

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月12日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659466

研究課題名（和文） 新しい口蓋裂治療のための遺伝子プロファイルの確立

研究課題名（英文） Establishment of gene expression profile
for new therapy of cleft palate

研究代表者

阪井 丘芳 (SAKAI TAKAYOSHI)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：90379082

研究成果の概要（和文）：本研究は、口蓋裂の臨床治療に応用するために、胎生期マウスの口蓋閉鎖に関わる分子機構を明らかにすることを目標にしている。口蓋突起が癒合する前、癒合する途中、癒合した後の遺伝子発現プロファイルを作製し、口蓋閉鎖に関与する可能性のある遺伝子群を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The aim of this research is to clarify the molecular mechanism of palatal fusion for clinical treatment of cleft palate. Gene expression profile of palatal processes before, during and after fusion was established, and some of genes that could be related to palatal fusion were identified.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	0	900,000
2010年度	900,000	0	900,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	360,000	3,360,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：唇顎口蓋裂・口蓋閉鎖・遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

口唇裂・口蓋裂とは、口唇、歯槽部、口蓋などの口腔顎顔面領域に披裂を生じる先天異常であり、日本では、新生児の約500人に1人の確率で発生し、海外でも割合は異なるが、発生頻度が高い。裂の程度、発生原器、披裂部位などによって様々なタイプがあり、以前より、原因は遺伝的要因と環境的要因の両者が複雑に関係していると言われている。代表研究者らは、大阪大学歯学部附属病院にて、口唇裂・口蓋裂患者の一環治療を行っている。現在のところ、口唇裂・口蓋裂患者に対して

は、成人年齢に達するまでは、手術を行う治療法が主体で、組織工学的、遺伝子工学的に閉鎖をはかるなどの新しい治療法が期待されているが、未だに発展していないのが現状である。

2. 研究の目的

胎生期における口蓋の発生機序は両側の上顎突起より口蓋突起が発生し、癒合する際に、口蓋板の成長と水平転移または挙上、上皮細胞の接着と自己分解、間葉の癒合という段階を経ると言われているが、このうちのいずれ

かで障害が起こると口蓋裂が発生する。本研究では、形態観察しやすいマウス胎児口蓋形成をモデルとして用い、口蓋閉鎖に寄与する遺伝子群を明らかにし、組織工学的、遺伝子工学的に口蓋閉鎖をはかり、新しい口蓋裂治療法を探究することを目的としている。

3. 研究の方法

口蓋突起先端部の上皮の遺伝子発現を癒合前、癒合中、癒合後の3者間で比較し、既知の遺伝子、新規遺伝子も含めて、口蓋閉鎖に関わる遺伝子群を明らかにする。口蓋閉鎖を制御している遺伝子のプロファイルを作製するために、連続的遺伝子発現解析法：SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) 法を用いる (www.sagenet.org)。少量のサンプルから total RNA を抽出し、T7-based RNA amplification 法を組み合わせた T7-SAGE 法を用いて、口蓋突起上皮の癒合前、癒合中、癒合後に関する遺伝子群のデータベースを構築する。そして、その情報をもとに、それぞれの遺伝子の口蓋閉鎖・形態形成における機能を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 胎生期口蓋閉鎖に関わる遺伝子の同定

①口蓋突起が接近した段階 (癒合前)、②口蓋突起が癒合している段階 (癒合中)、③口蓋突起が癒合した段階 (癒合後) で、突起先端部の RNA を抽出し、T7 RNA amplification 法にて RNA を増幅し、T7-SAGE 法を試みたが、効率化を図るため、マイクロアレイ法を用いた遺伝子解析を並行して行った。

(2) 口蓋突起上皮に特異的に発現する遺伝子の発現量確認

癒合中・癒合後に、Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1) の発現量の増加が確認され、定量的 real-time RT-PCR を用いても同様に発現量の増加が確認された。また、Krt13 (Keratin 13), Car3 (Carbonic anhydrase 3), Fmo2 (Flavin containing monooxygenase 2), Hdc (Histidine decarboxylase), Armc3 (armadillo repeat containing 3) についても同様に高い発現を認めた。

