

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592349

研究課題名（和文）口蓋裂発症モデルマウスを用いた口蓋裂重症化抑制を標的とする予防的薬物療法の開発

研究課題名（英文）Development of the preventive fetal medication of which a therapeutic target is improvement of the severity of cleft palate phenotype in the cleft palate model mouse

研究代表者

滝川俊也（TAKIGAWA TOSHIYA）

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号：90263095

研究成果の概要（和文）：

ヒトにおける口蓋裂表現型はさまざまであることはよく知られており、ヒトの口蓋裂の発症原因は多因子説で説明されている。しかし、実験動物を用いた口蓋裂モデルの口蓋裂表現型のほとんどすべてが完全口蓋裂のみを呈する結果、どのような種類の因子がヒトの口蓋裂表現型の多型性を生み出しているのか謎のままであり、そのメカニズムの解明が待たれている。当該研究はエピジェネティックな修飾因子が口蓋裂表現型の多型性を生み出していることを完全口蓋裂のみを発症する C57BL/6J 系統 TGF $\beta$ 3 遺伝子欠損マウスを用いて証明することを目的とした。さらに、当該研究は DNA メチル化酵素阻害剤の 1 つである RG108 を用いて口蓋裂重症度の改善を標的とする予防的胎児薬物療法の開発に挑戦した。新規に開発したインビトロ解析システムを用いて、C57BL/6J 系統 TGF $\beta$ 3 遺伝子欠損マウス胎児の口蓋突起内側縁上皮（MEE）細胞は上皮-間葉分化転換と口蓋突起の癒合を引き起こす能力を持っていないが、DNA メチル化酵素阻害剤 RG108 のインビトロ投与によって部位特異的な MEE 細胞の上皮-間葉分化転換と口蓋突起の癒合を引き起こすことを見いだした。そして、TGF $\beta$ 3 遺伝子欠損マウス胎児に RG108 を子宮内で暴露させた場合、さまざまな程度の不完全口蓋裂を呈する胎児が得られた。この実験モデルにおいて、*Igf2r* のセンスプロモーター領域の CG 配列は *Igf2r* のアンチセンスプロモーター領域の CG 配列よりも著しく脱メチル化されており、対照群に比べて口蓋組織における IGF2R の発現が著しく増加していた。

それらの実験結果を統合し、当該研究は口蓋裂表現型の多型性を生み出す原因がエピジェネティックなメカニズムにあることを新たに洞察して、（世界で）初めて口蓋裂表現型の重症度を改善することを標的とする予防的胎児薬物療法の可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：

It is well known that cleft palate phenotype in humans is varied and widely accepted that the cause of human cleft palate is accountable by “multi-factorial theory”. However, almost all the cleft palate phenotype in the cleft palate models using laboratory animals showed complete cleft palate only, so that what kind of factors that produce the phenotypic polymorphism of human cleft palate remains enigmatic and the mechanism underlying phenotypic polymorphism of human cleft palate wait for clarification. This study aimed to demonstrate that the epigenetic modifier produces a variety of cleft palate phenotype by using *Tgfbeta* 3 knockout C57BL/6J mice, whose homozygous fetuses show complete cleft palate only. Furthermore, this study challenged development of the preventive fetal medication using a DNA methyl transferase inhibitor RG108, of which therapeutic target is improvement of the severity of cleft palate phenotype. By using a newly developed *in vitro* analytic system, I found that although palatal medial edge epithelial (MEE) cells of *Tgfbeta* 3-null C57BL/6J mouse fetuses have no ability to bring about epithelial-mesenchymal transformation (EMT) and palate fusion, they can undergo spatially specific EMT and

partially fuse to the opposed palate by *in vitro* medication of a DNA methyltransferase inhibitor RG108. In addition, it was found that when the *Tgf-beta* 3-null mouse fetuses exposed to RG108 *in utero*, some of them showed variedly incomplete cleft palates, which is remarkably similar to the cleft palate phenotypes observed in humans. In this experimental model, DNA CG islands in the *Igf2r* sense promoter region became highly demethylated more than those in the intronic *Igf2r* antisense promoter region, which resulted in the strong expression of IGF2R in both of the epithelium and mesenchyme of the palatal tissues more than those in controls.

Taken those results together, this study provided a new insight into the epigenetic mechanism underlying the cause of phenotypic variation of cleft palate phenotype and suggested, for the first time, the possibility of the preventive fetal medication of which a therapeutic target is improvement of the severity of cleft palate phenotype.

