

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009~2010

課題番号：21792014

研究課題名 (和文) 口唇口蓋裂疾患感受性遺伝子群の解明

研究課題名 (英文) Analysis of candidate genes for cleft lip and palate

研究代表者

新井 伸作 (ARAI SHINSAKU)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：40529806

研究成果の概要 (和文)：

口蓋裂との関連が報告されている *Sprouty2* について、口蓋癒合における役割を明らかにするため、マウスを用いた研究を行った。*Sprouty2* 遺伝子欠損 (knock out: KO) マウスでは、胎仔の 21.9% に口蓋裂を認めた。また、口蓋裂発症胎仔では口蓋突起は挙上しておらず、舌の側方に存在していた。野生型 (wild type: WT) マウスの口蓋癒合時期 (口蓋突起挙上前、接合時、癒合時) では、*Sprouty2* は口蓋上皮細胞と口蓋間葉細胞に発現していた。時期による mRNA 発現量の変化はなく、口蓋癒合時期を通して恒常的に発現していた。*Sprouty2* 非存在下での口蓋癒合能について検討したところ、*Sprouty2* siRNA 導入群と対照群はいずれも接合部口蓋上皮が消失し、完全に癒合した。そこで、*Sprouty2* KO マウスの口蓋におけるアポトーシスについて TUNEL 染色を用いて検討したところ、WT との間に有意な差は認めなかった。次に、Ki-67 免疫組織化学染色にて細胞増殖について検討したところ、*Sprouty2* KO マウスの口蓋間葉には Ki-67 陽性細胞が有意に多かった。また、*Sprouty2* siRNA を導入した WT マウスの口蓋間葉細胞を用いて WST-8 アッセイにて生細胞数を測定したところ、*Sprouty2* siRNA 導入群で有意に細胞増殖が亢進していた。また、5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) 取込試験にて *Sprouty2* siRNA 導入群で有意に BrdU 陽性細胞が多かった。口蓋間葉細胞のタンパクをウエスタンブロット法にて解析したところ、*Sprouty2* siRNA 導入群では FGF 刺激時に細胞増殖の指標となる extracellular regulated kinase (ERK) のリン酸化が亢進していた。また、fibroblast growth factor (FGF) シグナルにより誘導される homeobox, msh-like1 (*Msx1*)、paired-like homeodomain transcription factor1 (*Ptx1*)、ets variant gene5 (*Etv5*) の mRNA 発現が *Sprouty2* KO マウスの口蓋で亢進していた。以上の結果より、*Sprouty2* は FGF シグナルを介して口蓋間葉の細胞増殖を制御しており、*Sprouty2* KO マウスでは口蓋間葉細胞の増殖異常により口蓋突起の挙上が阻害され、口蓋裂を発症することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Cleft palate is one of the most common craniofacial deformities. Because *Sprouty2* has recently been reported to play a key role in the occurrence of cleft palate in humans, we researched the role of *Sprouty2* in mice palatogenesis. *Sprouty2*-deficient palates fused completely in palatal organ culture. However, palate mesenchymal cell proliferation estimated by Ki-67 staining was increased in *Sprouty2* KO mice compared with WT mice. *Sprouty2*-null palates expressed higher levels of FGF target genes, such as *Msx1*, *Etv5*, and *Ptx1* than WT controls. Furthermore, proliferation and the extracellular signal-regulated kinase (Erk) activation in response to FGF was enhanced in palate mesenchymal cells transfected with *Sprouty2* small interfering RNA. These results suggest that *Sprouty2* regulates palate mesenchymal cell proliferation via FGF signaling and is involved in palatal shelf elevation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：口腔外科

科研費の分科・細目：医歯薬学・ゲノム医科学

キーワード：口唇口蓋裂、関連解析、SNP

1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂は、新生児に認められる多因子疾患の中で、わが国における発生頻度は0.2%と欧米に比して高い。現在では外科的治療法進歩によりほぼ満足すべき治療効果がえられるようになったものの、患者や家族にとっての精神的苦痛と長期間における治療の心理的負担は大きい。口唇口蓋裂の発症には、環境の要因と遺伝的要因の双方が関与されているとされており、兄弟での発症率が約10倍になるなど遺伝的関与が強く示唆される。

