

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792394

研究課題名(和文)口蓋形成後の口蓋裂発生メカニズムについて-MEOX2遺伝子に着目して-

研究課題名(英文)The mechanism of cleft palate after palatal fusion -Effect of MEOX2-

研究代表者

井村 英人(IMURA, HIDEYO)

愛知学院大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：10513187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：マウス口蓋形成後の口蓋裂発生原因遺伝子と考えられるMEOX2遺伝子に着目し変異部位を明らかにすることを目的とする。日本人口蓋裂患者99名に対して血液サンプルからDNAを抽出し、MEOX2(NM_005924.3 exons)の遺伝子変異exon部とその前後のintron部の塩基配列をシーケンス解析した。MEOX2遺伝子のexon3部におけるアミノ酸変異を認め、MEOX2遺伝子は、頭蓋および顔面の骨格異常との関係が示唆されており、発達した口蓋や、筋形成などに影響することが知られている。本研究より口蓋裂発生にMEOX2が関連し、口蓋突起癒合後の解離に影響を与えている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cleft palate must therefore be induced by a disruption during the developmental process of the palatal shelves. We reported that some embryos appeared to develop cleft palates after palatal fusion by TCDD. On the other hand, the same present status has been reported in mesenchyme homeobox 2(Meo x2) knockout mouse. We observed MEOX2 gene from the blood of the patient of a human cleft palate. Sequence analysis was conducted to 99 Japanese cleft palate patients. Candia et al. reported that the MEOX2 gene is expressed in a wide range of mesodermal structures, including the developing limbs, groups of muscles of the head, and the developing palate. Mankoo et al. reported that MEOX2 was essential for normal muscle formation and for the normal regulation of myogenic genes, as demonstrated by the downregulation of Pax3. A possibility that the variation of MEOX2 had affected by vulnerability of palatal muscle after palatal fusion was suggested.

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 発生 MEOX2 離開

1. 研究開始当初の背景

口蓋の形成過程は、1)舌側方において垂直位に形成された2つの口蓋突起が、舌の下方移動に伴って、舌背上に挙上して水平位をとる挙上期、2)水平位となった口蓋突起は伸長し、正中において互いに接触する接触期、3)接触部の上皮細胞の接着とアポトーシスが起これり、さらに両側口蓋突起の間葉組織が結合する癒合期となり、4)上皮索の消失により癒合が完了し、口蓋が形成される。したがって、口蓋の形成過程のこれらのどこかが障害されると口蓋裂が発生すると考えられている。従来からの口蓋裂の発生メカニズムは、口蓋突起の癒合時における programmed cell death の不調によるものとする報告が一般的であるが、それに相反する報告(Int. J. Dev. Biol. 48:39-46 2004)も出されており、口蓋裂の発症メカニズムについての明確な解答は出されていない。

2. 研究の目的

私は口蓋裂の発症のメカニズムを解明するため、ダイオキシン投与によるマウス口蓋裂発症実験や口蓋の正常な発生における基底膜の関与によりそのメカニズムについての研究を行ってきた。

私の行った研究では、妊娠マウスへの臨界濃度の TCDD 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin 投与により、出生直前の胎生 18 日目に胎子を取り出すと 100%口蓋裂を発症しているにもかかわらず、胎生 14 日では 4%、胎生 15 日では 17%、胎生 16 日では 13% の口蓋突起の癒合率を示すことを認めることから、

1) TCDD 投与群では両側の口蓋突起が口蓋形成の途中で一旦癒合し、口蓋を形成したのち癒合部が何らかの要因により解離して、口蓋裂を発生するという新しい口蓋裂発生のメカニズムが考えられ、その原因を組織学的に検討した。(Imura: Effect of

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin suggests abnormal palate development after palatal fusion. Congenital Anomalies. 2010.)

2) 口蓋突起癒合部において、正常口蓋とは異なる活発な細胞増殖と、異質なアポトーシスを認める細胞塊を認め、口蓋裂との関連性が疑われた。

また癒合後の離開の原因と考えられる頭蓋骨成長にダイオキシン投与群と非投与群では差はなく、側方への成長の差による口蓋裂の発生は否定された。

また、細胞間接着の異常が考えられたが細胞間接着因子である E-Cadherin, -Catenin, -Catenin の局在に差異はなかった。以上のことからダイオキシン投与時の口蓋突起の発育と癒合状況はダイオキシン非投与での口蓋癒合とは様相が異なっていることが明らかになったが、その様態と口蓋の解離の原因については未解決である。

