

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861731

研究課題名(和文) MAPK経路を介した口蓋突起挙上制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the palatal elevation system via MAPK pathway

研究代表者

松村 香織 (Matsumura, Kaori)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20615794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：口蓋裂の疾患感受性遺伝子を同定するために、本研究では癒合課程の口蓋組織を用いてマウスの口蓋組織形成時における遺伝子発現の変化に着目した。口蓋形成時期前後の硬口蓋および軟口蓋組織を取り出し、遺伝子発現をDNAマイクロアレイを用いて解析した。口蓋形成には多くの遺伝子が関与しており、さらに硬口蓋と軟口蓋では遺伝子発現パターンが異なっていた。このことから、裂型によりそれぞれ異なるメカニズムで発症していることが改めて考えられた。

研究成果の概要(英文)：We examined about gene expression pattern on palate development to identify the susceptibility genes of cleft palate. Palate tissues during development period were taken out and genetic manifestation was analyzed using a DNA microarray. Many genes participated in the palate formation, and moreover the genetic manifested pattern was different in hard palate and soft palate. It was considered to develop the symptoms by different mechanisms in each pattern of cleft.

研究分野：外科系歯学

キーワード：口唇口蓋裂 疾患感受性遺伝子 MAPK

## 1. 研究開始当初の背景

口唇裂・口蓋裂はヒトの先天奇形の中で最も頻度の高い疾患のひとつであり、口唇、歯槽部、口蓋などの口腔顎顔面領域に裂を生じる先天異常である。日本人では新生児約 500 人に 1 人の確率で発生する。口唇裂治療は乳児期の口唇形成術で終了するのに対し、口蓋裂治療は幼児期の口蓋形成術より学童期の言語治療および矯正治療まで一貫した長期にわたる治療が必要であり患者の負担は大きい。現在の治療の主体は外科的治療であり、未だに根本的解決法が存在しない。その原因の一つとして口蓋裂発生時の分子メカニズムが解明されていないことがあげられる。発症要因に関しては遺伝的要因と環境的要因からなる多因子説が有力である。環境的要因としてはこれまでに胎生期の葉酸不足や母親の年齢が指摘されているが、ヒト口蓋裂の遺伝的要因に関しては現在も発症の直接的要因となる因子については明らかになっていないのが現状である。胎生期の口蓋は左右の上顎突起より発生した口蓋突起が舌側方で伸長した後に舌の上方へ挙上し、水平転移、接合を経て癒合することで完成する。この口蓋発生段階のいずれかで障害が起こり、癒合が不完全となることで口蓋裂を発症する。

従来口蓋裂発症機序に関する研究は癒合期の口蓋上皮に着目したものが大半であり、口蓋間葉に着目した研究は少ない。しかしながら、口蓋裂患者の口蓋は短く、口蓋突起形成不全や挙上障害といった口蓋間葉における異常も深く関与しているのではないかと考えられる。我々はこれまでの研究で、FGFシグナリングを介したMAPK経路の負の制御因子であるSprouty2に着目し、Sprouty2遺伝子欠損マウスにおいて口蓋突起挙上障害により口蓋裂が発生することを発見した。しかしながらSprouty2遺伝子欠損マウスの口蓋裂発症頻度は低く、口蓋突起挙上への関与は間接的なものと考えられ、口蓋突起挙上の分子メカニズムの解明はいまだ不十分である。

## 2. 研究の目的

これまでの研究成果より口蓋突起挙上障害が口蓋裂発症への関与することが強く疑われるが、これまでの口蓋裂研究においては口蓋突起癒合時期の口蓋上皮に着目した研究がほとんどであり、口蓋突起挙上のメカニズムに関しては解明されていない。

本研究では口蓋突起挙上前後の間葉組織における網羅的遺伝子発現解析を行い、口蓋突起挙上のメカニズムの解明を目指す。また、口蓋突起挙上時期の口蓋間葉での細胞内シグナル伝達におけるSprouty2の役割についても明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1)口蓋突起挙上に関わる遺伝子のスクリーニング

口蓋突起癒合前 (E13.5) の Sprouty2 K0 マウスおよび対照として C57BL/6J マウスの口蓋突起より Laser Capture Microdissection (LCM) 法を行い口蓋突起の間葉組織を選択的に採取し total RNA を抽出する。二本鎖 cDNA の合成を行い、ハイブリダイゼーション後データスキャンを行う。Sprouty2 K0 マウスのマイクロアレイのデータ解析を行い、口蓋突起挙上前後の遺伝子発現変化の大きい遺伝子に関してデータベースを作成する。

### (2)標的遺伝子の同定

口蓋突起挙上時期に特異的に発現する遺伝子のうち、口蓋突起挙上前後 (E13.5 ~ E14.5) で発現量の変動が大きく、さらに Sprouty2 K0 マウスと野生型マウス間で発現量に大きな差がある遺伝子を標的遺伝子として設定する。Sprouty2 K0 マウスにおける口蓋間葉細胞増殖異常は FGF シグナルを介することが過去の研究から明らかになっており、FGF シグナル関連分子にターゲットを絞っていく。マイクロアレイで得られたデータを網羅的に解析するため IPA などのソフトウェアを用いて bioinformatics 解析を行う。

