group.

In conclusion, TCDD pathogenesis of cleft palate in mice was suggested to be caused by not only insufficient strength of palatal epithelium, but also hypoplasia of the muscles and bone.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口蓋裂, マウス, ダイオキシン, 解離, 接着因子

1. 研究開始当初の背景

口蓋裂の発生機序としては、(1)口蓋板の挙上や発育不良による口蓋板の接触不全、(2)口蓋板癒合能の低下、(3)口蓋板癒合後の崩壊などの報告があるが、これまでの実験系では口蓋板の発育不全と口蓋板癒合能の低下を観察したものしか報告されていない。一方、われわれはこれまでに環境ホルモン(内分泌攪乱物質)としても知られているダイオキシン(TCDD)によるマウス口蓋裂発生実験モデルを確立し、一旦癒合に至った個体でも、その後解離し口蓋裂になること等を報告してきた。

2. 研究の目的

口蓋裂発症の機序として、口蓋癒合後の解離・崩壊についての報告は少なく、実験系として確立されているものはない。そこでわれわれは、口蓋裂発生の第三の機序としての口蓋癒合後の解離に着目し、その分子生物学的メカニズムを探ることを目的とし、今回の研究を計画した。

3. 研究の方法

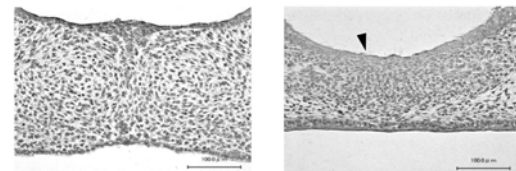
マウス口蓋裂モデルとしては当教室で確立したダイオキシンモデルを用いた。2,3,7,8-tetrachlorodibenzo dioxin(TCDD)あるいはオリーブ油をICR妊娠マウスの胎生12日目に経口投与し、胎生14日目から0.5〜1日おきに胎生18日目までの各段階で口蓋組織を摘出・固定し、実体顕微鏡での形態観察および組織学的観察を行うとともに各ステージにおいて、各種タンパクの発現および局在を免疫染色で観察した。

免疫組織化学的観察では、以下のマーカーにつき発現を検討した。

- (1) 基底膜の構成要素として、IV型コラーゲン、ラミニン
- (2) 細胞間接着因子として、E-カドヘリン、N-カドヘリン、 α -カテニン、 β -カテニン

4. 研究成果

初年度(H20年度)は、まず細胞間接着分子であるE-cadherin及び関連分子 α -catenin、 β -cateninの局在を検討した。その結果、TCDD投与マウスでは鼻腔粘膜上皮及び口蓋正中に存在した細胞塊部ではE-cadherin、 α -cateninの局在は認めず、 β -cateninのみが認められた。

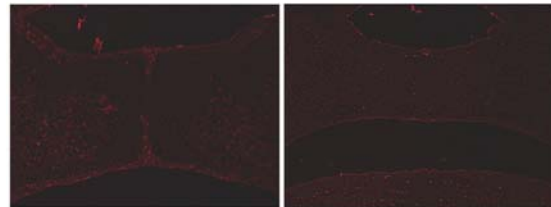


Control TCDD

E-cadherinの局在

TCDD群では鼻腔粘膜での発現が少ない

H21年度は、ラミニン、type IVコラーゲン等、基底膜を構成する主な因子につき検討を行った。その結果、type IVコラーゲンはコントロール群では基底膜を含めた上皮(口腔側、鼻腔側)層に局在しているのに対し、TCDD群では上皮表層に局在しているものの、基底膜相当部では染色性が低下していた。



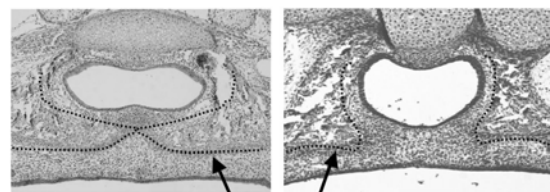
Control TCDD

type IVコラーゲンの局在

TCDD群では基底膜での発現が少ない

ラミニンでは上皮内の局在には大きな変化はなく、間葉系ではむしろ染色性が増強していた。

H22年度は口蓋骨の形成過程および軟口蓋の筋の発生過程について検討を行った。その結果、TCDD投与群では口蓋骨の形成不全が観察された。



Control TCDD

口蓋骨の形成(E16日)

TCDD群では口蓋骨の形成不全が認められる

以上より、TCDD投与マウスにおける口蓋裂の発症機序は上皮系の強度不足のみならず口蓋骨や軟口蓋の筋群の発育不全も関与している可能性が示唆された。

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 11 件)

