

平成 26 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592926

研究課題名(和文)口蓋裂発症における酸化ストレスの関与

研究課題名(英文)Effects of oxidative stress to pathogenesis of cleft palate.

研究代表者

山田 朋弘 (Yamada, Tomohiro)

九州大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60335619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：口蓋裂発症における酸化ストレスの影響を調べるため、酸化ストレス誘発剤投与による口蓋裂発生と生体内酸化ストレスの検討を行った。酸化ストレス誘発剤としてTCDD、ステロイドおよびLPSとD-ガラクトサミンを使用した。その結果、母体内(特に肝)だけの酸化ストレスでは口蓋形成に大きな影響はないと考えられた。そこで、酸化ストレスモデルとして、TCDD投与マウスを用いたところ、骨関連タンパクおよび筋芽細胞の分化マーカーの低発現が認められたことから、TCDDは口蓋の癒合障害に加え、骨および筋形成を障害し癒合後の離開を誘発することで口蓋裂を発症させることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To examine effect of the oxidative stress in the cleft palate pathogenesis, some oxidative stress inducers, i.e. TCDD, steroid, LPS, and D-galactosamine, were administered to pregnant mice. As a result, it was thought that palatogenesis was not received much effect by the oxidative stress only within the dam (liver in particular). Therefore TCDD administration mice were used as oxidative stress model. Because underexpression of osteogenesis-related protein and the myoblastic differentiation marker was observed, it was suggested that TCDD can induce cleft palate by dehiscence after the palate union with osteo-, and myogenesis suppression, in addition by the mechanism of palatal fusion inhibition.

研究分野：外科系歯学

科研費の分科・細目：基盤研究(C)

キーワード：口蓋裂 酸化ストレス 口蓋骨 軟口蓋 TCDD

### 1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスとは、生体内における活性酸素産生と抗酸化システムとのバランスが崩れ、酸化に傾くことをさす。酸化ストレスは生体成分の脂質、タンパク質、DNAを産生変化させ、細胞及び組織を障害する。酸化ストレスはがん、糖尿病、動脈硬化、アルツハイマーなど多岐にわたる疾患の原因になりうるとされており、主に研究されているのは高齢者における疾患である。しかしながら、化学物質に暴露された妊娠動物は容易に酸化ストレスにさらされ、特に胎盤は酸化ストレスに対する感受性が高いことが報告されている (Ejima et al. *Biol Reprod* 62, 2000)。われわれはこれまでにダイオキシン類がマウスに高率に口蓋裂をひきおこすことに注目し、その発生メカニズムについて研究を行ってきた。ダイオキシン類は主として肝シトクロム P450 によって代謝されるが、その際大量の活性酸素が発生する。従って、ダイオキシン投与マウスは極めて強い酸化ストレスにさらされていることとなり、口蓋裂発症メカニズムの大きな要因となりうると考えられる。ホモスチニンによる酸化ストレスが口蓋裂の原因になるとの報告もあり (Knott et al. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 39, 2003)、酸化ストレスと口蓋裂発症との関連は深いと思われる。

### 2. 研究の目的

最近の報告では酸化ストレスが骨代謝を抑制することがいわれており (Li et al. *Med Biol* 154, 2010)、口蓋形成期の強い酸化ストレスは口蓋骨の形成を抑制し、口蓋突起の成長抑制あるいは癒合後の崩壊を惹起することで口蓋裂を発症させる可能性が考えられる。この仮説を検証するために本研究を計画した。

### 3. 研究の方法

まずマウスへの酸化ストレス誘発剤投与による口蓋裂発生と生体内酸化ストレスの検討を行った。酸化ストレス誘発剤として、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo dioxin (TCDD)、ステロイド (プレドニゾロン) および lipopolysaccharide (LPS) と D-ガラクトサミンを使用した。各薬剤は妊娠 12 日目に胃管あるいは腹腔内注射により投与した。胎生 18 日目に母獣を安楽死させ、母体肝臓、胎盤、胎仔肝臓、胎仔口蓋組織を摘出し、実験に供した。その結果、TCDD では 40  $\mu$ g/kg でほぼ

