

## 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 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792028

研究課題名（和文） 口蓋発生メカニズムとフィロポディア—口蓋裂予防としてのイノシトールの影響—

研究課題名（英文） Cleft palate and filopodia -the influence of inositol will prevent cleft palate-

研究代表者

藤原 久美子 (FUJIWARA KUMIKO)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：60404737

研究成果の概要（和文）：

自然発生系 A/J マウスを使用し、イノシトール投与群では片側性口唇口蓋裂（UCLP）は全く認められず、両側性口唇口蓋裂（BCLP）は抑制傾向を認めた。また形態学的観察では、母獸あるいは胎児への全身的な影響は認められず、得られた CLP も変化は認めなかった。イノシトールはより BCLP を抑制する効果を有し、CLP の予防に有用であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

A/J mouse which is the spontaneous CLP strain was used and the inositol medication group and the control group considered incidence of CLP. By the inositol group, the unilateral cleft lip and palate (UCLP) was not accepted at all, but a bilateral cleft lip and palate (BCLP) accepted the control tendency as compared with the control. In morphologic observation, the systemic influence on the pregnant body or an embryo was not accepted. It has an effect which controls BCLP considered that the obstacle of inositol is serious. Furthermore, it was thought that inositol was useful as a prevention method of CLP since there is nothing influence for pregnant women and embryo.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

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・イノシトール・予防・Filopodia・アクチン線維

## 1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂(Cleft lip and/or palate、以下 CL/P)は先天性体表異常の中で最も多い疾患であり、日本では現在でも出生 500 人に 1 人程度の発症率と報告されている。審美的、心理的にも多くの問題点を抱える本疾患の予

防が望まれるが、未だ確定的なものはないのが現状である。CL/P は胎生期の顔面突起(隆起)が癒合に到らないために発生するが、その要因は遺伝的因子と環境要因に分けることができ、これら因子が単独、もしくは複数関与することで発症するという多因子闕説

で説明されているがいまだ明らかなものはない。

#### (1)口蓋裂と Filopodia

申請者はこれまでに口蓋形成期の口蓋突起癒合メカニズムについて研究を行い、ICRマウスに TCDD を至適濃度投与することで100%の口蓋裂胎仔が得られることを報告した。さらに口蓋癒合時期の口蓋突起先端をSEMで観察したところ、TCDD投与マウス胎仔では細胞表面が平滑となり、control群で認められた Filopodia 様組織がほとんど観察されなかった。(Morphological and immunohistochemical studies on cleft palates induced by 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin in mice. Fujiwara K, et al, Cong Anom, 2008: 48, 68-73)。つまり TCDD投与マウスの口蓋裂は、Filopodia の消失による口蓋突起間の接着機能の阻害により引き起こされている可能性が示唆された。さらに Filopodia が消失している口蓋突起先端部は、細胞表面の形態異常を伴っていることから、細胞骨格が何らかの影響を受け、そこから伸長する Filopodia が消失し、結果的に口蓋裂の原因となっている可能性が考えられた。

#### (2)口蓋裂と Inositol

申請者は本学口唇口蓋裂センターにおいて口蓋裂予防プログラムを実施しており、主に葉酸摂取を中心とした指導を行っている。葉酸の口唇口蓋裂発生抑制効果はこれまでに報告も多く広く知られているが、それでも予防できない葉酸抵抗群に対しての予防法が模索されている。そういったなかで Vitamin B 群のひとつと考えられている Inositol が注目されている。Inositol は脂肪肝・肝硬変の予防・治療薬としても利用され、またダイエット補助サプリメントとしても効果が期待されており、比較的安全に摂取される物質である。

Inositol は生体内では Glucose から合成され、欠乏することは稀である。近年、Inositol の欠乏が CL/P の発生のリスクファクターとなり得るとの疫学調査が報告された(Myoinositol, glucose and zinc status as risk factors for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in offspring: a case-control study. Ingrid P.C. et al, BJOG: an international Journal of Obstetrics and Gynaecology, 2004. Vol.111. 661-668)。Inositol の生体内分布として最も重要なものは、細胞膜上での細胞膜イノシトールリン脂質群 (PIs) を構成していることであり、またグリコシルホスファシルイノシトール (GPI または GPI アンカー) は細胞膜外面に存在する種々のタンパク質を膜上につなぎとめる基として知られている。PIs は細胞骨格、細胞運動、分泌などの細胞機能を

