

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592788

研究課題名(和文) 分子標的治療薬による口蓋裂重症化抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism to improve the cleft palate phenotype with the molecular target drug

研究代表者

滝川 俊也 (TAKIGAWA, Toshiya)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：90263095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：当該研究はマウスおよびヒトで同じ遺伝子異常をもつとしても、その遺伝学背景が異なると表現型が変化する事象の原因にエピジェネティック修飾因子が関与していることを2系統のTGF- $\beta$ 3ノックアウトマウスを用いて明らかにするとともに、分子標的治療薬の投与によって胎児口蓋組織の種々のシグナル伝達系を制御できること、ならびに遺伝子異常による口蓋裂表現型の重症化を薬理的に抑制できることを国内外で初めて実証したものである。近い将来、口蓋裂を発症する遺伝子異常が判明している場合でも、当該研究成果の発展により、いまだ生後の手術のみであるヒト口蓋裂治療に対して予防的胎児薬物療法という新たな治療戦略の創出が期待される。

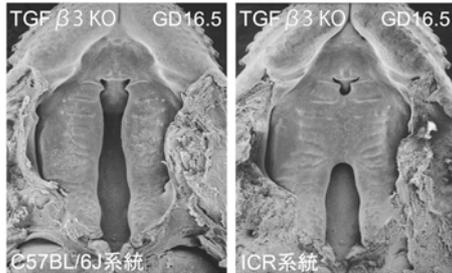
研究成果の概要(英文)：Even if the mice as well as humans carry the same gene mutation, the phenotype differs dependently on the genetic background, but its cause remained enigmatic. This study showed that the phenotype of the genetically induced palatal cleft is dependent on epigenetic modifiers, such as the balance in the expression level of IGF2R and various activated signaling molecules, by using two different strains of TGF- $\beta$ 3 knockout mice. Furthermore, we demonstrated for the first time that administration of molecular target drugs against DNA methyltransferase and epidermal growth factor receptor can improve the severity of the palatal cleft via the elevated expression of IGF2R and the reduced expression of phospho-Erk1/2, respectively. These findings provide insight into new strategies of preventive pharmacological fetal therapy in addition to postnatal surgery against human palatal cleft, to improve the severity of the fetal phenotype of pregnant woman with gene mutation of causing palatal cleft.

研究分野：発生学/口腔解剖学

キーワード：口蓋裂 TGF- $\beta$ 3ノックアウトマウス 分子標的治療薬 エピジェネティクス シグナル伝達系

### 1. 研究開始当初の背景

当該研究代表者は口蓋裂発症モデルマウスである TGFβ3 遺伝子欠損マウス (以下、TGFβ3 KO と略す。) について、マウス系統 (遺伝学的背景) が異なるとそれらの口蓋裂表現型は不完全口蓋裂から完全口蓋裂までの多様性を呈することに着目し、同マウスを 25 世代以上、互いに異なる 2 系統 (C57BL/6J, ICR) に戻し交配を続けて、同じ TGFβ3 KO でありながら、完全口蓋裂 (C57BL/6J 系統、以下、BL/6 と略す。) と不完全口蓋裂 (ICR 系統、以下 ICR と略す。) の異なる口蓋裂表現型を有する 2 系統を樹立した。



当該研究はそれら 2 系統の TGFβ3 KO マウスを用いて、当該研究代表者らがそれまでに見いだしていた分子標的治療薬の投与による口蓋裂重症化抑制作用の分子メカニズムを解明するための研究として開始した。

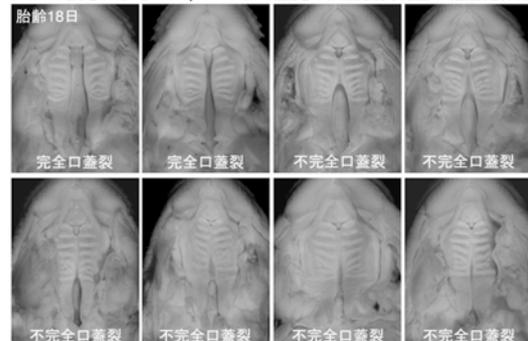
### 2. 研究の目的

当該研究は研究代表者のこれまでの研究成果に基づいた展開研究として、口蓋裂発症モデルマウスの口蓋裂表現型のマウス系統差を利用して、口蓋裂表現型の多型性を生み出す分子メカニズムの解明、および分子標的治療薬の投与による口蓋裂重症化抑制を標的とする予防的胎児薬物療法の開発・改良とその安全性の検証を行い、その研究成果をヒト口蓋裂治療に還元することを目的とした。