100%口蓋裂が発症したが、プレドニン 10mg では平均 43%の発症率であった。一方、LPS はD-ガラクトサミンを加えても、胎仔死亡率が上昇するだけで、ほとんど口蓋裂は発症しなかった。従って、母体内 (特に肝) だけでの酸化ストレスでは口蓋形成に大きな影響はないと考えられた。そこで、2012 年度は TCDD 投与マウス胎仔の口蓋試料より連続切片を作成し酸化ストレスのマーカーである 4-ヒドロキシ-2-ノネナル (4-HNE) の発現を確認した。従って酸化ストレスモデルとして、以後 TCDD 投与マウスを用いることとした。

10-12 週齢の ICR マウスの妊娠 12.5 日目に TCDD を 40 mg/kg 経口投与し、妊娠 14.5 日に胎仔口蓋組織を摘出して連続切片を作製するとともにタンパクを抽出した。その後、上皮基底膜マーカーである laminin, collagen IV, 骨形成マーカーである osteopontin, Runx2, 筋芽細胞マーカーである MyoD, desmin, TCDD およびエストロゲン受容体である AhR および ER- $\alpha$  の発現を免疫組織化学染色および Western blot 法にて解析した。

### 4. 研究成果

#### 1) 口蓋癒合後の解離による口蓋裂

胎生 14 日から口蓋突起の癒合が始まり、15 日目には 100%の口蓋で癒合が完了していた。TCDD 投与マウスにおいては、胎生 14~16 日で 3 - 18 % の口蓋に癒合が認められたが、胎生 17, 18 日では 100%のマウスが口蓋裂であった (Fig. 1)。

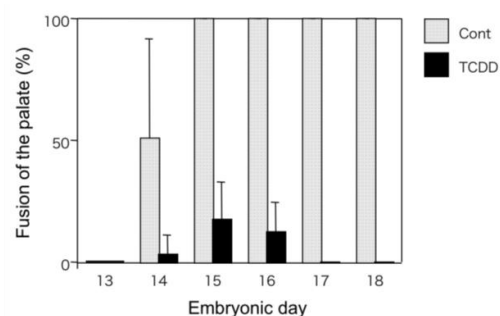


Fig. 1. Palatal fusion rate in normal and TCDD-treated mice.

TCDD 投与マウスにおける代表的な口蓋形態と軟口蓋部の組織切片を Fig. 2 に示す。胎生 15 日では一部の口蓋では癒合が認められたが (A, D)、16 日目では正中中部が薄くなり (B, E)、17 日目以降では全個体が口蓋裂であった (C, F)。

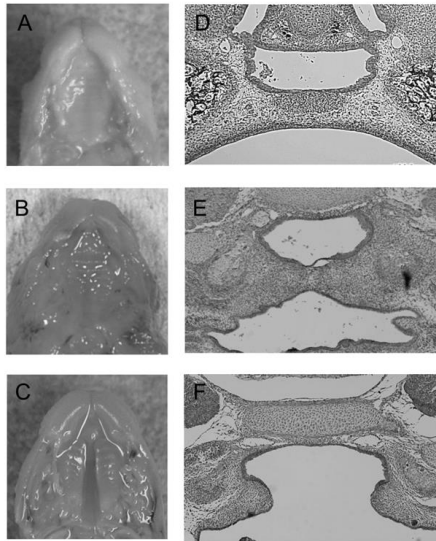


Fig. 2. Post-fusional split of the posterior palate causes cleft palate in mice.

