

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11936

研究課題名(和文) 先端的ゲノム解析法を用いた顎口腔顔面部先天異常の未知なる発生機序の解明

研究課題名(英文) Identification of the unknown mechanism of the congenital maxillofacial abnormalities using advanced genome sequence and analysis

研究代表者

伊藤 慎将 (Itoh, Shinsuke)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：40633706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：口唇口蓋裂(CLP)の発症機序を解明すべく、患者家族から協力を得て、複数のCLP家系からゲノムDNAのエクソーム解析を行った。異なる家族間で共通した変異を認めたDLC1遺伝子に着目した。

上述の家族性CLPと同様の塩基配列を有するコンディショナルノックアウトマウスを作成した。同マウスの一部に口蓋裂がみられ、口蓋骨の一部は欠如していた。DLC1は胎生11.5日齢の前頭鼻突起および神経管上皮に発現しており、さらに顎顔面発生に必須の転写因子TFAP2Aが、神経管および上顎突起の神経堤由来細胞において共発現していた。我々は顔面裂発症に関わる胚形成異常を引き起こす新たなDLC1の点突然変異を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口唇口蓋裂は種々の遺伝子異常が関与する発生頻度の高い先天異常である。哺乳障害、鼻咽腔閉鎖不全、歯牙の欠如をきたし、発音障害、顎顔面発育異常をまねく。口蓋裂の原因は多岐に及ぶが、近年遺伝子改変動物を利用した研究の発展から、飛躍的に口蓋裂発症に関わる遺伝子が報告されている。今回、複数の家族性口蓋裂から新規のDLC1遺伝子の変異を同定した。その変異を再現したコンディショナルノックアウトマウスを作成したところ、一部のマウスに口蓋裂がみられた。顎顔面形成におけるDLC1の関与が示唆され、口蓋裂発症機序の解明に寄与した。今後さらに解析を進めることで、口蓋裂の分子診断および分子治療開発の緒としたい。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the pathogenic mechanism of cleft lip and palate (CLP), we carried out exome sequencing of genomic DNA from multiple CLP families with the cooperation of patient families. We focused on the DLC1 gene, which has a common mutation among different families. We created a conditional knockout mouse with the same nucleotide sequence as the above-mentioned familial CLP. A cleft palate was observed in some of these mutant mice, and a part of the palatal bone was defected. DLC1 was expressed in the frontal nasal process and neural tube epithelium at embryonic day 11.5, and the transcriptional factor TFAP2A which is essential for maxillofacial development was co-expressed in neural crest-derived cells of the neural tube and maxillary process. We found a new DLC1 point mutation that causes embryogenesis abnormalities associated with facial cleft development.

研究分野：矯正・小児系歯学

キーワード：口唇口蓋裂 頭頸部先天異常 DLC1 ノックアウトマウス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂は種々の遺伝子異常が関与する最も頻度の高い先天異常の一つである。本疾患は哺乳障害、鼻咽腔閉鎖不全、歯牙の欠如を来し、発音障害、顎顔面発育異常をまねく。歯科領域との関わりが深い疾患であるが、歯科矯正学はその中心的役割を担う分野である。口蓋裂の原因は多岐に及ぶが、近年遺伝子改変動物を利用した研究の発展から、飛躍的に口蓋裂発症に関わる遺伝子が報告されており、徐々に細かい分子病態の解明に迫りつつある。しかし、それぞれの因子を繋ぐ分子機構は依然として未解明の部分も多い。

近年、次世代ゲノムシーケンス技術の普及に伴い、ヒトのゲノム単位での遺伝子解析が容易となり、単一遺伝子疾患だけでなく多因子疾患へのアプローチが可能となった。これまで遺伝子変異を同定するには非血族者により構成される多数のサンプルを用いた解析が主流であり、膨大な予算と煩雑な解析が必要であった。2010年には、エクソーム解析と呼ばれる新規アプローチが確立され、遺伝子疾患原因遺伝子の解明が進んでいる。エクソーム解析は全ゲノムの約1.2%を占めるエクソン領域と呼ばれるタンパク質をコードする領域全体を網羅的に解析する手法であり、比較的低コストでの解析が実現している。