### 3. 研究の方法

当該研究の開始時点で、BL/6 TGFβ3 KO マウスのヘテロ接合体の雌雄を交配し、妊娠 13-15 日の母マウスに DNA メチル化酵素阻害

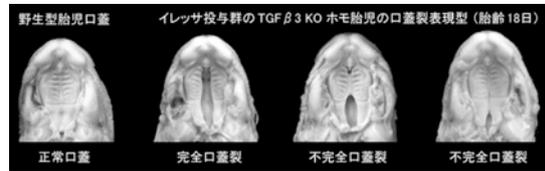
RG108 投与による TGFβ3 KO ホモ胎児の口蓋裂表現型の軽症化作用



剤 RG108 を腹腔内投与した場合、約 15.8 % (n:20/126) の頻度で TGFβ3 KO ホモ胎児の完全口蓋裂が不完全口蓋裂へと軽症化する

ことを確認している。

また、EGF (上皮成長因子) 受容体に対する分子標的治療薬イレッサを RG108 と同様の条件で妊娠母マウスに 3 日間腹腔内投与した場合、それぞれ約 15.8 % (n:20/126) および 17.7 % (n:11/62) の頻度で TGFβ3 KO ホモ胎児の完全口蓋裂が不完全口蓋裂へと軽症化することも確認している。



(1) 妊娠マウスへの RG108 の腹腔内投与が BL/6 TGFβ3 KO マウスホモ胎児における癒合時期の口蓋組織の IGF2R 発現量および各種シグナル伝達系に与える影響の解析

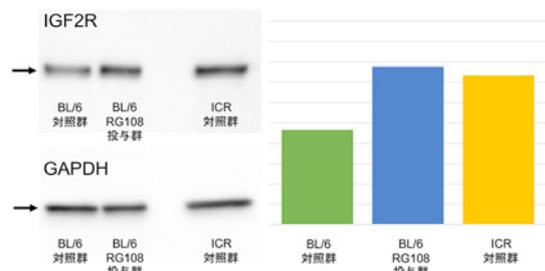
BL/6 および ICR TGFβ3 KO のヘテロ接合体の雌雄を交配し、妊娠 13 日から 1 日 1 回 RG108 (5mg/kg/day) またはイレッサ (5mg/kg/day) を腹腔内に投与して、ほぼ同じ口蓋発育段階 (口蓋突起癒合時期) となる妊娠 14 日夜 (ICR) または 15 日昼 (BL/6) の胎児を帝王切開により摘出して、各胎児の遺伝子型を PCR 法で調べるとともに、口蓋突起部分のみを実体顕微鏡下で切り取って、同組織からタンパクを抽出し、Western blot 解析試料とした。なお、ICR TGFβ3 KO および BL/6 TGFβ3 KO 対照群では RG108 およびイレッサの溶媒に用いるジメチルスルホキシドのみを等量、同様の条件で腹腔内に投与し、同様にタンパクを抽出した。

(2) DNA メチル化酵素阻害剤 RG108 投与がインプリンティング遺伝子 *Igf2r* センسプロモーター領域 (DMR1) およびアンチセンス センسプロモーター領域 (DMR2) のメチル化に及ぼす影響の解析

妊娠マウスへの RG108 の腹腔内投与を行って胎齢 15 日で摘出した BL/6 TGFβ3 KO ホモ胎児と野生型胎児 (対照群) の口蓋組織から DNA を抽出して、*Igf2r* のインプリンティングボックスのメチル化を PCR 法で解析した。

