

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861708

研究課題名(和文)p53ノックアウト口唇口蓋裂感受性マウスを用いた口蓋裂発生メカニズムの解明

研究課題名(英文)Explication of the cleft palate occurrence mechanism using p53 knock-out mouse

研究代表者

西川 敦(NISHIKAWA, Atsushi)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：40727583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトにおいて発生率の高い先天異常である口唇口蓋裂発症メカニズムにおけるアポトーシス関連物質のp53の役割について検索することを、本研究の目的とした。口蓋は、口蓋突起のinitiationに始まり、尾側への進展、舌上への挙上、水平方向への進展、正中での癒合という5つの形態変化で形成される。それら5つ全てのステージで、口蓋突起にp53のmRNAの発現を認めた。高率で口唇口蓋裂を自然発症する近交系マウスであるCL/Fr系統マウスと、そのCL/Fr系統マウスにp53欠損をさせたCL/Fr; p53マウスで口唇口蓋裂発症率に差があり、口蓋裂、口唇裂の発生部位とp53の発現部位に関連性が認められた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the role of p53 (a key regulator of apoptosis) in the pathogenesis of palatal cleft, with or without cleft lip. Palatal cleft is one of the most common congenital birth defects in humans. The palatal structure arises from five crucial developmental stages - initiation of palatal shelves; downgrowth of the palatal shelves; elevation of palatal shelves above the dorsal side of the tongue; horizontal growth of the palatal shelves; and fusion of paired palatal shelves at the midline. p53 was found to be expressed in the developing palatal shelves at all stages. The CL/Fr mouse strain is known to frequently exhibit spontaneous palatal cleft, with or without cleft lip. We found that the frequency of palatal cleft differed between CL/Fr mice with and without p53 mutation. Tissues displaying p53 expression were also consistent with the regions corresponding to palatal cleft and cleft lip.

研究分野：口腔外科

キーワード：口蓋口唇裂 p53

1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域において、口唇口蓋裂は最も発生率の高い外表奇形である。その発生原因は遺伝要因(内因)と環境要因(外因)の相互作用と周知されているが、疫学的・形態学的・遺伝学的知見の一致はまだない。一方、癌抑制遺伝子として知られる p53 遺伝子は、修復不能の DNA 障害をもつ細胞が発生初期の胎児に生じると、アポトーシスを誘導して、奇形の発生を防ぐことが知られている。過去に、p53 ノックアウトマウスにおける脳ヘルニア自然発症についての報告はあるが、口唇口蓋裂の発症に関しての言及はない。また、Msx1 や Fgf10/Fgfr2b などのノックアウトマウスでの口蓋裂発症の報告はあるが、p53 遺伝子との関連性は言及されていない。

我々が保有する CL/Fr 系統マウスは、高い確率で口唇口蓋裂を自然発症する近交系マウスである。これまでの研究により、この CL/Fr 系統マウスにおける p53 欠損マウスの作成に成功した。2006 年に我々は CL/Fr 系統 p53 ノックアウトマウスを用いた放射線照射実験が、p53 遺伝子の口蓋裂発症メカニズム研究にとって、有用なモデルであることを示し、口蓋裂病因解明の糸口に辿り着いた。

2. 研究の目的

高い確率で口唇口蓋裂を自然発症する近交系マウスである CL/Fr 系統マウスと、その CL/Fr 系統マウスに p53 欠損をさせた CL/Fr;p53 マウス間における口蓋裂の形成の差から、口蓋裂発症における p53 の役割を解明することを、本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) p53 の口蓋発生における mRNA 発現パターンの検索

口唇口蓋裂の感受性における p53 の機能を検索するためには、まず口蓋形成における p53 の発現領域を知る必要がある。そこで、口蓋発生における p53 の mRNA 発現パターンを検索した。

