

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：33902

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893271

研究課題名(和文)エストロゲンレセプター発現による口蓋突起癒合メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of palatal process fusion mechanism by estrogen receptor expression

研究代表者

加藤 大貴 (KATO, Tomoki)

愛知学院大学・歯学部・非常勤助教

研究者番号：00712803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：口唇口蓋裂自然発生系モデルマウスであるA/Jマウスを用い、口蓋形成期の口蓋部のエストロゲンレセプターの発現状態を検討することで口蓋裂とエストロゲンレセプターの関係を明らかにすることを目的に研究を計画した。口蓋形成期のマウス胎仔の口蓋部にエストロゲンレセプターの発現は認めなかった。今後は、サンプル数を増やすとともにER などの他のレセプターの免疫染色を行い、検討を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：A study was planned for the purpose of clarifying a cleft palate and the relations of the estrogen receptor by examining an expression of estrogen receptor state of the palatal part of the palatal forming phase using the A/J strain mouse which is an animal model with spontaneous cleft lip and/or palate. The expression of estrogen receptor did not accept it to a mouse embryonic palatal part of the palatal forming phase. The number of the samples is increased, and also the immunostaining of other receptors such as ER is performed, and examination is going to be performed in future.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口蓋裂 エストロゲンレセプター 予防

1. 研究開始当初の背景

口唇・口蓋裂は世界でよくみられる先天異常の一つであり、WHO によると世界中の平均で 600 人に 1 人の割合で出生し、世界の何処かで 2 分に 1 人の割合で出生すると推測されている。しかし、その発生率は人種により異なり、アジア人およびネイティブアメリカンでは 500 人に 1 人、ヨーロッパでは 1,000 人に 1 人、アフリカでは 2,500 人に 1 人の割合で出生しているとされている。日本における口唇・口蓋裂の出生率は、夏目らによると 0.144~0.206% (486~695 人に 1 人) の割合で出生している。その発生は現在、多因子疾患で説明されており、遺伝学的にメンデル遺伝方式では明確に説明できないが、家族内での再発率が高い先天異常の一つである。Sivertsen らは、ノルウェーにおける一度近親における再発危険率は口唇裂および口唇口蓋裂で 32 倍、口蓋裂では 56 倍と報告しており、特に一度近親が口蓋裂の場合の再発が高い。愛知学院大学歯学部附属病院口唇口蓋裂センターで保管している口唇・口蓋裂患者 1,843 名に対して、披裂パターンモデルを用いた口蓋裂患者の家族内発現に関する疫学的研究を行い、以下の結論を得た。口蓋裂の発端者 433 名の中で家族歴を認めた者は 37 名で、口蓋裂発端者の 8.5% に口唇・口蓋裂の家族歴が認められた。女性の口蓋裂発端者には口唇裂および口唇口蓋裂を持つ家族内発現者はいなかった。本研究により両親が口蓋裂の場合、その子供が口唇口蓋裂を持って生まれてくるのは女性のみであった。すなわち、口蓋裂の両親の子供が男性であれば、口唇・口蓋裂を発症しない可能性が示唆された。姉妹が口蓋裂の場合、発端者の裂型はすべて口蓋裂であった。性差は P1 の男性が 1 名のみで、その他は女性であった。このことから、第 1 子が女性の口蓋裂の場合、第 2 子が男性であれば、口蓋裂の出生を予防でき、口蓋裂が発症しても軽度である可能性が示唆され

た。本研究により、家族内に口蓋裂患者がいる口唇口蓋裂患者の出生には明らかな性差があることが示唆され、遺伝カウンセリングにおいて有用な情報となりうると思われた。臨床の現場においては、父母のいずれかが口蓋裂患者の場合、その両親の子供が男性である場合は口蓋裂である可能性は極めて低いと考えられた。第 1 子が女性の口蓋裂で、第 2 子が男性であれば、口蓋裂である可能性は同様に極めて低いと推定された。また、予防に関する疫学調査やその疫学データを実証する動物実験が行われている。

2. 研究の目的

われわれは披裂パターンモデルを用いた疫学調査において、口蓋裂の発生および口蓋裂の家族内発現において性差があることを報告してきた。また、われわれの先行研究にてエストロゲンの投与により口唇口蓋裂の発現が予防される可能性も報告してきた。そこで今回、ヒトにおける家族内発現率に近似しているモデルマウスである口唇口蓋裂自然発生系 A/J マウスを用い、口蓋形成期の口蓋部のエストロゲンレセプター等の発現状態および口蓋裂マウスの口蓋部のエストロゲンレセプターの発現様式、さらに性に深く関与している脳、副腎、生殖器のエストロゲンレセプター等の発現を検討することで口蓋裂とエストロゲンレセプター等の関係を明らかにすることを目的に研究を計画した。

