

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K12906

研究課題名(和文) ビオチンによるエピジェネティック制御から探る口蓋裂発生機序の解明とその予防

研究課題名(英文) Elucidation the effect of biotin on palate development through an epigenetic mechanism and the prevention of cleft palate

研究代表者

澤村 弘美 (Sawamura, Hiromi)

兵庫県立大学・環境人間学部・助教

研究者番号：30555371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：口蓋裂は日本人で頻度の高い先天顔面奇形の一つであり、複数の遺伝的要因と母体の環境的要因とが複雑に絡みあって生じる多因子しきい説が有力視されている。しかし、その発生要因および発生機序については解明されていない。

妊娠マウスにビオチン欠乏食を摂取させた後、妊娠10、11または12日にビオチンを投与したところ、妊娠11日以前にビオチンを投与したマウスにおいて口蓋裂の発生が有意に抑制された。このことから、正常な口蓋形成のためには妊娠11日以前における十分なビオチンの供給が重要であることが明らかとなり、口蓋形成初期においてビオチンが重要な役割を果たしていると推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口蓋裂の研究は、疾患遺伝子の同定によって遺伝的要因に関する研究は進んでいる反面、環境因子による詳細なメカニズムの報告が少ないのが現状である。本研究では、口蓋裂発生とヒストンのビオチン化およびメチル化との関連に着目し、新たな口蓋裂発生メカニズムを探索することで、環境因子による口蓋裂発生のメカニズムに関する新たな知見の提供を目指す。また、本研究において口蓋形成におけるビオチンの役割を解明することは、妊娠期におけるビオチン摂取の重要性の提唱につながり、将来的には妊娠期のビオチン補充が口蓋裂発生予防につながる可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Cleft palate is one of the most common congenital craniofacial anomalies in Japanese which is caused by genetic and environmental factors. However, the exact cause and mechanism of cleft palate has not yet been elucidated.

Pregnant mice were given a biotin-deficient diet and then were changed to a biotin-supplemented diet on day 10, 11 or 12 of gestation. The incidence of cleft palate was lower in the dg 10-supplemented group and the dg 11-supplemented group than the biotin-deficient group. It is suggested that biotin is necessary to develop and fuse the palatal process in mouse fetuses at midgestation (dg 11 and earlier). We speculated that biotin may play a role in the initial stage of palatal development.

研究分野：分子栄養学

キーワード：ビオチン 口蓋裂

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ビオチンは水溶性ビタミンの一つであり、カルボキシラーゼの補酵素として、糖新生、脂肪酸合成、分岐鎖アミノ酸代謝に関与している。ビオチンは幅広く食品に含まれているため、ヒトでの欠乏症は稀である。しかしながら、近年、妊娠後期の妊婦において、ビオチン欠乏の指標である 3-ヒドロキシイソ吉草酸が尿中に検出されることが報告されており (Mock DM, Am J Clin Nutr, 2002)、妊娠後期の妊婦における潜在性ビオチン欠乏が示唆されている。哺乳動物においては、母体のビオチン欠乏により胎仔に口蓋裂が発生すること、抗けいれん薬の投与によりビオチンの吸収が阻害されることが報告されている。妊婦における抗けいれん薬の服用は胎児奇形と強く関連していることから、ヒトにおいても妊娠期のビオチン欠乏が胎児奇形に関連している可能性が示唆される。

口蓋裂は日本人で頻度の高い先天顔面奇形の一つであり、複数の遺伝的要因と母体の環境的要因とが複雑に絡みあって生じる多因子しきい説が有力視されている。しかし、その発生要因および発生機序については解明されていない。口蓋裂の発生はエピジェネティクスの不調和によると推察されているが、詳細は不明である。近年、新たなヒストン修飾として、ヒストンのビオチン化がクロマチン凝縮に関与することが報告されており、ビオチンによるエピジェネティック制御が明らかになりつつある。申請者らは、ビオチン欠乏条件下で培養したヒト胚口蓋間充細胞 (HEPM 細胞) において、ヒストンのビオチン化が減少することを確認している。このことから、ビオチン欠乏がヒストンのビオチン化を介してエピジェネティックな変化を引き起こし、口蓋裂を誘発する可能性が推測される。

### 2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究ではビオチン欠乏によって生じるエピジェネティック変化を明らかにし、環境因子による口蓋裂発生機序の解明につなげる。本研究では *in vivo* および *in vitro* の両系を用いてビオチン欠乏によるエピジェネティック変化を検討する。研究期間内には以下のことを明らかにする。

