

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792233

研究課題名(和文) 口蓋突起挙上に着目した口蓋裂発症機序の解明

研究課題名(英文) Establishment of gene expression profile of palatal elevation

研究代表者

松村 香織 (Matsumura, Kaori)

九州大学・大学病院・その他

研究者番号：20615794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：口唇裂・口蓋裂は最も頻度の高い先天異常の一つであるがその原因はいまだに解明されていない。口蓋裂患者の口蓋は短く、口蓋裂発症には口蓋突起形成不全や挙上障害といった口蓋間葉における異常が深く関与しているのではないかと考え、口蓋突起挙上に関与する遺伝子を解明するため口蓋突起挙上時期の口蓋間葉における網羅的遺伝子発現解析を行った。Cell adhesion、Regulation of cell proliferation等の遺伝子群が発現上昇しており、FGFシグナル関連分子も口蓋突起挙上前後で特異的に発現上昇していたことから、口蓋突起挙上にFGFシグナル関連分子が深く関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The experiment was performed to clarify the molecular mechanism of palatal elevation for clinical treatment of cleft palate. Gene expression profile of palatal process before and after elevation was established, and some of genes that could be related to palatal elevation were identified.

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 口蓋突起挙上 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

口唇裂・口蓋裂は口唇、歯槽部、口蓋などの口腔顎顔面領域に裂を生じる先天異常である。ヒトの先天奇形の中で最も頻度の高い疾患のひとつであり、日本人では新生児約500人に1人の確率で発生する。口唇裂治療は乳児期の口唇形成術で終了するのに対し、口蓋裂治療は幼児期の口蓋形成術より学童期の言語治療および矯正治療まで一貫した長期にわたる治療が必要である。現在の治療の主体は外科的治療であり、未だに根本的解決法が存在しない。その原因の一つとして口蓋裂発生時の分子メカニズムが解明されていないことがあげられる。発症要因に関しては遺伝的要因と環境的要因からなる多因子説が有力である。環境的要因としてはこれまでに胎生期の葉酸不足や母親の年齢が指摘されているが、ヒト口蓋裂の遺伝的要因に関しては現在も発症の直接的要因となる因子については明らかになっていないのが現状である。胎生期の口蓋は左右の上顎突起より発生した口蓋突起が舌側方で伸長した後に舌の上方へ挙上し、水平転移、接合を経て癒合することで完成する。この口蓋発生段階のいずれかで障害が起こり、癒合が不完全となることで口蓋裂を発症する。

従来、口蓋裂発症機序に関する研究は癒合期の口蓋上皮に着目したものが大半であり、口蓋間葉に着目した研究は少ない。しかしながら、口蓋裂患者の口蓋は短く、口蓋突起形成不全や挙上障害といった口蓋間葉における異常も深く関与しているのではないかと考えられる。我々はこれまでの研究で、FGFシグナリングを介したMAPK経路の負の制御因子であるSprouty2に着目し、Sprouty2遺伝子欠損マウスにおいて口蓋突起挙上障害により口蓋裂が発生することを発見した。しかしながらSprouty2遺伝子欠損マウスの口蓋裂発症頻度は低く、口蓋突起挙上への関与は間接的なものと考えられ、口蓋突起挙上の分子メカニズムの解明はまだまだ不十分である。

2. 研究の目的

これまでの研究成果より口蓋突起挙上障害が口蓋裂発症への関与することが強く疑われるが、これまでの口蓋裂研究においては口蓋突起癒合時期の口蓋上皮に着目した研究がほとんどであり、口蓋突起挙上のメカニズムに関しては解明されていない。

本研究では口蓋突起挙上前後の間葉組織における網羅的遺伝子発現解析を行い、口蓋突起挙上のメカニズムの解明を目指す。また、口蓋突起挙上時期の口蓋間葉での細胞内シグナル伝達におけるSprouty2の役割についても明らかにする。

3. 研究の方法

口蓋突起挙上に関わる遺伝子のスクリーニング

口蓋突起癒合前(E13.5)のSprouty2 K0マウスおよび対照としてC57BL/6Jマウスの口蓋突起よりLaser Capture Microdissection (LCM)法を行い口蓋突起の間葉組織を選択的に採取しtotal RNAを抽出する。二本鎖cDNAの合成を行い、ハイブリダイゼーション後データスキャンを行う。Sprouty2 K0マウスのマイクロアレイのデータ解析を行い、口蓋突起挙上前後の遺伝子発現変化の大きい遺伝子に関してデータベースを作成する。

