

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861986

研究課題名(和文)イノシトールは口唇口蓋裂を抑制する-その機序解明からCLP発症原因を探る-

研究課題名(英文)The inositol prevents occurrence of cleft lip and palate

研究代表者

藤原 久美子 (Fujiwara, Kumiko)

富山大学・大学病院・助教

研究者番号：60404737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：口唇口蓋裂は先天性体表異常の中でも最も多い疾患であり、多くの問題点を抱える本疾患の原因解明が望まれるが、いまだ確定的なものがない。先行研究では、Inositolをマウスに投与することにより口蓋裂の発生が抑制される傾向があった。そこで本研究では、Inositolと、発生学的に細胞接着に関与するカドヘリンとの関与が知られているWnt signaling、中でも最終複合産物であるPROP1との関連性を明らかにすることを目的とした。その結果、MLPA法では明らかな遺伝子異常を認めることはできなかった。その他LHX4、HESX1などいくつかの遺伝子についても異常を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Cleft lip and palate are most frequent congenital anomaly, and the cause elucidation of this anomaly to hold many problems is expected, but there is not a yet definite thing. In the precedent study, the incidence of the cleft palate tended to be prevented by giving Inositol to a mouse. Therefore, in this study, it was intended to clarify association with Inositol and Wnt signaling. I examined it mainly on connection with PROP1. As a result, I was not able to accept clear gene abnormality by the MLPA method. I did not recognize abnormality about other LHX4, some genes including HESX1 either.

研究分野：歯科口腔外科

キーワード：口唇口蓋裂 MLPA法 Prop1

1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂は先天性体表異常の中でも最も多い疾患であり、日本では現在でも出生500人に一人程度の発症率と報告されている。審美的、心理的にも多くの問題点を抱える本疾患の原因解明が望まれるが、いまだ確定的なものがないのが現状である。口唇口蓋裂は胎生期の顔面突起が癒合に至らないために発生し、その要因は多因子閾説で説明されているが、いまだ明らかなものはない。

臨床的には、予防方法はいくつか立案されており、現在最も知られているのが妊娠初期からの葉酸摂取による神経堤由来疾患(NTDs)の発生抑制である。これには心疾患などの先天性疾患が含まれ、NTDsに含まれる口唇口蓋裂にも効果があり、葉酸を含むビタミン群の摂取は奨励されてきた。しかしその一方で、予防できない葉酸抵抗群に対しての予防法として、Inositolの投与が目されるようになってきた(Myoinositol, glucose and zinc status as risk factors for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in offspring: a case-control study. Ingrid P. C., et al., BJOC: an international Journal of obstetrics and gynaecology, 2004.)。これは、葉酸と同じビタミンB群に分類されるInositolをマウスに投与することにより口蓋裂の発生が抑制される傾向があったこれまでの研究成果(科学研究費補助金:若手(B)課題番号22792028、平成22-23年)を裏付けるものであった。そこで、Inositolによる口蓋裂発生抑制には、何らかの遺伝子群がInositolと特異的に作用することで引き起こされると推察し、顔面突起が癒合する際に強く作用する、細胞接着関連遺伝子を中心に検索を行うこととした。またさらに、生体内で存在するmyoinositolが先天性心疾患の予防に効果がある(Folate protection of congenital heart defects linked with canonical Wnt signaling and epigenetics. Kersti K., et al., Curr Opin Pediatr 22(5):561-566, 2010)との報告から、InositolとWnt signalingの関連性にもなんらかの因子が関与していることが考えられた。特にWnt/Catenin signalingは、前述した細胞接着因子であるCadherinと細胞膜を介して結合していることから、InositolとWnt/Catenin signalingの関連性を解明することがInositolの口蓋裂発生予防機序を解明する糸口になるものと考えられた。

2. 研究の目的

Wnt/カテニン経路は、脊椎動物と無脊椎動物の発生における細胞の運命の決定を調節している。WntリガンドがFrizzled受容体に結合し、この結合によって多機能キナーゼであるGSK-3 (Glycogen synthase kinase

