

令和元年6月25日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11785

研究課題名(和文) Sonic hedgehogの濃度勾配の二次口蓋癒合時における役割の解明

研究課題名(英文) The role of Shh gradient for secondary palate development

研究代表者

三原 聖美 (Mihara, Kiyomi)

大阪大学・歯学研究科・招へい教員

研究者番号：00551920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：口唇口蓋裂は顎顔面領域で起こる形態形成不全としては最も頻度の高い現症であり、日本人では500人に1人の割合で発症し、様々な遺伝的な要因や環境的な要因が関与していることが知られている。本研究では口蓋裂の原因として新たに胎生初期のレチノイン酸シグナルとShhシグナルとの関連とその相互作用が口蓋発生に及ぼす影響を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口唇口蓋裂は顎顔面領域で起こる形態形成不全としては最も頻度の高い現症であり、日本人では500人に1人の割合で発症し、様々な遺伝的な要因や環境的な要因が関与しているが不明な点が多く妊娠早期の確実な診断方法や発病する前の予防法等は存在しない。本研究で明らかになったShhシグナルとレチノイン酸シグナルとの相互関係の解明は新規診断、治療方法の開発に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：Cleft lip and/or paln late is one of the most common craniofacial disorder which could happen with 1/500 ratio in Japanese population. It is well known that In this study, we discovered important interaction of early embryonic Shh and retinoic acid signaling for palatal development. We further revealed the role of this signaling network for secondary palatal development.

研究分野：矯正歯科

キーワード：口唇口蓋裂 Shhシグナル レチノイン酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂は顎顔面領域で起こる形態形成不全としては最も頻度の高い現症であり、日本人では500人に1人の割合で発症し、様々な要因が関与していることが知られている。特に口蓋裂発症の部位となる二次口蓋の発生は、胎生期に左右の口蓋突起がまずは下方に成長し、水平方向に翻転、伸長し、最後に口蓋突起の先端部の上皮組織が取り除かれ、間葉組織が連続することで癒合し、形成が終了する。この非常にダイナミックな形態変化および形成は、時間的・空間的に厳密に制御されており、この過程のいずれかが障害されると口蓋裂が生じる。一方、Sonic hedgehog(以下 SHH)はヘッジホッグファミリーに所属するシグナル分子タンパクであり、脊椎動物の発生において最も重要なモルフォゲンとして、四肢や、身体の正中構造を決定するなどの、様々な器官系のデザインを形成する役割がある。顎顔面領域においても脳や顎顔面の正中構造物を形成する過程で重要な役割を担い、腹側正中線の欠失が生じると全前脳胞症を引き起こすことなどが知らせている。ヒトにおいては SHH の膜受容体である Patched-1 (以下 PTCH1) 遺伝子が基底細胞母斑症候群の原因遺伝子であることが知られており、口蓋や歯の発生が障害されることが報告されている。

### 2. 研究の目的

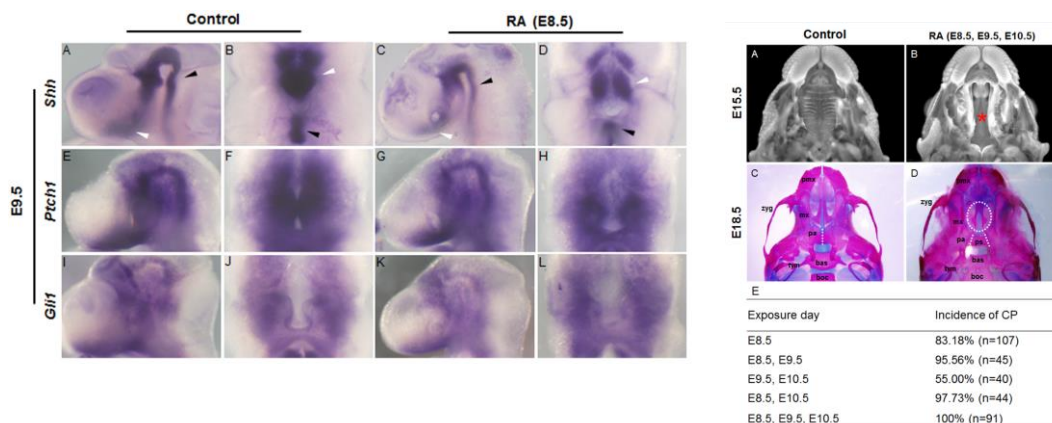
二次口蓋は胎生期に左右の口蓋突起がまずは下方に成長し、水平方向に翻転、伸長し、最後に上皮組織が取り除かれて癒合することで形成される。これらの発生学的イベントは時間的・空間的に厳密に制御されており、いずれか一つでも障害されると口蓋裂が生じる。一方、四肢や身体の正中構造を決定する Sonic hedgehog(以下 SHH)シグナリングは正常な口蓋発生にも必要不可欠である事が知られており、異常な SHH シグナリングはマウス及びヒトの口唇裂・口蓋裂の発症に関与することが分かっている。しかし、二次口蓋の上皮を取り除く過程において SHH シグナリングがどのように関与するかは未だ不明である。そこで本研究では SHH シグナリングが二次口蓋癒合時の上皮の除去にどのように関与するのかを詳細に解析し、口蓋裂発症における新たな分子及び細胞学的メカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

Shh 遺伝子の機能によって制御されているタンパクの発現分布を確認するために、免疫組織学的染色および In situ ハイブリダイゼーション法を用いることで口蓋突起口蓋癒合予定部位での遺伝子の発現部位を特定する HhatcrefacePtchlwiggle マウスを用いた SHH 遺伝子の機能解析で確認された遺伝子発現について、HhatcrefacePtchlwiggle マウスで口蓋裂が起こっている部位に減少している RNA に関わるタンパクを投与し、口蓋が癒合もしくは上皮の肥厚が起こらないことを確認し、SHH と関わりのある因子を同定する。