3. 研究の方法

マウスエストロゲンレセプターの観察 観察マウス

口蓋形成期の GD14 日目に妊娠マウスを頸椎脱臼にて屠殺し、帝王切開にて取り出した胎仔マウスの灌流固定を行った。灌流固定は、摘出した胎仔を開腹・開胸し、右心房および左心房に切開を加え、されに腹部大静脈を切断し脱血口とした。そして、心尖部より左心

室に 30G の注射針を刺入し、生理食塩水を注入することで脱血させた。その後 4%パラホルムアルデヒド (PFA) を同部より注入し灌流固定を行った。灌流固定を行った標本は、ホルマリンにて保存した。

染色

採取した組織は 1 晩 4℃ で後固定する。翌日常法に従い脱水処理を行い、パラフィンに包埋した。その後、6µm の厚さで作成した切片は、脱パラフィン、再水和後に HE 染色または免疫染色を行った。

免疫染色では、沸騰させた 0.01M クエン酸バッファー中で 5 分間の抗原賦活化処理後、内在性のペルオキシダーゼを除去するために、3%過酸化水素水に 15 分間浸した。3 回の PBS 洗浄後、5%のブロックエースを用いて 30 分間室温でブロッキング処理を行い、その後、各切片にブロックエースで希釈した 1 次抗体をのせて 4℃ で 1 晩反応させた。1 次抗体としてマウス抗 ERα 抗体、ウサギ抗を使用した。翌日、PBS で希釈した 0.1% Triton X で 2 回、PBS で 1 回洗浄した後、ヒストファインキットを用いて反応を行った。PBS で 2 回洗浄後、反応は Vector NpvaRED で発色反応を行い可視化した。その後、常法に従い脱水処理を行い封入を行った。

ヒトエストロゲンレセプターの変異の同定

エストロゲンが関与していると思われる疾患患者・患者の父・患者の母を Agilent 社 SureSelect Human Exome V5 を使用してキャプチャーして HiSeq2500 を使用して全エクソームシーケンシングを行った。

このデータをヒト参照ゲノム配列 hg19 に対してマッピングをおこない、GATK <http://www.broadinstitute.org/gatk/> を用いて変異検出を行った。その後、自作ツールを組み合わせ、患者にて de novo に生じた変異を抽出し、ANNOVAR

<http://www.openbioinformatics.org/annovar/>を用いて、遺伝子定義、多型情報 (日本人 1200 人エクソーム <http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/>を含む) などの情報付加を行い評価した。

4. 研究成果

口蓋部のエストロゲンレセプターの検討

1) 口蓋部の免疫染色を行ったが、エストロゲンレセプター (ER) を口蓋形成部に認めなかった。



2) 今後は、ER などの他のレセプターの免疫染色を行うとともに、切片の範囲を広げ、検討を行う。

3) サンプルも、GD13、GD15 など増やし検討を行う。

ER 遺伝子変異と口蓋裂の検討

1) 患者のトリオのエクソーム解析に、父親唾液由来ゲノム DNA サンプルを使用することで、平均 depth として患者 99x、父 91x、母 144x と十分なデータ量を得られた。

2) 上記サンプルについて de novo 解析を行った。厳しいフィルタ条件を使用すれば 10 か所の変異まで絞り込むことができた。

3) 今後、検出された変異に対するキャピラリーシーケンシングないしアンプリコンシーケンシングにより確認実験を行う必要がある。

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 5 件)

Tomoki Kato, Meiho Nakayama, Nagato Natsume . Therapeutic management for patients with cleft lip and palate complicated by sleep apnea syndrome: A case report Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology. 2015; 27(1):56-60. 査読有

Tomoki Kato, Seiji Mizuno, Kenji Kurosawa, Satoshi Suzuki, Teruyuki Niimi, Nagato Natsume . Jacobsen syndrome associated with cleft lip: a patient report and review Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology. 2015; 27(2):236-239. 査読有

加藤大貴、井村英人、東元 健、八木ひとみ、芝崎龍典、古川博雄、新美照幸、藤原久美子、鈴木 聡、外山佳孝、南 克浩、井上知佐子、早川統子、副島英伸、夏目長門 Beckwith-Wiedemann 症候群の臨床的研究-インプリント遺伝子解析と臨床経過を中心として- 日口蓋誌、39(1)、21-27、2014、査読有

