

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 年度～2010 年度

課題番号：20791499

研究課題名（和文）P53 ノックアウトマウスを用いた新規口唇口蓋裂感受性遺伝子の検索

研究課題名（英文）Search for new susceptibility gene controlled of cleft and/or palate development using p53 knock-out mice

研究代表

児玉 泰光（KODAMA YASUMIKTSU）

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：90419276

研究成果の概要（和文）：MSM 系統 p53 ノックアウトマウス製作に難渋し、引き続いて研究を継続し目的を達成する考えである。一方で、マイクロサテライトマーカーによる p53 タイピングにおける PCR の条件設定はほぼ定まり、順次条件を調整して安定したタイピングを目指している。新規口唇口蓋裂感受性遺伝子の同定には至っていないが、今後、本研究を継続することにより、該当遺伝子群の同定、解析、臨床面への寄与の可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We suffer from MSM p53 knockout mouse production. We continue a study continuously and are planning to achieve a purpose. Whereas the condition establishment of p53 typing and the PCR which we used microsatellite marker for was almost decided. We aim at the stable typing by adjusting a condition sequentially. It have not lead to the identification of new susceptibility gene for cleft lip and palate promotion yet, but the identification of the applicable gene cluster, analysis of function, likelihood of the contribution to a clinical were shown in future by continuing this study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学 A 2 2

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口唇口蓋裂、p53 遺伝子、アポトーシス、感受性遺伝子、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域において口唇口蓋裂は最も発生率の高い外表奇形である。さらに本邦発症率は欧米の2倍(500人に1人)で、我々にはその治療学や病因論を完結させる急務がある。本疾患に対する研究の多くは顎顔面発育・言語発育などの臨床研究で、

少しずつではあるが治療効果の向上が報告されている。しかし、治療技術が向上したとしても、手術痕は残遺し、それに伴う障害が消失することはない。したがって、その複雑な病因の一部でも解明し、発生率を下げることができれば、その恩

患は計り知れない。現段階では、病因を論ずる基礎研究は少なく分子遺伝学的研究は皆無とあって良い。基礎的実験に頻用される CL/Fr 系統マウスは、高い確率で口唇口蓋裂を自然発生する近交系マウスであるが、マウスの系統によっては口唇口蓋裂発症率に系統差が存在することが知られている。一方で p53 遺伝子は癌抑制遺伝子として知られる反面、発生初期の胎児ではアポトーシスを誘導し奇形の発生を防いでいる。過去に Sah や Armstrong は p53 ノックアウトマウスにおける脳ヘルニア自然発生について報告し、また、Nicol は口唇口蓋裂と benzopyrene 投与との関連性について、Norimura は放射線照射との関連性について報告をしている。しかし、口唇口蓋裂には言及しておらず、分子遺伝学的な考察はされていない。Zhang は Msx1 ノックアウトマウス、Rice は Fgf10/Frfr2b ノックアウトマウスにおいて、口蓋裂発生原因は口蓋突起での細胞分化増殖の減少によるものであると報告しているが、p53 遺伝子の影響については言及していない。そこで平成 18~19 年若手研究(B)(43340548)の科学研究費補助金を使用し口唇口蓋裂発生と p53 遺伝子の関連性について注目し研究を進めた結果、我々は CL/Fr 系統 p53 ノックアウトマウスを用いた放射線照射実験から p53 遺伝子が口蓋裂発症関連遺伝子であることを証明し、病因解明の糸口に辿り着いた。



CL/Fr mice

両側唇顎口蓋裂
正面観



CL/Fr mice

両側唇顎口蓋裂
上顎咬合面観

2. 研究の目的

本研究の目的は、上に示した先天奇形誘発マウスにおける p53 遺伝子欠損口唇口蓋裂感受性マウスを使用して、口唇口蓋裂発症における p53 遺伝子依存性アポトーシスの影響を考察し、口唇口蓋裂感受性遺伝子の検索をすることである。

3. 研究の方法

人工受精は本学脳研動物資源開発研究分野の協力のもとで行う。具体的には得られた凍結受精卵を母マウスに移植(移植日を妊娠 2 日目と規定する)し、妊娠 8 日、9 日、10 日、11 日、12 日、13 日目に本学アイソトープセンターにて γ 線照射を行う。照射後の妊娠マウスは、適切な麻酔処置後、妊娠 19 日目で安楽死させ開腹にて仔胎を摘出し、裂奇形の有無、体重、他の外表奇形について精査する。 γ 線照射は、0.5Gy、1.0Gy、1.5Gy、2.0Gy、2.5Gy、3.0Gy とし、照射量および照射時期によって生じる裂奇形の傾向を記録する。この時、マイクロサテライトマーカーを用いて p53 遺伝子欠失型を同定する。この実験により、最も効率よく表現形を同定できる条件確認し、この結果を元に他の系統における照射実験をより効率のかつ円滑に行う。各系統マウスにおける裂奇形発生頻度と CL/Fr 系統 p53 ノックアウトマウスの結果とを比較検討し、各系統間での差異を明らかにする。

(研究の順序)

(1) MSM 系統 p53 ノックアウトマウス

野生型マウスであり他の系統より発生頻度は下がることが予想される。その一方で、照射時期、照射量を変えることで特徴を考察することができる。

(2) MSM/B6 マウスの F1 p53 ノックアウトマウス

F1 マウスにおける感受性/抵抗性を判定することにより、口唇口蓋裂がどのような遺伝形式をとるかが明らかになる。また、各系統で発症率に最も開きのあった条件をコンソミックマウスでの照

射条件に設定する。これまでの文献から、FI p53 ノックアウトマウスの口唇口蓋裂発症頻度は、MSM 系統 p53 ノックアウトマウスの発症頻度に近づくことが予想される。

(3) コンソミックマウス

当初の予測通り MSM 系統は抵抗性、B6 系統は感受性を示した場合、B6 バックグラウンドのコンソミックマウスを購入し各染色体毎に照射実験を行う。この作業を繰り返し感受性遺伝子の存在する染色体を検索する。本研究はこまを最終目標とする。

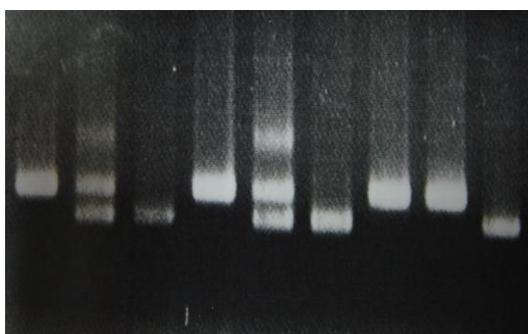
(*コンソミックマウス:ある1つまたはいくつかの染色体が、それ以外の染色体と異なる系統からなる固体。例えば、染色体1番がB6系統由来で、それ以外の染色体が全てMSM系統由来のマウスを用いて解析をした場合、もし、MSM系統マウスと結果が異なれば、異なる結果の原因は1番染色体に存在するB6由来の遺伝子と言及することができる)

(4) 53 遺伝子の関連遺伝子群の検索

最も細胞の増殖が盛んな胎生日前後の胎仔口蓋突起の切片を作製し、形態学的に観察する。具体的には、胎生 11.5 日から 12 時間毎に 13.5 日までの胎仔の口蓋突起部の前頭断連続切片を作製する。HE 染色で全体像・細胞核の状態を観察するとともに TUNEL 法にてアポトーシスの評価、Brd-U 法にて細胞増殖の評価を行う。そこで、p53 遺伝子型と口蓋突起部の細胞動態および口唇口蓋裂発生率との関連性について評価・検討を行う。また、p53 遺伝子の活性化により発現量の上昇が知られている p53 関連遺伝子として、p21 (細胞周期制御に関与)、GADD45 (DNA 修復に関与)、Bax (アポトーシスに関与)、MDM2 (p53 機能制御に関与) などがある。p53 遺伝子型や口唇口蓋裂の有無の違いによるそれらの遺伝子の発現タンパク量の差異をウェスタンブロット法を用いて解析することで、放射線照射の影響と口唇口蓋裂発生との関連性についてさらに進んだ考察が可能になる。

4. 研究成果

実験(1)の MSM 系統 p53 ノックアウトマウス製作に難渋し、動物実験施設における予期せぬ肝炎ウイルス蔓延なども加わって、実験途中でマウス製作をやり直した経緯がある。計画が予定通り完遂していないため引き続いて研究を継続し目的を達成する考えである。一方で、マイクロサテライトマーカーによる p53 タイピングにおける PCR の条件設定はほぼ定まり、順次条件を調整して安定したタイピングを目指しているところである。



Wt +/- -/- Wt +/- -/- Wt Wt -/
コントロール

マイクロサテライトマーカーによる p53 タイピング

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 件)

〔学会発表〕 (計 件)

〔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

児玉 泰光 (KODAMA YASUMITSU)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：90419276