(井村: ダイオキシンによるマウス口蓋裂の発生機序に関する形態学的及び免疫組織学的研究-口蓋突起癒合後の口蓋発生について-岡山歯誌、2008) 一方、発生過程の面から口蓋裂発症メカニズムを解明するため、口蓋の正常発生過程時の、「基底膜の消長」に着目し、口蓋突起の癒合期における基底膜型プロテオグリカン(パールカン)とその分解酵素ヘパラーゼの動態について検討した。その結果、1) 上皮索基底膜において他の基底膜構成成分に先んじてパールカンおよびコラーゲンの消失が観察されること。2) 口蓋突起上皮細胞が分泌したヘパラーゼはパールカンのヘパラン硫酸鎖に抱合されている増殖因子を遊離、活性化することにより間葉細胞の分泌・増殖を惹起する可能性があること。3) 口蓋突起上皮細胞が分泌した MMP(matrix metalloproteinase)はコラーゲンを細分化することで上皮索基底膜を分解・断裂消失させることを解明し、口蓋癒合

時の基底膜の動態が極めて重要であることを明らかにしてきた。(平田, 井村他:平成19年度, 20年度口腔外科学会総会ゴールドリボン賞受賞)。また、器官培養系においても口蓋癒合を確認し、基底膜動態の変化を報告した。(井村:平成22年度口腔外科学会総会)

口蓋突起癒合による口蓋形成後に口蓋が何らかのメカニズムで再び解離することによって口蓋裂が発生するという実験報告は、涉獵しうる限り、J. Jin等の報告しか見られない貴重な報告である。

彼らは、*MEOX2* 遺伝子ノックアウトマウスで口蓋裂が35.3%に発生しており、同様の現象を報告している(Developmental dynamics.235:539-546, 2006)。我々が行った研究においても100%にこの現象が起こっていないことから、遺伝子上の欠失部位や、転写異常等の原因が複雑に作用して、口蓋形成後の口蓋裂発生を起こしていると考え。ヒト研究において、Kitamuraは、口蓋が正常と思われるヒト中絶胎児500例と口蓋裂胎児80例の口蓋を観察した研究を行っており、口蓋裂は一度癒合したあと、崩壊していると報告している(Cleft Palate-Craniofacial Journal. 28(2):195-211, 1991)。その理由として、胎児の口蓋切片において、口蓋裂胎児全例において一側または両側の口蓋板間葉組織中に、上皮真珠、上皮残遺などを認めためとした。これはMEE(mesenchymal epithelial)細胞が残存している状態で口蓋が解離したため、口蓋板の中に上皮が残存した結果生じたものと述べている。

これまで、私が行ってきた研究及びJ. Jin等の研究から*MEOX2* 遺伝子が口蓋裂発生に関連していることが強く示唆されるが、ヒトにおいて口蓋裂との関連を調べた研究はない。*MEOX2* 遺伝子は、血管分化調節因子として、アルツハイマー病で観察される神経血管性機能障害(Nature Med 11(9):

959-965, 2005)に加えて、関連したマウスタンパク質の突然変異は、頭蓋および顔面の骨格異常との関係が示唆されている遺伝子である。ヒト染色体上では、7番染色体p22.1-p21.3に認められる(図3)。近年分子生物学研究の発達により、口唇口蓋裂においていくつかの候補遺伝子として*TGFA*、*TGFB3*、*MSX1*等が報告されているものの、*MEOX2* 遺伝子は候補遺伝子に挙がっていない。

私の所属する研究室では、米国アイオワ大学のJeffrey C. Murray教授と18年以上に渡り、大学間共同研究として遺伝子バンキングを行っており、口唇口蓋裂に関してはすでに世界最大の遺伝子試料を有する研究組織であり、約7700例の遺伝子資料をもとに様々な遺伝子の解析を行っている。

以上のことから、本研究は、ヒト口蓋裂患者の血液及び組織サンプルからDNAを抽出し、*MEOX2* 遺伝子上の変異の有無を同定し、口蓋形成後の口蓋裂発生への関与を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、口蓋突起癒合後に癒合した口蓋が再び解離して口蓋裂発生させる可能性のある*MEOX2* 遺伝子について、我が国最大となる7,700例に及ぶ遺伝子資料の中から、日本人口蓋裂患者資料99名を抽出し、*MEOX2* 遺伝子について解析を行った。

MEOX2 遺伝子は、ヒト7番染色体短腕部に75.46kbの長さを持つホメオボックス遺伝子(図4)で3つのexonからなる。ヒト*MEOX2* 遺伝子の変異に関してNCBIのSNPデータベースにintron部の変異は1039の報告があるがexon部の変異の報告は無い。そこで、3つのexon各々の両端20~27bpをプライマーとする。プライマーの配列が適正なものであるかどうかはPrimer 3等のソフトを用いて確認した。