交付決定額

総額 4,550,000 円 (内訳：直接経費 3,500,000 円、間接経費 1,050,000 円)

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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：形態系基礎歯科学

キーワード：口腔解剖学 (含組織学・発生学)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト頭頸部領域の先天異常において、口蓋裂は口唇裂に次いで高い頻度で起こる奇形である。これまでにヒトにおける口蓋裂発症メカニズムの解明を目的として、同じ哺乳類に属するマウス・ラットなどの齧歯類実験動物の胎児を用いた様々な実験が行われて口蓋裂を誘発する多数の催奇形性物質が明らかにされ、近年、それらの物質が口蓋形成関連遺伝子群に及ぼす影響も明らかにされつつある。また、ジーンターゲット法の開発によって作成された種々の遺伝子欠損マウスでも、これまでに口蓋裂表現型を呈するミュータントマウスが多数報告されている。これらの研究により、ヒトの口蓋裂を合併する先天異常症候群のいくつかは単一の遺伝子異常で発症する可能性が示されてきた。しかし、ヒトとマウスとの間で相同な遺伝子異常があっても口蓋裂発症の有無や口蓋裂を発症した場合の表現型の重症度などが全く異なる場合や人種差、民族差、家系差、個体差などが存在する事実がヒト口蓋裂患者の疫学的調査により明らかになってきた。また、口蓋裂単独発症の場合、ヒトでは明らかな遺伝子異常がみられないことがほとんどであり、複数の遺伝子変異による polygene 説や

SNP (単一塩基変異) や環境因子が複合して起こるとした多因子説 (multiple hit theory) など、様々な仮説が提唱されているものの、その本質的なメカニズムは未解明なままであった。また、口蓋裂発症や重症化の抑制を標的とした予防的胎児薬物治療はいまだ国内外の誰も見いだしていない未踏の領域であった。

### 2. 研究の目的

当該研究課題は申請者のこれまでの研究成果を基にした展開研究として、口蓋裂発症モデルマウスの口蓋裂表現型のマウス系統差を利用して、口蓋裂表現型の多型性を生み出すメカニズムの解明と口蓋裂重症化抑制を標的とする予防的薬物療法の基盤技術の開発を目的とした。

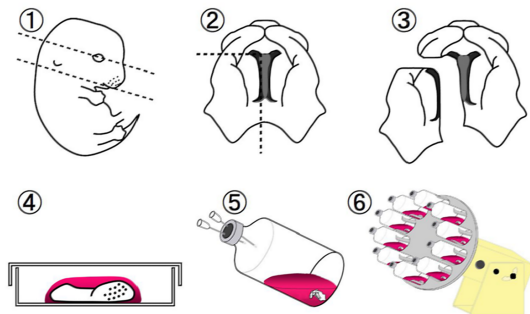
### 3. 研究の方法

口蓋裂発症モデルマウスとして、当該研究開始時点で 20 世代以上戻し交配を行って樹立した C57BL/6J 系統 TGFβ3 遺伝子欠損 (*Tgfb3* K0) マウスを用いて以下の研究方法により当該研究を実施した。なお、C57BL/6J 系統 *Tgfb3* K0 マウスホモ胎児の口蓋裂発症

頻度は 100 %で、表現型は完全口蓋裂のみを呈することを予備実験で確認している (n=147)。

3-1) DNA メチル化酵素阻害剤 RG108 が口蓋突起内側縁上皮細胞 (MEE 細胞) の最終分化能力に与える影響の *in vitro* 解析

DNA メチル化酵素阻害剤 RG108 投与が C57BL/6J 系統野生型マウスおよび口蓋裂発症モデルマウスである TGF  $\beta$  3 遺伝子欠損マウス (*Tgfb3* KO) の MEE 細胞の最終分化能力 (特に上皮-間葉分化転換能力) に与える影響について、当該研究代表者が独自に開発した新規 *in vitro* 解析システムを用いて調査した。(下図参照)



[図の説明] ① C57BL/6J 系統野生型および *Tgfb3* KO マウスのヘテロ接合体の雌雄を交配して妊娠 14 日のマウス胎児を摘出し、口蓋突起癒合前の上顎部分を切り出す。(点線は切開線を示す) ② 上顎部分からさらに片側の口蓋突起を切り取る。(点線は切開線を示す) ③ 片側の口蓋突起を取り除いて単一口蓋突起にした状態を示す。④ MatriGel™-based ECM (細胞外マトリックス) で単一口蓋突起を包埋し、室温で 30 分間静置してゲル化させる) ⑤ 培養用バイアルに試料と、培地に上皮基底膜の分解を抑制するため広範囲のメタプロテアーゼに対して酵素活性を阻害する GM6001 を 20  $\mu$ M の濃度で添加した BGJb 培地を入れて混合ガス (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) を 3 分間注入する。⑥ ローターに装着して 25 回転/分の速度でバイアルを回転させながら 37°C で 48 時間加温する。培養後のゲル包埋単一口蓋突起を形態学および組織学的に解析した。

3-2) DNA メチル化酵素阻害剤 RG108 の *in vitro* 投与が C57BL/6J 系統 *Tgfb3* KO マウスの口蓋突起の癒合に与える影響の調査

3-1) と同様に C57BL/6J *Tgfb3* KO マウス胎児の口蓋突起を左右一対のまま切り出して MatriGel™-based ECM に包埋しないで RG108 添加培地または非添加培地 (対照群) で回転浮遊培養を行った後、形態学および組織学的に解析した。

