

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 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890058

研究課題名（和文） 口唇裂発症時におけるエピジェネティックな変化

研究課題名（英文） How epigenetic regulate lip formation

研究代表者

東堀 紀尚（HIGASHIHORI NORIHISA）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：50585221

研究成果の概要（和文）：

本研究は、レチノイン酸による口唇裂発症にエピジェネティックな変化が関与しているという仮説をたて、エピジェネティックな変化を誘導するヒストンメチル化酵素および脱メチル化酵素の変化を検討した。レチノイン酸を含むビーズを胎生 3.5 日のニワトリの鼻窩に埋入させ、48時間後の RNA レベルでのヒストン H3 の 9 番目のリジンを修飾するヒストンメチル化酵素および脱メチル化酵素の発現変化をみたところ、ヒストン H3 の 9 番目のリジンをトリメチル化する酵素である SETDB1 が優位に減少した。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to identify an involvement of epigenetic changes during cleft lip formation by environmental factors such as retinoic acid. We have accomplished making cleft lip by implanting bead that contained retinoic acid into the nasal pit of E3.5 chick embryo. Using the same model, we have collected RNA from frontonasal mass and maxillary prominence to see the changes how retinoic acid affect histone methyltransferases or demethyltransferase that covalently modify lysine 9 of histone H3. SETDB1 that tri-methylate histone 3 of lysine 9 was significantly downregulated by treatment of retinoic acid.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1200000	360000	1560000
2011 年度	1090000	327000	1417000
年度			
年度			
年度			
総計	2290000	687000	2977000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：矯正、口唇裂・口蓋裂、エピジェネティック、ヒストン、メチル化、環境因子

1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂は、高頻度（1/600 人）にみられる先天異常疾患であり、他に先天的な異常を持たない非症候群性のものが大半である。非症候群性の口唇口蓋裂は、遺伝要因および環境要因との相互作用によって生じるものと

考えられている。口唇口蓋裂を発症した個人、またその両親の負担は多く、その治療には、矯正歯科医を始め、小児歯科医、口腔外科医、形成外科医、言語療法士など、様々な専門家が長期に渡り治療に関わっている。従って、我々の長期目標は、分子生物学見地から疾患

の発生機序をより良く解明することにより、発生率および症状の軽減をはかり、患者の負担を軽減させることである。

口唇口蓋裂の研究は、疾患遺伝子の同定によって遺伝による影響等の研究は進んでいる反面、環境因子による詳細なメカニズムの報告が少ないのが現状である。近年、環境要因によるDNAのメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな変化が、がん化に強く影響を及ぼしているという報告が多数されている。がん化と発生の過程で生じる先天異常は、共通したシグナルを介することが多いことから、環境要因が口唇形成時に、エピジェネティックな変化を起こしていることが考えられる。しかしながら、顎顔面発生でのエピジェネティックな変化もしくはエピジェネティックな変化を制御する遺伝子の変化による異常についての報告は、ほとんどされていないのが実情である。

2. 研究の目的

レチノイン酸の過剰な暴露により口唇口蓋裂をはじめとした先天異常疾患が生じることは古くから知られている。本研究は、ニワトリを動物モデルとして使用し、レチノイン酸を過剰投与した際に生じるエピジェネティックな変化、特にヒストンメチル化機構について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

① レチノイン酸過剰投与し口唇裂を発症させる

胎生3.5日のニワトリの鼻窩に5 mg/mlのレチノイン酸を含ませたビーズ（コントロールは、DMSOを使用）を片側に埋入させ（図1）、胎生14日まで培養し、その表現型を観察した。また同様のサンプルをアルザリンレッド・アルシアンブルー染色にて骨および軟骨の状態を観察した。

② レチノイン酸過剰投与によるヒストンメチル化酵素の変化

上記①と同様にレチノイン酸を過剰発現させ、48時間後に前鼻突起より抽出したRNAを用い（図1）、ヒストンメチル化酵素およびヒストン脱メチル化酵素の変化をreal-time RT-PCR法を用いてレチノイン酸による変化量を検討する。

③ レトロウイルスベクターの作成

A) レチノイン酸によりヒストンメチル化酵素が上昇した場合

変化があったヒストンメチル化酵素遺伝子の全長cDNAをクローニングし、ニワ

トリレトロウイルスベクターであるRCASベクターに組み込む。

B) レチノイン酸によりヒストンメチル化酵素が減少した場合

減少したヒストンメチル化酵素遺伝子発現を抑えるためにRNAi法を用いる。RNAiのターゲットとなる部位を最低3カ所選び、それぞれRNAi用のRCASベクターに組み込む。

