

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19681

研究課題名（和文）口蓋形成初期におけるビオチンの機能解明と口蓋裂予防への応用

研究課題名（英文）Clarification of the function of biotin during early palatogenesis and its application to 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・特任助教

研究者番号：30555371

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ビオチンを欠乏させた母体へのビオチン補給が胎仔の口蓋形成におよぼす影響を検討した。ビオチン欠乏マウスに対して妊娠10日から12日にビオチンを補給すると口蓋裂発生を完全に抑制できることを見出した。口蓋形成初期にビオチンが充足されていることが重要であると考えられる。妊娠13日の胎仔口蓋における結合型ビオチン量は、妊娠15日より多い傾向がみられ、ビオチンがたんぱく質と結合することにより口蓋形成に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口蓋裂は日本人で頻度の高い先天顔面奇形の一つである。しかし、その発生病因および発生機序については十分に解明されていない。口蓋裂の治療の主体は外科的治療であり、根本的治療法は存在しないことから、口蓋裂発生機序の解明および予防法の確立が求められる。本研究では、妊娠10日のビオチン欠乏マウスにビオチンを補給すると口蓋裂発生を完全に抑制できることを見出した。ビオチン欠乏による口蓋裂発生機序を明らかにしていくことで予防法の確立への貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effects of biotin supplementation to pregnant dams on the development of palatal processes in biotin-deficient fetal mice. We demonstrated that biotin administration to pregnant dams from day 10 to 12 of gestation prevents cleft palate in biotin-deficient fetal mice. This suggests that biotin is required in the initial stage of palatogenesis. The bound biotin concentration in palatal processes on day 13 of gestation (dg 13) was tend to higher than that on dg 15. It is suggested that biotin may binds to some proteins related to palatogenesis.

研究分野：栄養生化学

キーワード：ビオチン 口蓋裂

### 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、幅広く食品に含まれているため、ヒトでの欠乏症はまれである。近年、妊娠女性において、欠乏症状は見られないものの、体内のビオチンが不足している潜在性ビオチン欠乏が懸念されており、妊娠女性は通常の食生活をしていても潜在性ビオチン欠乏を生じるリスクがあることが示されている (Stratton et al. J Nutr, 2011)。妊娠期にはビオチンの要求量が高まると考えられることから、妊娠女性におけるビオチン摂取の重要性を明らかにする必要がある。

マウスにおいて、母体のビオチン欠乏により 90%以上の胎児に口蓋裂が発生することが報告されている。ビオチン欠乏による口蓋裂発生率は、他の口蓋裂関連因子 (関連遺伝子の改変マウスやレチノイン酸過剰等) による口蓋裂発生率と比較して非常に高く、ビオチンが胎児の口蓋形成に重要であると考えられる。申請者は、妊娠 11 日目のビオチン欠乏マウスにビオチンを供給すると、口蓋裂発生を抑制できることを見出している (未発表)。マウスの口蓋形成は妊娠 11 日頃に開始され、母体が摂取したビオチンは速やかに胎児に供給されることから、ビオチンが口蓋形成初期において重要な役割を果たしていると考えられる。

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、多数の遺伝子と多数の環境要因が相互に作用し、奇形の生じやすさが一定の値 (しきい値) を超えたときに口蓋裂が発生するという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十分に解明されていない。口蓋裂の治療の主体は外科的治療であり、根本的治療法は存在しないことから、口蓋裂発生機序の解明および予防法の確立が求められる。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機序の報告が少ないのが現状である。本研究は、環境因子による口蓋裂発生機序に関する新たな知見を提供することができ、口蓋裂予防法の確立への貢献が期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、口蓋形成初期におけるビオチンの機能を解明することにより、ビオチン欠乏による口蓋裂発生機序を明らかにする。以下のことを明らかにしていく。

- (1) ビオチンが口蓋形成過程において、どの時期に、どの部位において重要であるかを明らかにする。口蓋は、口蓋突起の成長、挙上、癒合という大きく 3 つの過程を経て形成される。口蓋の部位によって遺伝子発現や機能が異なることが報告されていることから、ビオチン欠乏が発生時期・部位特異的に口蓋に及ぼす影響を調べる。
- (2) ビオチン欠乏による口蓋裂発生がシグナル伝達の異常によるものであるかどうかを明らかにする。口蓋形成の各過程における重要なシグナルが多く報告されていることから、ビオチン欠乏がマウス口蓋のシグナル伝達に及ぼす影響を調べる。特に、ビオチンが重要な役割を果たしていると考えられた発生時期、部位を中心に検討する。
- (3) ビオチン欠乏による口蓋裂発生が、エピジェネティック変化を介して起こるのかどうかを明らかにする。ビオチン欠乏により変化が見られた因子をビオチンの標的遺伝子とし、標的遺伝子のプロモーター領域におけるヒストンのビオチン化を調べる。ビオチンはヒストンメチル化部位と競合的に結合することから、ヒストンメチル化への影響について解析する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ビオチン添加期間が口蓋形成に及ぼす影響

