

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792098

研究課題名（和文） 遺伝要因と環境要因の複合作用による口唇裂研究モデルの新規構築

研究課題名（英文） The novel study model of cleft lip established by the interaction between genetic and environmental factors in mice

研究代表者

中富 満城（NAKATOMI MITSUSHIRO）

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：10571771

研究成果の概要（和文）：*Msx1* 遺伝子変異（遺伝要因）を有するマウスの妊娠母獣を低酸素濃度下（環境要因）で飼育した結果、変異型の胎仔は野生型の胎仔と比較して有意に高確率で口唇裂を発症した。本研究の成果により従来理論的に提唱されてきた先天異常発症に関する遺伝子-環境多因子閾値モデルの具体的な実証が可能となった。本研究で確立された実験系は今後の口唇口蓋裂発症機構の解明に向けて有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：As a result of keeping a pregnant mouse carrying the gene mutation of *Msx1* under low oxygen environment for a certain period, mutant embryos exhibited the statistically higher frequency of cleft lip than wild-type embryos. Our results clearly demonstrated a concrete example of gene-environmental multifactorial threshold model, which has been theoretically advocated to explain a cause behind congenital anomalies. Our newly established experimental system would be of value to reveal the mechanisms of cleft lip and palate in the future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口唇裂、口蓋裂、先天異常、遺伝要因、環境要因、マウス、顔面発生

1. 研究開始当初の背景

ヒトやマウス等の哺乳類の胎生期の顔面発生過程において、内側鼻突起と外側鼻突起および上顎突起の三者が癒合して上口唇領域が形成され、左右の口蓋突起が癒合して二次口蓋が形成される。口唇裂や口蓋裂はこれらの突起の伸長不全や癒合不良により生じ、全身の先天異常の中でも特に高頻度で起こる。ヒトにおいてはその発症率の人種差が知られており、日本人を含む北東アジアで最も高い発症率を呈する。従って日本で口唇口蓋

裂の研究を進める事は高い臨床的意義を有すると考えられる。

口唇口蓋裂の発症には遺伝的要因と環境的要因の双方が重要な役割を果たすと考えられており、遺伝子-環境多因子閾値説が提唱されている。口唇口蓋裂患者の遺伝子変異解析により、リスク遺伝子として *MSX1*・*TGFA*・*TGFB3*・*FGFR1*・*IRF6*・*PVRL1*・*TBX22* 等が報告されている。環境要因としては母体の薬物摂取・低酸素・低栄養・喫煙・飲酒・X線曝露・紫外線曝露等が挙げられる。

従前は遺伝子変異マウスの解析（遺伝要因のみ）や妊婦の喫煙の影響についての疫学的調査等の研究（環境要因のみ）が個々に為されていたが、遺伝要因と環境要因を組み合わせた多因子閾値説の検証実験系は充分に得られていなかった。

本研究で着目した *Msx1* 遺伝子はホメオボックス型転写因子をコードし、ヒトにおいて *MSX1* 変異による非症候群性（孤発性）口唇口蓋裂の症例が多数報告されている。しかし哺乳類の顔面形成過程における *Msx1* の役割については未解明のままであった。研究代表者らは *Msx1* とペアードドメイン型転写因子である *Pax9* との二重変異マウスが口唇裂を発症する事を初めて明らかにし、顔面発生における遺伝子-遺伝子相互作用について研究を進めてきた (Nakatomi *et al.*, *Dev Biol*, 340:438-439, 2010)。未だ不明な点が多い口唇口蓋裂の発症機構についての研究を更に進展させる事により、ヒトにおける将来的な予防法および治療法の開発や発症リスクの適切な管理法の確立に資すると考えられ、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究ではまず顔面発生に重要な役割を果たす事が知られている *Msx1* 遺伝子の詳細な発現パターンを明らかにする。次に発生過程における遺伝子-環境多因子閾値モデルを具体的に実証するべく、これまでに充分確立されていなかった遺伝要因と環境要因を組み合わせた顔面発生研究モデルの新規構築を試みる。

3. 研究の方法

(1) 顔面原基における *Msx1* 発現領域の解析

Whole-mount および Section *in situ* hybridization 法により、胎齢 10 日目および 11 日目のマウス胎仔顔面原基における *Msx1* の発現領域を同定した。

(2) 顔面発生過程における遺伝-環境相互作用の解析

本研究においては遺伝要因として *Msx1* 変異マウスを、環境要因としてフェニトイン投与と低酸素濃度下での飼育を各々用いた。実験に先立ち本学動物実験倫理委員会に計画を申請し、審査の上で承認を得た。