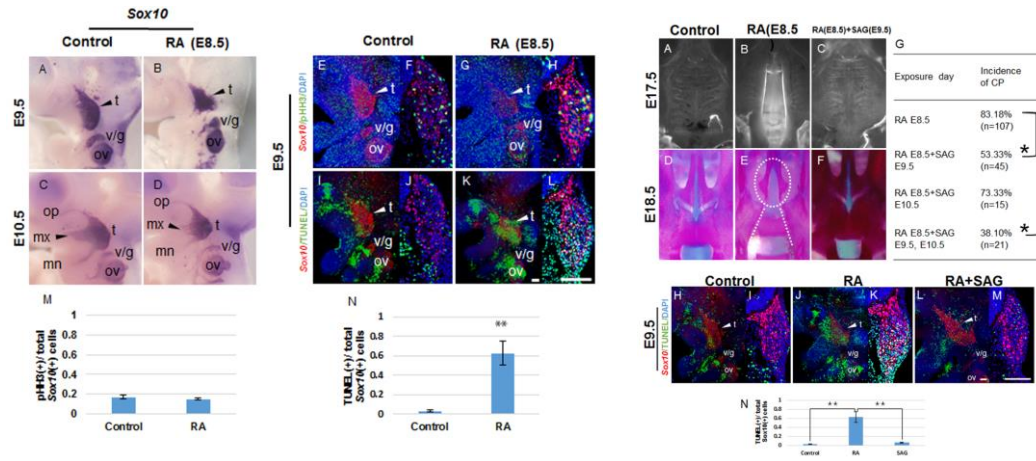
### 4. 研究成果

本研究結果から妊娠初期である胎生 8.5 日においてレチノイン酸を投与すると神経管腹側部において Shh シグナルの著しい発現減少が認められた (下左図)。また E8.5 におけるレチノイン酸の投与は他のステージに比べて有意に口蓋裂発症頻度が高い事も明らかとした (下右図)。

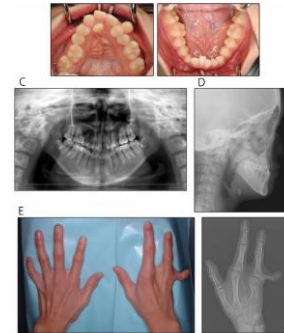


これらの発見は今までのレチノイン酸シグナルの口蓋裂誘発メカニズムは二次口蓋発生時に起こると考えられていたのに対して新たな知見を加えるものである。

また、口蓋裂を呈する個体においては顎顔面形成に重要な役割を果たす頭部神経堤細胞の細胞死が著しく増加している事を確認した (下左図)。更にこれらの細胞死は Shh シグナルのアゴニストを投与する事により減少し更には口蓋裂の表現型もレスキューされる事を見出した (下右図)。これらの知見はレチノイン酸シグナルや Shh シグナルの異常によって引き起こされる口蓋裂の新規診断法や予防法の開発に貢献するものである。



現在これらの研究データを用いて国際誌に投稿中である。実際の臨床の現場においても Shh シグナルの異常によるものと推察される口蓋裂と手指に表現型が認められる患者においても症例報告などを通して知見を深めた (右図)。現在はヒトゲノムサンプルを用いて実際の患者においてもこれらのシグナル経路に関わる遺伝子変異が認められるかの確認を行っている。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Kohei Nakatsugawa, [Hiroshi Kurosaka](#), [Kiyomi Mihara](#), Susumu Tanaka, Tomonao Aikawa, Mikihiro Kogo and [Takashi Yamashiro](#). Orthodontic- surgical approach for treating skeletal Class III malocclusion with severe maxillary deficiency in isolated cleft palate. Cleft Palate Craniofac J. 2019 Mar;56(3):400-407. (査読有り)

〔学会発表〕 (計 5 件)

青山剛三、Sarper Safiye、[三原聖美](#)、[岡 綾香](#)、[黒坂 寛](#)、[山城 隆](#)。ライブイメージングを用いた二次口蓋癒合時の medial edge epithelial cell : (MEE 細胞) の動態についての研究。第 40 回 日本口蓋裂学会総会・学術集会

[三原聖美](#)、上松節子、相川友直、古郷幹彦、[山城 隆](#)。上顎歯列の狭窄および重度の叢生を伴う口蓋裂を認める Russell-Silver 症候群の 1 治験例。第 40 回 日本口蓋裂学会総会・学術集会

[三原聖美](#)、上松節子、伊藤慎将、中津川昂平、[黒坂 寛](#)、[山城 隆](#)。グルコーストランスポーター 1 型異常症の口腔顎顔面領域の特徴的所見。第 58 回 近畿東海矯正歯科学会学術大会・総会

村田有香、森田知里、伊藤慎将、[三原聖美](#)、[黒坂 寛](#)、[山城 隆](#)。グルコーストランスポーター 1 型異常症における矯正歯科診断および矯正歯科治療の経過。第 59 回近畿東海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

〔図書〕 (計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 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 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：黒坂 寛  
ローマ字氏名：KUROSAKA HIROSHI  
所属研究機関名：大阪大学  
部局名：歯学研究科  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：20509369

研究分担者氏名：伊藤 慎将  
ローマ字氏名：ITOH SHINSUKE  
所属研究機関名：大阪大学  
部局名：歯学研究科  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：40633706

研究分担者氏名：山城 隆  
ローマ字氏名：YAMASHIRO TAKASHI  
所属研究機関名：大阪大学  
部局名：歯学研究科  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：70294428

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

※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。