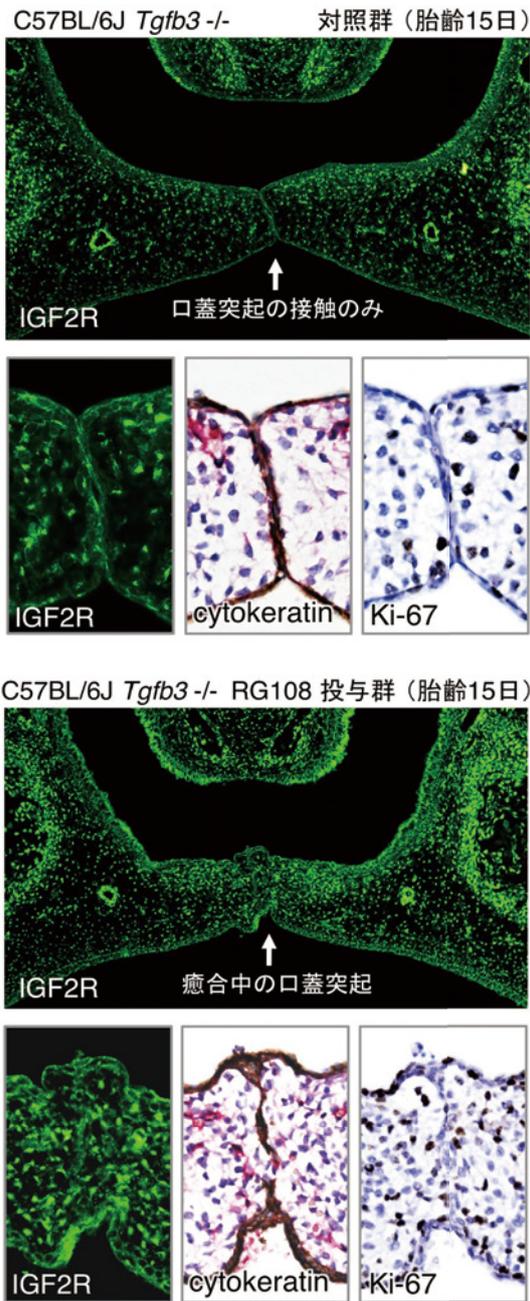
### 4. 研究成果

(1) RG108 投与群の TGFβ3 KO ホモ胎児口蓋組織における IGF2R 発現量の変化



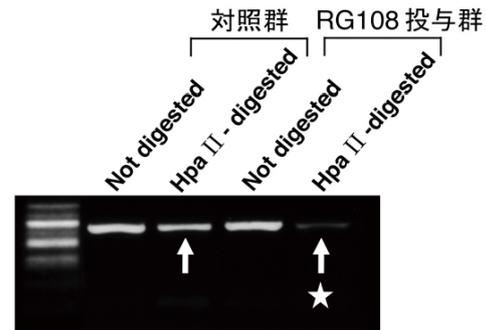
TGFβ3 ホモ胎児 (対照群) の口蓋突起癒合時期の口蓋組織では、BL/6 の IGF2R 発現量は ICR のそれに比べて低い DNA メチル化酵素

阻害剤 RG108 を投与すると ICR のそれと同等レベルまで発現量が上昇することが判明した。この Western blot の結果は当該研究の開始時点で判明していた免疫染色による組織学的な解析結果と合致している（下図）。



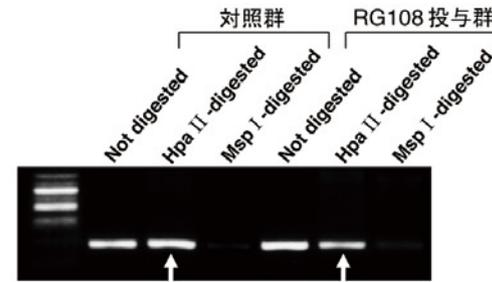
IGF2R は最もよく知られたインプリンティング遺伝子であり、TGFβ の潜在型から活性型への変換に必要な足場である。この結果は同じマウスであるにもかかわらず、マウス系統によって IGF2R 遺伝子のセンスプロモーター領域 (DMR1) およびアンチセンスプロモーター領域 (DMR2) のメチル化状態に著しい差異が生じていて、その結果、TGFβ 3 KO による口蓋裂の表現型に大きな影響を与えていると考えられる。この仮説は、RG108 投与による BL/6 TGFβ 3 ホモ胎児の完全口蓋裂が不完全口蓋裂に軽症化する実験結果とも合致していた。また、BL/6 野生型胎児口蓋突起の器

官培養系を用いて、RG108 が IGF2R 遺伝子の DMR1 および DMR2 のメチル化状態に及ぼす影響について解析した結果とも矛盾していない（下図）。



sense RNA promoter region (DMR1)

右端レーンの星印は（対照群と比べて）RG108 投与群のセンスプロモーター領域 (DMR1) のインプリティングボックス内のメチル化がほとんど存在しないことを示す。