2. 研究の目的

申請者の属する機関は、口唇口蓋裂を含む顎口腔顔面部に形態異常をきたす先天性疾患を有する患者の世界的な拠点病院である。本研究ではその強みを活かし、患者とその家族の協力を得て遺伝子解析を行う。家族内に健常者がいる場合には、解析結果を照合することで、より効率的に遺伝子変異や未知のSNPsを絞り込み、同定することが可能となる。顎口腔顔面領域の発生、発育に関わる新たな遺伝子・遺伝子間のシグナルを探索し、データベースの構築と新たな分子診断法の確立を図る。そして将来、臨床においては遺伝子発現に基づく、根本的でより有効な治療法へと繋がる緒となることが期待される。

3. 研究の方法

- 1) 研究協力に同意が得られた被験者およびその家族からサンプルを採取する。DNAを抽出し、シーケンス解析、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を行うことで既知や未知の遺伝子変異の同定を行う。
- 2) 同定された遺伝子変異についてゲノム編集を用いて細胞モデルによりスクリーニングを行い、表現型が変化したものについては遺伝子改変マウスを作製する。
- 3) 遺伝子改変マウスを用いて形態学的解析、分子生物学的解析を行い新たなシグナルカスケードの詳細を明らかにする。

4. 研究成果

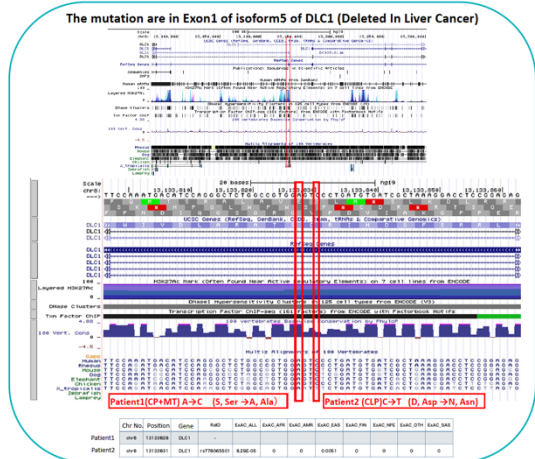
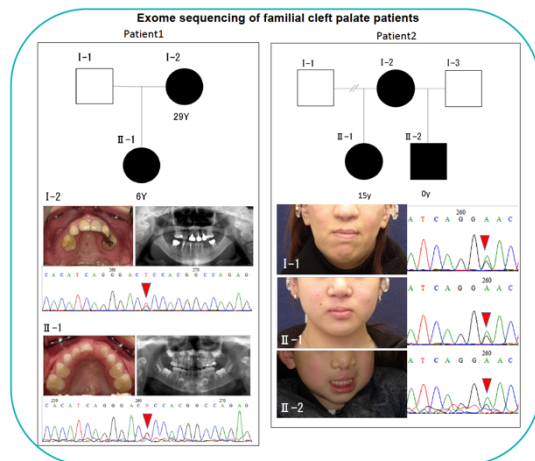
1) 複数の口唇口蓋裂家系のエクソーム解析

我々の属する大阪大学歯学部附属病院を受診している患者のうち、多数歯先天欠如を伴う口蓋裂を有し、なおかつ家族性に症状がみられる症例を抽出した。そのうち2つの家系に協力を得て、エクソーム解析を行った。

その結果、2つの家系に共通してみられた DLC1 (Deleted in Liver Cancer 1) の新規遺伝子変異を見出した<右図上>。

更に今回患者に見つかった遺伝子変異は DLC1 の Isoform 5 に特異的な exon 1 に存在し、同塩基変異は進化的にも高い保存性を示す場所において、アミノ酸置換を起こすことを見出した。また、近傍領域にはアクティブなエンハンサー領域のマーカーである H3K27Ac の免疫沈降で高いシグナルを示していた<右図下>。