3-2) DNA メチル化酵素阻害剤 RG108 の *in utero* 投与が C57BL/6J *Tgfb3* KO マウスの口蓋裂表現型に与える影響の調査

C57BL/6J 系統 *Tgfb3* KO マウスのヘテロ接合体の雌雄を交配し、妊娠 13 日から 15 日に RG108 を 5mg/kg/day で腹腔内投与を行い、胎齢 18 日の胎児について口蓋裂表現型を調査した。なお、対照群では RG108 の溶媒に用いたジメチルスルホキシドのみを同様の条件で投与した。

3-3) DNA メチル化酵素阻害剤 RG108 の *in utero* 投与により誘導される C57BL/6J 系統 *Tgfb3* KO マウス胎児の部位特異的口蓋突起癒合過程の組織学的解析

3-2) と同じ条件で RG108 の *in utero* 投与を行って、胎齢 15 日で C57BL/6J 系統 *Tgfb3* KO マウスホモ胎児を摘出し、RG108 投与で誘導される部位特異的な TGF  $\beta$  3-非依存性の口蓋突起の癒合過程を組織学的に解析した。

3-4) DNA メチル化酵素阻害剤 RG108 投与がインプリンティング遺伝子 *Igf2r* プロモーター領域およびアンチセンス mRNA (“*Air*”) のインプリンティングボックスのメチル化に及ぼす影響の解析

RG108 の *in utero* 投与を行って胎齢 15 日で摘出した C57BL/6J 系統 TGF  $\beta$  3 KO マウスホモ胎児と野生型胎児 (対照群) の口蓋組織から DNA を抽出して、*Igf2r* のインプリンティングボックスのメチル化を分子生物学的手法で解析した。

3-5) DNA メチル化酵素阻害剤 RG108 の *in utero* 投与により誘導される部位特異的口蓋突起癒合過程およびインプリンティング遺伝子 *Igf2r* の産物である IGF2R の発現状況の組織学的解析

3-4) と同じ条件で RG108 の *in utero* 投与を行い、胎齢 15 日で胎児を摘出し、IGF2R の発現状況や口蓋突起の癒合過程 (MEE 細胞の消失過程) などを組織学的に解析した。

3-6) DNA メチル化酵素阻害剤 RG108 の *in utero* 投与が次世代の C57BL/6J 系統 TGF  $\beta$  3 遺伝子欠損 (*Tgfb3* KO) マウスの口蓋裂表現型に与える影響の調査

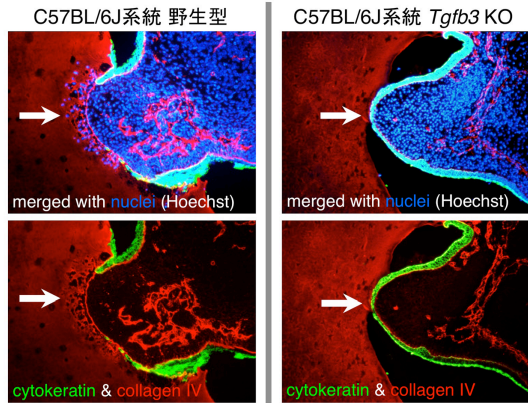
C57BL/6J 系統 *Tgfb3* KO マウスの妊娠母獣に同様の RG108 の *in utero* 投与を行って出産させて 8~12 週齢まで育てた後、ヘテロ接合体を交配し、新規 *in vitro* 解析システムを用いて、ホモ胎児の MEE 細胞の上皮-間葉分化転換能力を解析するとともに、胎齢 18 日でホモ胎児の口蓋裂表現型を調査した。

## 4. 研究成果

### 4-1)

当該研究代表者が独自に開発した新規 *in vitro* 解析システムを用いて、C57BL/6J 系統野生型マウスの MEE 細胞は上皮-間葉分化転

換能力を有することを証明した。一方、C57BL/6J 系統 *Tgfb3* KO マウスの MEE 細胞では上皮-間葉分化転換能力が完全に消失しているものの、DNA メチル化酵素阻害剤 RG108 の *in vitro* 投与によって C57BL/6J *Tgfb3* KO マウスの MEE 細胞の最終分化能力ことを見いだした。特に RG108 の *in vitro* 投与が MEE 細胞の TGF  $\beta$  3-非依存性の上皮-間葉分化転換を引き起こすことを発見した (下図参照)。



