

令和元年6月25日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15836

研究課題名(和文) 顎顔面形成不全に関わる遺伝的要因と環境的要因の相互作用解明

研究課題名(英文) Genetic and environmental interaction for the etiology of craniofacial defect

研究代表者

黒坂 寛 (Kurosaka, Hiroshi)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：20509369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：胎生期における顎顔面の形成は複雑かつ精巧に行われ、その発生過程の不具合は口唇口蓋裂等の顎顔面形成不全の原因となる。同疾患は多因子性疾患であり、胎生期における遺伝的要因と環境的要因に大きな影響を受けて発病する事が知られている。本研究では家族性に頭蓋骨早期癒合症、多数歯アンキローシスを呈する患者や口蓋裂と先天性欠如歯を持つ患者のエキソーム解析を行い新規遺伝子変異を同定した。今後は同新規遺伝子変異の機能解析を細胞株や動物モデルを用いて行い、同疾患の病態をより詳細に解析する予定である。またレチノイン酸シグナルとエタノールの過剰投与の相互作用についても顎顔面形成不全を引き起こす新規メカニズムを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎生期における顎顔面の形成は複雑かつ精巧に行われ、その発生過程の不具合は口唇口蓋裂等の顎顔面形成不全の原因となる。同疾患は多因子性疾患であり、胎生期における遺伝的要因と環境的要因に大きな影響を受けて発病する事が知られている。本研究では顎顔面形成不全に関わる新規遺伝子変異を多数同定した。この事は将来的な同疾患の新規診断法報や治療方法の確立に大きく寄与する。

研究成果の概要(英文)：Craniofacial development is a complex process that involves sequential growth and fusion of the facial prominences. When these processes fail, congenital craniofacial anomalies can occur. Cleft palate (CP) is one of the most common congenital craniofacial anomalies in humans and can be caused by either single or multiple genetic and environmental factor(s). In this research project we have performed multiple exome sequencing in familial craniofacial disorders. From this analysis, we discovered novel single nucleotide mutation which causes amino acid transition in DLC1 (Deleted in Liver Cancer 1) in two independent families. We have also identified novel gene mutation which is related to PTH signaling pathway in familial craniosynostosis.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：顎顔面形成不全 ゲノム 稀少疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂をはじめとする顎顔面形成不全は全ての先天性疾患の約 30%に併発する事が知られており、発音、咀嚼等の機能障害や審美障害を伴い著しい Quality of Life (QOL)の低下を来す。近年、国内外問わず大規模なヒトゲノム研究やスクリーニング等より多くの顎顔面形成不全の遺伝的要因や環境的要因が明らかとなりつつある。しかし、実際には特定の環境要因に対して感受性の高い(リスクの高い)遺伝的要因の存在も示唆されており(Nat Rev Genet. 2011 Mar;12(3):167-78.) パーソナル医療を達成する為にはこのような遺伝的要因と環境的要因の相互作用を理解する事が重要である。

これまでの継続した顎顔面形成不全の病因に関する研究で顎顔面形成不全を引き起こす環境因子の一つであるレチノイン酸は違う遺伝的要因を持つ動物では同じ条件でレチノイン酸を投与しても大きく表現型に差が出る事を見出した。この事から特定の遺伝的要因と環境的要因の組み合わせは顎顔面形成不全を引き起こす可能性が高い事、その組み合わせや相互作用を探索する事により将来的な顎顔面形成不全の診断、予防に貢献可能である事が予想された。