また CHIP シーケンスの結果、この変異部位は多くの転写因子が結合する部位であるが、その中でも神経堤由来細胞に高発現し、それらの分化成長に大きく関与し、すなわち頭頸部形成に重要な役割をもつ転写因子である TFAP2A



(Transcription factor AP-2 alpha)のエンハンサー領域としても働いている部位であることが分かった<右図上>。

2) 野生型マウス胚における DLC1 の発現動態

胎生 13.5 日齢のマウス胚における DLC1 isoform 5 の発現を解析するために in situ hybridization を行った。

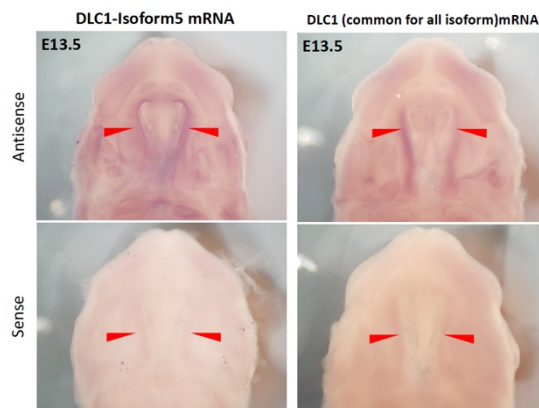
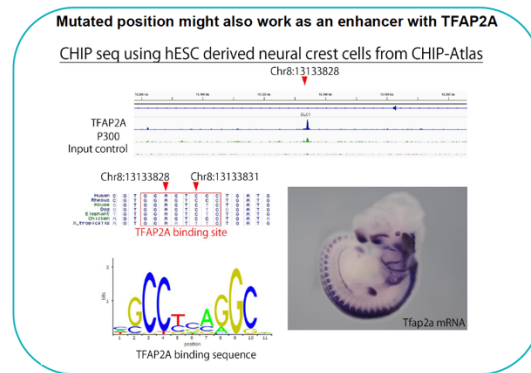
その結果、上図に示すとおり形成途中の口蓋突起に強い発現がみられた。

また、胎生 11.5 日齢および 13.5 日齢のマウス胚を用いて蛍光免疫染色による組織学的解析を行った。その結果、胎生 11.5 日齢において、前頭鼻突起および神経管の上皮に DLC1 が発現していた。また胎生 13.5 日齢においては、上皮の基底膜に沿った DLC 1 の発現がみられた<右図下>。

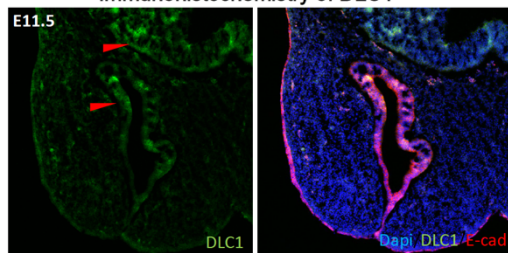
3) DLC1 と TFAP2A の発現動態

先に述べたとおり、今回我々が見出した DLC1 の変異部位は、転写因子 TFAP2A との関連が深いことから、神経堤細胞におけるそれぞれの発現動態を解析するため、胎生 9.5 日齢のマウス胚を用いて組織学的解析を行った。

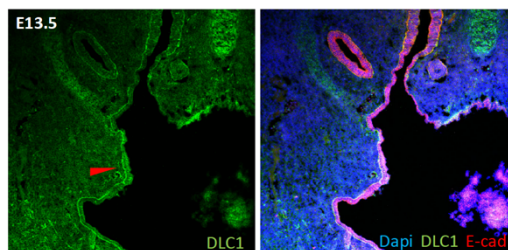
その結果、DLC1 と TFAP2A は神経管ならびに上顎突起の周囲の神経堤細胞において共発現していることが分かった<下図>。



