

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861710

研究課題名(和文) Twist 1 欠失ヘテロ個体マウスを用いた、頭蓋早期癒合の頭蓋成長モデルの作成

研究課題名(英文) Skeletal Analysys of the Twist +/- heterozygous mice, a Genetic Model for the Saethre-Chotzen syndrome

研究代表者

塗 隆志 (Nuri, Takashi)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：40445995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000 円

研究成果の概要(和文)：Twist 1 + / - マウスでは 6 週齢以降に冠状縫合の癒合をみとめ、8 週齢で 6 匹中 5 匹に両側性の完全閉鎖、1 匹に片側の完全閉鎖を認めた。2 次元解析によると、野生型では 4 週齢以降に前後方向と上下方向ともに直線状に成長するのに対し、Twist 1 + / - では前後方向の成長が止まり上下方向へ急速な成長が認められた。8 週齢のマウスにおいて野生型に対して Twist 1 + / - マウスは前後方向の成長が統計学的優位に短縮し、縦方向には優位に延長していた。三次元の検討では、Twist 1 + / - マウスは冠状縫合部の左右の拡大を認めた。眼窩の大きさには左右差はなかった。

研究成果の概要(英文)：Physical abnormalities such as polysyndactily were observed in all the mice which showed premature fusion after postnatal day of 42. The manner of the fusion in postnatal day of 42 were various; 20% showed part of unilateral coronal suture, 40% showed partial bilateral fusion 20% showed complete bilateral fusion and 20% showed non fusion. At postnatal age of 56, 17% showed complete unilateral fusion and 83% showed complete bilateral fusion.

The 2D analysis of the distances between two landmarks which indicate the distances of the height of the skull of Twist +/- were increased until postnatal age of 56 and the distance of the length were reached plateau at postnatal day of 28. At the postnatal age of 56, length of calvaria in WT were larger than Twist +/- and height of calvarial bone in Twist +/- were larger than WT significantly. Based on the 3D analysis, the Twist +/- shows relatively lateral displacement of the landmarks on parietal bone. The orbit were almost same between them.

研究分野：形成外科

キーワード：craniosynostosis Saethre chotzen coronal suture mouse model

1. 研究開始当初の背景

Syndromic craniosynostosis では頭蓋骨縫合の早期癒合から頭蓋内圧の上昇を来すため、頭蓋形成術が施行される。しかし成長過程の中で、頭蓋内圧の再上昇や形態の異常を原因に再手術を受ける症例も少なくない。Saethre-chotzen syndrome は Twist1 遺伝子の異常が原因で生じる Syndromic craniosynostosis であるが、Saethre-chotzen syndrome においてこれらの原因で再手術が必要とされる例は報告によると 6 - 42%にもおよびとされている¹⁻³。この原因としてほとんどの Craniosynostosis の患者が成長の初期に手術を受けるために、その後の自然成長を観察できないことが挙げられる。また冠状縫合の Twist 遺伝子の一つにこれらの症候群では頭蓋の成長が正常頭蓋と異なることが挙げられる。

2. 研究の目的

われわれは、Twist+/- マウスを用いて冠状縫合早期癒合を来す Saethre-chotzen syndrome における頭蓋成長のパターンを解析する目的に本研究を行った。

3. 研究の方法

Twist+/- マウスと野生型マウスを 2, 4, 6, 8 週齢でサンプリングし Micro CT (Microfocus X-Ray CT system, inspeXio SMX-90CT; Shimadzu, Kyoto Japan.) による撮影を行った。撮影によって得た DICOM データを 3D レンダリングソフト RealINTAGE(CYBERNET SYSTEMS CO.LTD)を用いて二次元および三次元解析

