

平成 30 年 5 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11237

研究課題名(和文)p53ノックアウトマウス人工授精凍結胚を用いた口蓋裂発生メカニズムの解析

研究課題名(英文)Analysis of the cleft lip/palate development mechanism using the p53 knockout mouse with Artificial insemination frozen embryos

研究代表者

児玉 泰光 (Kodama, Yasumitsu)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：90419276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：がん抑制遺伝子として知られるp53 遺伝子を「奇形発生の番人」と捉え、CL/Fr 系統マウス(口唇口蓋裂感受性系統)における口唇口蓋裂形成へのp53の影響を検索することを目的に「p53ノックアウトCL/Fr 系統マウス人工授精凍結胚」を用いて解析を行った。
CL/Fr;p53(-/-)マウスにおける口唇裂は、これまでに報告のない特異的な形態異常が原因と示唆された。CL/Fr;p53(-/-)マウスにおける口蓋裂は、いわゆる完全口蓋裂の病態に近く、口蓋突起は認められるものの、その大きさは非常に小さく、水平方向への増殖はほとんど生じていないことが判明した。

研究成果の概要(英文)：We regarded p53 gene known as tumor suppressor gene as "a guardian of the teratogenesis". It was intended to search effect of p53 on cleft lip and palate formation in the CL/Fr mouse (cleft lip and palate sensitive strain). We analyzed to use the p53 knockout CL/Fr mouse artificial insemination frozen embryos.
Cleft lip in the CL/Frp53(-/-) mouse was suggested to be caused by specific malformation without the report so far. The cleft palate in the p53(-/-) mouse was almost the clinical condition of so-called complete cleft palate, and the palatine process was found. The size of the palatine process was very small, and most of the growth to a horizontal direction was proved not to occur.

研究分野：歯学

キーワード：口蓋裂

1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂は、多くの優れた臨床研究により治療成績が向上し、良好な顎発育と言語発達を獲得できる水準が維持されている。一方で、その病因については複雑さゆえに大きな進展はなく、環境因子と遺伝因子の議論に止まって久しい。日々の臨床で、本疾患を抱える本人は勿論、後継子を願う両親は、その複雑とされている病因の一部でも解明される事を切に願っており、その期待に応えることは我々の責務である。本疾患の病因解明は、患児を取り巻く全ての方々の精神的負担を軽減させ、さらには次世代の発症率減少に寄与する可能性を秘めている。

2. 研究の目的

近年、様々な遺伝子組み換えマウスを用いた口唇および口蓋裂実験が数多く行われている。しかし、それらのマウスの多くは、口蓋裂や口唇裂を 100% の表現形として示す。しかし、ヒトの場合、家族性に口唇口蓋裂の認められる症候群をのぞいては、口唇口蓋裂は通常、孤立して認められる。つまり、口唇口蓋裂研究には、口蓋裂や口唇裂がある程度の頻度で認められる程度のマウスラインを用いることが望ましい。近交系マウスである CL/Fr 系統マウスは、通常環境で維持可能なマウスであることに加え、数% の確率で口唇口蓋裂が認められる。つまり、遺伝子的なバックグラウンドがほぼ同一にも関わらず(平均して僅か 0.01 のヘテロ接合性しか残っていない)、口唇口蓋裂が数% でのみ認められるマウスラインであり、口唇口蓋裂研究には非常に有用なラインと言える。1990 年以降に数多くの遺伝子組み換えマウスが報告されてきたが、口唇裂を生じている遺伝子組み換えマウスの報告は限られており、口唇裂研究の遅延の原因となっている。CL/Fr 系統マウスには、口唇裂も認められており、その点においても、この CL/Fr 系統マウスは、有用である。このいかなる因子の変化が、CL/Fr 系統マウスにおける口唇口蓋裂の発生頻度に影響を与えるかを明らかにすることによって、口唇口蓋裂の発祥メカニズムの解明が可能となる。

当科では、放射線誘発マウス胸腺リンパ腫モデルを用いた研究から、がん感受性遺伝子の同定に成功し、がん発生にはマウス系統差が存在する事、発がん因子に応じた感受性遺伝子座が存在する事などを明らかにしてきた。その中で「がん抑制遺伝子」としての p53 に着目し、発がんメカニズムを研究してきた。発生初期の胎仔に DNA 障害が生じると p53 がアポトーシスを誘導して奇形発症を防ぐ