なお *Msx1* ホモ接合体（以下 *Msx1^{+/+}*）は二

次口蓋裂を必発するが、口唇裂は発症しない。また全ての歯胚の発生が蕾状期で停止し、出生直後に死亡する。一方 *Msx1* ヘテロ接合体

（以下 *Msx1^{+/-}*）は特段の表現型を示さず野生型とほぼ同等あり、生後も生存可能である。従って本研究においては口唇裂の解析の為に *Msx1^{+/-}* の雌雄を交配して *Msx1^{+/-}* の胎仔を得た。また口蓋裂の解析の為に *Msx1^{+/-}* の雄と野生型の雌を交配して *Msx1^{+/-}* の胎仔を得た。

① フェニトインの催奇形性解析

フェニトイン（ヒダントイン）は臨床的に広く用いられている抗てんかん薬であるが、妊婦のフェニトイン摂取により胎児に口唇口蓋裂をはじめとする種々の先天異常が生じる事例が報告されている（胎児フェニトイン症候群）。近年の研究によりフェニトインは心室頻拍およびそれに伴う低酸素状態を引き起こす事が明らかとなった。そこで本研究においては *Msx1* 変異マウスの妊娠母獣にフェニトインを腹腔内投与して母体内に低酸素環境を惹起し、胎齢後期に胎仔を摘出して変異型と野生型の間での口唇口蓋裂の発症頻度を比較した。

② 低酸素濃度の催奇形性解析

前項の実験によるフェニトインの催奇形性が主に低酸素状態の惹起によるものか、もしくはフェニトイン特有の薬理作用によるものかを峻別する為、酸素濃度調節機能付きマウス飼育ケージを購入し、酸素と窒素の混合割合を変化させる事で低酸素飼育環境を構築した。ケージ内の酸素濃度は濃度計で常時モニターした。*Msx1* 変異マウスの妊娠母獣を一定期間低酸素下で飼育し、胎齢後期に胎仔を摘出して前項と同様に口唇口蓋裂の発症頻度を比較した。

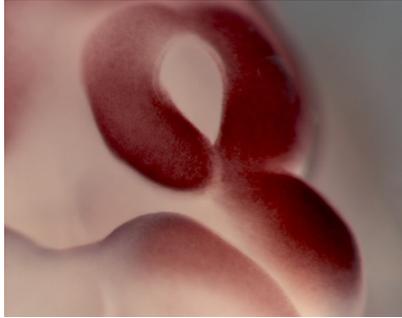
(3) 歯胚発生過程における遺伝-環境相互作用の解析

顔面発生と歯胚発生は共に上皮-間葉相互作用により進行し、Shh・Bmp・Fgf・Wnt 等多くのシグナル分子が共通して用いられる。*Msx1* は歯胚間葉に発現する事が知られている為、歯胚発生について得られる知見も顔面発生の分子メカニズムの理解に資すると考えられた。そこで遺伝要因と環境要因の複合作用が歯胚発生に及ぼす催奇形性についても同様に解析した。

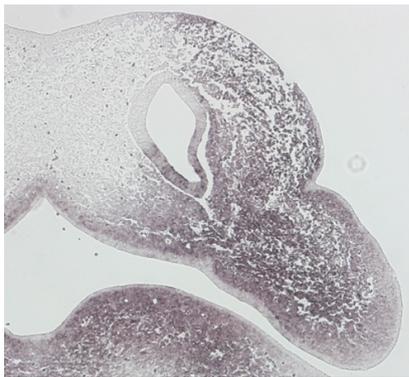
4. 研究成果

(1) *Msx1* の正常発現パターン

In situ hybridization 法により、胎齢 10 日目および 11 日目のマウス胎仔顔面原基において *Msx1* は内側鼻突起・外側鼻突起・上顎突起の間葉細胞に強く発現する事が明らかとなった (図 1・図 2)。



(図 1)
Whole-mount *in situ* 法による顔面原基における *Msx1* の発現領域 (濃染部)

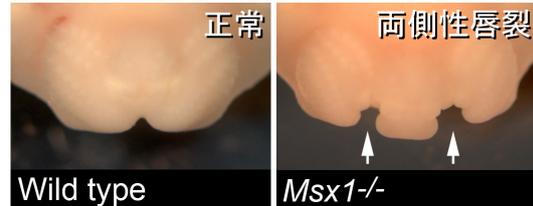


(図 2)
Section *in situ* 法による顔面原基における *Msx1* の発現領域 (濃染部)