口蓋は、口蓋突起の initiation に始まり、口蓋突起の尾側への進展、その後の口蓋突起の舌上への挙上、口蓋突起の水平方向への進展、正中での口蓋突起の癒合という5つの形態変化で形成される。各ステージでの p53 の mRNA の発現を検索した。検索には、口蓋突起における p53 の mRNA の発現を、3次元的にとらえることのできる DIG プローブによる whole mount in situ hybridization 法を用いた。口蓋突起の initiation における p53 の mRNA の発現を観察するために、wild-type の胎生 (E) 12.5 の胎仔を、口蓋突起の尾側への進展における p53 の mRNA の発現を観

察するために、wild-type の胎生 (E) 13.5 の胎仔を、口蓋突起の舌上への挙上および口蓋突起の水平方向への進展と正中での口蓋突起の癒合における p53 の mRNA の発現を観察するために、wild-type の胎生 (E) 14.5 の胎仔を獲得し、実験に使用した。

(2) CL/Fr; p53 マウスと CL/Fr マウスにおける口蓋裂形成の観察

本研究では当科で作製した CL/Fr; p53 マウスと CL/Fr マウスを使用して、口蓋裂形成における p53 の機能を解明する。体外人工受精および胚移植は、本学脳研究所動物資源開発支援研究分野・動物実験施設の協力のもとで行った。方法はすでに確立しており、p53(+/-) CL/Fr の雌雄による凍結受精卵は、約 600 個以上保存していたものを使用した。凍結受精卵を母マウスに移植し、妊娠マウスを準備した。主要器官形成期である妊娠 9.5 日に線量を 2Gy (1Gy/min) 照射した。照射後、口蓋形成期である胎生 (E) 12.5 日から 14.5 日にかけて、検索目的の形態に呼応した時期の胎仔を摘出した。摘出胎仔における裂奇形の有無とその形態を確認し記録した。摘出した胎仔の尾部をサンプリングし、p53 遺伝子 genotyping を行った。また、p53 の機能をより正確に判定するため、CL/Fr; p53 (+/-) マウスと、CL/Fr; p53 (-/-) マウスの両方を作成し、解析に利用した。

4. 研究成果

(1) p53 の口蓋発生における mRNA 発現パターンの検索

口蓋突起の initiation の生じている E12.5 の胎仔の口蓋突起に、p53 の発現を認め、p53 が口蓋突起の initiation に関わっていることが示唆された (Fig. 1)。また、発現は近心の口蓋突起の先端部に局限しており、p53 の口蓋突起 initiation での役割が、近心部に限られている可能性が考えられた。また、E12.5 では、既に口唇は閉鎖しているが、口唇に p53 の発現を認めた。

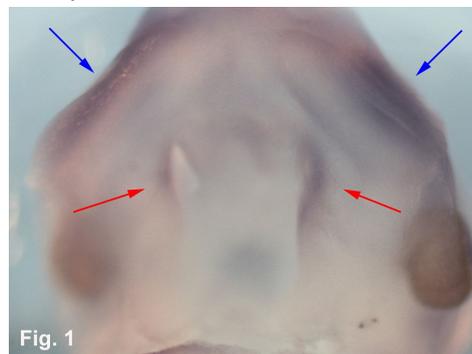


Fig. 1 ; E12.5 における p53 の発現。口蓋突起における発現 (赤矢印)、口唇における発現 (青矢印)

口蓋突起は initiation ステージで形成された後に、尾側へと進展する。その時期に相当するのが、E1 3.5 の胎仔であり、その口蓋突起に p53 の発現が認められた (Fig. 2)。E1 2.5 の胎仔とは違い、p53 の発現は、遠心にまで進展しており、p53 の機能が口蓋突起全体に広がったことを示唆している。また、p53 の発現は口蓋突起の先端に限局しており、p53 の機能が口蓋突起の尾側への進展に関連することが示唆された。また、E1 2.5 に引き続き、E1 3.5 においても、口唇に p53 の発現を認めた。

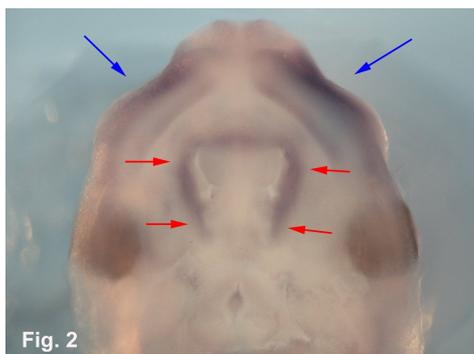


Fig. 2 ; E1 3.5 における p53 の発現。口蓋突起における発現 (赤矢印)、口唇における発現 (青矢印)