#### 2. 研究の目的

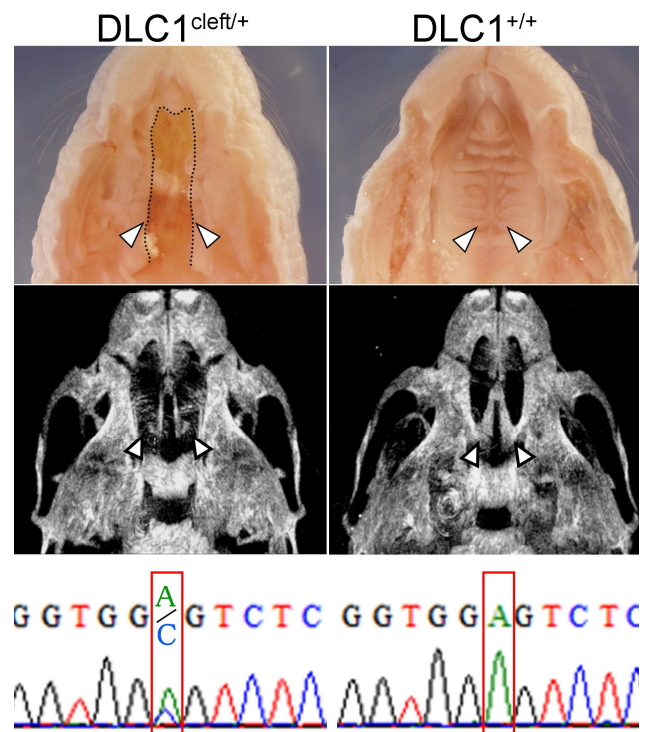
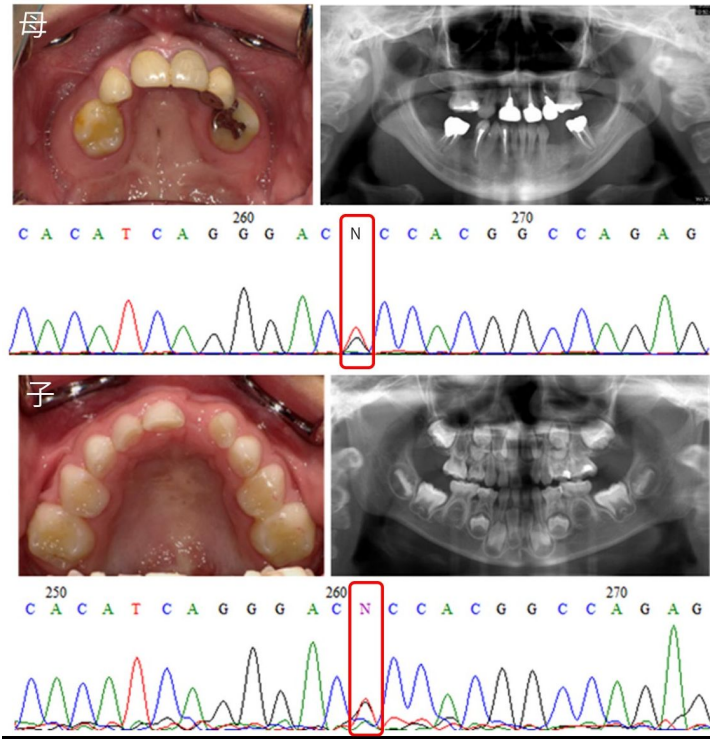
胎生期における顎顔面の形成は複雑かつ精巧に行われ、その発生過程の不具合は口唇口蓋裂等の顎顔面形成不全の原因となる。同疾患は多因子性疾患であり、胎生期における遺伝的要因と環境的要因に大きな影響を受けて発病する事が知られている。それぞれの要因における疾患発症のメカニズムは古くから研究が続けられているが、実際のヒトの発生過程では遺伝的要因と環境的要因が同時に作用する場合は殆どであり、これら二つの要因の相互作用によって起こりうる生物学的事象を解明する事は顎顔面形成不全を始めとする先天性疾患の病因を知る上で非常に重要である。本研究では様々な遺伝的要因と環境的要因の相互作用が疾患発症に至る機序を解明し、顎顔面形成不全の予防や早期発見に貢献する知見を生み出す事を目的とする。