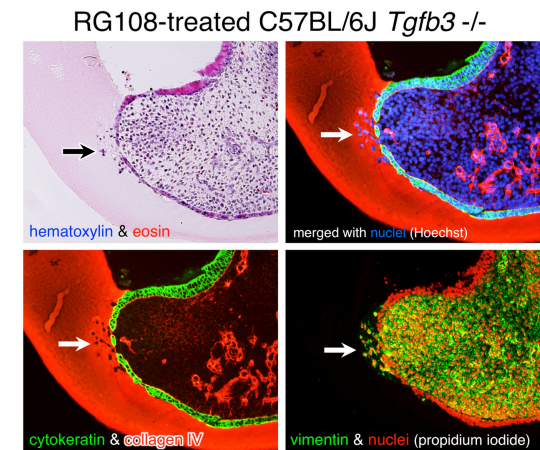
【写真説明】新規 *in vitro* 解析システムによる実験結果を示す。左列：C57BL/6J 系統野生型マウス胎児の単一口蓋を MatriGel™-based ECM (細胞外マトリックス) に包埋して培養した後、組織学的に解析した図を示す。MEE 細胞は上皮-間葉分化転換能力を保有している (矢印は上皮-間葉分化転換したサイトケラチン陰性の MEE 細胞を示す)。培地に GM6001 を添加して上皮基底膜の分解を阻害しているため、MatriGel™-based ECM 内に観察される矢印で示すサイトケラチン陰性細胞は口蓋突起の間葉に由来するのではなく、上皮-間葉分化転換した MEE 細胞である。ほとんどの MEE 細胞が上皮-間葉分化転換を起こしている。右列：左列 (野生型) と同じ条件で培養した C57BL/6J 系統 *Tgfb3* KO マウスの単一口蓋突起を示す。*Tgfb3* KO マウスの MEE 細胞では上皮-間葉分化転換能力が完全に消失していることが明らかである (矢印は上皮-間葉分化転換していないサイトケラチン陽性のままの MEE 細胞を示す)。

当該研究代表者が開発した新規 *in vitro* 解析システムは上記のとおり、MEE 細胞の最終分化能力、特に上皮-間葉分化転換能力を解析することが可能な唯一の方法であることが判明した。すなわち、C57BL/6J *Tgfb3* KO マウスのホモ胎児の MEE 細胞では上皮-間葉分化転換能力が完全に消失しているために完全口蓋裂を示すことがこの *in vitro* 解析システムにより解明された。

#### 4-2)

4-1) で用いた新規 *in vitro* 解析システムにより、DNA メチル化酵素阻害剤 RG108 の *in*

*vitro* 投与が C57BL/6J 系統 *Tgfb3* KO マウスホモ胎児の MEE 細胞の最終分化能力に及ぼす影響を調査した。その結果、RG108 の *in vitro* 投与により、対照群ではまったく上皮-間葉分化転換を起こさなかった MEE 細胞の一部が TGF  $\beta$  3-非依存性の上皮-間葉分化転換を起こすことが発見された。この研究結果は、「TGF  $\beta$  3 ノックアウトマウスの MEE 細胞は上皮-間葉分化転換を起こさない」という従来の定説を覆す画期的な知見である (下図参照)。

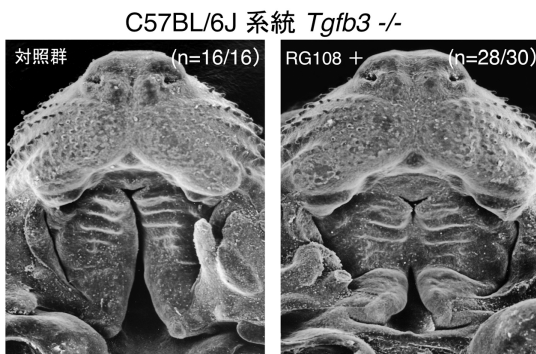


【写真説明】C57BL/6J 系統 *Tgfb3* KO マウスホモ胎児の単一口蓋突起に対する DNA メチル化酵素阻害剤 RG108 の *in vitro* 投与効果を新規 *in vitro* 解析システムで調査した実験結果を示す。左上図：ヘマトキシリン&エオジン染色を行った組織像。右上図：隣接切片のサイトケラチン (緑色蛍光) と IV 型コラーゲン (赤色蛍光) の免疫染色および細胞核 (青色蛍光) を重ね合わせた組織像。左下図：右上図と同一切片のサイトケラチン (緑色蛍光) と IV 型コラーゲン (赤色蛍光) の免疫染色像。右下図：隣接切片のビメンチン (緑色蛍光) の免疫染色と細胞核 (赤色蛍光) を重ね合わせた組織像。培地に RG108 を添加することにより、C57BL/6J 系統 *Tgfb3* KO マウス胎児の MEE 細胞の一部が TGF  $\beta$  3-非依存性に上皮-間葉分化転換を起こしている。(矢印は上皮-間葉分化転換したサイトケラチン陰性の MEE 細胞を示す)。培地に GM6001 を添加して上皮基底膜の分解を阻害しているため、MatriGel™-based ECM 内に観察される矢印で示すサイトケラチン陰性細胞は口蓋突起の間葉に由来するのではなく、上皮-間葉分化転換した MEE 細胞である。

#### 4-3)

4-2) の研究結果から C57BL/6J 系統 *Tgfb3* KO マウスホモ胎児の MEE 細胞の上皮-間葉分化転換を引き起こす RG108 の添加濃度を探索した後、同じ濃度で RG108 を添加した培地で同マウスホモ胎児の口蓋突起を対のままで培養し