口蓋突起は、尾側への進展の後、舌上への挙上、口蓋突起の水平方向への進展、さらに正中での口蓋突起の癒合によって形成される。マウスにおいては、E1 4.5 の胎仔が、それらの生じる時期となる。挙上を終了し、水平方向で増殖している口蓋突起に p53 の発現が認められた (Fig. 3)。特に、口蓋突起の先端に限局して発現しており、p53 が口蓋突起の水平方向への増殖に関与することが示唆された。また、p53 は近心から遠心にかけて口蓋突起全体に発現していたものの、遠心により強く発現していることが確認された。また、E1 4.5 においても、口唇に p53 の発現を認めたが、その発現領域は、E1 2.5 や E1 3.5 にくらべ、限局している傾向が強かった。

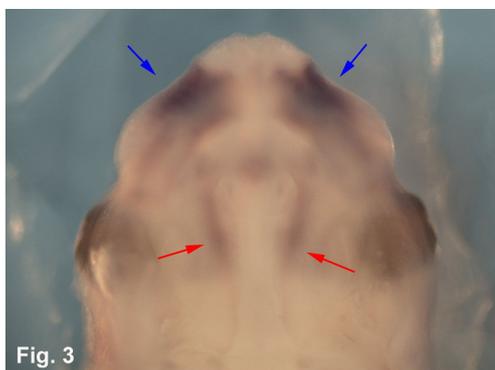


Fig. 3 ; E1 4.5 における p53 の発現。口蓋突起における発現 (赤矢印)、口唇における発現 (青矢印)

口蓋形成中に p53 が、限局的な発現を示す

ことが明らかとなった。それらの限局的な発現で、p53 が口唇口蓋裂の感受性に関与する可能性が示唆された。

(2) CL/Fr; p53 マウスと CL/Fr マウスにおける口蓋裂形成の観察

p53 全くない CL/Fr; p53 (-/-) マウスの作成は、p53 の口蓋形成における機能解析に、非常に重要なモデルとなるため、その作成を行った。CL/Fr; p53 (-/-) マウスは、成獣まで成長するものの、交配しないケースが多かった。また、成獣に達する前に死に至るものも多数あり、本研究課題の目的にはそぐわないことが示された。よって、本研究には、p53 欠損マウスに関しては、CL/Fr; p53 (+/-) マウスのみを使用することとした。

CL/Fr マウスへの放射線照射によって引き起こる裂は、口唇裂と口蓋裂の両方が誘発されるもの、口蓋裂のみが引き起こされるものに大別された。それぞれの欠損の発生率は、p53 を欠損した CL/Fr; p53 (+/-) において、減少していた。CL/Fr マウスで口唇口蓋裂の認められたものにおける、口唇裂の位置と p53 の発現領域が一致する傾向が認められた。

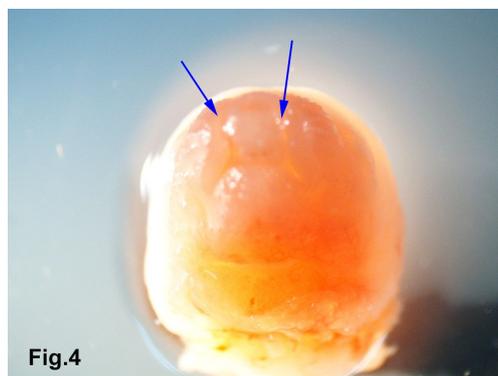


Fig. 4 ; CL/Fr; p53 (+/-) マウスにおける口唇 (矢印)

以上の結果から、p53 の口唇・口蓋形成における機能が確認され、p53 が口蓋突起の initiation から進展に関連することが示唆された。

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 0 件)

〔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

西川 敦 (NISHIKAWA, Atsushi)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号：40727583