#### 3. 研究の方法

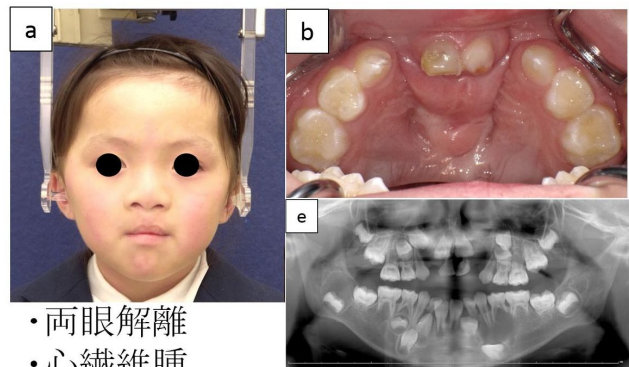
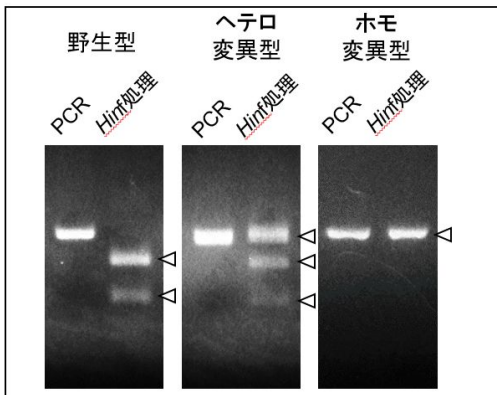
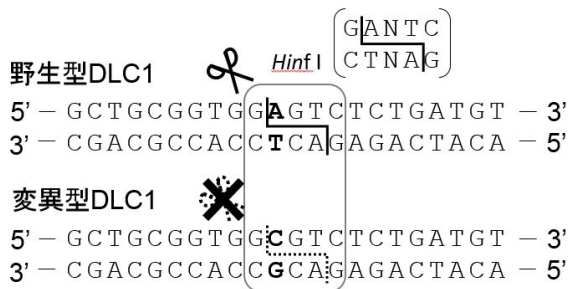
顎顔面形成不全における遺伝的要因を同定する為、家族性に症状を持つ患者からゲノムDNAを採取し、エキソーム解析や全ゲノム解析を行う。それと並行して顎顔面形成不全を引き起こす環境因子であるエタノール、レチノイン酸、煙草成分を妊娠マウスに投与し胎児に対する影響を検証する。次に患者から同定されたものと同じ遺伝子変異をゲノム編集技術を用いて動物モデルであるマウスに導入し、表現型を解析する。さらに作製した動物モデルに前述した環境因子を作用させ、表現型に対してどのような影響があるかを解析する。

#### 4. 研究成果

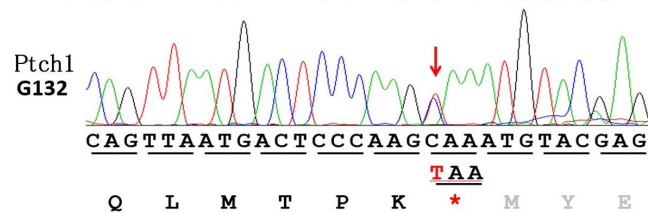
大阪大学歯学部附属病院に来院した遺伝的要因が強く疑われる口唇口蓋裂患者2家系のエキソーム解析を行い、その中でも Rho-Gap 遺伝子 family の Dlc1 遺伝子については複数の家系に渡り変異が認められた事からゲノム編集を用いてヒトと同じ変異を持つマウスを作製した(下左図)。



興味深い事に同遺伝子変異マウスの中には口蓋裂を発症するマウスが一定数存在した(上右図)。この事はD L C 1 が口蓋発生に必要不可欠な役割を果たす事を強く示唆するものである。また同遺伝子変異についてはP C R と制限酵素を組み合わせた簡便な診断方法を開発した(下左図)。また、口唇口蓋裂、多発顎骨嚢胞の症状を呈する患者の遺伝的検索を行い、新規 *Ptch1* 変異を同定して *Human Genome Variation* 誌に報告した(下右図)。



- ・両眼解離
- ・心臓腫
- ・両側性口唇口蓋裂
- ・多発性顎骨嚢胞



## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

A Novel PTCH1 mutation in basal cell nevus syndrome with rare craniofacial features  
Yuka Murata, Hiroshi Kurosaka\*, Yasuhisa Ohata, Tomonao Aikawa, Sosuke Takahata,  
Katsunori Fujii, Toshiyuki Miyashita, Chisato Morita, Toshihiro Inubushi, Takuo Kubota,  
Norio Sakai, Keiichi Ozono, Mikihiro Kogo, and Takashi Yamashiro  
Human Genome Variation In press 2019年2月 (査読有り)