3-beta, OMIM 605004)を含む複合体のカスケードが開始する。Wntシグナルが無い場合には(オフ状態)、カテニンがこれら複合体の分解に向かう。一方Wntが結合する場合(オン状態)には、最終的にホメオドメイン因子のPROP1(Prophet of Pit1, paired-like homeodomain transcription factor, OMIM:601538)と複合体を形成して、状況依存性の活性化を作用させることが示されている。胎生期にはWnt/カテニン経路は多くの細胞・組織においてFGFとTGFなどの経路からシグナルを集約している(ちなみにFGFやTGFはCL/P発生に深く関与している遺伝子として知られている)。さらに、GSK-3はグリコーゲン代謝の重要な経路に関与しており、さらにInositolは体内ではグリコーゲンから生成されることから考えると、非常に関連が深い遺伝子と考えており、(Towards an integrated view of Wnt signaling in development. Amerongen R., Nusse R., Development, 136(19):3245-14, 2010.)本研究でも関連性が示唆される。

以上のことより、wnt/catenin経路におけるInositolの口蓋裂予防抑制効果を検討するためには、この経路で最終的に複合体を形成するPROP1と、Inositolがグリコーゲンから生成されるにあたってGSK-3との関連性が示唆されるため、CL/P患者におけるこの遺伝子の変異の有無について検討を行うこととした

3. 研究の方法

サンプルの選出

これまで愛知学院大学歯学部ハイテクリサーチセンターに保管されている約7000例の検体のうち、非症候性口唇口蓋裂で、さらに十分なDNAが抽出できる20検体を選出、DNA抽出をQIAmp DNA mini Kit (QIAGEN)のプロトコルに従い抽出した。すべての使用サンプルは組織(粘膜あるいは皮膚組織)であった。

MLPA法 (DNAの変性、プローブのハイブリダイゼーション・ライゲーション・PCR増幅)

キャピラリー電気泳動による増幅ピークの検出 検出された各プローブの増幅ピークについてリファレンスサンプル(ワイルドタイプ)との比較解析を行い、Ratioを算出(MLPA専用ソフトCoffalyser.NET) MLPA法はシーケンスやFISH法などの従来型の検出方法では、発見が困難であった単一エクソンや染色体レベルにおける幅広いコピー数変化の検出に対応しているといわれている。本来欠失例であれば、連結化特異プローブ量が正常の半分に減少し、PCR増副産物量も半分程度に減少し、その量は65%以下となるため、Ratioが0.7以下となり欠失あり

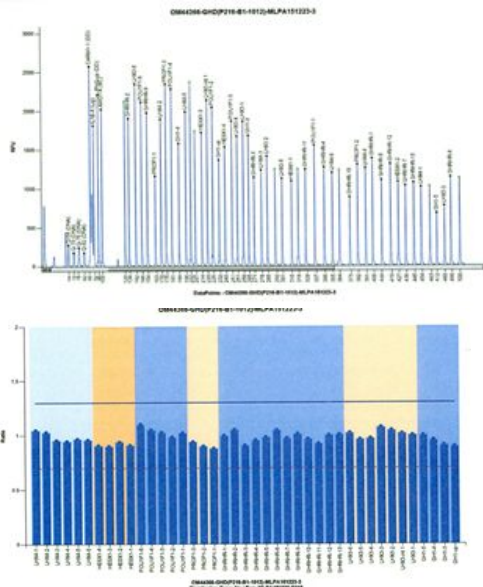
と判定できる。その一方、連結化特異プローブ量が正常の1.5倍に増加した結果、PCR増幅産物量も1.5倍程度増加し、その量は135%以上になるため、Ratioが1.3以上で挿入・重複例ありと判定できる。

4. 研究成果

今回DNAを抽出できたサンプルのうち、実際にMLPA法を行い、電気泳動により増幅ピークが検出されたものの、ワイルドタイプとの比較解析において、Ratio値が安定せず、正確な結果が得られたと判断されたものは2検体にとどまった。Ratio値が安定しなかった検体に関しては、さらに2回のMLPA法の解析を実施したが2回とも異なる結果となり、判定不能との結果となってしまった。