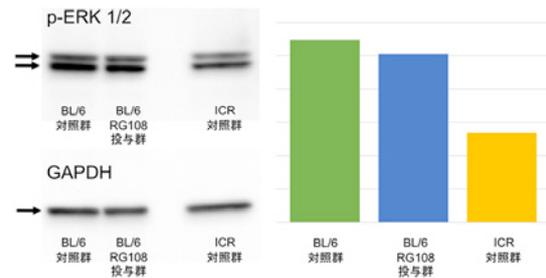


antisense RNA promoter region (DMR2)

アンチセンスプロモーター領域 (DMR2) のメチル化は完全に消失していない。

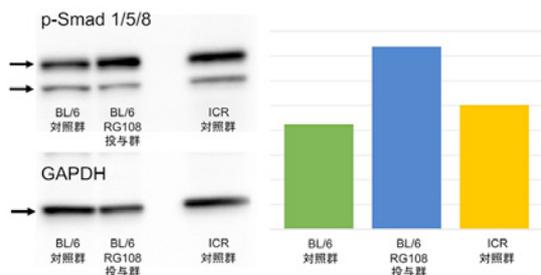
(2) RG108 投与群の TGFβ 3 KO ホモ胎児口蓋組織における p-ERK 1/2 発現量の変化

TGFβ 3 ホモ胎児の口蓋組織における p-ERK 1/2 発現量の比較



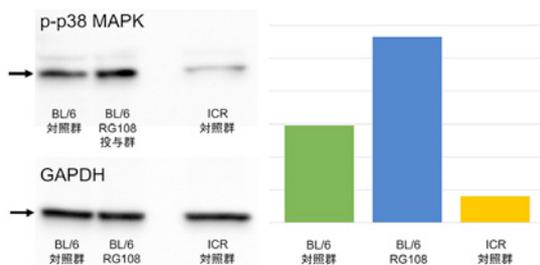
TGFβ 3 KO ホモ胎児（対照群）の口蓋突起癒合時期の口蓋組織では、BL/6 の p-ERK 1/2 発現量は ICR 系統のそれに比べて 2 倍程度多いことが判明した。p-ERK 1/2 は EGF 受容体の下流に存在する主要なシグナル伝達系であり、その作用は TGFβ 受容体の下流に存在する Smad 系と拮抗することが知られている。BL/6 と ICR との p-ERK 1/2 発現量の差異が口蓋裂表現型の差異を生み出している主要な原因であることが示唆される。その仮説は並行して行っているイレッサ投与実験の結果（後述）とも合致している。

(3) RG108 投与群の TGFβ 3 KO ホモ胎児口蓋組織における p-Smad 1/5/8 発現量の変化



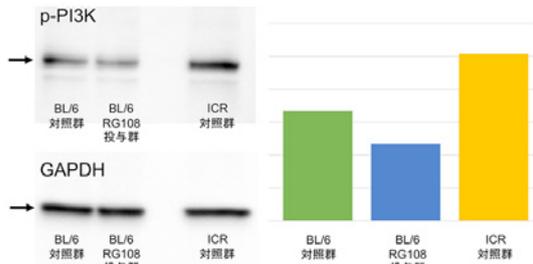
TGF  $\beta$  3 KO ホモ胎児 (対照群) の口蓋突起癒合時期の口蓋組織では、BL/6 の p-Smad 1/5/8 発現量は ICR のそれに比べてわずかに多いが、RG108 投与によって、BL/6 の発現量が大きく増加することが判明した。この p-Smad 1/5/8 は TGF  $\beta$  I 型受容体 (ALK-5) の下流に存在する主要なシグナル伝達系である。上記の TGF  $\beta$  活性化の足場となる IGF2R の発現量の上昇ともなって、TGF  $\beta$  3 欠損下でも TGF  $\beta$  1 および TGF  $\beta$  2 によって、その活性化が代償されたことに起因すると考えられた。