口唇口蓋裂の感受性遺伝子に関しては、*MSX1*、*TGFβ3*、*PAX9*などの報告はなされているが (In Vitro Cell Dev Biol Anim. 34:831-5, 1998; J human genet. 51:38-46, 2006)、その生理学的意義のほとんどが未だ明らかにされていないのが現状である。これまで私は、九州大学服巻保幸教授の指導のもと、口唇口蓋裂と同じく環境要因と遺伝的要因の双方が関与する多因子疾患である統合失調症において、グルタミン酸受容体遺伝子群の関連解析を行い、多因子疾患感受性遺伝子の解析を行ってきた実績を持つ (S Arai et al. Psychiatr Genet. accepted in Jul 21, 2008)。

2. 研究の目的

口唇口蓋裂の候補遺伝子を設定し、伝達不平衡テスト (transmission disequilibrium test; TDT)、患者-対照群を用いた関連解析を行い、日本人口唇口蓋裂発症の疾患感受性遺伝子を同定することにある。

また、口蓋裂との関連が報告されている *Sprouty2* について、マウスを用い口蓋癒合における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

I 口唇口蓋裂疾患感受性遺伝子の同定

1. 遺伝子解析用サンプルの採取

インフォームドコンセントを得られた日本人非症候性口唇口蓋裂患者・家族から採血、爪を採取する。

対照群として、インフォームドコンセントを得られた健常者から採血、爪の採取を行う。血液はマスクスクリーニング用血液乾燥濾紙にて常温保存、手術または術前検査を行う場合は、その際に全血を採取し、凍結保存し、DNAを抽出する。

2. 候補遺伝子と口唇口蓋裂との関連解析

・*MSX1*、*TGFβ3*、*PAX9*など遺伝子について伝達不平衡解析:

サンプルを採取した患者およびその両親のトリオを資料として、*MSX1*、*TGFβ3*、*PAX9*などに存在する複数の TagSNP について、ダイレクトシーケンス法、パイロシーケンス法を用いてジェノタイピングを行い、伝達不平衡テストを行う。

・*MSX1*、*TGFβ3*、*PAX9*などの遺伝子と口唇口蓋裂との関連解析:

MSX1、*TGFβ3*、*PAX9*などの遺伝子内の TagSNP について、対照群、罹患群それぞれを用いてジェノタイピングを行い、関連解析を行う。さらに、連鎖不平衡解析を行い、連鎖不平衡の保たれている SNP によりハプロタイプを構築し、ハプロタイプと疾患との関連解析を行う。

II *Sprouty2* の口蓋癒合における役割の解明

1. マウス

Sprouty2 KO マウスは武富らが過去に作製したマウスを用いた。対照群である WT マウスには C57BL/6J マウス (日本エスエルシー *Shizuoka, Japan*) を用いた。マウス妊娠確認はプラグを目視することにより行い、プラグ確認の朝を E0.5 とした。妊娠マウスの頸

椎を脱臼させた後、腹部を切開して胎仔を摘出した。摘出した胎仔は雌雄に関係なく実験に用いた。

2. マウス頭部前頭断切片の作製

マウス胎仔の頭部を切断し、頭部前頭断切片を作製した。作製した頭部前頭断切片を用いて、hematoxylin-eosin (HE) 染色を行った。

3. 免疫組織化学染色

パラフィン切片を処理し、一次抗体として抗 *Sprouty2* ポリクローナル抗体 (ウサギ由来、Protein Tech 社製 *Chicago, USA*)、抗 Ki-67 モノクローナル抗体 (ウサギ由来、Thermo Scientific 社製 *Miami, USA*) を反応させた。fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ウサギ IgG (ZYMED 社製 *California, USA*) を反応させ、Vecta Shield (VECTOR LABORATORIES 社製 *California, USA*) で包埋した。