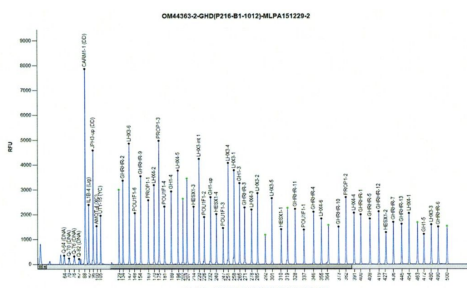
以下は判定可能であった、片側口唇口蓋裂サンプルの結果例を実際に示す。

(グラフ1, 2)



MLPA結果1(グラフ1)増幅ピークの検出結果。いずれの標的遺伝子でも明らかなピークの増大や減少を認めなかった。(グラフ2)ワイルドタイプとの比較解析の結果であるRatio値をグラフ化したもの。本サンプルでは、すべての標的遺伝子のRatio値が0.97から1.16の範囲であり、明らかな欠失や挿入・重複例を認めなかった。

(グラフ3)



MLPA法結果2(グラフ3): Ratio値が安定せず、解析不能結果となった増幅ピークの検出結果。PROU1F1-, 1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-6, では著明なRatio値の低下、その一方でLHX3-1, 3-2, 3-3-, 3-4, 3-5, 3-6では著明なRatio値の上昇(1.32-1.95)を認めた。

本研究結果においては、明らかな遺伝子変異も認めることはできなかった。特にWnt signaling関連の遺伝子については正常範囲内であり(【Ratio値】サンプル44364: Prop1-1 =1.02, Prop1-2 =1.04, Prop1-3 =1.01)(サンプル44366: Prop1-1 =0.88, Prop1-2 =0.9, Prop1-3 =0.94)いかなる変異も疑えなかった。これらから、口唇口蓋裂関連の遺伝子としてPropは必ずしも遺伝子変異を持っているものではないことが考えられた。

今回利用したMLPA法では、直接口唇口蓋裂発生と関連のない遺伝子も同時に検査項目となっていた、LHX4-1.4-2.4-3.4-4.4-5、HESX1-1, 1-2, 1-3, 1-4, PROU1F1-1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, GHRHR-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, LHX3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, GH1-3, 1-4, 1-5についても評価を行った。しかしいずれの遺伝子も明らかな欠失などを認める所見はなかった(Ratio値はすべて0.87-1.16、サンプル44364:平均Ratio1.03、サンプル44366:平均Ratio0.97)。

ただし、その他のサンプルを含め、本来正常であるはずの他の遺伝子でもRatio値が一定せず判定が困難となったサンプルもあった。しかしながら、そのサンプルの中でも以下のような特徴を示していた。

HESX1-1, 1-2, 1-3, 1-4 および PROU1F1-, 1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-6, では著明なRatio値の低下(0.69-0.3)を認めた。

PROP1-1, 1-2, 1-3 および LHX3-1, 3-2, 3-3-, 3-4, 3-5, 3-6 では著明なRatio値の上昇(1.32-1.95)を認めた。

つまり、今回判定不能となったサンプルであっても、ある遺伝子においては同じRatio値の変化(増大もしくは低下)が認められていたことが明らかとなった。このことが判定不可能となった原因の一つである可能性もあるが、さらに解析を行うことで、口唇口蓋裂発生へ何らかの影響を与えている可能性もあるかもしれない。

また、その他にMLPA法による計測が正確に行えなかった点として、以下の2点が原因と考えられた。

もとのDNA抽出資料が組織由来(皮膚もしくは口腔粘膜)であったことに由来していると思われる、MLPA法を実施するには血液サンプルを使用することが望ましいと思われた。

QIAmp Kitは広く利用されているDNA抽

出法であるが、MLPA 法との明らかな互換性は確定的ではなく、あるいは組織から DNA の抽出方法を変更することで正確なデータが得られた可能性も考えられた。今後は他のサンプルでも DNA 抽出を再度実施し、MLPA 法と適合するかを再評価し、目的遺伝子についての最終的にはダイレクトシーケンスにて確認をしていく予定である。

5．主な発表論文等：なし

6．研究組織

(1)研究代表者

藤原久美子 (FUJIWARA Kumiko)

富山大学・大学病院・助教

研究者番号：60404737