#### (4) RG108 投与群の TGF $\beta$ 3 KO ホモ胎児口蓋組織における p-p38 MAPK 発現量の変化



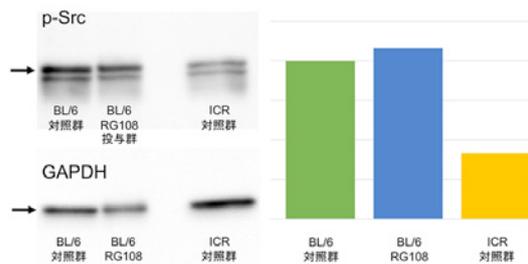
TGF  $\beta$  3 KO ホモ胎児 (対照群) の口蓋突起癒合時期の口蓋組織では、BL/6 の p-p38 MAPK の発現量は ICR のそれに比べて3倍程度も高く、RG108 投与によって、さらに発現量が大きく増加することが判明した。この p-p38 MAPK の発現量の大きな差異は、RG108 投与による完全口蓋裂の不完全口蓋裂への軽症化を妨げている主要な原因と考えられるため、現在、p-p38 MAPK に対する選択的阻害剤併用投与の予備実験を進めている。

#### (5) RG108 投与群の TGF $\beta$ 3 KO ホモ胎児口蓋組織における p-PI3K 発現量の変化



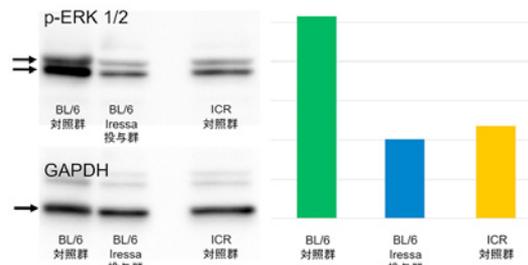
TGF  $\beta$  3 KO ホモ胎児 (対照群) の口蓋突起癒合時期の口蓋組織では、BL/6 の p-PI3K の発現量は ICR のそれに比べて低い、RG108 投与によって、p-PI3K の発現量が少し低下することが判明した。

#### (6) RG108 投与群の TGF $\beta$ 3 KO ホモ胎児口蓋組織における p-Src 発現量の変化



TGF  $\beta$  3 KO ホモ胎児 (対照群) の口蓋突起癒合時期の口蓋組織では、BL/6 の p-Src の発現量は ICR 系統のそれに比べて2倍以上高いが、RG108 投与によっても、p-Src の発現はほとんど変化していないことが判明した。この p-Src 発現量の大きな差異は、RG108 投与による完全口蓋裂の不完全口蓋裂への軽症化を妨げている主要な原因と考えられるため、現在、p-p38 MAPK に対する選択的阻害剤の併用投与の予備実験を進めている。

#### (7) イレッサ投与群の TGF $\beta$ 3 KO ホモ胎児口蓋組織における p-ERK 1/2 発現量の変化



TGF  $\beta$  3 KO ホモ胎児 (対照群) の口蓋突起癒合時期の口蓋組織では、BL/6 の p-ERK 1/2 発現量は ICR のそれに比べて2倍程度多いが、イレッサ投与により、p-ERK 1/2 の発現量が ICR のそれと同等レベルまで抑制できることが判明した。同じマウスであるにもかかわらず、BL/6 と ICR との間で胎児期の口蓋組織で p-ERK 1/2 の発現量が根本的に異なっていることが、TGF  $\beta$  3 KO ホモ胎児が呈する BL/6 の完全口蓋裂と ICR の不完全口蓋裂との表現型の差異を生じさせている原因であることが強く示唆された。また、イレッサ投与による BL/6 の p-ERK 1/2 の発現抑制が完全口蓋裂を不完全口蓋裂へと軽症化させるために重要であることが示唆された。

以上の研究成果を総括すると、対照群ではマウス系統により胎児期の口蓋組織における IGF2R の発現量、p-ERK 1/2、p-Smad 1/5/8、p-PI3K、p-p38 MAPK、p-Src の発現量 (活性化の程度) が根本的に異なっており、それらの差異が口蓋裂表現型の差異を生じさせている原因であることが強く示唆された。また、DNA メチル化酵素阻害剤の投与は BL/6 の TGF  $\beta$  3 KO ホモ胎児口蓋組織の IGF2R の発現量を ICR のそれと同等レベルにまで上昇させるだけではなく、TGF  $\beta$  の主要なシグナル伝達系である p-Smad1/5/8 の発現量も ICR のそれら