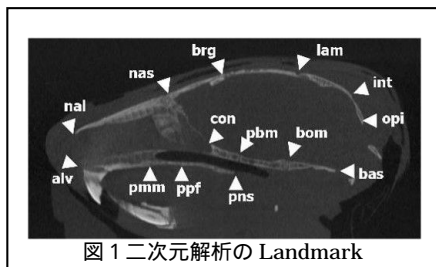


図1 二次元解析の Landmark

を行った。解析にはこれまで報告されている文献をもとにマウスの頭蓋冠に landmark を設定しそれぞれの 2 点間距離を測定することで行った。

4. 研究成果

サンプリングを行ったマウスの個体数は 2, 4, 6, 8 週齢でそれぞれ野生型は 8, 10, 5, 6 匹 Twist 1 +/- マウスは 5, 9, 8, 6 匹であった。Twist +/- マウスでは 6 週齢以降に冠状縫合の癒合をみとめた。6 週齢での癒合形態は片側の一部癒合 20%、両側の一部癒合は 40%、両側完全癒合 20%、癒合なし 20% であった。8 週齢では両側性の完全癒合が 83%、片側の完全癒合が 17% であった(図 2)。

2 次元解析によると、野生型では 4 週齢以降に前後方向と上下方向ともに直線状に成長するのに対し、Twist 1 +/- では 4 週齢から 6 週齢の間で前後方向の成長が止まっているのが成長曲線より明らかであった。一方で頭蓋の縦方向の成長は野生型においては緩やかに成長しているのに対し、Twist +/- マウスでは 4 週齢以降に顕著な成長を認めた。

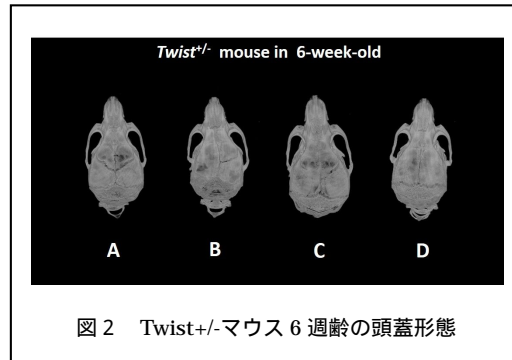


図2 Twist +/- マウス 6 週齢の頭蓋形態

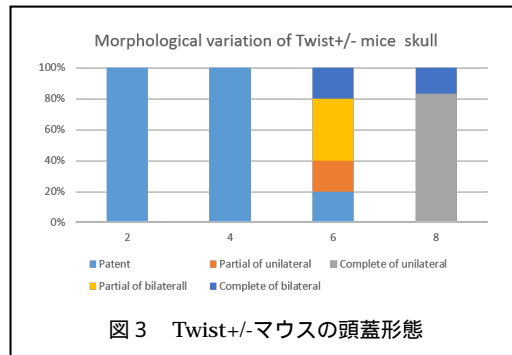
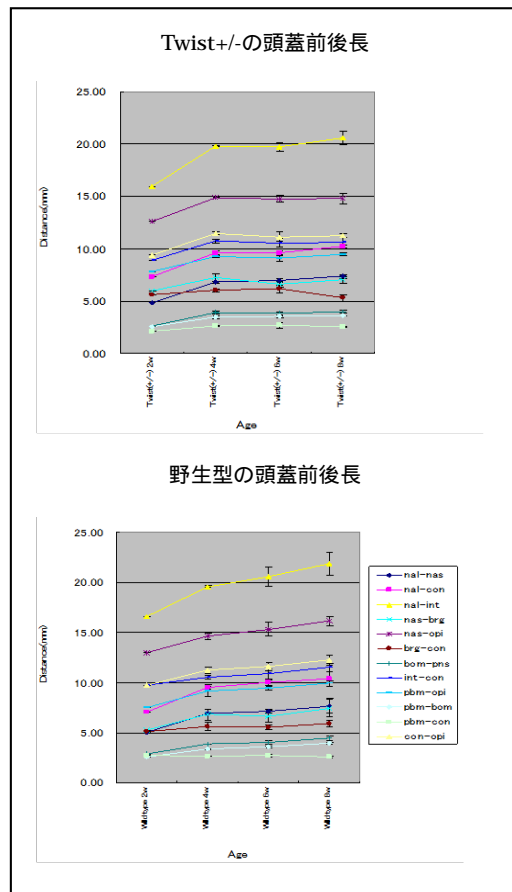