標的遺伝子の同定

口蓋突起挙上時期に特異的に発現する遺伝子のうち、口蓋突起挙上前後(E13.5～E14.5)で発現量の変動が大きく、さらにSprouty2 K0マウスと野生型マウス間で発現量に大きな差がある遺伝子を標的遺伝子として設定する。Sprouty2 K0マウスにおける口蓋間葉細胞増殖異常はFGFシグナルを介することが過去の研究から明らかになっており、FGFシグナル関連分子にターゲットを絞っていく。マイクロアレイで得られたデータを網羅的に解析するためIPAなどのソフトウェアを用いてbioinformatics解析を行う。

口蓋間葉細胞内シグナル伝達におけるSprouty2の関与

口蓋突起挙上直前(E13.5)のマウス口蓋を採取し、間葉細胞の初代培養を行う。Sprouty2 siRNA導入群、control群において細胞内シグナル伝達(特にMAPK)について、western blotting法やRT-PCR法を用いて解析する。

4. 研究成果

口蓋突起挙上時期の網羅的遺伝子発現解析

マウスの挙上前および挙上後の口蓋組織(硬口蓋および軟口蓋組織)よりRNAを採取し、DNAマイクロアレイを行った。39429遺伝子の発現を認め、カットオフ値をZ-score -2以下、2以上とし、2866遺伝子を抽出した。口蓋突起挙上直前に発現が増強する遺伝子として硬口蓋ではforkhead box N4(Foxn4)、軟口蓋ではkeratin 20などが検出された。クラスタリング施行後、口蓋突起挙上前後で発現増加した遺伝子群のGene ontology(GO)解析を行ったところ、軟口蓋ではCell adhesion, Reguration of cell proliferation等の働きを持つ遺伝子群が発現減少しているが、硬口蓋では逆に発現増加しており口蓋突起挙上時期において硬口蓋および軟口蓋で遺伝子発現パターンは異なっていることが判明した。また、口蓋裂患者では高率に心臓や耳の奇形を合併するが、GO解析にて口蓋

突起挙上直前に心臓や耳の形成に関与する遺伝子群の発現上昇を認めた。

口蓋突起挙上時期の口蓋間葉での細胞内シグナル伝達解析

口蓋由来間葉細胞において、FGF シグナルを介した MAPK(pERK1/2)は siRNA Sprouty2 群にて増強されるが、EGF 刺激下においては変化しないことを発見した。この知見は口蓋形成期の間葉細胞において、Sprouty2 が FGF シグナリングを特異的に抑制し、MAPK の調整を行っている可能性が示唆される。マイクロアレイによる解析においても FGF シグナリングが口蓋癒合時に特徴的に働いているという知見を得た。

今後他の遺伝子群も含めて、遺伝子改変マウスの解析も検討しながら、口蓋突起挙上への関与とそのメカニズムについて解析を進めていく予定である。

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0件)

[学会発表](計7件)

Kaori Matsumura, Masaaki Sasaguri, Shinsaku Arai, Seiji Nakamura.

Microarray analysis of global gene expression during palatal elevation. 12th International Congress on Cleft Lip/Palate and Related Craniofacial Anomalies, Florida, USA, May 5, 2013

Kaori Matsumura, Masaaki Sasaguri, Shinsaku Arai, Takeshi Mitsuyasu, Seiji Nakamura.

Three-dimensional evaluation of postoperative bone resorption after secondary bone grafting. 21st International Congress on Oral and Maxillofacial Surgery, Barcelona, Spain, October 21, 2013

Kaori Matsumura, Masaaki Sasaguri, Shinsaku Arai, Seiji Nakamura.

A case of Aicardi syndrome. 10th Congress of Oral and Maxillofacial Surgery, Bali, Indonesia, September 12, 2012

Masaaki Sasaguri, Shinsaku Arai, Sachiyo Hasegawa, Kaori Matsumura, Takeshi Mitsuyasu, Norifumi Nakamura Seiji Nakamura, Yuko Ogata.

Effects of intravelar veloplasty in re-pushback palatoplasty. 12th International Congress on Cleft Lip/Palate and Related Craniofacial

Anomalies, Florida, USA, May 5, 2013

笹栗正明、鈴木 陽、窪田泰孝、光安岳志、長谷川幸代、新井伸作、松村香織、森 悦秀、中村誠司
九州大学病院口唇口蓋裂クリニックにおける診療体系
第 36 回日本口蓋裂学会総会・学術大会、新潟、2013 年 5 月 26 日

光安岳志、笹栗正明、大部一成、新井伸作、松村香織、中村誠司
多発奇形症候群における口唇口蓋裂の治療について
第 24 回日本小児口腔外科学会総会・学術大会、愛知、2012 年 11 月 24 日

新井伸作、笹栗正明、窪田泰孝、光安岳志、松村香織、中村誠司
当院における口蓋裂クリティカルパスの評価
第 37 回日本口蓋裂学会総会・学術大会、佐賀、2013 年 5 月 30 日

[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：
出願年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
松村 香織 (KAORI MATSUMURA)
九州大学・大学病院・医員
研究者番号：20615794

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者

なし