- ①ビオチンは、ヒストンメチル化部位に競合的に結合することにより、転写活性を調節する可能性が報告されている。ヒト胚口蓋間充細胞 (HEPM 細胞) およびマウスを用いて、ビオチン欠乏が口蓋におけるヒストン修飾状態 (メチル化およびビオチン化) に及ぼす影響を調べる。
- ②HEPM 細胞およびマウスを用いて、ビオチン欠乏が口蓋におけるヒストン修飾酵素 (メチル化酵素、脱メチル化酵素、ビオチン化関連酵素) の遺伝子発現量に及ぼす影響を調べる。
- ③上記①②の実験で変化が見られた酵素およびヒストン修飾状態について、マウスの口蓋形成過程 (妊娠 12~15 日) における変化を継時的に調べる。
- ④ビオチン欠乏群へのビオチン投与を行い、ビオチンによる口蓋裂発生抑制効果を調べる。妊娠 7~12 日目のビオチン欠乏マウスにビオチンを投与し、上記の実験で変化が見られたヒストン修飾酵素、ヒストン修飾状態および口蓋形成に及ぼす影響を調べることにより、ビオチンによる口蓋裂発生抑制効果を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ビオチン欠乏が HEPM 細胞におけるヒストン修飾に及ぼす影響

ビオチン欠乏が口蓋におけるヒストン修飾に及ぼす影響についてヒト培養細胞を用いて検討した。ビオチンはメチル化部位であるヒストン H3K4 および H3K9、アセチル化部位である H4K8 および H4K12 に競合的に結合することにより、転写活性を調節する可能性が報告されている。そこで、口蓋裂との関連が示唆されているヒストン H3K9 のメチル化酵素 SETDB1 に着目し、ビオチン欠乏がヒストン修飾に及ぼす影響を調べた。

ビオチン欠乏培地またはコントロール培地で HEPM 細胞を培養した。Avidin Agarose を用いて FBS からビオチンを除去し、コントロール培地には終濃度が 10 nM となるようにビオチンを添加した。12 日間培養を行い、RNA を抽出した。ヒストン H3K9 のメチル化酵素および脱メチル化酵素、ヒストンのビオチン化に関与するホロカルボキシラーゼ合成酵素 (HCS) の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法にて解析した。

#### (2) ビオチン欠乏マウスへのビオチン投与がマウス口蓋におけるヒストン修飾に及ぼす影響

申請者らは、これまでに、妊娠 12 日のビオチン欠乏マウスにビオチンを経口投与すると胎仔の口蓋形成に改善が見られることを見出し、正常な口蓋形成には妊娠 12 日以前におけるビオチン栄養状態が深く関与していると考えられる。そこで、ビオチンによる口蓋裂発生抑制効果を検討するために、妊娠 10、11 または 12 日のビオチン欠乏マウスにビオチンを経口投与する回復群を設け、欠乏群、コントロール群との比較検討を行った。妊娠確認日を妊娠 0 日とし、ビオチン欠乏飼料またはコントロール飼料 (ビオチン 5mg/kg diet) を与えて飼育した。妊娠 10、11 または 12 日にビオチン欠乏マウスに 0.1 mg/mL のビオチン溶液 250  $\mu$ L を経口投与し、その後コントロール飼料に切り替えた群を回復群とし、妊娠 17 日に屠殺した (Fig. 1)。胎仔から口蓋突起を採取し、ヒストンメチル化酵素、脱メチル化酵素、HCS の mRNA 量をリアルタイム PCR 法にて解析した。口蓋裂の発生率を調べ、ビオチンによる口蓋裂発生抑制効果を検討した。

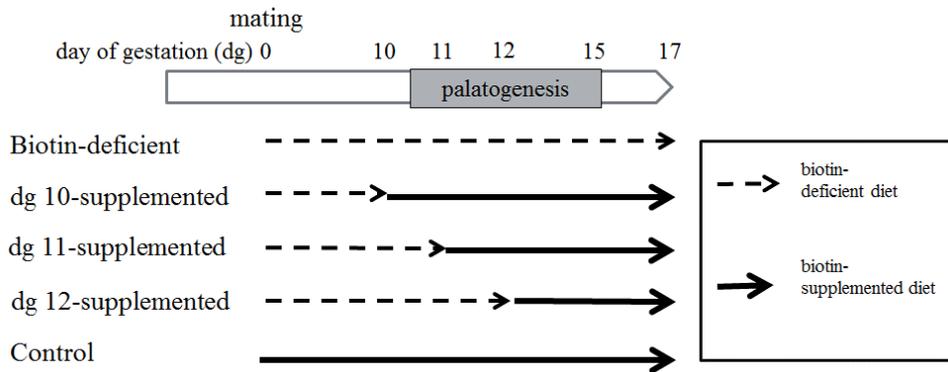


Fig. 1 実験計画

#### 4. 研究成果

(1) ビオチン欠乏が HEPM 細胞におけるヒストン修飾に及ぼす影響

ヒストンのビオチン化に関与する HCS およびヒストン H3K9 のメチル化酵素 SETDB1 の mRNA 量は群間で差は見られなかった。そこで、HCS との物理的相互作用が報告されているヒストンメチル化酵素 EHMT1 の mRNA 量を調べたところ、ビオチン欠乏培地で 12 日間培養した HEPM 細胞において、コントロール群よりも有意に発現量が増加した (Fig. 2)。このことから、ビオチン欠乏が EHMT1 の発現に影響を及ぼし、口蓋におけるヒストンのメチル化に影響する可能性が推測された。ビオチンは、ヒストンメチル化部位に競合的に結合することが報告されており、ビオチン欠乏条件下で培養した HEPM 細胞ではヒストンのビオチン化が減少することを確認していることから、ビオチン欠乏によってヒストンのビオチン化が減少することでヒストンのメチル化が増加する可能性が示唆された。

また、HepG2 細胞や Caco-2 細胞において、ビオチン欠乏条件下ではトランスポーターである sodium-dependent multivitamin transporter (SMVT) の発現量が上昇することが報告されているが、HEPM 細胞においては発現量に差が見られなかった。これにより、口蓋におけるビオチン欠乏による影響が肝臓などの他の組織とは異なる可能性が推測された。これらの結果を受けて、次に動物実験を実施した。

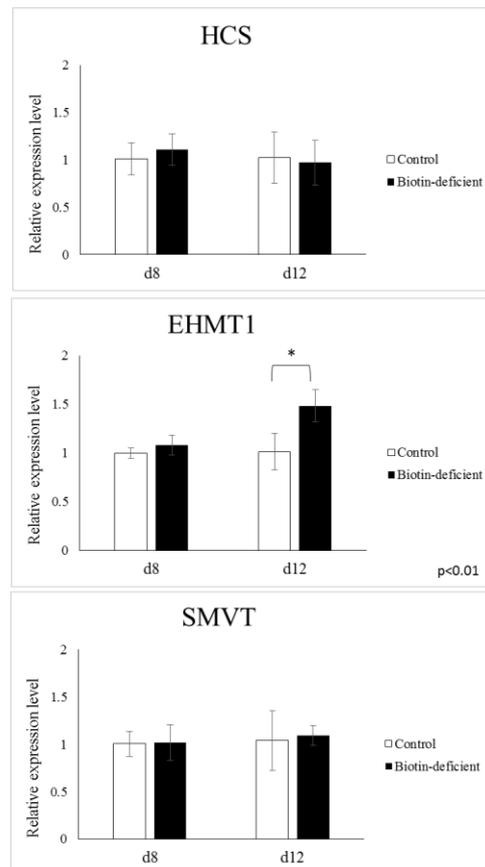


Fig.2 HEPM 細胞における mRNA 発現量

(2) ビオチン欠乏マウスへのビオチン投与による口蓋裂発生抑制効果

予備的検討として、ビオチンが妊娠期のどの時期に重要であるかを調べるために、妊娠 10、11 または 12 日のビオチン欠乏マウスにビオチンを経口投与し、口蓋裂発生抑制効果を検討した (各群 n=2)。口蓋裂発生率は欠乏群が最も高く (57.7%)、dg12 投与群では 42.9%、dg10 投与群、dg11 投与群、コントロール群は 0%であった。この結果から、妊娠 11 日にビオチンを投与すると口蓋裂の発生を抑制できると考え、欠乏群、コントロール群、dg11 投与群の 3 群で次の実験を行った (各群 n=5)。

母体体重、胎児数、吸収胚・死亡胚数、胎児体重は群間で差はみられなかった。口蓋裂発生率は欠乏群で 43.1%、dg11 投与群で 7.6%、添加群で 0.0%となり、欠乏群と比較して dg11 投与群では口蓋裂発生率が有意に減少した (表 1)。この結果から、正常な口蓋形成のためには妊娠 10 日~11 日の段階で母体に十分なビオチンが供給されていることが重要であり、これ以降にビオチンを投与しても口蓋は完全には癒合せず口蓋裂が発生する可能性が高いことが明らかとなった。

口蓋のビオチン量は欠乏群で有意に低値を示し、dg11 投与群とコントロール群間で差はみられなかった (Fig. 3)。母体肝臓のビオチン量は群間で差はみられず、母体血清、胎児肝臓のビオチン量は、口蓋と同様に欠乏群で有意に低値を示し、dg11 投与群とコントロール群間で差はみられなかった。

表1 ビオチン欠乏が胎児発育に及ぼす影響

	平均胎児数(匹)	吸収胚・死亡胚数(匹)	胎児体重(g)	口蓋裂発生率(%)
欠乏群	14	1	1.0	43.1 <sup>a</sup>
dg11投与群	14	1	0.9	7.6 <sup>b</sup>
添加群	12	1	1.1	0.0 <sup>b</sup>

p<0.05

(3) ビオチン欠乏マウスへのビオチン投与がマウス口蓋におけるヒストン修飾に及ぼす影響

胎児口蓋におけるヒストンメチル化酵素およびHCSのmRNA発現量は群間で差はみられなかった(Fig. 4)。この原因として、今回測定した試料は妊娠17日の口蓋であり、マウスの口蓋形成は妊娠15日までに完了することから、口蓋形成期間終了後の口蓋ではビオチンの要求量が低く、影響がみられなかった可能性が考えられる。よって、今後はビオチンが重要な役割を果たしていると思われる妊娠10~11日の口蓋におけるヒストン修飾の変化を検討する必要がある。

SMVTのmRNAはHEPM細胞の結果と同様に群間で差はみられなかった。過去の研究において、ビオチン欠乏状態にすると胎盤や胎児肝臓におけるSMVTのmRNA発現量が増加することを確認していることから、口蓋はビオチン欠乏による影響が他の組織とは異なる可能性が考えられる。あるいは、妊娠17日の口蓋ではビオチンの要求量が低い可能性が考えられることから、口蓋形成期間の口蓋におけるSMVT発現量を明らかにする必要がある。

#### (4) 今後の展望

本研究により、正常な口蓋形成のためには妊娠10日~11日の段階で母体に十分なビオチンが供給されていることが重要であることが明らかとなった。マウスの口蓋形成は妊娠10.5日頃から開始されるため、口蓋形成初期においてビオチンが重要な役割を果たしていると推察される。今後は、口蓋形成初期におけるヒストン修飾の変化やシグナル伝達への影響を明らかにすることで口蓋形成におけるビオチンの機能の解明を目指す。これにより、妊娠期のどの段階でビオチンが重要であるかを明らかにすることができ、将来的には妊娠期のビオチン補充が口蓋裂発生予防につながる可能性が期待できる。

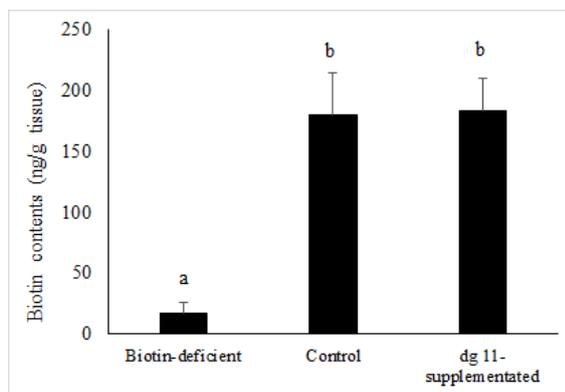


Fig.3 胎児口蓋のビオチン量

p<0.001

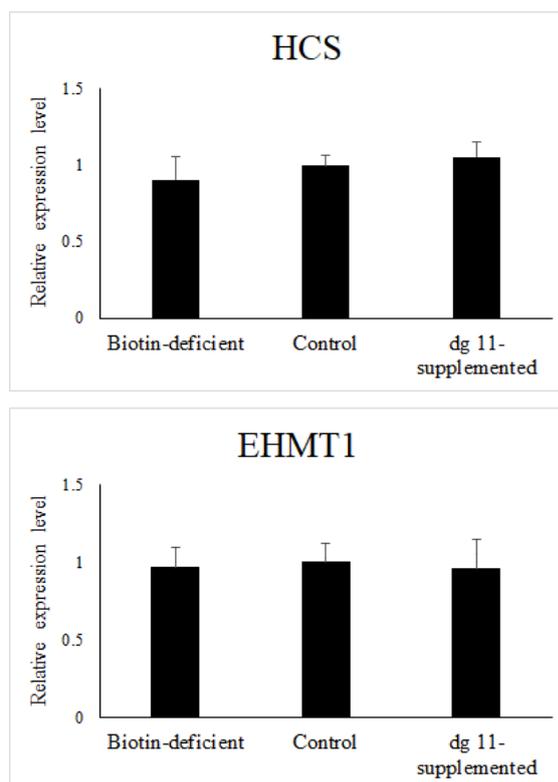


Fig.4 胎児口蓋における mRNA 発現量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hiromi Sawamura and Toshiaki Watanabe
2. 発表標題 Influences of biotin on fetal development in mice.
3. 学会等名 第59回日本先天異常学会・13th World Congress of the International Cleft Lip and Palate Foundation (CLEFT2019) 合同学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤村弘美、難波美瑞恵、小濱奏子、榎原周平、根來宗孝、渡邊敏明
2. 発表標題 ピオチン欠乏妊娠マウスへのピオチン投与が口蓋裂発生に及ぼす影響
3. 学会等名 第60回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2020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