Stage and tissue specific effect of cyclophosphamide during tooth development.  
Kohei Nakatsugawa, Hiroshi Kurosaka\*, Toshihiro Inubushi, Gozo Aoyama, Yukako Isogai,  
Yu usami, Satoru Toyosawa and Takashi Yamashiro  
European Journal of Orthodontics In press 2019年2月 (査読有り)

Adult patient with bilateral cleft lip and palate treated using bone graft followed by  
lateral distraction: A case report  
Ayaka Oka, Chihiro Tanikawa, Hiroshi Kurosaka, Takashi Yamashiro  
Orthodontic Waves In press 2018年11月(査読有り)

Choanal atresia and stenosis: Development and diseases of the nasal cavity.  
Kurosaka H\*  
Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology e336 2018年10月(査読有り)

Runx1-Stat3 signaling regulates the epithelial stem cells in continuously growing  
incisors.  
Sarper SE, Inubushi T, Kurosaka H, Ono Minagi H, Kuremoto KI, Sakai T, Taniuchi I,  
Yamashiro T  
Scientific reports 8(1) 10906 2018年7月(査読有り)

Runx1-Stat3-Tgfb3 signaling network regulating the anterior palatal development.  
Sarper SE, Kurosaka H, Inubushi T, Ono Minagi H, Kuremoto KI, Sakai T, Taniuchi I,  
Yamashiro T  
Scientific reports 8(1) 11208 2018年7月(査読有り)

Dentofacial characteristics in a patient with Aarskog-Scott syndrome  
Tanikawa Chihiro, Kurosaka Hiroshi, Nakatsugawa Kohei, Yamashiro Takashi  
ORTHODONTIC WAVES 77(2) 150-155 2018年6月(査読有り)

Skeletal Class II open-bite malocclusion with idiopathic condylar resorption  
Oka A, Kurosaka H, Yashiro K, Haraguchi S, Lee D, Yamashiro T  
Australian Orthodontic Journal 34(1) 85-93 2018年5月(査読有り)

Ventral neural patterning in the absence of a Shh activity gradient from the floorplate.  
Iulianella A, Sakai D, Kurosaka H, Trainor PA  
Developmental dynamics : an official publication of the American Association of  
Anatomists 247(1) 170-184 2018年1月(査読有り)

Orthodontic-Surgical Approach for Treating Skeletal Class III Malocclusion With Severe  
Maxillary Deficiency in Isolated Cleft Palate.  
Nakatsugawa K, Kurosaka H\*, Mihara K, Tanaka S, Aikawa T, Kogo M, Yamashiro T  
The Cleft palate-craniofacial journal : official publication of the American Cleft  
Palate-Craniofacial Association 1055665618777573 2018年1月(査読有り)

Rdh10 loss-of-function and perturbed retinoid signaling underlies the etiology of choanal  
atresia.  
Kurosaka H\*, Wang Q, Sandell L, Yamashiro T, Trainor PA  
Human molecular genetics 26(7) 1268-1279 2017年4月(査読有り)

Runx1 mediates the development of the granular convoluted tubules in the submandibular glands.

Ono Minagi H, Sarper SE, Kurosaka H, Kuremoto KI, Taniuchi I, Sakai T, Yamashiro T  
PloS one 12(9) e0184395 2017年(査読有り)

A quantitative method for defining high-arched palate using the Tcof1(+/-) mutant mouse as a model.