Immunohistochemistry of DLC1

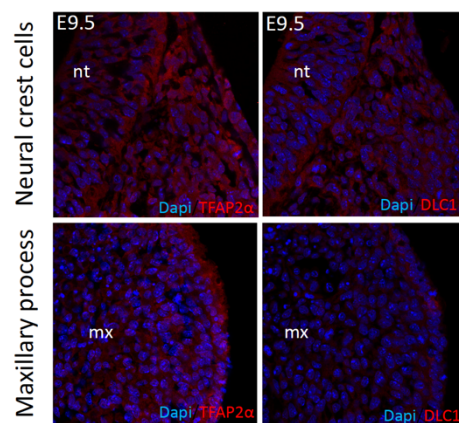


DLC1 express at the frontonasal process and neural tube



DLC1 express along the basement membrane below the epithelium

Expression of DLC1&TFAP2A in neural crest cells



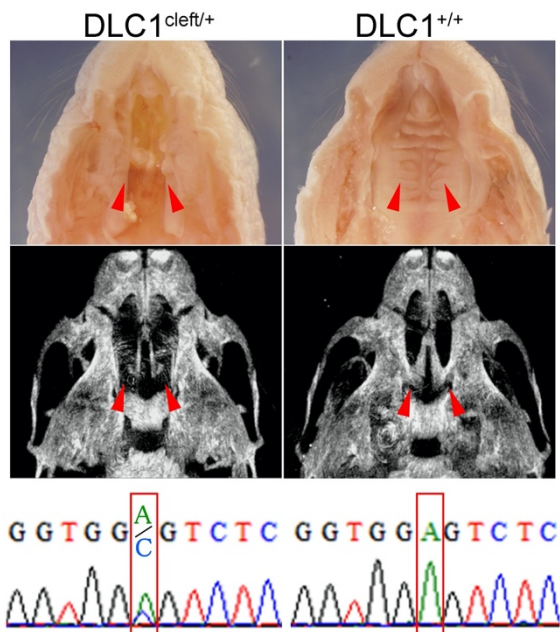
mx: maxillary process; nt: neural tube

Both TFAP2α and DLC1 express in neural neural crest cells around the neural tube and maxillary process