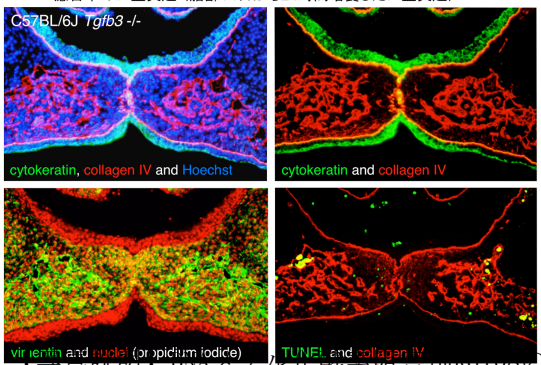
て、口蓋突起の癒合に与える影響を調査した。その結果、DNAメチル化酵素阻害剤RG108の *in vitro* 投与により口蓋突起は部位特異的にTGF  $\beta$  3-非依存性の癒合を起こすことを見いだした（下図参照）。



【写真説明】 DNAメチル化酵素阻害剤RG108の *in vitro* 投与がC57BL/6J系統 *Tgfb3* KOマウスホモ胎児の口蓋突起の癒合に与える影響を調査した実験結果を示す。左図：対照群（RG108の溶媒に用いたジメチルスルホキシドのみを培地に添加）。口蓋突起が相互に接触する前の胎齢14日から48時間培養した後の口蓋の走査電子顕微鏡（SEM）像を示す。口蓋突起の癒合は起こらない（n=16/16）。右図：RG108の *in vitro* 投与群。RG108を培地に添加して、対照群と同じく48時間培養した後の口蓋のSEM像を示す。培地にRG108を添加した場合は口蓋の前方部分のみが癒合する。（n=28/30、奏効率 93.3 %）

また、この部位特異的なTGF  $\beta$  3-非依存性の口蓋突起の癒合過程を調査するため、このRG108の *in vitro* 投与実験系で、さらに培養時間を短縮して組織学的に解析した結果、TGF  $\beta$  3-非依存性の口蓋突起の癒合過程で上皮-間葉分化転換が確認された（下図参照）。

RG108の *in vitro* 投与群のC57BL/6J系統 *Tgfb3* KOマウス胎児の癒合中の口蓋突起（胎齢14日から24時間培養した口蓋突起）



【写真説明】 DNAメチル化酵素阻害剤RG108の *in vitro* 投与により誘導されるC57BL/6J系統 *Tgfb3* KOマウスホモ胎児の癒合中の口蓋突起（胎齢14日から24時間培養後）の組織学的解析結果を示す。左上図：サイトケラチン（緑色蛍光）とIV型コラーゲン（赤色蛍光）の免

疫染色および細胞核（青色蛍光）を重ね合わせた組織像。右上図：同一切片のサイトケラチン（緑色蛍光）とIV型コラーゲン（赤色蛍光）の免疫染色の組織像。左下図：隣接切片のビメンチン（緑色蛍光）の免疫染色と細胞核（赤色蛍光）を重ね合わせた組織像。右下図：TUNEL法によるアポトーシスの検出（緑色蛍光）とIV型コラーゲン（赤色蛍光）を重ね合わせた組織像。

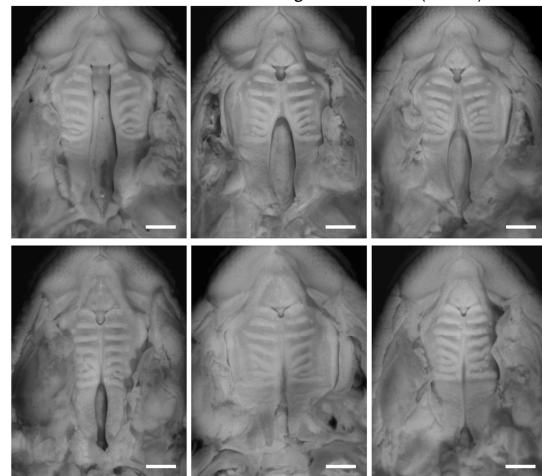
癒合部の上皮基底膜が消失する前にMEE細胞がサイトケラチン陰性、ビメンチン陽性となり、TGF  $\beta$  3-非依存性の上皮-間葉分化転換が起こることを示している。そのような癒合部分のMEE細胞はTUNEL陰性であり、アポトーシスは起こっていない。これらの結果から、口蓋突起の癒合にはMEE細胞の上皮-間葉分化転換能力が必要であり、アポトーシスは必須の現象ではないことが判明した。

#### 4-4)

上記の *in vitro* 実験系の結果から、DNAメチル化酵素阻害剤RG108はMEE細胞の部位特異的なTGF  $\beta$  3-非依存性上皮-間葉分化転換を引き起こして口蓋裂表現型を軽症化させる効果があることを見いだした。そこで、さらにRG108の *in utero* 投与実験を実施した。