4. RNAの抽出および complementary DNA (cDNA) の合成

RNAの抽出にはフェノール・クロロホルム法を用いた。吸光度計にて RNA の濃度を測定し、reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) にて cDNA を作製した。RT-PCR は、GeneAmp RNA PCR キット (Applied Biosystems 社製 *New Jersey, USA*) を使用した。

5. リアルタイム PCR 法

リアルタイム PCR は Brilliant SYBR® Green QPCR Reagents (STRATAGENE 社製 *California, USA*) を用いて行った。*Sprouty2*、*Msx1*、paired-like homeodomain transcription factor1 (*Ptx1*)、ets variant gene5 (*Etv5*)、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) のプライマーをそれぞれ設計し行った。定量化には MxPro QPCR Software (STRATAGENE 社製 *California, USA*) を用いた。各 messenger RNA (mRNA) の発現量は *GAPDH* mRNA の発現量と比較して、相対的発現量を算出した。

6. ウェスタンブロット法

溶解溶液を用いて細胞からタンパク質を抽出し、吸光度測定にて濃度定量後、1 レーン当たり総タンパク質量が 75 μg になるようにして、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis (SDS-PAGE) を行った。その後、タンパク質成分を poly vinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Millipore 社製 *Massachusetts, USA*) に転写した。次に、1 次抗体として抗リン酸化 extracellular regulated kinase (ERK) 1/2 モノクローナル抗体および抗 ERK2 ポリクローナル抗体 (Santacruz Biotechnology 社製 *California, USA*) を用いて反応させた。次に、2 次抗体として HRP 標識抗ウサギ IgG (Jackson Immuno-Research Laboratories 社製

Pennsylvania, USA) を用いて反応させた。その後、Super signal (PIERCE 社製 *Illinois, USA*) で発色させて X 線フィルム (Fuji Film 社製 *Tokyo, Japan*) 上で検出した。バンドの強度は画像解析ソフト NIH image (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて計測した。

7. small interfering RNA (siRNA) の導入

Sprouty2 遺伝子発現抑制は Stealth RNAi™ specific for *Sprouty2* (Invitrogen 社製 *California, USA*) を用いてリポフェクション法にて行った。対照群には Negative control siRNA (Invitrogen 社製 *California, USA*) を導入した。

8. マウス口蓋器官培養

器官培養は Shuler らの方法に準じて行った。E13.5 の WT マウスより両側の口蓋突起を採取し、Millicell-CM (Millipore 社製 *Massachusetts, USA*) 上に左右の口蓋突起先端部が相対して接するように置いた。6 ウェル細胞培養用ディッシュに 10% fetal bovine serum (FBS) 含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) /F12 培地 (Sigma-Aldrich 社製 *St.Louis, USA*) 1 ml および siRNA transfection reagent を入れ、その上に Millicell-CM を置いたインサートウェル (Falcon 社製 *New Jersey, USA*) を挿入した。siRNA transfection reagent の組成は 1 ウェルあたり OptiMEM 100 μl 、*Sprouty2* siRNA (Invitrogen 社製 *California, USA*) 500nM、Oligofectamine (Invitrogen 社製 *California, USA*) 8 μl とした。培養後、メンブレンごと口蓋突起を採取し、4% PFA で固定後パラフィン包埋した。厚さ 5 μm のパラフィン切片を作製し、HE 染色を行い口蓋の癒合を判定した。

9. TdT-mediated dUTP-biotin nick-end labeling (TUNEL) 染色

胎生 13.5 日の WT マウス胎仔および *Sprouty2* KO マウス胎仔の頭部前頭断切片にて、*In situ* Cell Death Detection Kit (Roche applied science 社製 *Basel, Swiss*) を用いてアポトーシス細胞を検出した。

10. マウス口蓋間葉細胞の初代培養

E13.5 の WT マウス口蓋突起を採取し、酵素処理を行った。細胞を分散し、10% FBS 含有 DMEM/F12 培地にて培養した。

11. 細胞増殖アッセイ

採取後 1 回から 2 回継代したマウス口蓋間葉細胞に *Sprouty2* siRNA 25 nM もしくは Control siRNA を遺伝子導入し、96 ウェルプレートに 5×10^2 個/ウェルで播種した。播種後、24 時間毎に WST-8 生細胞数検出キット (ナカライテスク社製 *Kyoto, Japan*) を用いて細胞数測定を行った。