### 2) 上皮基底膜に対する TCDD の影響

口蓋の強度を規定する因子として上皮基底膜に着目し, type IV collagen および laminin の局在を免疫組織化学的に検討した。TCDD 投与群とコントロール群の間に明らかな差は認められなかった (Fig. 3)。

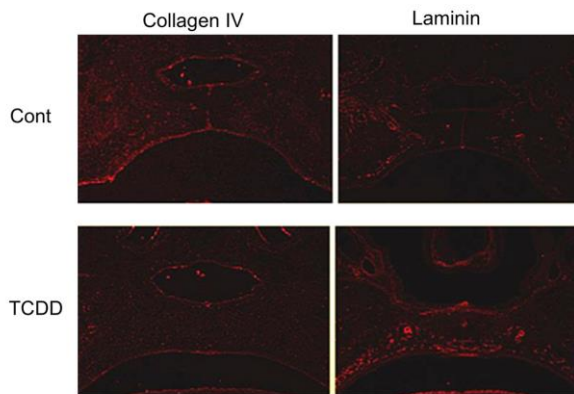


Fig. 3. Collagen IV and laminin expression in the palate of TCDD treated mice.

### 3) 口蓋骨形成に対する TCDD の影響

骨芽細胞および骨形成のマーカーとして, Runx2 および osteopontin (OPN) の口蓋骨における発現を検討した。免疫組織化学的な局在の検討では, Runx2 および osteopontin は TCDD 投与群では発現が減弱していた (Fig. 4A, 4B)。

Western blot 法では Runx2 は口蓋後方に比べ前方での発現量が多いことが示された。また, TCDD 投与群では Runx2 および OPN の発現

低下が観察された (Fig. 4C)。

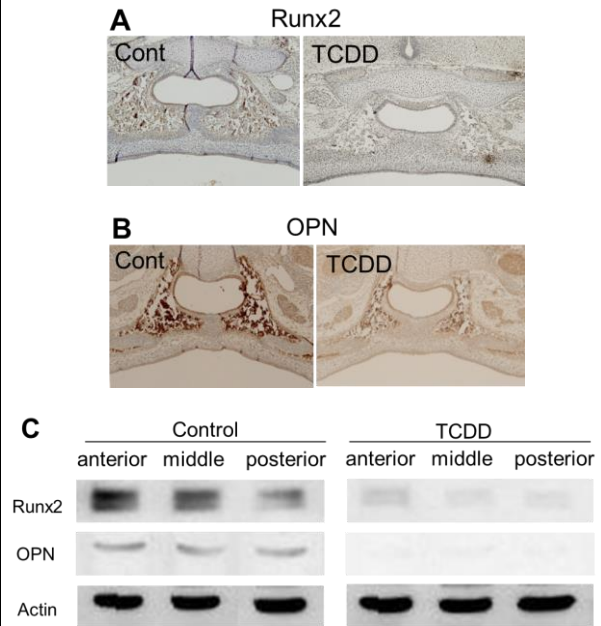
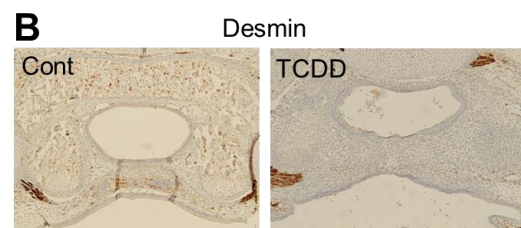
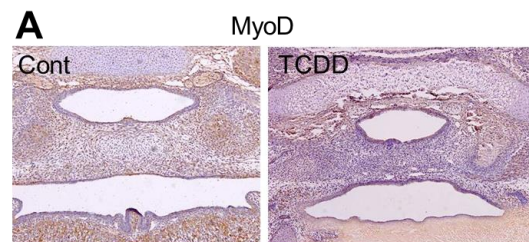


Fig. 4. Osteogenesis suppression in the palates of TCDD-treated mice.