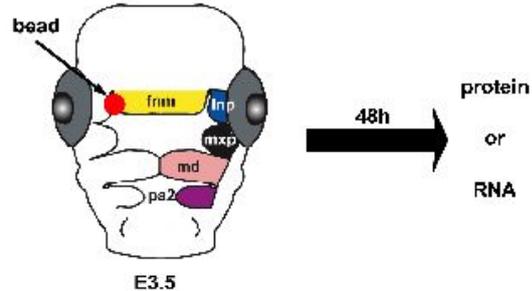


図1. E3.5の鼻窩にビーズを埋入し、48時間後タンパクもしくはRNAを抽出する。

4. 研究成果

環境因子であるレチノイン酸を過剰に摂取すると口唇裂・口蓋裂が発症することは、古くから知られている。

最初に胎生3.5日のニワトリ胎児の鼻窩へレチノイン酸を過剰投与させ口唇裂を高頻度に発症させ(n = 19/20)、技術的な問題がないことを確認した。すべての口唇裂が発症したサンプルは、premaxillary boneとmaxillary boneとの癒合が阻害されており、ニワトリを用いた口唇裂発症の際生じる表現型と同様であった。

レチノイン酸の過剰投与によって生じる口唇裂発症時において生体内でエピジェネティックな変化が生じているのではないかという仮説をたて、その変化を検討することとした。2000年頃よりエピジェネティックな変化にヒストンの修飾が重要だと考えられ始め、その修飾する酵素が発見された。それらの修飾酵素は、DNAメチル化酵素、脱メチル化酵素とは異なり、特定の部位を認識し修飾することがわかっている。本研究ではまず、遺伝子発現の抑制に関わっているヒストンH3の9番目のリジンへのヒストンメチル化酵素および脱メチル化酵素の発現がレチノイン酸によって増減しているかどうかを検討した。胎生3.5日にレチノイン酸を含んだビーズを鼻窩へ入れ過剰投与させ48時間後に胎児の前鼻突起および上顎突起（口唇はこの2つの突起が癒合することによって生じる）からRNAを抽出した。尚、コントロールはDMSOを含んだビーズを用いた（DMSOでは口唇裂は発症しない

)。抽出したRNAからcDNAを作成し、real-time PCRを行った。ターゲット遺伝子は、ヒストンH3の9番目のリジンをメチル化するヒストンメチル化酵素と脱メチル化するヒストン脱メチル化酵素、およびインターナルコントロールのGAPDH、計9種の変化をみた。結果は、ヒストンH3の9番目のリジンに対するヒストンメチル化酵素であるSETDB1の発現が優位に減少していた。また他の酵素には変化がなかった。

SETDB1をノックダウンさせるとレチノイン酸過剰投与と同様な表現形が生じる事が示唆されたため、SETDB1を局所でノックダウンさせるため、SETDB1のRNAiをのせたレトロウイルスベクターの作成を行なっている。現在クローニングの最中である。

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1件)

1. 山田大輔、東堀紀尚、川元龍夫、森山啓司. Le Fort I 型骨切り術を併用し上下顎移動術を行った骨格性下顎前突症例の外鼻形態変化に対する三次元的検討. 日本顎変形症学会雑誌. 22巻. 2012

[学会発表] (計7件)

1. Kataoka K, Ogawa T, Baba Y, Higashihori N, Suzuki S, Moriyama K. Ultrasonographic monitoring for bony healing after maxillary distraction osteogenesis in an adult cleft lip and palate case, 9th European Craniofacial Congress, September 14-17, 2011, Salzburg
2. 茂木和久、川元龍夫、東堀紀尚、森山啓司., 東京医科歯科大学歯学部附属病院顎顔面矯正学分野を受診し下顎頭変形を認めた不正咬合患者に関する臨床統計学的検討., 第24回日本顎関節学会総会, 平成23年7月23-24日, 広島
3. 川元龍夫、鈴木剛史、岡村江里花、中山友美子、茂木和久、山田大輔、東堀紀尚、森山啓司., 東京医科歯科大学顎顔面矯正学分野における31年間の顎変形症治療に関する検討., 第21回日本顎変形症学会総会・30周年記念国際シンポジウム, 平成23年6月16-17日, 東京
4. 中山友美子、川元龍夫、鈴木一史、東堀紀尚、森山啓司., 下顎枝矢状分割術を施行した骨格性下顎前突症例の長期術後経過からみた咬合安定性に関する検討., 第21回日本顎変形症学会総会・30周年記念国際シンポジウム, 平成23年6

月16-17日, 東京

5. 岡村絵里花、川元龍夫、山田大輔、東堀紀尚、森山啓司., 顔面非対称を伴う骨格性下顎前突患者における顎矯正手術前後の硬軟組織変化に対する三次元的解析., 第21回日本顎変形症学会総会・30周年記念国際シンポジウム, 平成23年6月16-17日, 東京
6. 片岡恵一、小川卓也、馬場祥行、東堀紀尚、鈴木聖一、森山啓司., 上顎骨延長法適用後に超音波画像を用い延長部硬組織の治癒過程を経時的に観察した口唇口蓋裂の一症例., 第35回日本口蓋裂学会総会, 平成23年5月25-26日, 新潟
7. Higashihori N et al., A role of *TBX2* 2 during avian frontonasal prominence morphogenesis, 第34回日本口蓋裂学会総会・学術集会, 平成22年5月27日, 東京

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0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0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

()

研究者番号：

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：