図3 Twist +/- マウスの頭蓋形態



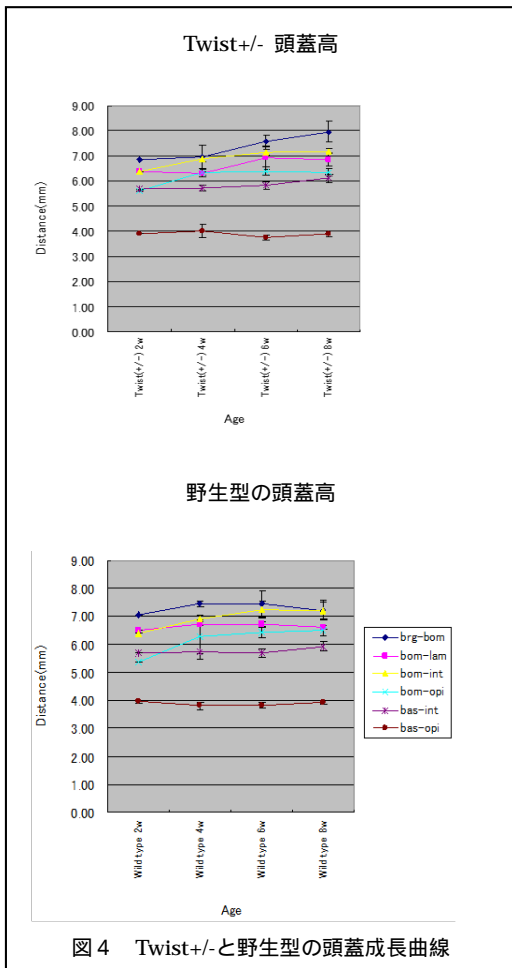


図4 Twist+/-と野生型の頭蓋成長曲線

8週齢のマウスのデータを用いた2次元解析では、縦方向の成長を示すランドマーク間 (brg-bom, int-bas) において Twist 1+/- マウスは野生型に対して統計学的優位に大きく、前後方向の成長を表すランドマーク間距離 (opm-opi, con-int, con-opi, nas-opi) では Twist 1+/- マウスは野生型に対して統

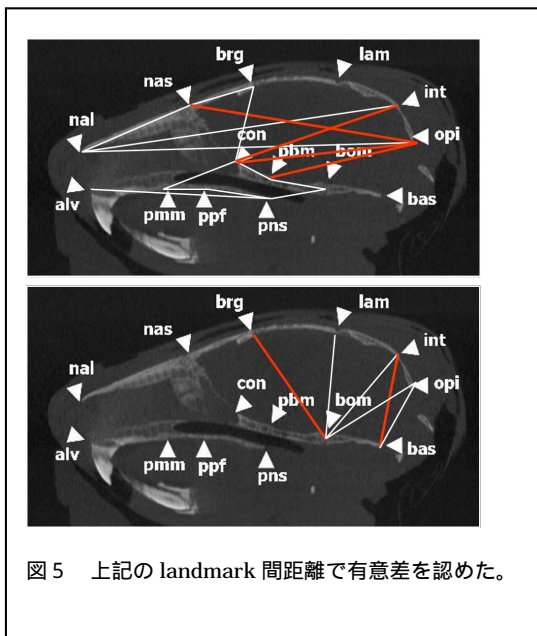


図5 上記の landmark 間距離で有意差を認めた。

計学的優位に短縮していることがわかった (図5)。

三次元の検討では、Twist 1+/- マウスは頭蓋冠の横方向の成長が野生型に対して大きい傾向にあった。顔面の長さは Twist 1+/- マウスで比較的短縮していることがわかった。眼窩の大きさには両者に差はなかった (図6)。