加藤大貴、古川博雄、新美照幸、鈴木 聡、外山佳孝、夏目長門 両側性口唇口蓋裂を伴った 18p モノソミーの 1 例 日口外誌、60(3)、147-150、2014、査読有

Natsume N, Kato T, Hayakawa T, Imura H. Diagnostic/genetic screening - approach for genetic diagnoses and prevention of cleft lip and/or palate. Chin J Dent Res. 2013;16(2):95-100. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

Tomoki Kato, Nagato Natsume Approach for diagnoses and prevention of

cleft lip and/or palate -Genetic Screening, Epidemiological Analysis, Animal Study- International Cleft lip and Palate Foundation 2014 Workshop, 2014.9

加藤大貴、水野誠司、古川博雄、新美照幸、井村英人、中原晋一、夏目長門：口蓋裂を合併した Russell- Silver 症候群の 1 例 . 第 54 回日本先天異常学会学術集会、2014 年 7 月 27 日、相模原

加藤大貴、太田 亨、村田幸枝、古川博雄、新美照幸、吉浦孝一郎、夏目長門： MLL2 遺伝子解析を行った歌舞伎症候群の臨床所、第 54 回日本先天異常学会学術集会、2014 年 7 月 27 日、相模原

加藤大貴、井村英人、古川博雄、新美照幸、南 克浩、杉山成司、佐藤孝至、鈴木 聡、夏目長門： Zimmermann-Laband 症候群の 1 例、第 38 回日本口蓋裂学会総会・学術集会、2014 年 5 月 29-30 日、札幌

加藤大貴、井村英人、古川博雄、新美照幸、南 克浩、佐藤孝至、杉山成司、鈴木 聡、夏目長門：口唇口蓋裂を合併した Sotos 症候群の 1 例、第 38 回日本口蓋裂学会総会・学術集会、2014 年 5 月 29-30 日、札幌

加藤大貴、井村英人、古川博雄、新美照幸、南 克浩、佐藤孝至、杉山成司、鈴木 聡、夏目長門： EEC 症候群の 2 例、第 38 回日本口蓋裂学会総会・学術集会、2014 年 5 月 29-30 日、札幌

加藤大貴、井村英人、古川博雄、新美照幸、南 克浩、鈴木 聡、外山佳孝、芝崎龍典、村田幸枝、太田 亨、夏目長門：歌舞伎症候群の臨床的研究 第 1 報 歌舞伎症候群の責任遺伝子解析を中心にして . 第 38 回日本口蓋裂学会総会・学術集会、2014 年 5 月 29-30 日、札幌

加藤大貴、古川博雄、井村英人、新美照幸、南 克浩、外山佳孝、芝崎龍典、村田幸枝、太田 亨、夏目長門：歌舞伎症候群の臨床的研究 第 2 報 口腔内所見を中心として .

第 38 回日本口蓋裂学会総会・学術集会、2014
年 5 月 29-30 日、札幌

加藤大貴、斎藤直樹、井村英人、古川博雄、
新美照幸、外山佳孝、芝崎龍典、村田幸枝、
太田 亨、夏目長門、歌舞伎症候群の臨床的
研究第 3 報 鼻咽腔ファイバースコープ所見
について . 第 38 回日本口蓋裂学会総会・
学術集会、2014 年 5 月 29-30 日、札幌

加藤大貴、井上知佐子、森 智子、岩田睦
代、斎藤直樹、古川博雄、井村英人、新美照
幸、南 克浩、村田幸枝、太田 亨、夏目長
門：歌舞伎症候群の臨床的研究第 4 報 鼻咽
腔閉鎖機能を中心として . 第 38 回日本口
蓋裂学会総会・学術集会、2014 年 5 月 29-30
日、札幌

加藤大貴、永縄 貴、船曳信行、古川博雄、
新美照幸、南 克浩、井村英人、夏目長門：
歌舞伎症候群の臨床的研究 第 5 報 外科的
矯正治療を回避し補綴治療にて良好な咬合
改善が得られた 1 例 . 第 38 回日本口蓋裂
学会総会・学術集会、2014 年 5 月 29-30 日、
札幌

加藤大貴 , 古川博雄 , 井村英人 , 新美照幸 ,
南 克浩 , 外山佳孝 , 長瀬好和 , 夏目長門：
Cohen 症候群の 1 例 . 第 38 回日本口蓋裂学
会総会・学術集会、2014 年 5 月 29-30 日、
札幌

6 . 研究組織

(1) 研究代表者 加藤 大貴

(KATO TOMOKI)

愛知学院大学・歯学部・非常勤助教

研究者番号：00712803