4) DLC1 変異マウスにみられた頭頸部奇形

今回我々が見出した DLC1 遺伝子の変異と同様の変異をもつコンディショナルノックアウトマウスを CRISPR/Cas9 のゲノム編集技術を用いて作成した。

その結果、一定の割合で口蓋裂を伴う頭頸部奇形を有するマウスが得られた。
マイクロCT撮影により、口蓋裂がみられた変異マウスの口蓋骨は一部が欠如していた。



以上をまとめると、今回家族性の口蓋裂を有する2つの家系から協力を得てエクソーム解析を行い、DLC1 遺伝子の新規変異を同定した。これと同様の変異を有する遺伝子改変マウスを作成したところ、一定の割合で口蓋裂を有していた。DLC1 遺伝子の変異部位は、頭頸部発生に重要である転写因子 TFAP2A の Binding site であったことから、その下流シグナルに影響を及ぼすことで、頭蓋顔面形成異常が生じている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Shinsuke Itoh, Hiroshi Kurosaka, Yuka Murata, Chisato Morita, Kuriko Kagitani-Shimono, Shin Nabatame, Keiichi Ozono & Takashi Yamashiro | 4. 巻 78 |
| 2. 論文標題 Analysis of craniofacial character of glucose transporter type I deficiency syndrome | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Orthodontic Waves | 6. 最初と最後の頁 151-159 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.odw.2019.10.002 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 伊藤 慎将、辻本 貴行、森田 知里、犬伏 俊博、黒坂 寛、山城 隆 |
| 2. 発表標題 ジュベール症候群を有する男児の上顎前突に対して早期治療を行った一例 |
| 3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会学術大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 森田 知里、伊藤 慎将、犬伏 俊博、相川 友直、古郷 幹彦、山城 隆 |
| 2. 発表標題 上顎骨前方形骨延長術を行った両側性口唇口蓋裂患者の長期保定症例 |
| 3. 学会等名 第43回日本口蓋裂学会総会・学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 黒坂 寛、森田知里、山城 隆 |
| 2. 発表標題 口唇口蓋裂の新規原因遺伝子DLC1の機能解析 |
| 3. 学会等名 第42回日本口蓋裂学会総会・学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山城 隆、黒坂 寛、伊藤 慎将、相川 友直 |
| 2. 発表標題 下顎前突治療における外科と矯正のチームアプローチ：大阪大学歯学部附属病院での実際 |
| 3. 学会等名 日本顎変形症学会 第14回教育研修会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 伊藤慎将、柴 大樹、森田知里、犬伏俊博、黒坂 寛、山城 隆 |
| 2. 発表標題 歯科矯正用アンカースクリューを用いたメカニクスを応用した上下空隙歯列を伴う骨格性下顎前突症例 |
| 3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 村田有香、黒坂 寛、伊藤慎将、田中 晋、相川友直、古郷幹彦、山城 隆 |
| 2. 発表標題 唇顎口蓋裂患者に対して上顎骨前方部骨延長術により歯列弓形態を改善した1症例 |
| 3. 学会等名 第28回日本顎変形症学会総会・学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 竹内優斗、伊藤慎将、古郷幹彦、山城 隆 |
| 2. 発表標題 鼻腔内に位置していた切歯骨を歯列弓内へ牽引し、前歯部被蓋を改善した両側性唇顎口蓋裂の一症例 |
| 3. 学会等名 第60回近畿矯正歯科学会学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 村田有香、黒坂 寛、伊藤慎将、森田知里、山城 隆 |
| 2. 発表標題 グルコーストランスポーター1型異常症の顎顔面口腔領域における特徴および矯正歯科治療の経過に関する報告 |
| 3. 学会等名 第60回近畿矯正歯科学会学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Shinsuke Itoh |
| 2. 発表標題 Orthodontic anchorage screws facilitate surgical orthodontic treatment in jaw deformities and cleft lip and palate patients |
| 3. 学会等名 World implant Orthodontic Conference 2017 (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 伊藤 慎将、谷川 千尋、相川 友直、古郷 幹彦、山城 隆 |
| 2. 発表標題 上顎前方形骨延長術後に歯科矯正用アンカースクリューを利用して矯正歯科治療を行った口唇口蓋裂の一症例 |
| 3. 学会等名 第27回日本顎変形症学会総会・学術大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 伊藤慎将、前田 純、森田知里、山城 隆 |
| 2. 発表標題 口唇口蓋裂を有する患者の矯正歯科治療における上顎骨前方形骨延長術と歯科矯正用アンカースクリューを応用したメカニクスの有効性 |
| 3. 学会等名 第59回近畿東海矯正歯科学会学術大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 伊藤慎将、前田 純、森田知里、黒坂 寛、山城 隆 |
| 2. 発表標題 上顎骨前方部骨延長術後、歯科矯正用アンカースクリューを応用して空隙閉鎖を行った口唇口蓋裂の一症例 |
| 3. 学会等名 第76回日本矯正歯科学会学術大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 竹内優斗、伊藤慎将、古郷幹彦、山城 隆 |
| 2. 発表標題 鼻腔内に迷入していた切歯骨を歯列弓内へ牽引し、前歯部被蓋を改善した両側性唇顎口蓋裂の一症例 |
| 3. 学会等名 第76回日本矯正歯科学会学術大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-----------|---|------------------------------------|----|
| 研究 分担者 | 黒坂 寛 (Kurosaka Hiroshi) (20509369) | 大阪大学・歯学部附属病院・講師 (14401) | |
| 研究 分担者 | 山城 隆 (Yamashiro Takashi) (70294428) | 大阪大学・歯学研究科・教授 (14401) | |