直接調節していることが明らかになりつつある (Itoh T, et al, Autophosphorylation of type 1 phosphatidylinositol phosphate kinase regulates its lipid kinase activity. J Biol Chem, 275, 19389-19394, 2000)。以上のことから Inositol の生体内分布としてもっとも重要なものが細胞膜の構造体イノシトールリン脂質であることを考えると、その表面より Actin 線維を介して成長する Filopodia に Inositol が強い影響を与えている可能性が考えられ、結果的に Inositol の欠乏が口蓋裂の発生を誘起している可能性が推察されるのである。

#### 2. 研究の目的

そこで本研究では、イノシトールと口蓋裂形成の関連性を解明することを目的として計画した。

口蓋裂発生機序に関する研究において、口蓋突起接着・癒合のメカニズムに注目した報告は多いが、生体内の Inositol の動態と口蓋突起癒合時に出現する Filopodia との関連を検討したものはこれまでになく、さらに口唇口蓋裂に関する予防法では、現在葉酸摂取による方法が中心であるが、葉酸のみでは口蓋裂の予防が不十分である。そこで追加プログラムとして Inositol を併用した予防法につながり、今後の臨床応用に効果が期待できると考えられる。さらに、Inositol はシクロヘキサンの各炭素上の水素原子がひとつずつヒドロキシ基に置き換わった構造 (1,2,3,4,5,6-シクロヘキサンヘキサオール) を持つ、シクリトールの一種で甘味を持つ物質である。Inositol は生体に必須のビタミン群であり、現在では Vitamin B 群の一種と考えられ、穀物の糠や豆、果物や肉や魚と広く含有される。また、セロトニン異常に起因するうつ病、パニック障害、強迫性障害に有効とされる研究結果もある。そのため Inositol の局在が明らかになれば口蓋裂発生予防につながるだけでなく、全身へ与える影響を検討する一助になる可能性も考えられる。

#### 3. 研究の方法

##### (1)投与量の決定

ヒトにおけるイノシトール投与量は 400mg/kg であり、これを A/J マウスへ投与する体積量を決定する。マウス 1 回あたりの投与可能体積量は、0.5ml が限度であるため、A/J マウス 1 頭当たり、30~40g とすると、 $400 \text{ mg/kg} \times 0.03 \text{ kg} \sim 400 \text{ mg/kg} \times 0.04 \text{ kg} \Rightarrow 12 \text{ mg} \sim 16 \text{ mg}$  の投与が必要となる。そのため、0.1 ml 当り、4 mg の投与が必要となる  $\Rightarrow 100 \text{ ml}$  当り 4000 mg (4 g) のイノシトールを溶解し、10 ml 当り 400 mg (0.4 g) の溶液を作成、体重ごとに投与を行った。

##### (2)マウスの飼育

口唇口蓋裂自然発生系である A/J マウスは、未經産マウス週齢 4 週以上のものを中部化学資材より購入し、愛知学院大学歯学部動物実験室に搬入した。搬入後 1 週間の待機期間を経て、メイティングを行った。それまではコントロール群、投与群ともに水道水と餌 (CE-1) を自由摂取させていた。その後、それぞれ♀2-3 匹に対し♂1 匹を同ケージにし、午後 8 時より午前 8 時までの 12 時間メイティングを実施、すみやかに♀1 匹ずつをケージに分けて、妊娠した♀マウスを実験に使用した。

(3) イノシトール  
シグマ社製イノシトールを使用した。

(4) 投与時期  
上記①の投与量に従い、特にマウスの口蓋形成期が GD9.5 と報告されているため、その前後である GD9、10、11 の 3 日間投与を行った。