口蓋裂患者の血液よりDNAを抽出したのち

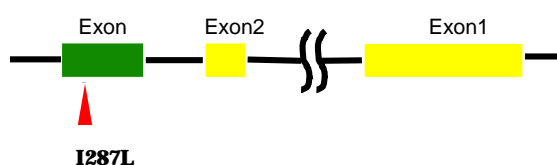
PCRにて増幅した。

ABI 3730XL を用いて *MEOX2* (NM_005924) 遺伝子の3つの exon についてダイレクトシーケンスを行った。

本研究は、愛知学院大学歯学部倫理委員会 (No.11) の承認を得て行った。

4. 研究成果

7番染色体に存在する *MEOX2* 遺伝子の exon3 部におけるアミノ酸変異 (rs2237493) 1287L を認めた。(図1)



(図1)

MEOX2 遺伝子は、血管分化調節因子であり、関連したマウスタンパク質の突然変異は、頭蓋および顔面の骨格異常との関係が示唆されている遺伝子であるとともに発達した口蓋や、筋形成などに影響することが知られている。

本研究の結果から口蓋裂発生に *MEOX2* が関連し、口蓋突起癒合後の解離に影響を与えている可能性が示唆された。

Candiaらは、マウス胚発生中の *in situ* ハイブリダイゼーション解析で *MEOX2* 遺伝子が手足、頭部の筋、発達中の口蓋を含む中胚葉の広範囲で発現されることを報告している。これらの知見は、*MEOX2* 遺伝子のヒト相同体の変異は頭蓋顔面および/または骨格異常に関与する可能性を示唆している。また、Mankooらは、*PAX3* のダウンレギュレーションによって示されるように *MEOX2* は、正常な筋形成のためと筋原性遺伝子の正常な調節のために不可欠であったことを報告している。本結果より、*MEOX2* 遺伝子の変異が口蓋融合後口蓋筋の脆弱性の影響を与えている可能性が示唆された。

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3件)

1. 井村英人、新美照幸、藤原久美子、南克浩、古川博雄、加藤大貴、森明弘、大野磨弥、原田純、夏目長門：声門下気道狭窄を認めた口唇顎裂患者の1例。日本口蓋裂学会雑誌 39(1)41 - 45, 2014.

2. 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。日本口蓋裂学会雑誌 39(1)21 - 27, 2014.

3. Butali A, Suzuki S, Cooper ME, Mansilla AM, Cuenco K, Leslie EJ, Suzuki Y, Niimi T, Yamamoto M, Ayanga G, Erkhembaatar T, Furukawa H, Fujiwara K, Imura H, Petrin AL, Natsume N, Beaty TH, Marazita ML, Murray JC. :Replication of genome wide association identified candidate genes confirm the role of common and rare variants in PAX7 and VAX1 in the etiology of nonsyndromic CL(P). Am J Med Genet A. 161A(5):965-72, 2013.

[学会発表](計6件)

1. 井村英人、鈴木聡、大野磨弥、森明弘、山田朋弘、森悦秀、菅原利夫、夏目長門：口蓋形成後の口蓋裂発生メカニズム *MEOX2* に着目してー。2014.5.29 - 30. 日本口蓋裂学会総会・学術集会 (札幌)

2. H Imura, S Suzuki, M Ono, K Minami, K Fujiwara, T Kato, N Natsume: The mechanism of cleft palate after palatal fusion Hideto Imura, November25-28,2013 CLEFT2013 ICPF (HANOI, Vietnam)

3. H IMURA, S SUZUKI, K MINAMI, T KATO, T Hayakawa, N NATSUME : A case of Tetrasomy 15q with left cleft lip and alveolus. May5-10,2013 12th International Congress on Cleft Lip/Palate and Related Craniofacial Anomaies Hilton Orlando Lake Buena Vista, (Florida USA)

4. 井村英人、新美照幸、藤原久美子、南克浩、加藤大貴、大野磨弥、森明弘、夏目長門：声門下気道狭窄を認めた口唇顎裂患者の1例。2013.4 日本口蓋裂学会雑誌 38 巻 2 号 Page257

5. 井村英人、鈴木聡、新美照幸、藤原久美子、南克浩、古川博雄、加藤大貴、大野磨弥、

森明弘、森智子、菅原利夫、夏目長門：口唇口蓋裂を認めた oral-facial-digital syndrome の一例 . 2013.4 日本口蓋裂学会雑誌 38 巻 2 号 Page251

6. 井村英人・古川博雄・鈴木聡・新美照幸・南克浩・藤原久美子・加藤大貴・大野磨弥・夏目長門：左側口唇顎裂を伴った Tetrasomy 15q の一例 2011.10.21 日本口腔外科学会総会（大阪）

〔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 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

井村 英人 (IMURA HIDETO)
愛知学院大学・歯学部・非常勤講師
研究者番号：10513187

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：