ことが知られている。本研究では表現型を胸腺リンパ腫から口唇口蓋裂に置き換え、p53 遺伝子を「奇形発生の番人」と捉え、CL/Fr 系統マウスにおける口唇口蓋裂形成への p53 の影響を検索することを目的に、本研究を行なった。

3. 研究の方法

p53 欠損 CL/Fr 系統マウスにおける口唇口蓋裂発症頻度を解析する。口唇口蓋裂を発症している場合、生後しばらくして致死となる。その際、母親マウスによる食殺行為のために口蓋裂を有するマウスの獲得が難しいことが多く、口唇口蓋裂発症マウスを見逃してしまうことになる。一方、口唇口蓋形成は、マウスの場合、受精後 16 日ではほぼ完成するため、それ以降の胎仔であれば、口唇口蓋裂が発症しているか認識できる。そのために、p53 欠損 CL/Fr 系統マウスにおける口唇口蓋裂発症頻度を解析するために、妊娠 19 日目で安楽死させ開腹にて胎仔を摘出し、裂奇形の有無、体重、他の外表奇形について観察した。妊娠に関しては、通常自然交配に基本とする。しかし、従来の自然交配では膣詮 (vergingal plug) の確認が困難なケースも多く、正確性や効率性の面で問題が多い。そこで、本研究では本学脳研動物資源開発研究分野の協力を得て、人工授精凍結胚を導入を決めた。CL/Fr-;p53(+/-) の胚を凍結保存し、偽妊娠マウスの子宮に移植する。この凍結授精胚の応用は、授精時期を厳密に管理できることから、研究データのばらつき減少、少ない個体で確実な結果抽出、経済的で効率化された研究の進行に寄与すると考えられた。また、適宜、授精胚を採取し、研究の進捗に合わせた繁殖計画、実験動物の維持管理を行うことが可能と考えられた。さらに、本研究では、CL/Fr 系統マウスにおける口唇口蓋裂発症に対する p53 の影響をより正確に理解するために、偽妊娠マウスを屠殺せず、CL/Fr;p53(+/-) マウスを出生させ、得られた CL/Fr;p53(+/-) マウス同士を交配させ、p53 が完全に欠損した CL/Fr;p53(-/-) マウスを、妊娠 19 日目の母親マウス屠殺により、獲得することを計画した。

マウスにおける口唇裂発症は、遺伝子改変マウスでもほとんど報告がなく、いかなる形態的な変化を引き起こしているかの把握が、解決すべき大きな課題と言える。そこで、CL/Fr;p53(-/-) マウスの前頭断面による組織切片を作成し、Hematoxylin Eosin 染色により、詳細な形態観察を行った。

口蓋形成は、口蓋突起の変位を大きな特徴としている。口蓋突起は、上顎突起の一部から派生し、舌の横を下方に成長する。その後、舌背に転位し、増殖方向を正中へと変える。その際に、舌は口蓋突起の転位を促すように、

その舌背の位置を低くする。正中で会合した左右の口蓋突起は、その後上皮のアポトーシスにより、癒合を完成させる。口蓋裂は、口蓋突起の欠損、舌の横における下方への成長不全、舌背への転位の欠損、正中方向への増殖不足、会合上皮のアポトーシスの欠損、蓋突起の転位の際の口蓋突起と舌との連携不全のいずれかによって引き起こる。各ステップにおける重要なシグナルが多く報告されており、CL/Fr;p53(-/-)マウスにおける口蓋裂が、いずれのパターンで引き起こるのかを知ることは、いずれのシグナルの異常によるかを推察できるため重要な情報となる。また、近年、口蓋形成は、近心、中央部、遠心、正中部、側方部で、その分子発生メカニズムが異なることが報告されている。つまり、CL/Fr;p53(-/-)マウスにおける口蓋裂も各部位でそのパターンが違う可能性がある。そのため、口蓋形成は、近心、中央部、遠心、正中部、側方部それぞれの部位で、口蓋形成がどのようになっているか精査した。

4. 研究成果

CL/Fr マウス、CL/Fr;p53(+/-)マウス、CL/Fr;p53(-/-)マウスそれぞれで、口蓋裂が確認された。CL/Fr;p53(-/-)マウスでは、口唇口蓋裂が認められた(図1)。



