

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24659890

研究課題名(和文)口蓋裂治療のための遺伝子データベースの応用

研究課題名(英文)Application of gene database for the treatment of cleft palate

研究代表者

阪井 丘芳 (SAKAI, TAKAYOSHI)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90379082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、新しい口蓋裂の治療を開発するために、胎仔マウスの口蓋癒合に関わるメカニズムを明らかにすることを目標としている。口蓋突起の癒合時期に合わせた遺伝子発現データベースを作製し、口蓋閉鎖に関与する可能性のある遺伝子群の発見に用いた。癒合中・癒合後に、Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1)の発現量の増加を認め、定量的real-time PCRを用いた遺伝子発現量の解析でも同様の増加が確認された。さらなるCEACAM1の口蓋癒合に対する機能解析によって将来的には新しい口蓋裂治療に発展させる予定である。

研究成果の概要(英文)：Our purpose of this study is to understand the mechanism of palatal fusion for cleft palate treatment. Gene expression database was created and applied for the discovery of genes that related to palatal fusion. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1) was identified from database and increased during and after palatal fusion. Quantitative real-time PCR confirmed the increase of CEACAM1. Functional antibody of CEACAM1 inhibited palatal fusion. CEACAM1 could be important for palatal fusion. These data regarding the interaction of CEACAM1 and palatal development would be used for future treatment of cleft palate.

研究分野：医歯薬学

キーワード：口蓋裂

1. 研究開始当初の背景

口腔顎顔面領域に披裂を生じる先天異常である口唇裂・口蓋裂は、国内の新生児約 500 人に 1 人の確率で発生し、海外における発生率は異なるが、依然頻度が高いことが報告されている。裂の程度、発生原器、披裂部位などによって様々な病態があり、原因は遺伝的要因と環境的要因の両者が複雑に関係しているとされてきた。代表研究者らは、大阪大学歯学部附属病院にて、口唇裂・口蓋裂患者の一環治療を継続している。現在の医療では、口唇裂・口蓋裂患者に対しては、成人となるまで手術治療が主体で、組織工学的、遺伝子工学的に閉鎖をはかるなどの新しい治療法が期待されているが、未だに進展していないのが現状である。

2. 研究の目的

口蓋の発生機序は胎生期において両側の上顎突起から口蓋突起が発生し、癒合するまでに、口蓋板の成長と水平転移または挙上、上皮細胞の接着と自己分解、間葉の癒合という過程で進行すると言われているが、このうちのいずれかで障害が起こると口蓋裂が発生する。本研究では、形態観察しやすいマウス胎仔口蓋形成をモデルとして用いて、口蓋閉鎖に寄与する遺伝子群を明らかにする。将来的には、組織工学的、遺伝子工学的に口蓋閉鎖をはかる新しい口蓋裂治療法を探究することを目的としている。

3. 研究の方法

まず口蓋がどのような分子機構で閉鎖し口腔を形成するかを明らかにするために、口蓋突起先端部の遺伝子発現を癒合前、癒合中、癒合後の 3 者間で比較し、既知の遺伝子、新規遺伝子も含めて、口蓋閉鎖に関わる遺伝子群を明らかにする。口蓋閉鎖を制御している遺伝子のプロファイルを作製するために、連続的遺伝子発現解析法：SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) 法を用いる (www.sagenet.org)。少量のサンプルから total RNA を抽出し、T7-based RNA amplification 法を組み合わせた T7-SAGE 法を用いて、口蓋突起上皮の癒合前、癒合中、癒合後に關する遺伝子群のデータベースを構築する。そして、その情報をもとに、それぞれの遺伝子の口蓋閉鎖・形態形成における機能を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 口蓋閉鎖に関わる遺伝子の同定

口蓋突起が接近した段階 (癒合前) 口蓋突起が癒合している段階 (癒合中) 口蓋突起が癒合した段階 (癒合後) で、突起先端部の RNA を抽出し、T7 RNA amplification

法にて RNA を増幅し、T7-SAGE 法を試みた。ライブラリー作製に予想以上に時間を要するため、マイクロアレイ法を用いた遺伝子解析を並行して行った。

(2) 口蓋癒合時に口蓋突起上皮に発現する遺伝子の発現量確認
癒合中・癒合後に、Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1) の発現が増加しており、定量的 real-time RT-PCR を用いても同様に発現量の増加を確認した。

(3) 口蓋突起癒合部に特異的に発現する遺伝子の発現分布確認
発現分布を明らかにするために、抗 CEACAM1 抗体を用いて免疫組織学的解析を行った。口蓋癒合中から癒合後にかけて、CEACAM1 が口蓋突起先端部に強く発現していた。他の遺伝子に関しては解析中である。