DNAメチル化酵素阻害剤RG108の *in utero* 投与の至適な投与条件（投与量、投与経路、投与回数）の探索を行なったうえで、胎齢13日～15日にRG108を5 mg/kg/dayの3回腹腔内投与をC57BL/6J系統 *Tgfb3* KOマウスの妊娠母獣に対して行い、胎齢18日で胎児を摘出して、ホモ胎児の口蓋裂表現型の調査を行った。その結果、RG108の *in utero* 投与によって完全口蓋裂のみを呈していたC57BL/6J系統TGF  $\beta$  3 KOマウスホモ胎児の口蓋裂表現型に変化がみられるようになり、不完全口蓋裂を呈するホモ胎児が得られた（下図参照）。

RG108-treated C57BL6J *Tgfb3* KO mice (GD18)



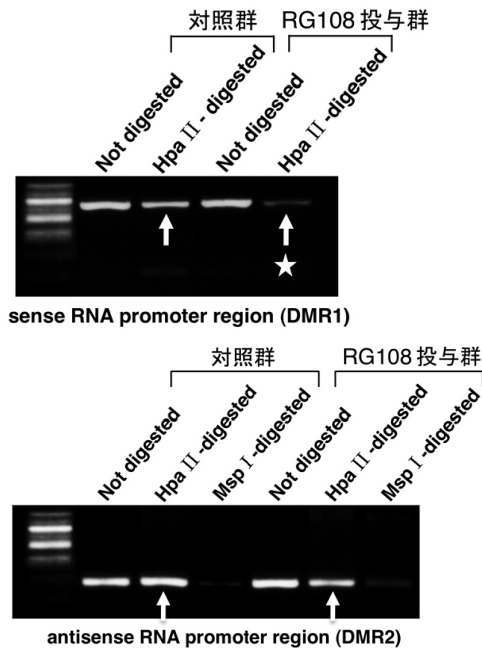
bars : 2 mm

【写真説明】 DNAメチル化酵素阻害剤RG108の *in utero* 投与を行って、胎齢18日のC57BL/6J系統 *Tgfb3* KOマウスホモ胎児の口蓋裂表現型の調査結果を示す。上段左図：RG108投与群で口蓋裂が軽症化しなかった表現型で、対照群や未処理群と同様に口蓋突起が挙上するものの癒合がまったく起こらない完全口蓋裂を示す (n =106/126)。上段中図および右図、下段の図はRG108投与により表現型が不完全口蓋裂に軽症化した例を示す (n=20/126、RG108投与による口蓋裂軽症化の奏成功率15.9%)。

このRG108の *in utero* 投与実験の結果では、完全口蓋裂が不完全口蓋裂に軽症化した場合でも、さらに口蓋裂表現型のバリエーション(多型性)がみられた。DNAメチル化酵素阻害剤RG108の *in utero* 投与で誘導された口蓋裂表現型の多型性はヒトの口蓋裂表現型にみられる多型性にきわめて類似している点が注目される。これらの研究結果は口蓋裂表現型の多型性を生み出す修飾因子(modifier)がDNAのメチル化状態にあることを示唆している。

4-5)

4-4)の研究結果から、DNAメチル化酵素阻害剤RG108の *in utero* 投与によって完全口蓋裂のみを呈していたC57BL/6J系統TGF  $\beta$  3 KOマウスホモ胎児の口蓋裂表現型が不完全口蓋裂に軽症化されるという当該研究の知見に基づいて、代表的なインプリンティング遺伝子である *Igf2r* の転写・翻訳された産物IGF2Rが潜在型TGF  $\beta$  の活性化の足場となる点に着目し、*Igf2r*の組織特異的メチル化可変領域(differentially methylated region; DMR)のメチル化状態を調査した(下図参照)。

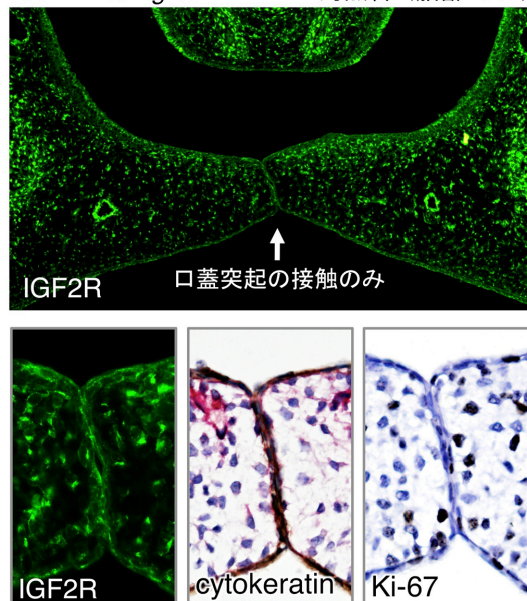


【図の説明】 RG108群と対照群の胎齢15日の口蓋組織からDNAを抽出し、*Igf2r*の組織特異的メチル化可変領域DMR1および *Igf2r*のアンチセンスmRNAのプロモーターとなるDMR2のCG配列に対して、非メチル化CG配列のみを切断可能な制限酵素Hpa- II、またはメチル化、非メチル化のいずれでもCG配列を切断可能なMsp- I で処理したDNAをそれぞれPCR法にて解析した結果、RG108投与群では対照群に比べて、*Igf2r*のセンスプロモーター領域がほとんどメチル化されていないことが判明した。また、*Igf2r*のアンチセンスmRNAのプロモーターとなるDMR2のメチル化はRG108投与群でも約半分程度はメチル化されたままであることも判明した。