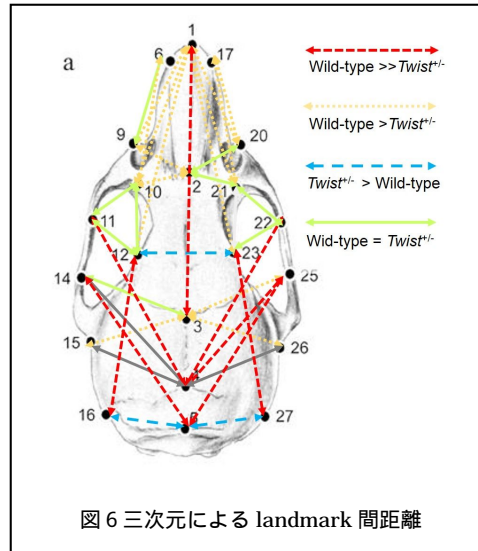


図6 三次元による landmark 間距離

本研究の最終目標はマウスのモデルを用いて Saethre-chotzen syndrome をはじめとする冠状縫合早期癒合症が頭蓋および顔面へ与える影響を調べるものである。これまでも Twist+/- マウスを用いた冠状縫合の癒合の観察の報告はなされてきたが、早期癒合の時期は報告によってばらつきがあり、頭蓋の形態を把握する上では癒合の前後における一定期間の観察が必要であると考えられた。

我々の用いた Twist+/- マウスは4週齢から6週齢の間に早期癒合を来すことが考えられ、8週齢まで観察を行うことで、野生型との間に形態学的に統計学的優位差を認めた。我々は今後、早期癒合の有効な治療法についてさらなる実験を行っていく予定であるが、今回の実験によって得られたデータは、Twist 遺伝子が冠状縫合および頭蓋の形態に及ぼす影響のみならず、治療による効果を判定する上での基準値として有用である。

<引用文献>

1. Mooney MP, Fellows-Mayle W, Losken HW, Dechant J, Burows AM, Smith TD, Cooper GM, Pollack I, Siegel MI. Increased intracranial pressure after coronal suturectomy in cranosynostotic rabbits. J Craniofac surg 1999;10:104-10
2. Foster KA, Frim DM, McKinnon M. Recurrence of synostosis following surgical repair of cranosynostosis. Plast Reconstr Surg 2008;121:e70-6
3. Woods RH, Ul-Haq E, Wilkie AO,

- Jayamohan J, Richards PG, Johnson D, Lester T, Wall SA. Reoperation for intracranial hypertension in *TWIST1*-confirmed Saethre-Chotzen syndrome: a 15-year review. *Plast Reconstr Surg* 2009;123:1801-10
4. Perlyn CA, DeLeon VB, Babbs C, Govier D, Burell L, Darvann T, Kreiborg S, Morriss-Kay G. The craniofacial phenotype of the Crouzon mouse: analysis of a model for syndromic craniosynostosis using three-dimensional MicroCT. *Cleft Palate Craniofac J*. 2006;43:740-8

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 2 件)

塗 隆志、上田晃一、井関祥子、太田正人、Twist 1 欠失ヘテロ個体マウスを用いた、頭蓋早期癒合の頭蓋成長モデルの作成 第23回 日本形成外科学会基礎学術集会(松本)2014年10月

Takashi Nuri, Koichi Ueda, Sachiko Iseki, Masato Ota, Skeletal Analysis of the *Twist*^{+/-} heterozygous mice, a Genetic Model for the Sathre-Chotzen syndrome. 16th Biennial Congress of the International Society of Craniofacial Surgery (東京) 2015年9月

〔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

塗 隆志 (NURI Takashi)

大阪医科大学医学部講師

研究者番号：40445995