(4) 器官培養を用いた機能阻害実験
器官培養中に CEACAM1 の機能阻害抗体を添加したところ、口蓋突起の癒合が阻害され、CEACAM1 の口蓋癒合への関与が示唆された。細胞接着因子 CEACAM1 の器官形成に対する関与の報告は少なく、口蓋形成に関しては皆無であるために、機能的に未知の点が多い。今後、他の遺伝子群との関連を含めて、遺伝子改変マウスの解析も視野に入れながら、口蓋癒合に対する関与とそのメカニズムについてさらなる解析を進めていきたいと考えている。

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 10 件)

Tanaka N, Nohara K, Okuno K, Kotani Y, Okazaki H, Matsumura M, Sakai T. Development of a swallowing frequency meter using a laryngeal microphone. Journal of Oral Rehabilitation 39(6):411-420, 2012

Mima J, Koshino A, Oka K, Uchida H, Hieda Y, Nohara K, Kogo M, Chai Y, Sakai T. Regulation of the Epithelial Adhesion Molecule CEACAM1 is Important for Palate Formation. PLoS ONE 8(4), e61653, 2013

Ueda N, Nohara K, Kotani Y, Tanaka N, Okuno K, Sakai T. Effects of the bolus volume on hyoid movements in normal individuals. Journal of Oral Rehabilitation 40(7), 491-499, 2013.

Sakai T, Onodera T. Btd7/Cleftin regulates cleft formation and branching morphogenesis of epithelial cells. *Journal of Oral Biosciences* 55, 73-75, 2013

Okuno K, Tachimura T, Sakai T. Influences of swallowing volume and viscosity on regulation of levator veli palatini muscle activity during swallowing. *Journal of Oral Rehabilitation* 40(9): 657-663, 2013

Tanaka N, Nohara K, Kotani Y, Matsumura M, Sakai T. Swallowing frequency in elderly people during daily life. *Journal of Oral Rehabilitation* 40(10): 744-750, 2013

Okuno K, Nohara K, Tanaka N, Sasao Y, Sakai T. The efficacy of a lingual augmentation prosthesis for swallowing after a glossectomy: A clinical report. *Journal of Prosthetic Dentistry* 111(4), 342-345, 2014

Inada Y, Uchida H, Umemura Y, Nakamura W, Sakai T, Koike N and Yagita N. Cell and tissue-autonomous development of the circadian clock in mouse embryos. *FEBS Letters* 588(3), 459-465, 2014

Sasao Y, Nohara K, Okuno K, Nakamura Y, Sakai T. Videoendoscopic diagnosis for predicting the response to oral appliance therapy in severe obstructive sleep apnea. *Sleep Breathing* 18(4), 809-815, 2014

Obana-Koshino A, Ono H, Uchida H, Miura J, Nakamura W, Nohara K, Maruyama Y, Hattori A, Sakai T. Melatonin inhibits embryonic salivary gland branching morphogenesis by regulating both epithelial cell adhesion and morphology. *PLoS ONE*: 10(4), e0119960, 2015

[学会発表](計 19 件)

Okuno K, Nohara K, Wakasugi Y, Sakai T. Comparison of swallowing reflex during sleep and while awake, The 20th Annual Dysphagia Research Society Meeting, Toronto, Canada, March 8-10, 2012

Sakai T, Mima J, Koshino A, Uchida H, Kogo M, Nohara K, Hieda Y. The Potential Role of Ceacam1 in Folic Acid-Related Mouse Embryonic Palatal Fusion, The 69th Annual Meeting of American Cleft Palate-craniofacial Association,

California, April 17-21, 2012

Takai E, Nohara K, Satoh K, Sugiyama C, Sakai T. Videofluorographic Study of Velar Velocity during Speech in Adults with/without Cleft Palate, The 69th Annual Meeting of American Cleft Palate-craniofacial Association, California, April 17-21, 2012

Otsuki K, Yamanishi T, Morimoto Y, Miya S., Ishihama K, Kida K, Tsuji T, Nohara K, Sakai T, Kogo M. Morphological Assessment of the Maxillary Alveolar Arch after Early Two-Stage Palatoplasty -A Modification in the Hard Palate Closure Technique, The 69th Annual Meeting of American Cleft Palate-craniofacial Association, California, April 17-21, 2012