(3) 口蓋突起癒合部に特異的に発現する遺伝子の発現分布確認

抗 CEACAM1 抗体を入手し、免疫組織学的解析を行うと、口蓋癒合中から癒合後にかけて、CEACAM1 が口蓋突起先端部に強く発現していることが確認された。他の遺伝子に関しては解析中である。

(4) 器官培養を用いた機能阻害実験

機能阻害抗体にて口蓋癒合が阻害され、CEACAM1 の口蓋癒合への関与が示唆された。現在のところ、細胞接着因子 CEACAM1 の器管形成に対する関与は未だに報告されていない。今後、他の遺伝子群も含めて、遺伝子改変マウスの解析も検討しながら、口蓋癒合に対する関与とそのメカニズムについて解析を進めていく予定である。

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 14 件)

- ① Tanaka N, Nohara K, Okuno K, Kotani Y, Okazaki H, Matsumura M, Sakai T, Development of a swallowing frequency meter using a laryngeal microphone. Journal of Oral Rehabilitation, in press (査読有)
- ② Miyajima H, Matsumoto T, Sakai T, Yamaguchi S, An SH, Abe M, Wakisaka S, Lee KY, Egusa H, Imazato S, Hydrogel-based biomimetic environment for in vitro modulation of branching morphogenesis. Biomaterials 32, 6754-6763, 2011 (査読有)
- ③ Onodera T, Sakai T, Hsu JC, Matsumoto K, Chiorini JA, Yamada KM. Btbd7 Regulates Epithelial Cell Dynamics and Branching Morphogenesis. Science 329, 562-565, 2010, Sakai T: corresponding author and equally contributed first author (査読有)
- ④ Nohara K, Kotani Y, Sasao Y, Ojima M, Tachimura T, Sakai T. Effect of a Speech Aid Prosthesis on Reducing Muscle Fatigue. Journal of Dental Research 89, 478-481, 2010 (査読有)
- ⑤ Sakai T, Onodera T, Yamada KM. Cleft Formation and Branching morphogenesis of Salivary Gland: Exploration of New Functional Genes. Interface Oral Health Science 2009, 13-19, 2010 (査読無)
- ⑥ 田中信和、野原幹司、小谷泰子、岡崎浩也、松村雅史、阪井丘芳、喉頭マイクロフォンを用いた嚥下回数測定デバイスの開発、日本摂食・嚥下リハビリテーション

- ン学会誌 14(3)、229-237、2010 (査読有)
- ⑦ 奥野健太郎、野原幹司、佐々生康宏、阪井丘芳、下顎に装着する嚥下補助装置が有効であった舌悪性腫瘍術後の3症例、日本摂食・嚥下リハビリテーション学会誌 14(3)、279-287、2010 (査読有)
- ⑧ 河合利彦、館村卓、外山義雄、阪井丘芳、非ニュートン性液状食品の嚥下時の口蓋帆挙筋活動、日本摂食・嚥下リハビリテーション学会誌 14(3)、265-270、2010 (査読有)
- ⑨ 深津ひかり、野原幹司、佐々生康宏、尾島麻希、小谷泰子、阪井丘芳、内視鏡を用いた嚥下直前の食塊の観察、日本摂食・嚥下リハビリテーション学会誌 14(1)、27-32、2010 (査読有)
- ⑩ Sakai T. Epithelial Branching Morphogenesis of Salivary Gland: Exploration of New Functional Regulators. Journal of Medical Investigation 56, 234-238, 2009 (査読無)
- ⑪ 尾島麻希、長野有美、野原幹司、阪井丘芳、ドライマウス患者における黒豆エキスシロップの有用性について、FFI ジャーナル 214(4)、498-502、2009 (査読有)
- ⑫ 尾島麻希、野原幹司、阪井丘芳、啼泣時や会話時に顔面非対称を呈し歯科を受診した4例、障害者歯科 30(2)、116-119、2009 (査読有)
- ⑬ 河合利彦、館村卓、外山義雄、阪井丘芳、低粘性液状食品の粘性の相違が嚥下時の口蓋帆挙筋活動におよぼす影響、日本摂食・嚥下リハビリテーション学会誌 13(2)、128-134、2009 (査読有)
- ⑭ 佐々生康宏、奥野健太郎、野原幹司、阪井丘芳、睡眠時無呼吸症候群治療における歯科の役割第2回—口腔内装置の治療効果予測—、睡眠医療 3(1)、97-102、2009 (査読有)
- [学会発表] (計 28 件)
- ① 田中信和、野原幹司、辻聡、小谷泰子、尾島麻希、阪井丘芳、唾液量および嚥下頻度とGERD自覚症状の強さとの関係、第28回日本障害者歯科学会総会および学術大会、福岡、2011年11月4日
- ② 若杉葉子、野原幹司、小谷泰子、尾島麻希、奥野健太郎、阪井丘芳、誤嚥の有無と炎症反応—VE、VFとCRPの比較—、第28回日本障害者歯科学会総会および学術大会、福岡、2011年11月4日
- ③ 美馬淳子、越野綾、内田仁司、野原幹司、古郷幹彦、檜枝洋紀、阪井丘芳、口蓋突起癒合時における葉酸摂取とCEACAM1の関係、第56回日本口腔外科学会総会・学術大会、大阪、2011年10月22日 (優秀口演賞受賞演題)
- ④ 奥野健太郎、野原幹司、佐々生康宏、阪井丘芳、下顎に装着する嚥下補助装置が有効であった舌悪性腫瘍術後の3症例、第56回日本口腔外科学会総会・学術大会、大阪、2011年10月22日
- ⑤ 中村祐己、佐々生康宏、奥野健太郎、野原幹司、阪井丘芳、閉塞型睡眠時無呼吸症候群における内視鏡を用いた気道形態の動的評価、第56回日本口腔外科学会総会・学術大会、大阪、2011年10月22日
- ⑥ 松野頌平、深津ひかり、野原幹司、佐々生康宏、阪井丘芳、内視鏡を用いて評価した口腔腫瘍術後患者の食塊形成機能、第56回日本口腔外科学会総会・学術大会、大阪、2011年10月22日
- ⑦ 高井英月子、野原幹司、佐藤耕一、古郷幹彦、阪井丘芳、VFによる発音時の軟口蓋の速さ解析・健常成人および口蓋裂症例について、第56回日本口腔外科学会総会・学術大会、大阪、2011年10月22日
- ⑧ 佐藤耕一、高井英月子、野原幹司、山西整、石浜孝二、阪井丘芳、古郷幹彦、Furlow法またはPush-back法による口蓋裂術後の軟口蓋の形態的検討、第56回日本口腔外科学会総会・学術大会、大阪、2011年10月22日
- ⑨ 奥野健太郎、佐々生康宏、中村祐己、野原幹司、阪井丘芳、口腔内装置装着によりCPAP至適圧が減少した1例、日本睡眠学会第36回定期学術集会、京都、2011年10

- 月15日
- ⑩ 辻 聡、野原幹司、田中信和、小谷泰子、尾島麻希、阪井丘芳、唾液量および嚥下頻度とGERD自覚症状の強さとの関係、第22回日本老年歯科医学会学術大会、東京、2011年6月16日
 - ⑪ 小谷泰子、野原幹司、尾島麻希、佐々生康宏、阪井丘芳、在宅における嚥下内視鏡検査の普及を目指して NPO法人における卒後研修、第22回日本老年歯科医学会学術大会、東京、2011年6月16日
 - ⑫ 松野頌平、深津ひかり、野原幹司、佐々生康宏、阪井丘芳、内視鏡を用いて評価した高齢者の食塊形成機能、日本老年歯科医学会第22回学術大会、東京、2011年6月16日
 - ⑬ 美馬淳子、古郷幹彦、吉岡秀郎、野原幹司、檜枝洋記、阪井丘芳、口蓋突起癒合時における葉酸摂取とCEACAM 1 の関係、第35回日本口蓋裂学会総会・学術集会、新潟、2011年5月25日
 - ⑭ 日景朱美、野原幹司、杉山千尋、宮本勝行、越野綾、阪井丘芳、口蓋化構音を認めた成人機能性構音障害の訓練経過、第35回日本口蓋裂学会総会・学術集会、新潟、2011年5月25日
 - ⑮ 越野綾、野原幹司、小谷泰子、杉山千尋、高井英月子、阪井丘芳、大阪大学歯学部附属病院顎口腔機能治療部における唇顎口蓋裂初診患者の臨床統計、第35回日本口蓋裂学会総会・学術集会、新潟、2011年5月25日
 - ⑯ 高井英月子、野原幹司、佐藤耕一、越野綾、阪井丘芳、VFにおける発音時の軟口蓋の速度解析-健常成人および口蓋裂症例について-、第35回日本口蓋裂学会総会・学術集会、新潟、2011年5月25日
 - ⑰ 杉山千尋、野原幹司、越野綾、宮成典、山西 整、古郷幹彦、阪井丘芳、Furlow法とpushback法による口蓋形成術後のnasalance scoreの比較、第35回日本口蓋裂学会総会・学術集会、新潟、2011年5月25日
 - ⑱ Mima J, Kogo M, Nohara K, Hieda Y, Sakai T. The Relationship Between Folic Acid and Palatal Fusion. The 68th Annual Meeting of American Cleft Palate-craniofacial Association, Puerto Rico, USA, April 4, 2011
 - ⑲ 上田菜美、野原幹司、小谷泰子、阪井丘芳、Videofluorographyにおける嚥下時の舌骨の運動速さ、第22回NPO法人日本口腔科学会近畿地方部会、大阪、2010年11月27日
 - ⑳ 田中信和、野原幹司、小谷泰子、阪井丘芳、高齢者の日常生活における嚥下頻度、第22回NPO法人日本口腔科学会近畿地方部会、大阪、2010年11月27日
 - ㉑ 杉岡奈緒、尾島麻希、野原幹司、辻 聡、阪井丘芳：ドライマウス外来患者の唾液量と適切な保湿剤選択に関する検
第27回障害者歯科学会学術大会、東京、2010年10月24日
 - ㉒ 河合利彦、山内義之、館村 卓、阪井丘芳、寝たきり高齢者への口腔ケアが循環動態に及ぼす影響、第27回日本障害者歯科学会学術大会、東京、2010年10月24日、東京
 - ㉓ 美馬淳子、古郷幹彦、野原幹司、檜枝洋記、阪井丘芳、マウス口蓋形成における細胞接着因子CEACAM 1 の機能解析、第34回日本口蓋裂学会総会・学術集会、東京、2010年5月27日
 - ㉔ Mima J, Kogo M, Nohara K, Tanaka S, Hieda Y, Sakai T. CEACAM1 Requirement in Mouse Embryonic Palatal Fusion. The 67th Annual Meeting of American Cleft Palate-craniofacial Association, Texas, USA, March 15, 2010
 - ㉕ Mima J, Kogo M, Nohara K, Tanaka S, Hieda Y, Sakai T. Microanalysis of Global Gene Expression in Mouse Embryonic Tissue of Palatal Fusion. The 11th International Confederation for Cleft Lip and Palate and Related Craniofacial Anomalies. Brazil, September 10, 2009

- ⑳ Miyajima H, Matsumoto T, SangHyun A, Sakai T, Soumura T. Effect of Substrate Stiffness on Branching Morphogenesis of Mouse Submandibular Gland. The 2nd TERMIS Congress in conjunction with 2009 Seoul Cell Symposium, Seoul, Korea, August 31, 2009
- ㉑ 美馬淳子、古郷幹彦、野原幹司、檜枝洋記、阪井丘芳、マウス胎生期口蓋癒合過程におけるCEACAM1の役割、第33回日本口蓋裂学会総会・学術集会、東京、2009年5月28日
- ㉒ Mima J, Kogo M, Nohara K, Hieda Y, Sakai T. The Role of CEACAM1 in Mouse Embryonic Palatal Fusion. The 66th Annual Meeting of American Cleft Palate-craniofacial Association, Arizona, USA, April 20, 2009

[図書] (計 1 件)

- ① 阪井丘芳、Btbd7 は上皮細胞の動態と分枝形態形成を制御する、サイエンス誌に載った日本人研究者 2010, 50, 2011

[その他]

ホームページ等

- ① The Impossible Will Take A Little While -Defining A Key Developmental Pathway in the Salivary Gland-, Interviews with Oral Health Researchers, National Institutes of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, October 26, 2010, <http://www.nidcr.nih.gov/Research/ResearchResults/InterviewsOHR/Clefting.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪井 丘芳 (SAKAI TAKAYOSHI)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：90379082

(2) 研究分担者

野原 幹司 (NOHARA KANJI)
大阪大学・歯学部附属病院・助教
研究者番号：20346167