- ① Imura H, Yamada T, Mishima K, Fujiwara K, Kawaki H, Hirata A, Sogawa N, Ueno T, Sugahara T. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin suggests abnormal palate development after palatal fusion. *Congenital Anomalies*, 査読有, 50, 2010, 77-84
- ② Mishima K, Yamada T, Matsumura T, Moritani N. Lyapunov exponents for Japanese vowels in normal adult and cleft palate speakers. *Folia Phoniatr Logop*, 査読有, 63, 2010, 129-133
- ③ Yamada T, Mishima K, Moritani N, Janune D, Matsumura T, Ikeya Y, Yamamoto T. Nasolabial morphological changes after a Le Fort I osteotomy: a three-dimensional anthropometric study. *Journal of Craniofacial Surgery*, 査読有, 21, 2010, 1089-1095
- ④ Shirasu N, Ueno T, Hirata A, Kagawa T, Kanou M, Sawaki M, Wakimoto M, Ota A, Moritani N, Imura H, Matsumura T, Yamada T, Yamachika E. Bone formation in a rat calvarial defect model after transplanting autogenous bone marrow with beta-tricalcium phosphate. *Acta Histochemica*, 査読有, 112, 2010, 270-277
- ⑤ Yamada T, Mishima K, Ota A, Moritani N, Matsumura T, Katase N, Yamamoto T. A case of ATLL (adult T-cell leukemia/lymphoma) mimicking dental infectious disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 査読有, 109, 2010, e51-e55
- ⑥ Yamada T, Ueno T, Moritani N, Mishima K, Hirata A, Matsumura T. Primary intraosseous squamous cell carcinomas: five new clinicopathologic case studies. *J Cranio-Maxillofacial Surgery*, 査読有, 37, 2009, 448-453
- ⑦ Yamada T, Mishima K, Imura H, Ueno T, Matsumura T, Moritani N. Osteomyelitis of the mandible secondary to infantile osteopetrosis: a case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 査読有, 107, 2009, e25-e29
- ⑧ Yamada T, Mishima K, Matsumura T, Moritani N, Janune D, Sugahara T. Postoperative course after SSRO in mandibular asymmetries with or without MMF. *Oral and Maxillofacial Surgery*, 査読有, 13, 2009, 27-31
- ⑨ 山田朋弘, 三島克章, 森谷徳文, 松村達志,

Danilo Janune. 先天性心疾患を合併した口唇口蓋裂患者の治療. *岡山大学歯学雑誌*, 査読有, 28, 2009, 19-25

- ⑩ Fujiwara K, Yamada T, Mishima K, Imura H, Sugahara T. Morphological and immunohistochemical study on cleft palate induced by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in mice. *Congenital Anomalies*, 査読有, 48, 2008, 68-73
- ⑪ Yamada T, Mishima K, Matsumura T, Moritani N, Sugahara T. Mandibular stability after SSRO with or without post-operative maxillo-mandibular fixation for class III malocclusion. *Oral and Maxillofacial Surgery*, 査読有, 12, 2008, 177-180

[学会発表] (計 6 件)

- ① 井村英人, 平田あずみ, 山田朋弘, 南 克浩, 新美照幸, 古川博雄, 三島克章, 藤原久美子, 鈴木 聡, 菅原利夫, 前田初彦, 夏目長門. 口唇口蓋裂に関する実験的研究-第 124 報- 器官培養による口蓋突起癒合時の観察. 第 55 回日本口腔外科学会総会, 2010.10.16-18, 千葉
- ② 平田あずみ, 井村英人, 山田朋弘, 植野高章, 三島克章, 南 克浩, 夏目長門, 菅原利夫. Homeobox family HOXC 遺伝子は口蓋形成に関与する. 第 55 回日本口腔外科学会総会, 2010.10.16-18, 千葉
- ③ Hirata A, Tsuji T, Ueno T, Yamada T, Imura H, Kagawa T, Matsumura T, Moritani N, Mishima K, Sugahara T, Nakamura N. Localization of heparanase during palatal bone formation in palatogenesis in mice. 36th European Symposium on Calcified Tissues, 2009.5.23-27, ウィーン
- ④ Wakimoto M, Ueno T, Hirata A, Shirasu N, Matsumura T, Yamada T, Sugahara T, Aghaloo T, Moy PK. Clinical and histological study in alveolar bone following post-extraction socket augmentation using Master Graft® granules. European Association for Osseointegration 18th Annual Scientific Meeting, 2009.9.29, モナコ
- ⑤ 平田あずみ, 山田朋弘, 植野高章, 井村英人, 香川智正, 山近英樹, 松村達志, 森谷徳文, 三島克章, 菅原利夫. 口蓋の骨形成過程におけるヘパラン硫酸とヘパラーゼの役割. 第 54 回日本口腔外科学会総会, 2009.10.10, 札幌
- ⑥ Hirata A, Imura H, Yamada T, Ueno T, Yamachika E, Moritani N, Matsumura T, Kagawa T, Mishima K, Sugahara T.

Heparanase contribute to palate fusion by degrading perlecan. XIX Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery, September 9-12, 2008, ボローニャ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 朋弘 (YAMADA TOMOHIRO)
高知大学・教育研究部医療学系・准教授
研究者番号：60335619

(2) 研究分担者

三島 克章 (MISHIMA KATSUAKI)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：60304317
平田 あずみ (HIRATA AZUMI)
大阪大学・大学院工学研究科・特任研究員
研究者番号：40263587
松村 達志 (MATSUMURA TATSUSHI)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：70432648
森谷 徳文 (MORITANI NORIFUMI)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：60467751