Conley ZR, Hague M, Kurosaka H, Dixon J, Dixon MJ, Trainor PA  
Developmental biology 415(2) 296-305 2016年7月(査読有り)

[学会発表](計 17 件)

Hiroshi Kurosaka, Chihiro Tanikawa, Kayo Nishimura, Shinsuke Ito and Takashi Yamashiro.  
Analyzing the variation of orthodontic treatment in patients with cleft lip and/or palate.  
The 11th Congress of the Asian Pacific Craniofacial Association. (招待講演)(国際学会)

Hiroshi Kurosaka, Qi Wang, Lisa Sandell, Masataka Kikuchi, Akihiro Nakaya and Paul Trainor.  
Critical roles of Rdh10 in craniofacial development. The 13th International Congress of  
Human Genetics. (国際学会)

Wang Qi、山城 隆、黒坂 寛. レチノイン酸シグナルと Shh シグナルの相互作用が顔面形成に及ぼす役割. 58回 歯科基礎医学会学術大会

黒坂 寛、Wang Qi、山城 隆. 口蓋発生及び後鼻孔形成におけるレチノイン酸シグナリングの生物学的役割. 第40回 日本口蓋裂学会総会・学術集会

Sarper S, Kurosaka H, Mihara K, Ono H, Yamashiro T. Cbfb is involved in the anteriorly Specific Palatogenesis. 97th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (国際学会)

Wang Q, Yamashiro T, Kurosaka H. Retinoic-acid-induced defective branchiomic muscle by downregulation of Pitx2. Japanese Association for Dental Research.

Qi Wang, Takashi Yamashiro, Hiroshi Kurosaka. Retinoic-acid-induced defective branchiomic muscle by downregulation of Pitx2. Gordon Research Conference Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration (国際学会)2017

Hiroshi Kurosaka, Yanran Wu, Qi Wang, Chisato Morita, Akihiro Nakaya, Atsuko Okazaki, Kaori Kobayashi, Masataka Kikuchi, Tomoji Mashimo, Yoshihiro Uno, Shinya Oki, Takashi Yamashiro. Gordon Research Conference Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration (国際学会)2017

黒坂 寛. Rdh10 の時期特異的な機能障害は口唇口蓋裂や後鼻孔閉鎖の原因となる. 第41回日本口蓋裂学会総会・学術大会

Wang Qi、山城 隆、黒坂 寛. レチノイン酸シグナルと Shh シグナルの相互作用が口蓋裂及ぼす役割. 第59回歯科基礎医学会学術大会

黒坂 寛、森田 知里、山城隆. 口唇口蓋裂の新規原因遺伝子 DLC1 の機能解析. 第42回 日本口蓋裂学会総会・学術集会

中津川 昂平、黒坂 寛、山城 隆. シクロホスファミド投与が多様な歯牙形成不全を誘発する. 第60回歯科基礎医学会学術大会

中津川 昂平、黒坂 寛、犬伏 俊博、山城 隆. シクロホスファミド投与がマウスの大白歯の歯胚形成に与える影響. 第77回 日本矯正歯科学会学術大会

Yanran Wu, Hiroshi Kurosaka, Qi Wang, Paul Trainor and Takashi Yamashiro.  
Investigating the role of retinoic acid signaling during upper face development. 第77回日本矯正歯科学会学術大会

岡 綾香、黒坂 寛、中津川 昂平、三原 聖美、田中 晋、古郷 幹彦、山城 隆. 著しい骨格性下顎前突および開咬を呈し、Opitz 症候群の疑いのある両側性唇顎口蓋裂の一症例. 第77回 日

## 本矯正歯科学会学術大会

磯貝 由佳子, 岡 綾香, 中津川 昂平, 黒坂 寛, 山城 隆. 歯根吸収に配慮して全顎的矯正治療を行った Turner 症候群患者の一治療例. 第 77 回 日本矯正歯科学会学術大会

村田有香, 犬伏俊博, 山本沙優里, 森田知里, 伊藤慎将, 黒坂 寛, 山城 隆. 骨細胞への分化誘導法を確立する新たなアプローチ. 第 77 回日本矯正歯科学会学術大会

〔図書〕(計 1 件)

歯科矯正学 第 6 版

黒坂 寛 (担当:分担執筆, 範囲:頭蓋および顎顔面骨の発生および成長)

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

### (2)研究協力者

研究協力者氏名: 中谷 明弘

ローマ字氏名: NAKAYA AKIHIRO

研究協力者氏名: 菊地 正隆

ローマ字氏名: KIKUCHI MASATAKA

研究協力者氏名: 真下 知士

ローマ字氏名: MASHIMO TOMOJI

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。