Kida K, Yamanishi T, Otsuki K, Ishihama K, Miya S, Takai E, Satoh K, Nohara K, Sakai T, Kogo M. Postoperative Assessment of Alveolar Bone Grafting with A Combination of the Chin Bone and Beta-Tri Calcium Phosphate (Beta-TCP), The 69th Annual Meeting of American Cleft Palate-craniofacial Association, California, April 17-21, 2012

Okuno K, Nohara K, Wakasugi Y, Sakai T. Comparison of swallowing reflex during sleep and while awake. DRS 20th annual meeting, Seattle, WA, USA, March 13, 2012

Obana A, Uchida H, Miura Z, Nakamura W, Nohara K, Maruyama Y, Hattori A, Sakai T. Melatonin regulates the branching morphogenesis of embryonic salivary gland by adjusting the adhesion and morphology of epithelial cells Best Poster Presentation, The 9th Annual Meeting of Gordon Conference -Salivary Gland and Exocrine Biology-, Galveston, TX, USA, Feb 4, 2013

Uchida H, Obana A, Nakamura W, Sakai T. Demonstration of circadian oscillation in the mouse salivary glands (parotid gland, submandibular gland, and sublingual gland) in vitro, The 9th Annual Meeting of Gordon Conference ~Salivary Gland and Exocrine Biology~, Galveston, TX, Feb 4, 2013

Sakai T, Koshino A, Ono H, Uchida H, Mima J, Hieda Y, Nohara K, Koga M, Chai Y, Oka K. The relationship between CEACAM1 and TGF in palatal fusion. 12th international congress on cleft

lip/palate and related craniofacial anomalies, Florida USA, May 5-10, 2013

Sugiyama C, Nohara K, Takai E, Sakai T. A comparison of the prevalences of speech sound errors in Japanese children with or without cleft palate. 12th international congress on cleft lip/palate and related craniofacial anomalies, Florida USA, May 5-10, 2013

Sugiyama C, Nohara K, Hikage A, Miyamoto K, Koshino A, Okuno K, Sakai T. An investigation of relationship between articulation and motor coordination in individuals with cleft palate. 12th international congress on cleft lip/palate and related craniofacial anomalies, Florida USA, May 5-10, 2013

Takai E, Nohara K, Sato K, Sugiyama C, Sakai T. Videofluorographic study of velar velocity during speech and swallowing in adults with/without cleft palate. 12th international congress on cleft lip/palate and related craniofacial anomalies, Florida USA, May 5-10, 2013

Otsuki K, Yamanishi T, Yamamoto T, Fujibayashi E, Hiroishi S, Tsuji T, Seikai T, Nohara K, Sakai T, Kogo M. Cephalometric analysis of patients with complete unilateral cleft lip and palate following the early two-stage palatoplasty. 12th international congress on cleft lip/palate and related craniofacial anomalies, Florida USA, May 5-10, 2013

Hiroishi S, Yamanishi T, Yamamoto T, Fujibayashi E, Otsuki K, Isomura E, Sato K, Takai E, Sakai T, Kogo M. Treatment outcome of premaxillary osteotomy for patients with complete bilateral cleft lip and palate. 12th international congress on cleft lip/palate and related craniofacial anomalies, Florida USA, May 5-10, 2013

Kaneko N, Nohara K, Uchida Y, Ueda N, Tanaka N, Mitsuyama M, Sakai T. Effect of mucociliary transport function on incidence of aspiration pneumonia in elderly aspirators, The 22th Annual Meeting of the Dysphasia Research Society. Tennessee, USA, March 6, 2014.

Ueda N, Nohara K, Tanaka N, Okuno K, Sakai T. A comparison of the maximum hyoid velocity in healthy younger and older women. The 22th Annual Dysphagia Research Society Meeting, Nashville, USA, March 6-8,

2014

Nohara K, Tanaka N, Sakai T. Relationships between salivary flow, swallowing frequency, and GERD symptoms. The 22th Annual Dysphagia Research Society Meeting, Nashville, USA, March 6-8, 2014

Nohara K, Kaneko N, Uchida Y, Tanaka N, Sakai T. Relationship between airway clearance function and aspiration pneumonia in geriatric nursing home residents. The 4th ESSD Congress, Brussels, Belgium, October 23-25, 2014

Sugiyama C, Nohara K, Hikage A, Hishikawa A, Takai E, Kogo M, Sakai T. An investigation of relationship between articulation and motor coordination in individuals with UCLP. 71th Annual American Cleft Palate-Craniofacial Meeting, Indianapolis, USA, March 24-29, 2014

〔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

阪井 丘芳 (SAKAI TAKAYOSHI)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：90379082

(2) 研究分担者

野原 幹司 (NOHARA KANJI)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：20346167

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：