図1
CL/Fr;p53(-/-)マウス

口唇裂部では、鼻中隔ならびに一次口蓋突起の形態異常が確認された。通常鼻中隔の側方に位置すべき上顎前歯が、鼻中隔の下方に位置していた(図2)。口唇裂は、前歯歯胚を有する鼻中隔下部組織と頬組織の間に生じていることが確認された。近心の口蓋部では、非常に薄く矮小な口蓋突起の存在が認められ、舌背に位置するものの水平方向への増殖が停止していた(図3)。正中部、側方部の違いを示すようなデータは得られなかった。中央部の口蓋では、近心部と同様に、舌背に位置する口蓋突起は認められるものの、

その大きさは非常に小さく、水平方向への増殖はほとんど生じていなかった(図4)。

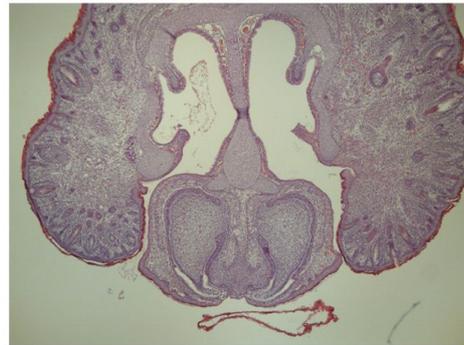


図2
CL/Fr;p53(-/-)マウス
口唇部

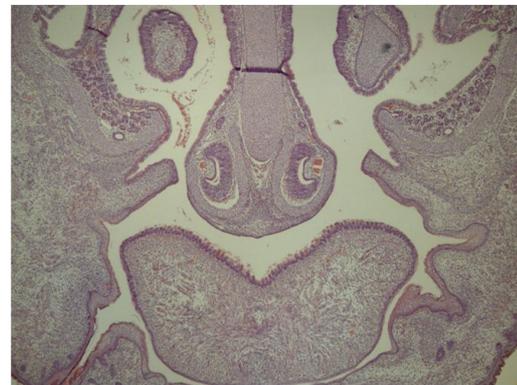


図3
CL/Fr;p53(-/-)マウス
近心部

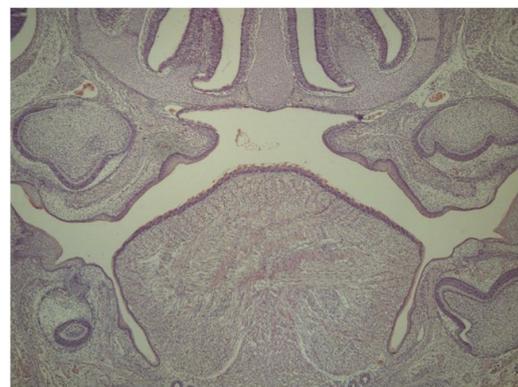


図4
CL/Fr;p53(-/-)マウス
中央部

遠心部の口蓋でも、舌背に位置する口蓋突起は認められるものの、その大きさは非常に小さかった(図5)。

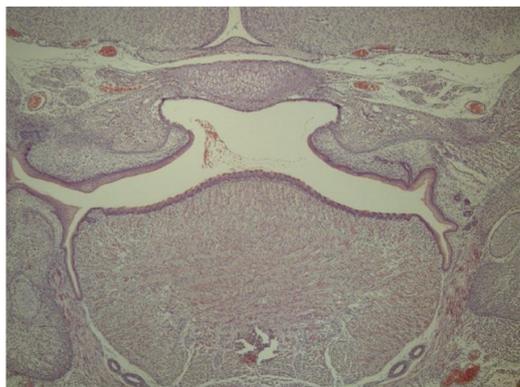


図5
CL/Fr;p53(-/-)マウス
遠心部

以上のように、口唇裂は、今までに報告のない形態異常によって引き起こっていることが明らかとなった。CL/Fr;p53(-/-)マウスにおける口蓋裂は、近心から遠心部にまで及ぶものであるものであった。さらに、口蓋突起そのものの大きさが非常に小さいものの、舌背への転位は生じていること、正中方向への増殖は、ほとんど生じていないことが確認された。そのような表現形は近心から遠心まで、程度の差はあるものの概ね共通していた。口唇・口蓋以外に大きな異常は確認できなかった。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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：
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

児玉 泰光 (KODAMA, Yasumitsu)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：90419276

(2)研究分担者

大峽 淳 (OHAZAMA, Atsushi)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：40266169

(3)連携研究者

()

研究者番号：