12. 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) 標識

マウス口蓋間葉細胞に *Sprouty2* siRNA 導入後 BrdU labeling and detection kit (Roche

applied science 社製 *Basel, Swiss*) を用いて BrdU 標識を行った。siRNA transfection reagent の組成は 1 ウェルあたり OptiMEM 100 μ l、Sprouty2 siRNA (Invitrogen 社製 *California, USA*) 25 nM、Oligofectamine (Invitrogen 社製 *California, USA*) 2 μ l とした。BrdU 反応後、抗 BrdU 抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、陽性細胞数を測定した。

4. 研究成果

口唇口蓋裂の感受性候補遺伝子における TDT、関連解析については、サンプル採取を継続している。

Sprouty2 の口蓋癒合における役割について

1. 口蓋癒合時期の野生型マウスにおける *Sprouty2* の発現に関する検討

WT マウスの口蓋癒合時期 (口蓋突起挙上前、接合時、癒合時) の頭部前頭断切片において、*Sprouty2* は口蓋上皮細胞と口蓋間葉細胞に発現していた。WT マウスの口蓋突起より mRNA を採取し、リアルタイム PCR を行ったところ、時期による mRNA 発現量の変化はなかったが、口蓋癒合時期を通して恒常的に発現していた。

2. *Sprouty2* 遺伝子欠損マウス口蓋の表現型に関する検討

Sprouty2 KO マウス胎仔の 21.9% に口蓋裂を認め、口蓋裂発症胎仔では口蓋突起は挙上しておらず、舌の側方に存在していた。

3. 口蓋器官培養における *Sprouty2* 遺伝子発現抑制の効果

Sprouty2 非存在下での口蓋癒合能について検討するため、WT マウスの口蓋突起を採取し、*Sprouty2* siRNA 導入下に口蓋器官培養を行った。*Sprouty2* siRNA 導入群と対照群はいずれも接合部口蓋上皮が消失し、完全に癒合した。

4. *Sprouty2* KO マウスの口蓋間葉におけるアポトーシスおよび細胞増殖に関する検討
Sprouty2 KO マウスの口蓋におけるアポトーシスについて TUNEL 染色を用いて検討したところ、WT との間に有意な差は認めなかった。次に、Ki-67 免疫組織化学染色にて細胞増殖について検討したところ、*Sprouty2* KO マウスの口蓋間葉には Ki-67 陽性細胞が有意に多かった。また、*Sprouty2* siRNA を導入した WT マウスの口蓋間葉細胞を用いて WST-8 アッセイにて生細胞数を測定したところ、*Sprouty2* siRNA 導入群で有意に細胞増殖が亢進していた。また、BrdU 取込試験にて *Sprouty2* siRNA 導入群で有意に BrdU 陽性細胞が多かった。

5. *Sprouty2* による口蓋間葉細胞増殖制御に関連するシグナル経路に関する検討

口蓋間葉細胞よりタンパクを抽出してウ

エスタンブロット法にて解析したところ、*Sprouty2* siRNA 導入群では FGF 刺激時に細胞増殖の指標となる extracellular regulated kinase (ERK) のリン酸化が亢進していた。また、fibroblast growth factor (FGF) シグナルにより誘導される homeobox、*Msx1*、*Ptx1*、*Etv5* の mRNA 発現を確認したところ、*Sprouty2* KO マウスの口蓋で発現が亢進していた。

以上の結果より、*Sprouty2* は FGF シグナルを介して口蓋間葉の細胞増殖を制御しており、*Sprouty2* KO マウスでは口蓋間葉細胞の増殖異常により口蓋突起の挙上が阻害され、口蓋裂を発症することが示唆された。

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 2 件)

Kaori MATSUMURA, Takaharu TAKETOMI, Keigo YOSHIZAKI, Shinsaku ARAI, Terukazu SANUI, Daigo YOSHIGA, Akihiko YOSHIMURA, Seiji NAKAMURA