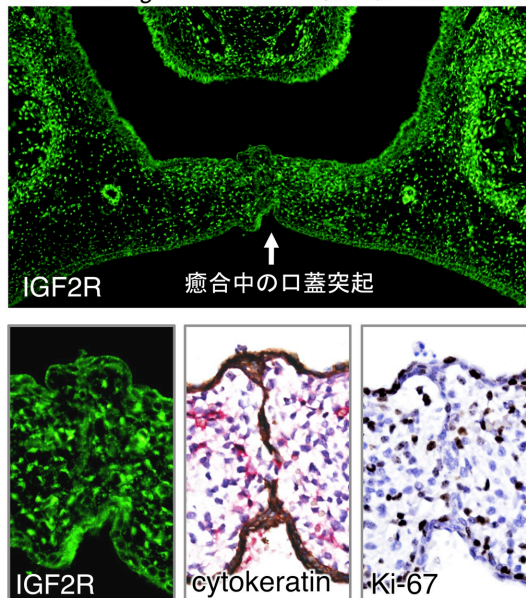
4-6)

4-5)の研究結果により、DNAメチル化酵素阻害剤RG108の *in utero* 投与によって *Igf2r* のセンスmRNAがアンチセンスmRNA (“Air”) に対して転写が著明に増加していることが示唆されたため、胎齢15日のTGF  $\beta$  3 KOマウスホモ胎児の口蓋組織について、*Igf2r*の産物であるIGF2Rの発現とRG108投与で誘導される部位特異的癒合過程を免疫組織化学法により解析した。その結果、対照群(RG108非投与群)に比べて *Igf2r*の産物であるIGF2Rの発現が口蓋突起のMEE細胞や間葉細胞で明らかに増強していること、増殖細胞特異的抗原 Ki-67陽性細胞が口蓋突起間葉で著明に増加していること、さらにMEE細胞の最終分化が誘導されてMEE細胞の消失が起こっていることが確認された。これらの結果は、単一の遺伝子異常による口蓋裂の表現型が不可変ではなく、インプリンティング遺伝子の産物であるIGF2Rの発原量との相互作用によって多型性が生じていることを実証している(下図参照)。

C57BL/6J *Tgfb3* <sup>-/-</sup> 対照群 (胎齢15日)



C57BL/6J *Tgfb3*<sup>-/-</sup> RG108 投与群 (胎齢15日)



【写真説明】右列：RG108 の溶媒に用いたジメチルスルホキシドのみを投与した胎齢 15 日の C57BL/6J 系統 *Tgfb3* KO マウスの口蓋突起の組織像を示す (対照群)。左右の口蓋突起の先端が互いに接触しているが、MEE 細胞の消失は起こっていない。右列：DNA メチル化酵素阻害剤 RG108 の *in utero* 投与を行って、胎齢 15 日の C57BL/6J 系統 *Tgfb3* KO マウスの癒合中の口蓋突起を示す。MEE 細胞が一部消失している部分で間葉の合流 (癒合) が観察される。

上段は IGF2R の免疫染色像 (緑色蛍光) を示す。対照群 (左列図) に比べて RG108 投与群 (右列図) では明らかに IGF2R の染色強度が高い。また、左列下段中図に示すように、対照群ではサイトケラチン陽性 (茶色) の MEE 細胞の消失はみられないが、RG108 投与群 (右下段中図) で MEE 細胞が一部消失している。細胞増殖を Ki-67 の免疫染色で調べたところ、対照群 (左列下段右図) に比べて、RG108 投与群 (右下段右図) の口蓋突起間葉では増殖している細胞が明らかに多い。

4-7)

妊娠母獣の妊娠13日~15日にDNAメチル化酵素阻害剤を投与 (RG108 5 mg/Kg/day、3日間投与) し、出産させた仔を8~10週齢まで育てた C57BL/6J 系統 *Tgfb3* KO ヘテロ接合体の雌雄を交配して、DNAメチル化酵素阻害剤を投与せずに妊娠14日で胎児を取り出し、当該研究で用いている *in vitro* 解析法で MEE 細胞の最終分化能力 (MEE 細胞の消失能力) を組織学的に調査した。その結果、野生型 (*Tgfb3* +/+) 胎児の口蓋突起の最終分化能力は、無処理群の野生型胎児と比べて特に変化が認められなかった (n=12)。また、妊娠18日で胎児を取り

出して口蓋裂表現型を調査したところ、ホモ接合体 (*Tgfb3* -/-) が呈する口蓋裂表現型は完全口蓋裂のみで、無処理群との差異は認められなかった (n=10)。これらの結果から、当該研究で用いた DNA メチル化酵素阻害剤 RG108 の *in utero* 投与は次世代の MEE 細胞の最終分化能力に何ら影響を与えないことが判明した。

当該研究成果の総括)

当該研究代表者は当該研究の実施により、口蓋裂発症モデルマウスホモ胎児に DNA メチル化酵素阻害剤 RG108 を胎児期に *in utero* 投与して、MEE 細胞の TGF  $\beta$  3-非依存性の上皮-間葉分化転換を促進させ、口蓋裂表現型を軽症化することに世界で初めて成功した。DNA メチル化酵素阻害剤 RG108 の *in utero* 投与により軽症化した不完全口蓋裂にみられる多型性はヒトの口蓋裂表現型にみられる多型性と比べて類似しており、これら当該研究成果は口蓋裂表現型の多型性を生み出す修飾因子 (modifier) の本体が *Igf2r* を代表とするインプリンティング遺伝子の DNA のメチル化状態である可能性を強く示唆している。

また、当該研究で用いた DNA メチル化酵素阻害剤 RG108 は他の DNA メチル化酵素阻害剤である 5-アザ-2'-デオキシシチジンのように DNA に取り込まれて DNA メチル化を阻害するのではなく、DNA メチルトランスフェラーゼに対する直接的な DNA メチル化阻害作用を有する分子標的試薬である。当該研究では胎児期に DNA メチル化酵素阻害剤 RG108 を *in utero* 投与しても、仔の成長や次世代の生殖に対する影響などはまったくないことなども調査して、遺伝子異常がもたらす表現型を軽症化させる予防的胎児薬物療法をさらにヒトへの応用に発展できる可能性を確認した。

これらの研究成果により、当該研究代表者滝川俊也は、当該研究の当初の目的であったヒト口蓋裂表現型の重症化抑制を標的とする予防的胎児薬物療法の概念の創成、動物実験モデルを用いた技術基盤の開発を概ね達成したと考えられる。当該研究代表者はここまでの研究成果を海外学術雑誌にて公表するために投稿準備を進めている。また、今後、さらに当該研究成果の展開研究を計画している。

謝辞)

当該研究を遂行するにあたり、科研費による研究資金のご援助をいただきましたことを心より感謝申し上げます。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Autophagy in regulation of Toll-like receptor signaling. Into T., Inomata M., Takayama E., Takigawa T. Cellular Signaling 24:1150-1162. (2012)

② Differential distribution of post-translationally modified microtubules in osteoclasts. Akisaka T., Yoshida H., Takigawa T. Journal of histochemistry and cytochemistry 59(6):630-638. (2011)

③ 免疫系を調節する Toll 様受容体のリガンド認識とシグナル伝達機構～その生理学的・病理学的役割. 引頭 毅、猪俣 恵、滝川俊也. 岐阜歯科学会雑誌. 第 37 巻 3 号 : 138-158. (2011 年).

[学会発表] (計 5 件)

① DNA メチル化酵素阻害剤投与による TGF  $\beta$  3 ノックアウトマウスの重篤な口蓋裂表現型の軽症化効果について. 滝川俊也、明坂年隆、高井良招、引頭 毅. 第 117 回日本解剖学会. 2012 年 3 月 28 日. 甲府市.

② ゲフィチニブ投与による TGF  $\beta$  3 ノックアウトマウスの重篤な口蓋裂表現型の改善作用について. 滝川俊也、高井良招、明坂年隆. 第 53 回日本歯科基礎医学会. 2011 年 10 月 2 日. 岐阜市.

③ TGF  $\beta$  3 ノックアウトマウスの口蓋裂表現型とマウス系統に依存した口蓋突起内側縁上皮細胞の最終分化能力との相関関係. 滝川俊也. 第 116 回日本解剖学会/第 88 回日本生理学会合同大会. 2011 年 3 月 28 日.  
\* 東日本大地震の影響により横浜市での開催が中止され、急遽、誌上開催となった.

④ 肺癌治療薬イレッサ投与による TGF  $\beta$  3 ノックアウトマウスの口蓋裂表現型の重症化抑制作用について. 滝川俊也、明坂年隆、高井良招. 第 70 回日本解剖学会中部支部学会. 2010 年 10 月 16 日. 岐阜市.

⑤ 肺癌治療薬イレッサ投与による TGF  $\beta$  3 遺伝子欠損マウスの口蓋裂表現型を軽症化させるための予防的胎児治療の試み. 滝川俊也、高井良招、明坂年隆、塩田浩平. 第 115 回日本解剖学会全国学術集会. 2010 年 3 月 28 日. 盛岡市.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

滝川 俊也 (TAKIGAWA TOSHIYA)

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号 : 90263095

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし