

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17194

研究課題名（和文）口蓋癒合後の離開による口蓋裂発生機序 - 骨、筋関連遺伝子とIRF6の影響について -

研究課題名（英文）Mechanism of cleft palate development by separation after palatal fusion - Effects of bone, muscle related genes and IRF6-

研究代表者

佐久間 千里 (SAKUMA, Chisato)

愛知学院大学・歯学部・歯学部研究員

研究者番号：40849709

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：申請者は、「胎生期に左右の口蓋突起が癒合し、口蓋が一旦形成された後に、癒合部が離開して口蓋裂が発症する」という、従来の概念とは異なった口蓋裂発症機序について研究しており、TCDD投与群の口腔粘膜の基底膜の断裂を認めた部位では、E-cadherinの消失を認めたことから、一度癒合した口蓋部における基底膜の破断と上皮組織の異常増殖や細胞間接着の低下と間葉系細胞の増殖阻害が複雑に影響し、上皮間葉転換の異常を生じて口蓋裂を発症する可能性があることを報告した(Sakuma: Int J Mol Scu. 23(4):2069, 2022)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口蓋裂の発症機序は、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考え方が一般的であり、口蓋が癒合しない原因について多くの研究が行われている。しかしながら、口蓋裂発症機序に関する明確な回答は出ていない。本研究成果として、一度癒合した口蓋部における基底膜の破断と上皮組織の異常増殖や細胞間接着の低下と間葉系細胞の増殖阻害が複雑に影響し、上皮間葉転換の異常を生じて口蓋裂を発症する可能性があることが明らかとなったことから、口蓋の離開を阻止する要素を発見される可能性が考えられ、新しい口蓋裂発症予防法の確立につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：The applicant has been studying the mechanism of cleft palate onset, which is different from the conventional concept that the right and left palatal processes fuse during the embryonic period, and once the palate is formed, the fused area separates and cleft palate develops. We reported that the rupture of the basement membrane and abnormal proliferation of epithelial tissues, decreased intercellular adhesion, and inhibition of mesenchymal cell proliferation in the once-fused palate may have a complex effect on the development of cleft palate by causing abnormal epithelial-mesenchymal transition (Sakuma: Int J Mol Scu. 23(4):2069, 2022)

研究分野：口唇口蓋裂

キーワード：口蓋裂 口唇口蓋裂 TCDD 発生

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂はヒトの先天異常疾患において最も多く発生する外表奇形であり、口唇口蓋裂の日本人における発生頻度は約500~600人に1人と報告されている (Natsume: Plast Reconstr Surg, 79(3):499-501, 1987)。さらに、口唇口蓋裂のうち口蓋裂の発生頻度は約30%とされている (Nagase Y, Natsume N, et al.: J Maxillofac Oral Surg, 9(4): 389- 395, 2010)。国内外において口蓋裂研究は行われているが、その発生機序の詳細については明らかにされていない点が多い。これまで、口蓋の発生段階のどこかで異常が生じることにより口蓋裂が発生すると考えられており、口蓋形成時に左右の口蓋突起が癒合しないことで口蓋裂を発症するという説が一般的であり、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ものの、その解明には至っていない。一方、本研究は口蓋裂の発症機序の一つとして、一度癒合した口蓋が離開に転じることによって口蓋裂を発症する場合があることを示しており、今後の口蓋裂研究において、口蓋癒合後の離開による口蓋裂の発症機序を解明することにより口蓋の離開を阻止する要素が発見される可能性が考えられ、国内のみならず世界的に新しい口蓋裂発症予防法の確立につながることを期待された。また、正常の口蓋癒合において左右の口蓋突起が癒合する際、口蓋正中部に形成された上皮索の消失を生じ、口蓋の癒合が完了するが、Anita S. らは (Laryngoscope Investig Otolaryngol. 4(1):160-164, 2018)、口蓋が癒合する際に上皮索の消失に IRF6 が関与していると報告している。IRF6 は Van der Woude 症候群の原因遺伝子の1つである。Van der Woude 症候群では、口唇口蓋裂と下唇に先天性下唇瘻が表現型として出現することが知られている。先天性下唇瘻の発生機序は、下顎突起の癒合不全ないし癒合後の離開によるとされることから、口蓋癒合後の離開という観点において、非症候性の口蓋裂患者と IRF6 との関連を明らかにする必要があると考えた。

### 2. 研究の目的

これまで、口蓋裂の発症機序は、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考え方が一般的であり、口蓋が癒合しない原因について多くの研究が行われている。しかしながら、口蓋裂発症機序に関する明確な回答は出していない。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、口蓋裂発症予防法を確立することを目的としている。本研究は、一旦形成された口蓋が離開に転じる際の骨形成や筋形成について口蓋組織の様態を観察するとともに口蓋癒合時に関与する遺伝子 IRF6 について調べることで、一旦癒合した口蓋が離開に転じるメカニズムを解明し、口蓋の離開を阻止する要素を発見される可能性が考えられ、新しい口蓋裂発症予防法の確立につながることを期待される。

### 3. 研究の方法

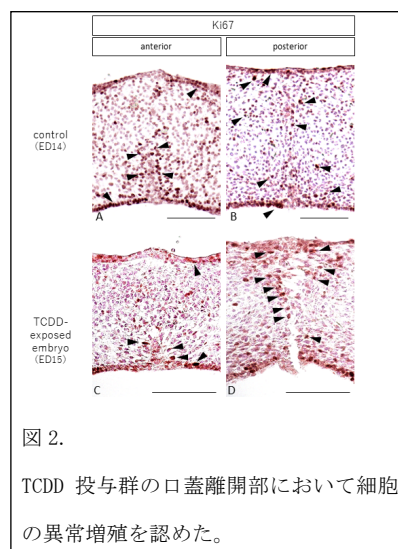
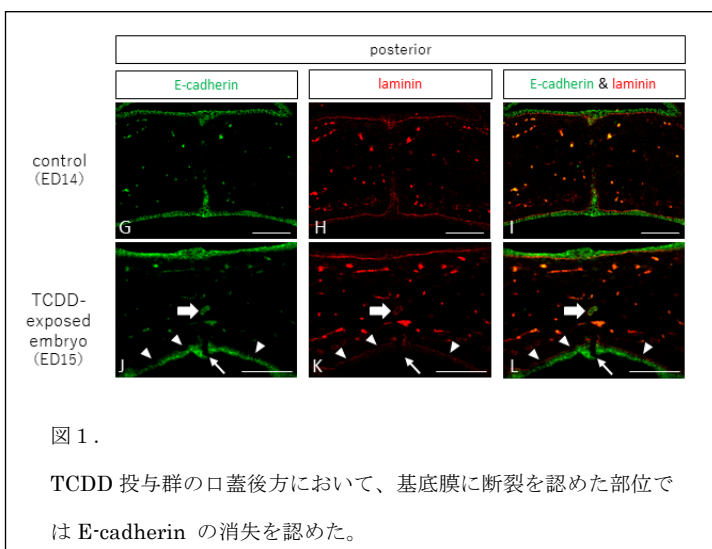
申請者は、TCDD 投与マウスの口蓋癒合部および離開に転じている部分における骨および筋組織の免疫染色を行い、対照群の口蓋癒合部と比較することで、口蓋癒合後に離開する機序について免疫組織学的に確認した。これと同時に、申請者の研究室が保有している12000件以上のヒト遺伝子試料をもとに、口蓋裂単独患者血液サンプルより、DNA シーケンスを行った。IRF6 遺伝子は exon 数7個で、12994bp の長さをもつ遺伝子であり、表現型として口蓋裂に着目し、口蓋裂患者試料のうち7個の exon 各々の両端20-27bp をプライマーとし、遺伝子変異について確認し、

口蓋裂との関連を調べた。申請者は他の研究者と共同で、ベトナム人における非症候性口唇・口蓋裂(NSOFC)の病因について、527 の症例-親トリオと 527 の対照サンプルを収集することにより、さまざまな NSOFC 表現型に基づいて層別分析を実施した。

研究の遂行にあたり、マウス実験や遺伝子研究等の実施、および研究結果の解析および考察は申請者が行い、研究計画指導者は愛知学院大学 歯学部 井村英人講師、研究技術支援者は愛知学院大学歯学部解剖学講座 池田やよい教授、および大阪医科大学医学部 平田あずみ准教授、研究指導および研究結果の考察指導者は愛知学院大学歯学部口腔先天異常学研究室 夏目長門教授であり、研究の進捗状況に応じて研究協力を得ることが可能であった。

#### 4. 研究成果

(1) 申請者は、「胎生期に左右の口蓋突起が癒合し、口蓋が一旦形成された後に、癒合部が離開して口蓋裂が発症する」という、従来の概念とは異なった口蓋裂発症機序について研究しており、特に、一旦癒合した口蓋が離開する機序について、基底膜の断裂によって離開することを明らかにしてきた (Sakuma: J Craniomaxillofac Surg. 46(12):2027-2031, 2018)。これまで、TCDD 投与群の口腔粘膜の基底膜の断裂を認めた部位では、E-cadherin の消失を認めたこと (図 1) から、一度癒合した口蓋部における基底膜の破断と上皮組織の異常増殖 (図 2) や細



胞間接着の低下と間葉系細胞の増殖阻害が複雑に影響し、上皮間葉転換の異常を生じて口蓋裂を発症する可能性があることを報告した (Sakuma: Int J Mol Sci. 23(4):2069, 2022)。また、口蓋裂は口蓋部の筋の断裂や骨の断裂を伴うことから、口蓋部の筋組織や骨組織の異常も口蓋癒合後の離開に関与している可能性が考えられた。そこで、TCDD 投与マウスの口蓋が離開に転じている部分の筋組織や骨組織について、口蓋部の特異的筋転写因子である MyoD、筋特異的タンパク質である Desmin、骨芽細胞の転写因子である Runx2、骨特異的タンパク質 Osteopontin の発現について観察し、対照群と比較することで、口蓋が離開していくメカニズムを明らかにしようとしているが、未だ十分な結果は得られておらず、継続して研究を進めている。

(2) 申請者は、申請者の研究室が保有しているベトナム人口蓋裂単独患者血液サンプルより、他の研究者と共同で、ベトナム人における非症候性口唇・口蓋裂の病因について研究を行った。ベトナム人における非症候性口腔顔面裂 (NSOFC) の病因について、TP63-IRF6 経路および GREM1 の潜在的な変異体を特定することを目的として、527 の症例-親トリオと 527 の対照サンプルを収集することにより、症例-対照分析には対立遺伝子、優性、劣性、および過剰優性

モデルを使用し、症例-親については家族ベースの関連性テストを使用して、さまざまな NSOFC 表現型に基づいて層別分析を実施した。IRF6 rs2235375 と NSCLP および NSCL/P との関連について明らかにし (表 1)、また、NSCL/P に関連する新規マーカーとして IRF6 rs846810、NSOFC に関連する IRF6 の rs2235375-rs846810 のハプロタイプ G-G および C-A も同定した (表 2) (Pham LNG, Sakuma: Genes (Basel) 14(11):1995, 2023)。

表 1. *IRF6-TP63*, *GREM1* 単一スクレオチド多型 (SNP) の関連

Gene	Case (Control)	P <sub>Geno</sub> Value	OR <sub>Allele</sub> (95% CI) P <sub>Allele</sub> Value	OR <sub>Dom</sub> (95% CI) P <sub>Dom</sub> Value	OR <sub>Rec</sub> (95% CI) P <sub>Rec</sub> Value	OR <sub>Over</sub> (95% CI) P <sub>Over</sub> Value
NSCLO <i>IRF6</i>						
rs2235375	CC/CG/GG 40/86/46 (165/263/99)	0.0329	1.38 (1.08-1.76) 0.0096	0.66 (0.45-0.99) 0.0440	1.58 (1.06-2.40) 0.0254	1.00 (0.71-1.41) 0.9828
rs846810	AA/AG/GG 93/63/16 (330/176/21)	0.0117	1.46 (1.11-1.93) 0.0074	0.70 (0.50-0.99) 0.0464	2.47 (1.26-4.85) 0.0068	1.15 (0.80-1.65) 0.4379
TP63						
rs9332461	GG/AG/AA 101/65/6 (302/201/24)	0.8219	0.93 (0.70-1.25) 0.6366	1.06 (0.75-1.50) 0.7443	0.76 (0.30-1.89) 0.5493	0.99 (0.69-1.40) 0.9346
GREM1						
rs2280738	CC/CG/GG 109/57/6 (318/174/35)	0.3022	0.83 (0.62-1.13) 0.2323	1.14 (0.80-1.62) 0.4791	0.51 (0.21-1.23) 0.1265	1.01 (0.70-1.45) 0.9763
rs1258763	CC/CT/TT 142/28/2 (456/66/5)	NA	1.32 (0.86-2.03) 0.2071	NA	NA	1.35 (0.84-2.19) 0.2100
NSCLP <i>IRF6</i>						
rs2235375	CC/CG/GG 61/121/72 (165/263/99)	0.0053	1.40 (1.13-1.74) <b>0.0018</b>	0.69 (0.49-0.98) 0.0352	1.71 (1.21-2.43) 0.0025	0.91 (0.68-1.23) 0.5527
rs846810	AA/AG/GG 141/92/21 (330/176/21)	0.0215	1.37 (1.07-1.76) 0.0116	0.75 (0.55-1.00) 0.0572	2.17 (1.16-4.06) 0.0129	1.13 (0.83-1.55) 0.4362
TP63						
rs9332461	GG/AG/AA 140/100/14 (302/201/24)	0.7652	1.09 (0.85-1.39) 0.4962	0.92 (0.68-1.24) 0.5634	1.22 (0.62-2.41) 0.5600	1.05 (0.77-1.43) 0.7408
GREM1						
rs2280738	CC/CG/GG 138/99/17 (318/174/35)	0.2463	1.18 (0.92-1.50) 0.1897	0.78 (0.58-1.06) 0.1104	1.01 (0.55-1.84) 0.9784	1.30 (0.95-1.77) 0.1018
rs1258763	CC/CT/TT 220/32/2 (456/66/5)	NA	0.98 (0.65-1.48) 0.9291	NA	NA	1.01 (0.64-1.58) 0.9764
NSCL/P <i>IRF6</i>						
rs2235375	CC/CG/GG 101/207/118 (165/263/99)	<b>0.0014</b>	1.39 (1.16-1.67) <b>0.0003</b>	0.68 (0.51-0.91) 0.0093	1.66 (1.22-2.25) <b>0.0011</b>	0.95 (0.73-1.22) 0.6868
rs846810	AA/AG/GG 234/135/37 (330/176/21)	0.0031	1.41 (1.14-1.74) <b>0.0015</b>	0.73 (0.56-0.94) 0.0164	2.29 (1.32-3.98) 0.0025	1.14 (0.87-1.49) 0.3354
TP63						
rs9332461	GG/AG/AA 241/165/20 (302/201/24)	0.9735	1.02 (0.83-1.27) 0.8239	0.97 (0.75-1.25) 0.8203	1.03 (0.56-1.90) 0.9180	1.03 (0.79-1.33) 0.8518
GREM1						
rs2280738	CC/CG/GG 247/156/23 (318/174/35)	0.427	1.03 (0.83-1.28) 0.7744	0.90 (0.70-1.18) 0.4609	0.80 (0.47-1.38) 0.4251	1.17 (0.90-1.53) 0.2452
rs1258763	CC/CT/TT 362/60/4 (456/66/5)	NA	1.12 (0.79-1.57) 0.5268	NA	NA	1.15 (0.79-1.67) 0.4794

Abbreviations: NA, not available; Geno, genotypic; Dom, dominant; Rec, recessive; Ove, over-dominant. In bold are p-values that were significant after adjustment with Bonferroni correction in multiple tests ( $p \leq 0.002$ ).

*IRF6* 遺伝子では、rs2235375 は、アレリックモデルで NSCLP ( $p = 0.0018$ ) および NSCL / P ( $p = 0.0003$ ) と有意な関連を示した。

表 2. ハプロタイプ関連分析

Gene/Haplotype	Haplotype Freq.	Case, Control Freq.	P <sub>CC</sub> Value	T/U	P <sub>TDT</sub> Value
NSOFC <i>IRF6</i>					
rs2235375-rs846810					
C-A	0.522	0.497, 0.548	0.0183	240.0/281.7	0.0679
G-A	0.246	0.246, 0.245	0.9553	191.2/177.5	0.4753
G-G	0.221	0.251, 0.192	<b>0.0012</b>	198.5/164.6	0.0747
GREM1					
rs2280738-rs1258763					
C-C	0.699	0.695, 0.703	0.6844	217.5/206.8	0.6026
G-C	0.226	0.227, 0.224	0.8941	185.7/169.4	0.3855
C-T	0.069	0.072, 0.065	0.5151	63.4/85.3	0.0725
NSCL/P <i>IRF6</i>					
rs2235375-rs846810					
C-A	0.514	0.472, 0.548	<b>0.0011</b>	180.8/238.8	0.0046
G-A	0.251	0.259, 0.246	0.5112	162.0/146.0	0.3612
G-G	0.223	0.261, 0.192	<b>0.0003</b>	167.5/119.5	0.0046
GREM1					
rs2280738-rs1258763					
C-C	0.697	0.689, 0.703	0.4861	179.6/172.4	0.7008
G-C	0.228	0.231, 0.224	0.7154	153.3/142.4	0.5239
C-T	0.069	0.074, 0.065	0.4333	53.2/67.4	0.1958

Abbreviations: CC, case-control; TDT, transmission disequilibrium test; Freq., frequency; T/U, transmitted/not transmitted. In bold are p-values that were significant after adjustment with Bonferroni correction in multiple tests ( $p \leq 0.0017$ ).

*IRF6* の 2 つの SNP と *GREM1* の 2 つの SNP に基づいてハプロタイプを分析したところ、NSOFC 表現型のリスクに関連する 2 マーカーハプロタイプを確認し主に rs2235375 のマイナー対立遺伝子(G)と rs846810 の G 対立遺伝子を含むハプロタイプについて統計的有意性が観察された。G-G (*IRF6* の rs2235375-rs846810) ハプロタイプは、NSCL / P および NSOFC (それぞれ 0.0003 および 0.0012 の p 値) の病因と関連していた。さらに、C-A (*IRF6* の rs2235375-rs846810) ハプロタイプは、ケースコントロール分析において NSCL / P ( $p = 0.0011$ ) で有意であった。

5. 主な発表論文等

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

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 2022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） 10.3390/ijms23042069.	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 該当する

1. 著者名 Pham LNG, Niimi T, Suzuki S, Nguyen MD, Nguyen LCH, Nguyen TD, Hoang KA, Nguyen DM, Sakuma C, Hayakawa T, Hiyori M, Natsume N, Furukawa H, Imura H, Akashi J, Ohta T, Natsume N.	4. 巻 14
2. 論文標題 Association between IRF6, TP63, GREM1 Gene Polymorphisms and Non-Syndromic Orofacial Cleft Phenotypes in Vietnamese Population: A Case-Control and Family-Based Study.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes.	6. 最初と最後の頁 1995
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes14111995.	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐久間千里, 井村英人, 早川統子, 吉田和加, 藤原久美子, 鈴木聡, 古川博雄, 新美照幸, 南克浩, 吉田磨弥, 森明弘, 伊東雅哲, 秋山泰範, 秋山友樹, 夏目長奈, 夏目長門
2. 発表標題 口唇・口蓋裂患者に対する疫学的研究第70報：東海地区における2020年の本症出生調査報告
3. 学会等名 第46回日本口蓋裂学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐久間 千里, 井村英人, 吉田磨弥, 伊東雅哲, 秋山泰範, 秋山友樹, 夏目長奈, 南克浩, 新美照幸, 古川博雄, 夏目長門
2. 発表標題 当センターの口唇口蓋裂出生前カウンセリングの現状2012-2021年報告
3. 学会等名 第62回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐久間千里, 井村英人, 早川統子, 吉田和加, 藤原久美子, 鈴木 聡, 古川博雄, 南 克浩, 新美照幸, 吉田磨弥, 森 明弘, 伊東雅哲, 秋山泰範, 秋山友樹
2. 発表標題 口唇・口蓋裂患者に関する疫学的研究 第68報: 東海地区における2019年の本症出生調査報告
3. 学会等名 第45回日本口蓋裂学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐久間千里
2. 発表標題 口蓋裂発症メカニズムの解明 口蓋癒合後の離開による口蓋裂の発症について
3. 学会等名 第63回日本先天異常学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐久間千里, 井村英人, 吉田磨弥, 北川 健, 伊東雅哲, 秋山泰範, 秋山友樹, 夏目長奈, 南 克浩, 新美照幸, 古川博雄, 夏目長門
2. 発表標題 愛知学院大学歯学部附属病院口唇口蓋裂センターにおける出生前カウンセリングの現状 2012-2022年報告
3. 学会等名 第47回日本口蓋裂学会総会・学術集会
4. 発表年 2023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
研究協力者	井村 英人  (IMURA Hideto)		

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
研究協力者	夏目 長門  (NATSUME NAGATO)		
研究協力者	池田 やよい  (IKEDA Yayoi)		
研究協力者	平田 あずみ  (HIRATA Azumi)		

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