実験動物には 7 週令の ICR 系雌性マウスを用い、同種雄性マウスと交配させ妊娠マウスを製作した。妊娠確認日を妊娠 0 日 (胎齢 0 日) とし、欠乏群にはビオチン欠乏飼料を、コントロール群にはビオチン添加飼料を与えた。ビオチン欠乏飼料にビオチンを 5mg/kg 添加したものをビオチン添加飼料とした。さらに、妊娠 10 日までビオチン欠乏飼料を与えた後にビオチン添加飼料に切り替える群を添加群とし、それぞれビオチン供給期間を変えて妊娠 15 日まで飼育した。

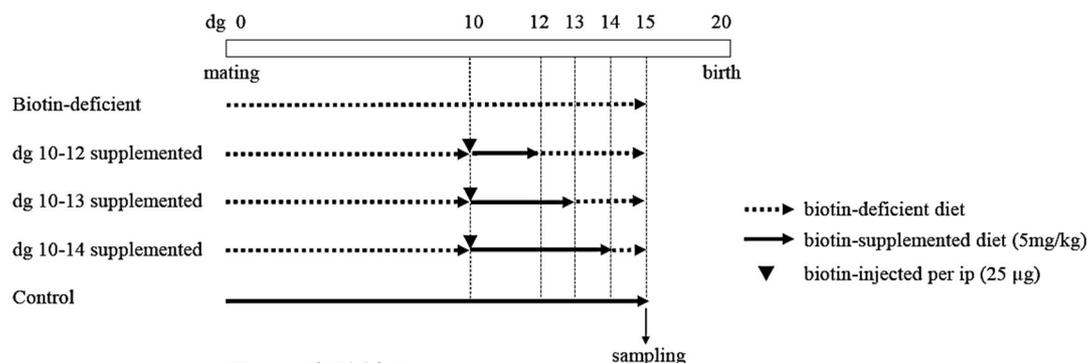


図 1 実験計画

添加群は、dg10-12 添加群、dg10-13 添加群、dg10-14 添加群とした（図 1）。妊娠 15 日の胎児を摘出し、口蓋突起を採取した。

また、ビオチンの添加量が必要量よりも過剰であったため、添加期間による影響が見られなかった可能性が考えられたことから、本研究で用いたビオチン添加量が欠乏状態に及ぼす影響を調べるため、母体および胎仔の組織中ビオチン量、血清 3-ヒドロキシイソ吉草酸（3-HIA）濃度を測定した。血清 3-HIA は、シナピン酸を内部標準物質に用いて、GC-MS 法により相対値を求めた。

## (2) 発生時期によるビオチン必要量の比較

ビオチンの供給が重要だと考えられる口蓋形成初期における影響を検討した。実験動物には 7 週令の ICR 系雌性マウスを用い、(1)と同様の方法で妊娠動物を作製した。飼育方法も(1)と同様とし、ビオチン欠乏飼料またはビオチン添加飼料を与えて妊娠 13 日まで飼育した。ICR マウスは妊娠 11 日頃に口蓋突起が発生し、妊娠 13 日頃に左右の口蓋突起が舌の側面に沿って垂直方向に伸長することが報告されていることから、口蓋突起が発生してから垂直方向に成長するまでの時期にビオチンが必要であると推測し、妊娠 13 日の胎仔を摘出し、左右の口蓋突起を採取した。(1)で採取した妊娠 15 日の胎仔口蓋との比較を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ビオチン添加期間が胎児の口蓋形成に及ぼす影響

口蓋裂発生率は欠乏群で有意に高くなり、ビオチン欠乏により口蓋裂が生じた。一方、妊娠 10 日までビオチン欠乏飼料で飼育した後にビオチン添加飼料に切り替えた添加群においては、すべての添加群（dg10-12, dg10-13, dg10-14）で口蓋裂発生率が 0%となった（表 1）。

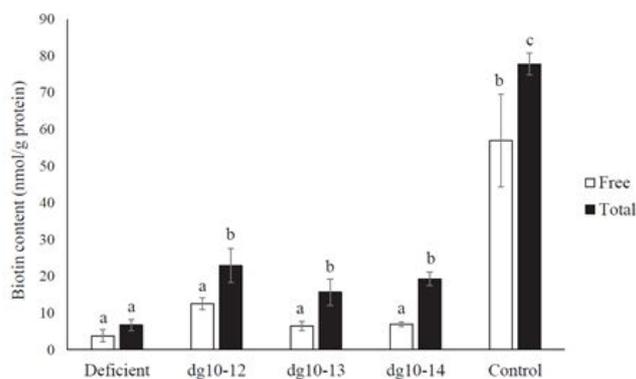
表 1 ビオチン添加期間が母体および胎児に及ぼす影響

	Dietary groups				
	Deficient	day 10-12 of gestation supplemented	day 10-13 of gestation supplemented	day 10-14 of gestation supplemented	Control
Dams					
No. dams examined	3	3	3	3	3
Body weight gain during dg 0-15 (g)	18.2 (17-19) <sup>a</sup>	22.2 (22-23) <sup>b</sup>	17.7 (17-19) <sup>a</sup>	19.3 (18-20) <sup>ab</sup>	22.2 (21-23) <sup>b</sup>
Fetuses					
No. fetuses examined	38	47	38	42	43
Mean	12.7 (12-13)	15.7 (13-18)	12.7 (12-13)	14.0 (13-15)	14.3 (12-16)
Body weight on dg 15 (g)	0.39 ± 0.032	0.42 ± 0.043	0.42 ± 0.053	0.43 ± 0.023	0.49 ± 0.022
Cleft palate (%)	63.6 <sup>c</sup>	0.0 <sup>d</sup>	0.0 <sup>d</sup>	0.0 <sup>d</sup>	0.0 <sup>d</sup>

Values are mean ± SD or mean (min-max).

Different superscript letters indicate significant difference between groups: <sup>ab</sup>P<0.05; <sup>cd</sup>P<0.001.

口蓋突起中のビオチン量は、コントロール群と比較して欠乏群および添加群で有意に減少した（図 2）。以前の研究より、妊娠 11 日以降にビオチンを添加すると、口蓋裂発生率は減少するが、完全には抑制できないことが確認されていることから、妊娠 10 日頃にビオチンが充足していることが重要であると考えられる。ICR マウスでは、妊娠 11 日頃に口蓋突起が発生し、妊娠 13 日頃に左右の口蓋突起が舌の側面に沿って垂直方向に伸長することが報告されており、口蓋突起が発生してから垂直位をとるまでの段階においてビオチンが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また、ビオチン添加群とコントロール群とのあいだで有意差がみられたことから、今回のビオチン添加期間（2~4 日）ではコントロール群と同等まで回復できる量のビオチンは補給されなかったが、口蓋形成に必要な量のビオチンは補給されていたと考えられる。ビオチン添加期間が 2 日の dg10-12 群においても口蓋裂発生率が 0%となったことから、口蓋形成初期に必要な量のビオチンが補給されていれば、その後のビオチン補給がなくても正常に口蓋が形成される可能性が示唆された。しかし、今回添加したビオチン量が口蓋形成に必要な量よりも過剰であり、添加期間の影響が見られなかった可能性も考えられる。そこで、各群のビオチン欠乏状態について調べた。



Values are mean ± SD.

Different superscript letters indicate significant difference between groups.

図 2 妊娠 15 日の胎仔口蓋におけるビオチン量

母体血清中のビオチン量は、コントロール群と比較して欠乏群およびすべての添加群で有意に減少した。母体肝臓中のビオチン量は差が見られなかったが、胎仔肝臓中のビオチン量は欠乏群およびすべての添加群でコントロール群と比較して有意に減少し、欠乏群は dg10-14 添加群

よりも有意に低かった（表 2）。このことから、母体に供給されたビオチンは、胎児に優先的に供給されると考えられ、ビオチン添加期間が長くなるほど胎仔組織中のビオチン量が増加する傾向が見られた。

表 2 妊娠 15 日の母体および胎仔組織におけるビオチン量

	Biotin concentration	Dietary groups				Control
		Biotin-deficient	dg10-12 supplemented	dg10-13 supplemented	dg10-14 supplemented	
Dams						
Serum <sup>1</sup>	total	48.6 ± 9.9 <sup>a</sup>	44.1 ± 4.1 <sup>a</sup>	45.8 ± 10.5 <sup>a</sup>	50.0 ± 14.7 <sup>a</sup>	112.2 ± 19.0 <sup>b</sup>
	free	42.7 ± 9.6 <sup>a</sup>	38.7 ± 6.4 <sup>a</sup>	44.3 ± 10.7 <sup>a</sup>	44.1 ± 12.1 <sup>a</sup>	106.3 ± 20.5 <sup>b</sup>
Liver <sup>2</sup>	total	2.1 ± 0.7	2.2 ± 0.5	1.9 ± 0.2	1.7 ± 0.3	2.1 ± 0.3
	free	1.6 ± 0.2	1.8 ± 0.7	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.3	1.5 ± 0.1
Fetuses						
Liver <sup>2</sup>	total	0.2 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>ab</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>ab</sup>	0.9 ± 0.3 <sup>b</sup>	3.0 ± 0.5 <sup>c</sup>
	free	0.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.5 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> pmol/L, <sup>2</sup> nmol/g. Values are the mean ± SD.

Values are mean ± SD.

また、各群における血清 3-HIA 濃度（内部標準に対する相対的濃度として示す）は、欠乏群で 0.037 ± 0.014、dg10-12 群で 0.008 ± 0.000、コントロール群で 0.011 ± 0.004 となり、欠乏群で有意に増加した。ビオチン欠乏時に 3-HIA が増加することから、ビオチン欠乏群はビオチン欠乏状態であったと考えられる。一方、dg10-12 添加群は、母体血清および胎仔肝臓中のビオチン量は低下していたものの、3-HIA への影響が見られなかったことから、潜在的な欠乏状態であったと考えられる。口蓋ビオチン量はすべての添加群で欠乏群よりも有意に高かったことから、口蓋に優先的にビオチンが供給されたのではないかと推測される。

## (2) 発生時期によるビオチン必要量の比較

発生時期によるビオチン必要量の違いが考えられたことから、妊娠 13 日と妊娠 15 日の胎仔口蓋ビオチン量を比較した。発生時期によるビオチン量の差は見られなかった。しかし、妊娠 13 日のコントロール群の方が妊娠 15 日のコントロール群よりも結合型ビオチン量が多い傾向が見られたことから、ビオチンが口蓋形成に関わっていると推測される口蓋形成初期においては、結合型ビオチンが多く存在している可能性が考えられる。ビオチンが特定のタンパク質と結合することで口蓋が形成され、ビオチン欠乏によって結合型ビオチンが減少することにより口蓋形成が障害される可能性が推測された。

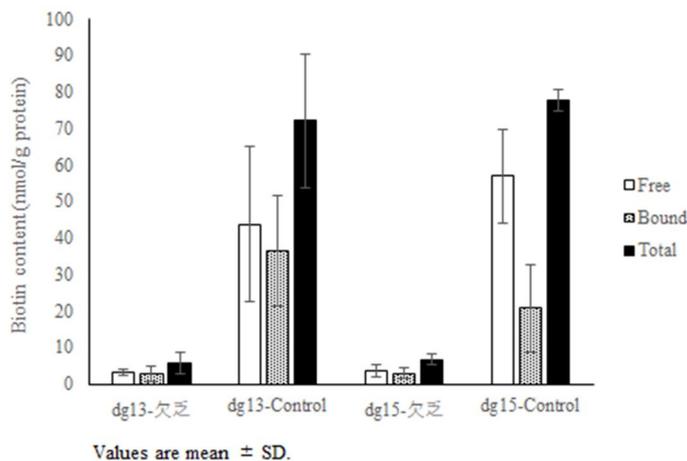


図 3 妊娠 13 日および 15 日の胎仔口蓋におけるビオチン量

以上の結果から、正常な口蓋形成のためには、妊娠 10 日の時点で十分なビオチンが供給されていることが重要であり、ビオチンが特定のタンパク質と結合することで口蓋形成に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiromi Sawamura, Moe Kawase, Ami Yano, Shuhei Ebara, Munetaka Negoro, Toshiaki Watanabe	4. 巻 38
2. 論文標題 Biotin supplementation to pregnant dams prevents cleft palate in biotin-deficient fetal mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 微量栄養素研究	6. 最初と最後の頁 44-47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.51029/jtnrs.38.0_44	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 澤村弘美, 榎原周平, 根来宗孝, 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供給期間が胎児の口蓋形成に及ぼす影響
3. 学会等名 第38回日本微量栄養素学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------