(5) 試料の観察  
GD18 に母獣を頸椎脱臼し、胎仔を取り出し、観察を行った。得られた試料は頭部のみホルマリンに浸漬し保存した。

#### 4. 研究成果

(1) コントロール群  
コントロール群は、母獣 16、着床数 147 (平均着床数 8.1)、死亡吸収数 18 であり、口唇・口蓋裂 (CL/P) は 12 であった。このうち両側性口唇口蓋裂 (BCLP) 7、片側性口唇口蓋裂 (UCLP) 1、口蓋裂のみ (CP) 4 であった。

(2) イノシトール投与群  
一方イノシトール投与群は、母獣 18、着床数 110 (平均着床数 6.1)、死亡吸収数 16 であり、CL/P は 5 であった。このうち CLP が 0、BCLP が 2、CP が 3 であった。

(表 1 : 死亡吸収数の下段は%)

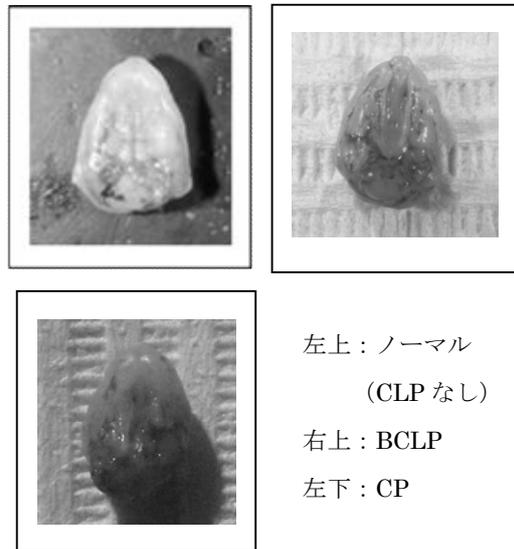
	着床数	死亡・吸収数
control	147	18
		12.24
inositol	110	16
		14.55

(表 2 : それぞれの下段は発生率%)

	UCLP	BCLP	CP	CL
control	1	7	4	0
	0.68	4.76	2.72	-
inositol	0	2	3	0
	-	1.82	2.73	-

(3) 口唇口蓋裂発生数に関する考察  
コントロール群と比較し、イノシトール投与群では、口蓋裂単独の発生は変化なかったものの、両側性口唇口蓋裂の発生率は低い傾向を示した。また、イノシトール投与群は片側性口唇口蓋裂の発生が 1 例もなかった。このように発生頻度のみでの検討ではあるが、イノシトールは、①口唇裂の発生抑制に何らかの予防的効果があるのではないかと、②特に両側性のような障害が重度となる口唇口蓋裂において抑制効果が認められると考えられることから、イノシトールは臨床的にも有用な予防因子として使用可能である可能性が示唆された。

#### 得られた組織標本の観察



左上 : ノーマル  
(CLP なし)  
右上 : BCLP  
左下 : CP

(4) コントロール群およびイノシトール投与群における妊娠経過と標本の観察における

#### 4. 研究成果

考察  
コントロール群に比較して、ノーマル群での母獣の体重や胎仔の体重にも明らかな影響は認められなかった。死亡吸収数についても特に有意差は認められなかった。妊娠経過についても明らかな差は認められなかった。また得られた組織標本では、実態顕微鏡下での観察においてそれぞれ口蓋裂の幅や表面性状に明らかな変化は認められなかった。両側性口唇口蓋裂においても、口唇形態や口蓋裂の状態に差は認められなかった。以上のことから、イノシトール投与による妊娠マウスへの影響は①妊娠経過や胎仔への体重増減などの明らかな変化はみとめられなかった、②コントロール群、イノシトール群どちらの口唇口蓋裂、あるいは口蓋裂の形態をみても、あきらかな器質的变化は確認できなかった、つまり、イノシトールは特に両

側性口唇口蓋裂の発生を抑制する効果が認められたが、全身的な影響はほとんどなく、また予防できなかった口唇口蓋裂に関しても、コントロール群と比較し変化はなかったことから、少なくとも両側性のような重度の口唇口蓋裂を予防するには非常に有用な予防方法につながると考えられた。

今後は得られた試料をもとに、さらなる研究を実施し、イノシトールがどの機転で両側性口唇口蓋裂の予防効果を発現しているかを検討する必要があると考えている。