Sprouty2 controls proliferation of palate mesenchymal cells via fibroblast growth factor signaling

Biochemical and Biophysical Research Communications 404(2011)1076-1082

中間 友美、笹栗 正明、松崎 幸代、緒方 祐子、光安 岳志、新井 伸作、松村 香織、中村 誠司

異常構音を有する口蓋裂患者の語音弁別能に関する検討

日本口蓋裂学会雑誌 35 (3) 186-194, 2010

[学会発表] (計 10 件)

松村 香織、武富 孝治、笹栗 正明、光安 岳志、吉賀 大午、新井 伸作、前原 隆、讚井 彰一、中村 誠司

MAPK 抑制因子 *Sprouty2* の FGF シグナルを介した口蓋間葉細胞増殖制御

第 55 回日本口腔外科学会総会・学術大会 千葉 2010.10

Kaori MATSUMURA, Takaharu TAKETOMI, Daigo YOSHIGA, Shinsaku ARAI, Takashi MAEHARA, Terukazu SANUI, Kazuaki NONAKA, Akihiko YOSHIMURA, Seiji NAKAMURA

Sprouty2 deficient mice exhibit cleft palate.

International Association of Dental

Research Barcelona, Spain 2010.7

Shinsaku ARAI, Masaaki SASAGURI, Takeshi MITSUYASU, Tomomi NAKAMA, Kaori MATSUMURA, Seiji NAKAMURA

Evaluation of re-pushback surgery for cleft palate patients with severe velopharyngeal incompetence
6th Congress of the International Cleft Lip and Palate Foundation Seoul, Korea 2010.6

Kaori MATSUMURA, Takaharu TAKETOMI, Masaaki SASAGURI, Takeshi MITSUYASU, Tomomi TSUJIGUCHI, Shinsaku ARAI, Daigo YOSHIGA, Takashi MAEHARA, Terukazu SANUI, Akihiko YOSHIMURA, Seiji NAKAMURA
Sprouty2 deficient mice exhibit cleft palate.
6th Congress of the International Cleft Lip and Palate Foundation Seoul, Korea 2010.6

Tomomi NAKAMA, Masaaki SASAGURI, Takeshi MITSUYASU, Shinsaku ARAI, Kaori MATSUMURA, Seiji NAKAMURA
A study of speech discrimination ability of cleft palate patients with abnormal articulation
6th Congress of the International Cleft Lip and Palate Foundation Seoul, Korea 2010.6

松村 香織、武富 孝治、笹栗 正明、光安 岳志、吉賀 大午、新井 伸作、前原 隆、讚井 彰一、中村 誠司
Sprouty2 はマウス口蓋癒合に関与する
第 64 回日本口腔科学会総会・学術大会 北海道 2010.6

松村 香織、武富 孝治、笹栗 正明、光安 岳志、辻口 友美、吉賀 大午、新井 伸作、吉崎 恵悟、中村 誠司
マウス口蓋形成における Sprouty2 の役割
第 34 回日本口蓋裂学会総会・学術大会 東京 2010.5

光安 岳志、笹栗 正明、金城 亜紀、大部 一成、辻口 友美、新井 伸作、松村 香織、中村 誠司
摂食・嚥下障害を認めた重度多発異常を伴口蓋裂症例に対する 口蓋形成術の意義
第 34 回日本口蓋裂学会総会・学術集会 東京 2010.5

光安 岳志、笹栗 正明、中間 友美、松村 香織、新井 伸作、中村 誠司
片側性不完全口唇裂症例における術前外鼻矯正の有用性の検討
第 54 回日本口腔外科学会総会・学術大会 北海道 2009.10

中間 友美、笹栗 正明、松崎 幸代、緒方 祐子、光安 岳志、新井 伸作、松村 香織、中村 誠司
異常構音を有する口蓋裂患者の語音弁別に関する検討
第 33 回日本口蓋裂学会総会 東京 2009.5

〔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
新井 伸作 (ARAI SHINSAKU)
九州大学・大学病院・医員
研究者番号：40529806

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし