

令和 4 年 6 月 25 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10325

研究課題名(和文) 口蓋突起癒合後の口蓋裂発生メカニズムの解析 細胞外マトリックスの影響

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of cleft palate development after palatal fusion-Effect of extracellular matrixes-

研究代表者

井村 英人 (Imura, Hideto)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：10513187

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)：口蓋裂を100%発症する濃度のTCDDに暴露された口蓋癒合期のマウス胎仔では、複数の個体において口蓋癒合途中で離開に転じている場合があることが確認された。TCDD投与マウスにおいて口蓋癒合後の離開による口蓋裂の発症機序として、がんの転移に類似した機序がある可能性が考えられた。また、上皮組織の異常な細胞増殖や、細胞間接着の低下および間葉系細胞の増殖阻害が口蓋の離開を生じる要因の一つである可能性が示唆された。口蓋裂を発症する過程において一度癒合した口蓋が離開に転じる機序を解明することにより、離開を阻止する要素が発見される可能性が考えられ、新たな口蓋裂発症の予防法の確立につながることで期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで口蓋裂の発生機序に関して、口蓋形成時に左右の口蓋突起が癒合しないことによって口蓋裂を発症するという説が一般的であった。したがって、口蓋が癒合しない原因について様々な研究が行われてきたが、明確な回答は出ていない。

本研究は、口蓋裂を発症する過程において一度癒合した口蓋が離開に転じる機序があることを明らかとしたことは、学術的意義がある。また、離開を阻止する要素が発見される可能性が考えられ、新たな口蓋裂発症の予防法の確立につながることで期待される点で社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：In fetal mice exposed to TCDD at concentrations that cause cleft palate in 100% of cases, some of the fetuses exhibited cleft palate dehiscence during palatal fusion. The mechanism of cleft palate generation by cleavage after palatal fusion in TCDD-treated mice may be similar to that of cancer metastasis. Cleft palate development after fusion may be caused by an abnormal EMT resulting from the complex effects of abnormal proliferation of epithelial tissues, abnormal intercellular adhesion, and inhibition of mesenchymal cell proliferation along with rupture of the basement membrane.

By elucidating the mechanism of cleft palate cleavage, this research may lead to the identification of factors that prevent cleft palate cleavage and the establishment of new preventive methods.

研究分野：口唇口蓋裂

キーワード：口蓋裂 発生機序 TCDD 離開 癒合 基底膜

## 1. 研究開始当初の背景

私達は口蓋裂の発症のメカニズムを解明するため、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) 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。私達の行った研究では、妊娠マウスへの臨界濃度の TCDD 投与により、出生直前の胎生 18 日目に胎仔を取り出すと 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から、

(1) TCDD 投与群では両側の口蓋突起が一旦癒合し、口蓋を形成したのち癒合部が何らかの要因により離開して、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観察されたため、その原因を組織学的に検討した。

(2) 口蓋癒合後の離開の原因と考えられる過度の水平方向への頭蓋骨成長に TCDD 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。

以上のことから TCDD 投与マウス投与時の口蓋突起の発育と癒合状況は TCDD 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、その様態と口蓋の離開の原因については未解決である。

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離開することによって口蓋裂が発生するという実験報告は、渉猟しうる限り、我々および J. Jin 等の報告しか見られない貴重な報告である。Jin 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。私達が行ってきた研究及び J. Jin 等の研究から、私達は、マウスにおける口蓋離開現象をヒトでも明らかとするため、ヒト DNA と *MEOX2* との関連について調査を行った。口蓋裂患者 96 名の血液サンプルから DNA を抽出し、*MEOX2* 遺伝子の変異の有無を確認したところ、48 名の口蓋裂患者にて *MEOX2* 遺伝子の exon3 部におけるアミノ酸変異 I287L(rs2237493)を確認した。また同部における T/T 配列を持つ者は、それ以外の配列である T/G と G/G を持つ者と比較して、口蓋裂を発症するリスクが 1.82 倍有意に高くなることを明らかにした。一方この *MEOX2* 遺伝子の変異について、人種差を調べるため、ベトナム人口蓋裂患者 227 例と、ベトナム人健常者 293 例の *MEOX2* 遺伝子の変異を調査したところ、SNP rs2237493 の変異を認め、ベトナム人女性では、男性と比較し、口蓋裂を発症するリスクが 1.455 倍高く、口蓋裂に性差があることを報告した。

口蓋裂の発症に関して、私たちが行ってきた遺伝子からの解析、および基底膜の代謝機構からの研究により、口蓋裂発症のメカニズムの一端が明らかになっているが、不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

これまで口蓋形成時に左右の口蓋突起が癒合しないことによって口蓋裂を発症するという説が一般的であった。したがって、口蓋が癒合しない原因について様々な研究が行われてきたが、明確な回答は出ていない。

本研究は、口蓋突起の癒合および離開の様態から口蓋裂発症のメカニズムを解明し、口蓋裂発症予防法の確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物および胎仔摘出

8-10 週齢の ICR 系雌マウス (CLEA, Tokyo, Japan) を購入し、室温  $22 \pm 1^\circ \text{C}$ 、湿度  $50 \pm 10\%$ 、定期的な 12 時間ごとの明暗サイクル下、標準固形試料と飲料水を制限なく摂取できる環境で飼育した。未経産雌マウスを同系の成熟雄マウスと終夜交配させ、翌朝膈陰形成が確認できたものを、当日の午前 0 時に妊娠したと想定し、胎生 1 日とした。胎生 12 日に、対照群にはトルエン含有オリーブ油 0.4ml、TCDD 投与群には口蓋裂を 100%発症する濃度である  $40 \mu\text{g}/\text{kg}$  の TCDD (Accu Standard Inc., New Haven, CT, USA) をトルエン含有オリーブ油 0.4ml に溶解し、それぞれ胃管にて単回経口投与した。口蓋形成期の口蓋部の観察を行うため、帝王切開により摘出した胎仔を使用した。対照群は胎生 14 日のマウス胎仔を使用した。

### (2) 組織固定および切片作製

摘出した胎仔頭部を 4%パラホルムアルデヒド (PFA) 0.1M リン酸緩衝液 (PBS) 溶液 (pH7.4) を用いて、24 時間浸漬固定を行った。上昇エタノール系列及びキシレンによる脱水・脱脂処理後、パラフィン包埋した。回転式マイクロトームを用いて、厚さ  $6 \mu\text{m}$  の胎仔頭部前頭断切片を作製した。

### (3) 組織学的観察

胎仔口蓋部前頭断切片を用いて Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色を行い、口蓋形成期の口蓋を前

方から後方にかけて観察し、対照群と TCDD 投与群との比較を行った。

#### (4) 免疫組織学的観察

##### ① 蛍光免疫組織染色による上皮組織、上皮細胞間接着因子および基底膜組織の観察

一次抗体は、マウス・モノクローナル抗 E-cadherin 抗体(ab76055、Abcam、Cambridge、UK)、ウサギ・ポリクローナル抗 laminin 抗体(L9393、Sigma、St. Louis、MO、USA)を使用した。抗 E-cadherin 抗体は上皮組織および上皮細胞間接着因子の観察、抗 laminin 抗体は基底膜組織の観察をするために用いた。

口蓋前方から後方にかけて観察を行った。二次抗体は、Goat anti-Mouse IgG (H+L);Alexa Fluor 488 (A-11029、Invitrogen、Carlsbad、CA、USA)、Goat anti-Rabbit IgG (H+L);Alexa Fluor 594(R37117、Invitrogen)を使用した。

##### ② 上皮細胞間接着因子の観察

一次抗体は、ウサギ・モノクローナル抗  $\beta$ -catenin 抗体(ab32572、Abcam)、マウス・モノクローナル抗  $\alpha$ -catenin 抗体(66221-1-1g、Proteintech、Rosemont、IL、USA)を使用し、口蓋前方から後方にかけて上皮細胞間接着因子の観察を行った。

胎仔口蓋部前頭断切片を脱パラフィン後、沸騰したクエン酸緩衝液 (pH7.0) の中でマイクロウェーブを 5 分照射し、抗原賦活化処理を行った。5% ブロックエース (UKB80、DS Pharma Biomedical) で 2 時間ブロッキングを行い、予備実験により最適化した濃度に希釈した一次抗体の混合溶液に浸漬して室温で 1 時間振盪し、さらに 4°C で一晩反応させた。翌日、一次抗体に対応した標識ポリマーを室温で 30 分反応させ、ペルオキシダーゼ染色キット (Nova RED Substrate Kit、SK-4800、Vector、Burlingame、CA、USA) を用いて、室温で 5-10 分反応させて染色した。

##### ③ アポトーシスの観察

胎仔口蓋部前頭断切片を脱パラフィン後、TUNEL assay kit (ab66110、Abcam) を用いて一連の操作を行い、蛍光 TUNEL 染色法を行った。核は、DAPI (D9542、Sigma) にて染色を行った。口蓋前方から後方にかけてアポトーシスの観察を行った。

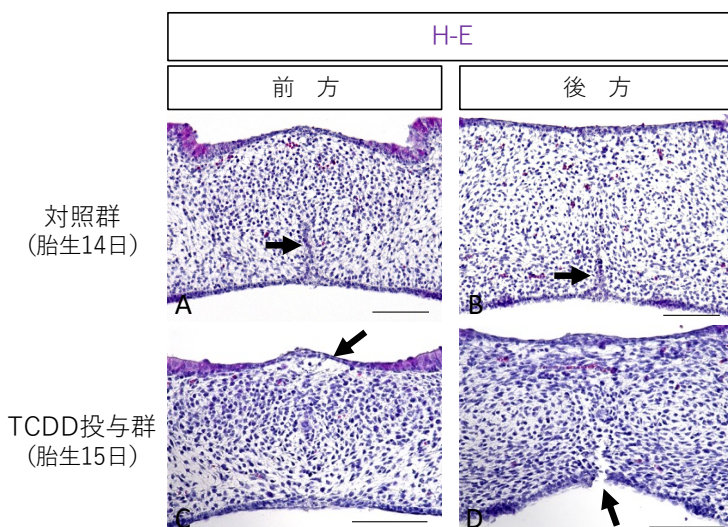
##### ④ 細胞増殖の観察

一次抗体は、マウス・モノクローナル抗 Ki67 抗体(RM-9106、Lab Vision、Fremont、CA、USA)を使用し、口蓋前方から後方にかけて細胞増殖の観察を行った。

胎仔口蓋部前頭断切片を脱パラフィン後、沸騰したクエン酸緩衝液 (pH7.0) の中でマイクロウェーブを 5 分照射し、抗原賦活化処理を行った。5% ブロックエース (UKB80、DS Pharma Biomedical) で 2 時間ブロッキングを行い、予備実験により最適化した濃度に希釈した一次抗体の混合溶液に浸漬して室温で 1 時間振盪し、さらに 4°C で一晩反応させた。翌日、一次抗体に対応した標識ポリマーを室温で 30 分反応させ、ペルオキシダーゼ染色キット (Nova RED Substrate Kit、SK-4800、Vector) を用いて、室温で 5-10 分反応させて染色した。H-E 染色、免疫組織染色を行ったすべての組織切片は、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X710、Keyence、大阪) を使用して検鏡、撮影を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 組織学的観察 (図 1)



対照群において H-E 染色を行ったところ、口蓋は前方から後方まで癒合しており、口蓋棚の正中部には上皮索を認めた (図 1A、B : 矢印)。

対照群では、前方の口蓋癒合部において口蓋棚全体に細胞を認めたが (図 1-A)、TCDD 投与群では鼻腔側粘膜下の細胞密度が疎になっていた (図 1C : 矢印)。また、口蓋後方部において、口腔側からの口蓋の離開 (図 1D : 矢印) を認めた。

図 1 : 対照群および TCDD 投与群の口蓋前頭断切片の H-E 染色像



(2) 上皮および上皮細胞間接着因子、基底膜の観察 (図2、3)

対照群の前方と後方の口蓋では、鼻腔側および口腔側粘膜、上皮索において、上皮細胞間接着因子である E-cadherin は上皮細胞に陽性を示し、基底膜の構成成分である laminin は連続的な染色像を認めた (図 2A-C、G-I)。

TCDD 投与群の前方の口蓋癒合部では、鼻腔側および口腔側粘膜、上皮索において E-cadherin は上皮細胞に陽性を示し、鼻腔側粘膜および上皮索において laminin は連続的な染色像を認めたが (図 2D-F)、口腔側粘膜では不連続な染色像を認めた (図 2E、F: 矢頭)。後方の口蓋離開部では、口腔側粘膜に離開を認め (図 2J-L: 小矢印)、laminin は口腔側粘膜において不連続な染色像を認め (図 2K、L: 矢頭)、同部の上皮細胞は E-cadherin 陰性であった (図 2J、L: 矢頭)。また、口蓋離開部付近の上皮索において E-cadherin は上皮細胞に陽性を示し (図 2J、L:

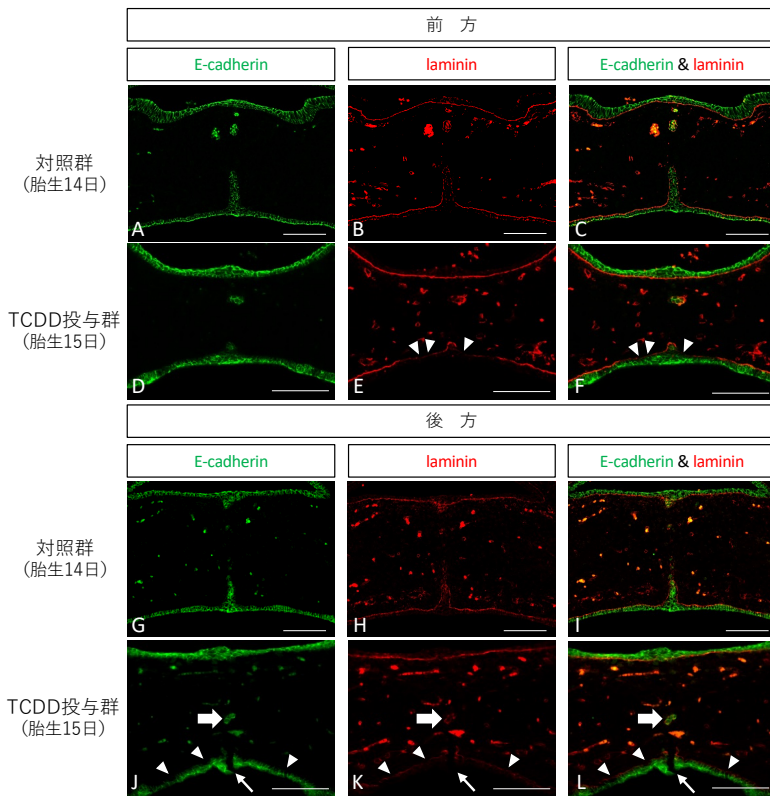


図2 対照群およびTCDD 投与群の口蓋前頭断切片の E-cadherin および laminin 染色像

大矢印)、laminin の染色像を認めた (図 2K、L: 大矢印)。

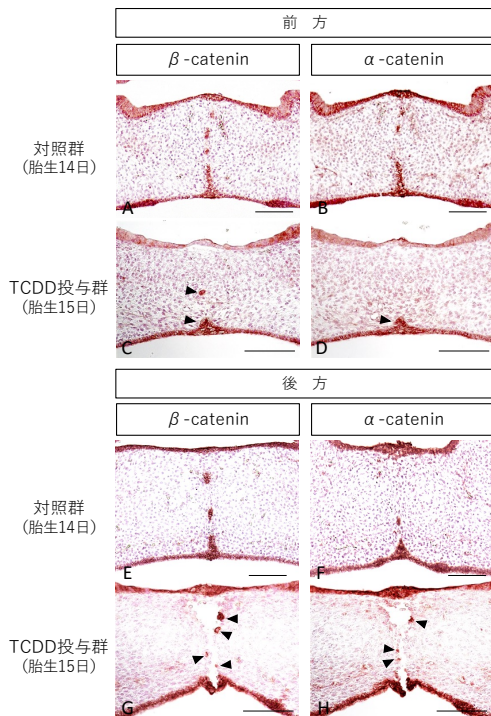


図3 対照群およびTCDD 投与群の口蓋前頭断切片の  $\beta$ -catenin、 $\alpha$ -catenin の染色像 (scale bar=100  $\mu$ m)

また、E-cadherin と複合体を形成する上皮細胞間接着因子である  $\beta$ -catenin、 $\alpha$ -catenin の局在を調べたところ、対照群について、前方および後方の口蓋部では、鼻腔側および口腔側粘膜、上皮索において  $\beta$ -catenin および  $\alpha$ -catenin は上皮細胞に陽性を示した (図 3A、B、E、F)。

TCDD 投与群について、前方の口蓋癒合部では、対照群と同様に鼻腔側および口腔側粘膜において  $\beta$ -catenin、 $\alpha$ -catenin は上皮細胞に陽性を示したが、鼻腔側粘膜正中部では陰性であった (図 3C、D)。口蓋正中部の上皮索において  $\beta$ -catenin、 $\alpha$ -catenin は上皮細胞に陽性を示した (図 3C、D: 矢頭)。また、後方の口蓋離開部では、鼻腔側および口腔側粘膜において  $\beta$ -catenin、 $\alpha$ -catenin は上皮細胞に陽性を示し (図 3G、H)、口蓋離開部付近の上皮索において  $\beta$ -catenin、 $\alpha$ -catenin は上皮細胞に陽性を示した (図 3G、H: 矢頭)。

(3) アポトーシスの観察 (図4)

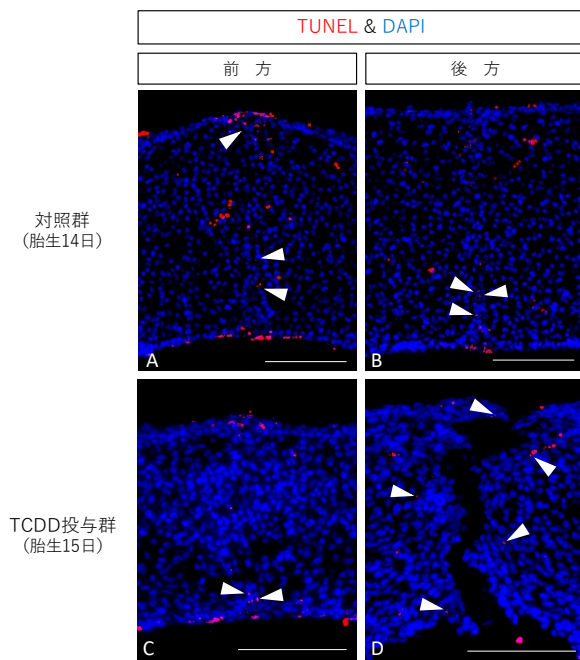


図4 対照群およびTCDD投与群の口蓋前頭断切片のTUNEL染色像 (scale bar=100 μm)

対照群では、前方および後方の口蓋において、上皮索にアポトーシスが起きていることを示すTUNEL陽性細胞を認めた (図4A、B: 矢頭)。

TCDD投与群では、前方の口蓋癒合部においては対照群と同様に上皮索にTUNEL陽性細胞を認め (図4C: 矢頭)、後方の口蓋離開部では、離開部周囲にTUNEL陽性細胞を認めた (図4D: 矢頭)。

(4) 細胞増殖の観察 (図5)

対照群では、前方の口蓋では鼻腔側および口腔側粘膜、上皮索周囲に細胞増殖マーカーであるKi67陽性細胞を認めた (図5A: 矢頭)。後方の口蓋では鼻腔側および口腔側粘膜、口蓋棚全体にKi67陽性細胞を認めた (図5B: 矢頭)。

TCDD投与群では、前方の口蓋癒合部では鼻腔側および口腔側粘膜、上皮索周囲にKi67陽性細胞を認めた (図5C: 矢頭)。後方の口蓋離開部では離開部周囲にKi67陽性細胞を認めた (図5D: 矢頭)。

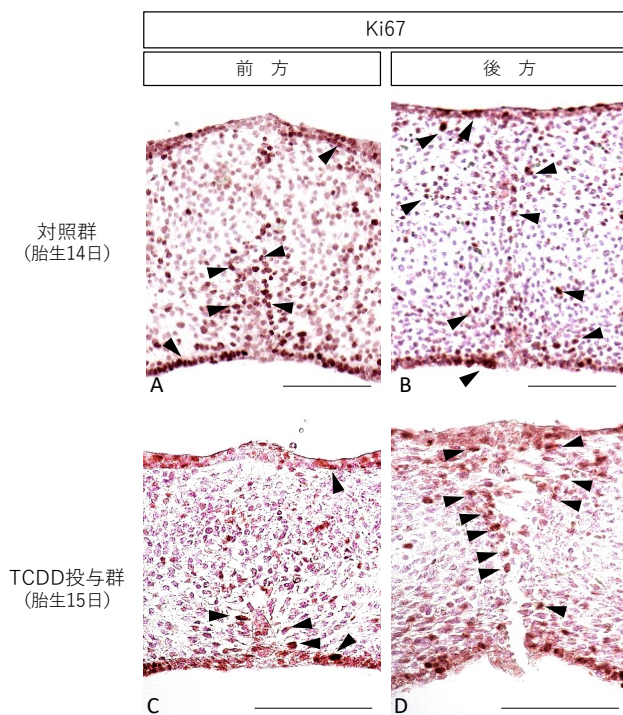


図5 対照群およびTCDD投与群の口蓋前頭断切片のKi67染色像 (scale bar=100 μm)

TCDD投与マウスにおいて口蓋癒合後の離開による口蓋裂の発症機序として、がんの転移に類似した機序がある可能性が考えられた。また、上皮組織の異常な細胞増殖や、細胞間接着の低下、および間葉系細胞の増殖阻害が口蓋の離開を生じる要因の一つである可能性が示唆された。

口蓋裂を発症するまでの段階において一度癒合した口蓋が離開に転じる機序を解明することにより、離開を阻止する要素が発見される可能性が考えられ、新たな口蓋裂発症の予防法の確立につながる事が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hideto Imura, Nagato Natsume, Teruyuki Niimi, Maya Yoshida, Chisato Sakuma	4. 巻 3
2. 論文標題 Case of feeding disorder due to lymphangioma of the tongue: Importance in developing countries	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Congenit Anom	6. 最初と最後の頁 105 - 107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cga.12410.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nguyen DM, Suzuki S, Imura H, Niimi T, Furukawa H, Ta TV, Tong SM, Nguyen TT, Pham LNG, Tran DL, Natsume N.:	4. 巻 Sep;9(9)
2. 論文標題 Family based and case-control designs reveal an association of TFAP2A in nonsyndromic cleft lip only among Vietnamese population.021	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Genet Genomic Med.	6. 最初と最後の頁 e1754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mgg3.1754.	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 -

1. 著者名 Sakuma C, Imura H, Yamada T, Hirata A, Ikeda Y, Ito M, Natsume N.	4. 巻 23(4)
2. 論文標題 :Histological and Immunohistochemical Studies to Determine the Mechanism of Cleft Palate Induction after Palatal Fusion in Mice Exposed to TCDD.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 2069
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcms.2018.09.016.	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8件（うち招待講演 6件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Imura H, Natsume N
2. 発表標題 Developmental mechanism of cleft palate: Cleft palate formation after palatal fusion
3. 学会等名 THE JAPANESE TERATOLOGY SOCIETY 60TH ANNUAL MEETING Symposium（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐久間 千里, 井村 英人, 山田 朋弘, 池田 やよい, 夏目 長門
2. 発表標題 口唇口蓋裂に関する実験的研究(第132報) マウスの口蓋突起癒合後の離開による口蓋裂発生機序について
3. 学会等名 日本口蓋裂学会雑誌
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chisato Sakuma, Hideto Imura, Tomohiro Yamada, Yayoi Ikeda, Toshio Sugahara, Nagato Natsume
2. 発表標題 Cleft palate after palatal fusion in mice exposed to TCDD
3. 学会等名 The 59Th Annual Meeting of The Japanese Teratology Society The 13th World Congress of The International Cleft Lip and Palate Foundation(Nagoya) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki S, Ono M, Niimi T, Yamamoto M, Imura H, Nguyen C, Leslie E, Cooper M, Natsume N, Nguyen M, Marazita ML, Murray JC
2. 発表標題 Replication of GWAS candidate genes in nonsyndromic cleft lip and/or cleft palate in Vietnamese population.
3. 学会等名 The 59Th Annual Meeting of The Japanese Teratology Society The 13th World Congress of The International Cleft Lip and Palate Foundation(Nagoya) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S Suzuki, ML Marazita, ME Cooper, E Dragan, A Butali, M Mansila, N Natsume, Y Suzuki, T Niimi, M Yamamoto, G Ayanga, T Erkhembaatar, H Furukawa, K Minami, H Imura, K Fujiwara, J L'Heureux J, K Durda, AC. Lidral, JC Murray
2. 発表標題 Replication of genome wide association findings for cleft lip and palate - a role for variants in MAFB, VAX1 and PAX7 in Asian populations.
3. 学会等名 The 59Th Annual Meeting of The Japanese Teratology Society The 13th World Congress of The International Cleft Lip and Palate Foundation(Nagoya) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chisato Sakuma, Hideto Imura, Tomohiro Yamada, Yayoi Ikeda, Toshio Sugahara, Nagato Natsume
2. 発表標題 Cleft palate after palatal fusion in mice exposed to TCDD.
3. 学会等名 The 59th Annual Meeting of The Japanese Teratology Society The 13th World Congress of The International Cleft Lip and Palate Foundation(Nagoya) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Duy Le Tran, Hideto Imura, Akihiro Mori, Satoshi Suzuki, Teruyuki Niimi, Toko Hayakawa, Tham Thi Hong Nguyen, Phuong Thi Pham, Ut Cong Nguyen, Viet Hoang, Hiep Minh Trinh, Minh Duc Nguyen, Tan Van Ngo, Mai Van Phan, Nagato Natsume
2. 発表標題 Association of MEOX2 polymorphism with nonsyndromic cleft palate only in a comparison between a Japanese population and a Vietnamese population.
3. 学会等名 The 59th Annual Meeting of The Japanese Teratology Society The 13th World Congress of The International Cleft Lip and Palate Foundation(Nagoya) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakuma C, Imura H, Hayakawa T, Waka Y, Fujiwara K, Suzuki S, Furukawa H, Minami K, Niimi T, Yoshida M, Mori A, Ito M, Akiyama Y, Akiyama Y, Natsume N Natsume N
2. 発表標題 Epidemiological study of patients with CLP No.67 -Birth survey of 2018 in the Tokai region-
3. 学会等名 THE JAPANESE TERATOLOGY SOCIETY 60TH ANNUAL MEETING Symposium (招待講演)
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
研究 分担 者	平田 あずみ	大阪医科薬科大学・医学部・准教授	
	(Hirata Azumi)		
	(40263587)	(34401)	



## 6. 研究組織（つづき）

	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	鈴木 聡  (Suzuki Satoshi)  (30468996)	愛知学院大学・歯学部・歯学部研究員    (33902)	
研究分担者	南 克浩  (Minami Katsuhiro)  (70346162)	愛知学院大学・歯学部・講師    (33902)	
研究分担者	吉田 磨弥 (大野磨弥)  (Yoshida Maya)  (70760718)	愛知学院大学・歯学部・歯学部研究員    (33902)	
研究分担者	森 明弘  (Mori Akihiro)  (30804413)	愛知学院大学・歯学部・歯学部研究員    (33902)	

## 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

## 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関