### 4) 軟口蓋の筋形成に対する TCDD の影響

筋芽細胞のマーカーとして MyoD および Desmin の軟口蓋における発現を検討した。MyoD および desmin はコントロール群では軟口蓋に局在が認められたものの, TCDD 投与群では消失していた (Fig. 5A, 5B)。

Western blot 法では, Desmin は口蓋前方に比べ後方での発現量が多いことが示された。TCDD 投与群では MyoD および desmin の発現低下が観察された (Fig. 5C, 5D)。



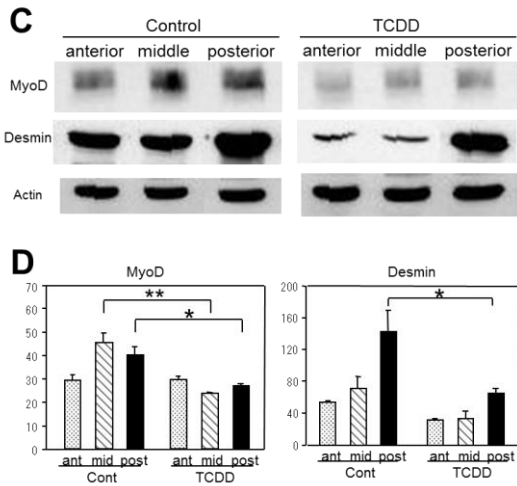


Fig. 5. Myogenesis suppression in the palates of TCDD-treated mice.

### 5) 口蓋における Ah レセプターおよび エストロゲンレセプターの局在

TCDD は AhR を介して作用をおこすこと、ER を攪乱すること、ER は骨代謝に関連し骨形成を抑制することが報告されていることから、AhR および ER- $\alpha$  の発現を免疫組織化学的に検討した。その結果、AhR および ER- $\alpha$  ともにコントロール群では口蓋骨に広く発現されていた。TCDD 投与により AhR は筋組織にも局在するようになり、一方 ER- $\alpha$  は骨での局在が消失した (Fig. 6A, 6B)。

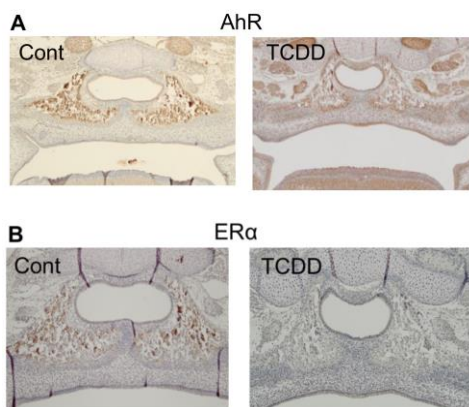


Fig. 6. AhR and ER- $\alpha$  expression in the palates of TCDD-treated mice.

### 結 論

TCDD による口蓋裂発症の機序として、口蓋の癒合阻害に加え、骨および筋形成阻害による癒合後の口蓋離開が関与する可能性が示唆された。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

① Yamada T, Hirata A, Sasabe E, Yoshimura T, Ohno S, Kitamura N, Yamamoto T, TCDD disrupts posterior palatogenesis and causes cleft palate. J Craniomaxillofacial Surgery 査読あり, 42(1), 2014, 1-6.

[学会発表] (計 1 件)

山田朋弘, 平田あずみ, 井村英人, 大野清二, 笹部衣里, 仙頭慎哉, 村田智子, 北村直也, 山本哲也, TCDD による口蓋後部の形成異常と口蓋裂発症との関わり 第 58 会日本口腔外科学会総会・学術大会, 2013. 10. 11-13

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

山田 朋弘 (YAMADA, Tomohiro)  
九州大学・大学院歯学研究院・准教授  
研究者番号: 6 0 3 3 5 6 1 9

#### (2) 研究分担者

山本 哲也 (YAMAMOTO, Tetsuya)  
高知大学・教育研究部医療学系・教授  
研究者番号: 0 0 2 0 0 8 2 4

笹部 衣里 (SASABE, Eri)  
高知大学・教育研究部医療学系・助教  
研究者番号: 4 0 3 6 3 2 8 8