と同等レベルにまで活性化させることが判明した。一方、対照群でBL/6よりもICRで活性化レベルの低いp-Srcとp-p38 MAPKが著しく活性化していることも判明し、これらの活性化を抑制することにより口蓋裂表現型の軽症化の奏効率がさらに高まる可能性が見いだされた。これらの実験結果はこれまでに*in vitro*解析で見いだされていた同薬剤投与による口蓋突起癒合部上皮細胞の上皮-間葉分化転換能力の上昇および口蓋突起癒合能力の上昇等の実験結果とも合致しており、口蓋突起の癒合および遺伝子異常による口蓋裂表現型をエピジェネティックに制御している分子メカニズムの解明に大きく寄与する成果であり、口蓋裂重症化抑制を標的とする予防的胎児薬物療法の実現に向けたきわめて新規性の高い知見である。現在、論文投稿に向けてIGF2Rの発現および各種シグナル伝達系のWestern Blot解析を3回ずつ繰り返して実験結果の再現性を確認している。

#### (8) 得られた研究成果の国内外での位置づけとインパクトおよび今後の展望

当該研究成果は同じ遺伝子改変マウスであっても、その遺伝学背景(系統)が異なると表現型が変化する事象の原因にエピジェネティックな修飾因子が関与していることを初めて明らかにするとともに、DNAメチル化酵素や上皮成長因子に対する分子標的治療薬の投与により、胎児口蓋組織のシグナル伝達系を制御できること、ならびに遺伝子異常による口蓋裂表現型の重症化を薬理的に抑制できることを国内外で初めて実証したものである。

現在、ヒトの出生前遺伝子診断技術が日進月歩で進んでおり、体外受精による不妊治療では桑実胚の段階から細胞を取り出し、次世代シーケンサで網羅的に遺伝子異常の有無を解析できるようになってきた。

TGF $\beta$ 3遺伝子異常のように表現型が口蓋裂に限られる場合、口蓋裂の発症や重症化抑制を標的とする予防的胎児薬物療法を開発することができれば、安易な生命の選択を回避できるようになると予想される。この観点からみて、当該研究成果は予防的胎児薬物療法という夢の実現に向けた先駆的研究であり、近い将来、当該研究の成果および今後の研究の発展により、いまだ生後の手術のみであるヒトの口蓋裂治療に対して予防的胎児薬物療法という新たな治療戦略が加わることが期待される。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 口蓋形成および口蓋裂発症における上皮-間葉分化転換とエピジェネティクス～細胞の運命は遺伝子だけで決まらない～  
滝川俊也. 第168回京都歯科口腔外科集談会. 2014年12月21日. 京都大学医学部稲盛ホール(京都市)
- ② DNAメチル化酵素阻害剤投与によるTGF $\beta$ 3ノックアウトマウス胎児の口蓋裂表現型の薬理的改善に関する研究. 杉山明子、滝川俊也、引頭毅. 第56回歯科基礎医学会学術大会. 2014年9月27日. 福岡国際会議場(福岡市)
- ③ TGF $\beta$ 2およびTGF $\beta$ 3ダブルノックアウトマウス胎児の口蓋裂表現型と口蓋突起の癒合に関する研究. 滝川俊也. 第119回日本解剖学会全国学術集会. 2014年3月28日. 自治医科大学(宇都宮市)
- ④ DNAメチル化酵素阻害剤投与によるTGF $\beta$ 3ノックアウトマウスの口蓋裂軽症化に関する研究. 滝川俊也、高木秀太、今井田千恵. 第73回日本解剖学会・中部支部学術集会. 2013年10月5日. 山梨大学(甲府市)
- ⑤ イレッサ投与によるTGF $\beta$ 3ノックアウトマウス胎児の口蓋裂表現型の薬理的改善. 滝川俊也、引頭毅、高木秀太、今井田千恵. 第55回歯科基礎医学会. 2013年9月22日. 岡山理科大学(岡山市)

[その他]

ホームページ等  
現在、作成中

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

滝川 俊也 (TAKIGAWA, Toshiya)  
朝日大学・歯学部・教授  
研究者番号: 90263095

##### (2) 研究分担者

引頭 毅 (INTO, Takeshi)  
朝日大学・歯学部・講師  
研究者番号: 10360918

高木 秀太 (TAKAGI, Shuta)

朝日大学・歯学部・元助教

研究者番号: 10711351

(平成25年度のみ研究分担者として参加)

##### (3) 研究協力者

杉山 明子 (SUGIYAMA, Akiko)

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号: 90304534

(平成26年度から当該研究に参加)