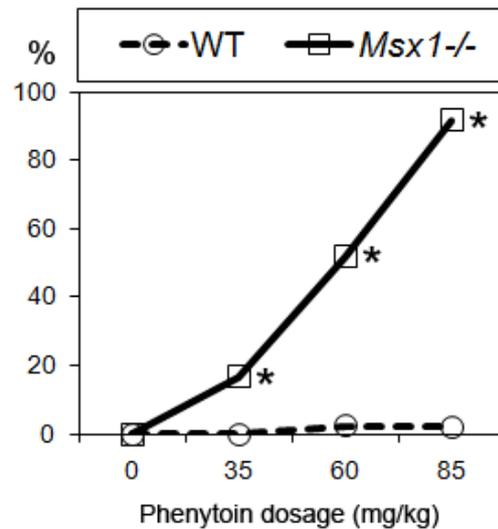
(2) ①フェニトインの催奇形性

妊娠母獣の腹腔内にフェニトインを投与後、胎齢後期に胎仔を摘出して口唇裂の発症の有無を比較した所、野生型の胎仔は最も高濃度の場合でもほとんど口唇裂を発症しなかったのに対し、*Msx1*^{-/-}胎仔は濃度依存性に有意に高確率で口唇裂を発症した (図 3・図 4)。ヒトの場合と同様に個体によって片側性もしくは両側性の口唇裂が観察された。口蓋裂についても同様に比較した所、野生型に対して *Msx1*^{-/-}胎仔は濃度依存性に有意に高確率で二次口蓋裂を発症した。これもヒトの場合と同様に完全または不完全 (部分的) な裂隙が観察された。

また異なるマウスの系統間で比較した所、BL6 系統のマウスは CD1 系統のマウスよりもフェニトインに対する感受性が高い事が明らかになった。ヒトにおいても先天奇形の発症率の人種差が知られており、遺伝的バックグラウンドの差異が環境要因に対する感受性の高低に影響を与える可能性が示唆された。



(図 3)
フェニトイン投与により *Msx1* ホモ接合体胎仔に誘導された口唇裂 (矢印)



(図 4)
フェニトイン投与による胎仔の口唇裂発症率の比較

②低酸素濃度の催奇形性

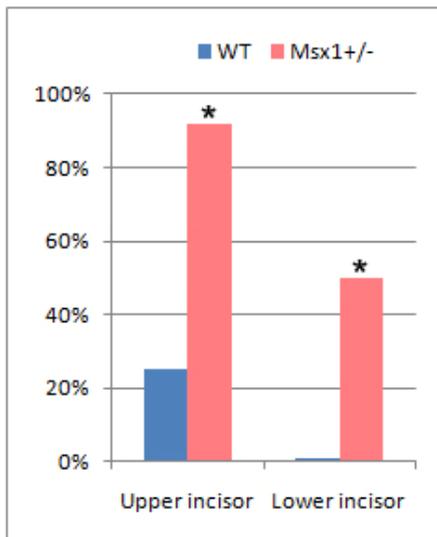
酸素濃度調節機能付きマウス飼育ケージを購入し、妊娠母獣を一定期間低酸素濃度下で飼育し、野生型と変異型の胎仔間での口唇裂の発症の有無を比較した (図 5)。その結果、*Msx1* 変異胎仔において野生型よりも有意に高確率で口唇裂の発症が観察された事から、フェニトインによる催奇形性は主として母体の低酸素状態を惹起する事によるものと推測された。



(図5)
酸素濃度調節機能付きマウス飼育ケージおよび酸素・窒素ガスボンベ

(3) 歯胚発生に対する催奇形性

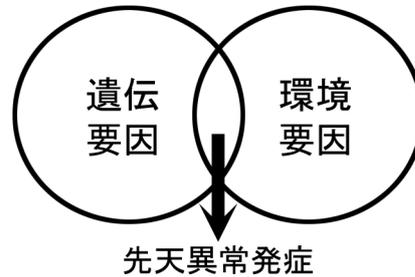
フェニトイン投与が歯胚発生に与える影響について解析した結果、切歯の歯乳頭間葉（歯髄）における著しい鬱血とそれに伴う象牙芽細胞の部分的消失が観察された。この表現型は *Msx1*^{-/-}胎仔において野生型よりも有意に高確率で発症し、下顎切歯よりも上顎切歯で顕著に認められた（図6）。また低酸素濃度下の飼育によっても同様の表現型が観察された。



(図6)
フェニトイン投与による切歯歯髄内における鬱血の発症率

以上の結果より、遺伝要因単独または環境要因単独の場合と比較して、両者が組み合わさった場合に有意に高確率で口唇口蓋裂や歯髄内鬱血が発症する事が明らかとなり、従

来理論的に提唱されてきた遺伝-環境多因子閾値モデルを具体的に実証する事が可能となった（図7）。本研究で新規に確立された実験系は今後の口唇口蓋裂や歯胚発生の研究の進展に有用であると考えられる。



(図7)
遺伝-環境多因子閾値モデルの概念図

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）

〔学会発表〕（計1件）

中富満城，依田浩子，大島勇人：遺伝要因と環境要因の複合作用が顎顔面形態形成に及ぼす影響．第118回日本解剖学会総会・全国学術集会，高松，2013.3.28-30.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中富 満城 (NAKATOMI MITSUSHIRO)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：10571771