## 4. 研究成果

マウスの挙上前および挙上後の口蓋組織 (硬口蓋および軟口蓋組織) より RNA を採取し、DNA マイクロアレイを行った。39429 遺伝子の発現を認め、カットオフ値を Z-score -2 以下、2 以上とし、2866 遺伝子を抽出した。口蓋形成時には多くの遺伝子変動があり、さらに硬口蓋、軟口蓋では発現パターンが異なっていた。硬口蓋では forkhead box N4 (Foxn4)、軟口蓋では keratin 20 などが発現上昇遺伝子として検出された。クラスタリング施行後、口蓋突起挙上前後で発現増加した遺伝子群の Gene ontology (GO) 解析を行ったところ、軟口蓋では Cell adhesion、Regulation of cell proliferation 等の働きを持つ遺伝子群が発現減少しているが、硬口蓋では逆に発現増加しており口蓋突起挙上時期において硬口蓋および軟口蓋で遺伝子発現パターンは異なっていることが判明した。また、口蓋裂患者では高率に心臓や耳の奇形を合併するが、GO 解析にて口蓋突起挙上直前に心臓や耳の形成に関与する遺伝子群の発現上昇を認めた。

今後他の遺伝子群も含めて、遺伝子改変マウスの解析も検討しながら、口蓋突起挙上への関与とそのメカニズムについて解析を進めていく予定である。

## 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3件)

松村香織・笹栗正明・光安岳志・新井伸作・前野亜実・中村誠司  
唇顎口蓋裂を伴った Aicardi 症候群の1例  
日本小児口腔外科学会雑誌 26(1) 14-18, 2016

松村香織・大部一成・中村誠司  
抗リン脂質抗体症候群患者の抜歯経験  
日本有病者歯科医療学会雑誌 25(3) 220-225, 2016

松村香織・笹栗正明・光安岳志・新井伸作・前野亜実・中村誠司  
口唇形成術後に上唇に生じた断端神経腫の1例  
日本口蓋裂学会雑誌 41(3) 212-216, 2016

〔学会発表〕(計11件)

Kaori Matsumura, Shinsaku Arai, Takeshi Mitsuyasu, Ami Maeno, Seiji Nakamura.  
Microarray analysis of global gene expression during palate development.  
10th World cleft lip and palate congress, Chennai, India, October 26, 2016. (Invited speaker)

Ami MAENO, Kaori MATSUMURA, Shinsaku ARAI, Takeshi MITSUYASU, Seiji NAKAMURA  
Clinicostatistical investigation on cleft lip and/or palate patients in the Kyushu University Hospital  
10th World cleft lip and palate congress, Chennai, India, October 26, 2016

竹崎 友吏子, 松村 香織, 林田 淳之介, 緒方 謙一, 新井 伸作, 前野 亜実, 坂本 瑞樹, 清島 保, 大部 一成, 中村 誠司  
口腔粘膜に発症した Sweet 病の2例  
第49回日本口腔科学会九州地方部会、沖縄、2016年10月15日

前野 亜実 松村 香織 新井 伸作 光安 岳志 中村 誠司  
口蓋裂を伴った第一第二鰓弓症候群患者の周術期管理経験  
第40回日本口蓋裂学会学術総会、大阪、2016年5月26日

Ami MAENO, Shinsaku ARAI, Kaori MATSUMURA, Takeshi MITSUYASU, Masaaki SASAGURI, Seiji NAKAMURA  
A case of cleft lip and palate with respiratory obstruction caused by postintubation laryngotracheal stenosis after cheiloplasty  
The 57th Korean association of oral and maxillofacial surgery, Gunsan, Korea, April 22, 2016

松村香織、大部一成、中村誠司

抗リン脂質抗体症候群患者の抜歯経験  
第26回日本有病者歯科医療学会総会・学術集、東京、2016年4月15日

松村香織、川野真太郎、森山雅文、山内昌樹、三上友里恵、清島保、中村誠司  
歯肉腫瘍を契機に診断されたランゲルハンス細胞組織球症の1症例  
第27回日本小児口腔外科学会総会・学術集会、宮崎、2015年11月6日

大部一成、金城亜紀、松村香織、石橋佳奈、後藤雄一、長谷川幸代、森悦秀、中村誠司  
九州大学病院顎顔面口腔外科における口腔がんの手術後に発生する肺炎についての臨床的検討  
第21回日本摂食嚥下リハビリテーション学会総会・学術集会、京都、2015年9月17日

久保田恵吾、新井伸作、松村香織、光安岳志、三上友理恵、辻口友美、笹栗正明、長谷川幸代、森悦秀、中村誠司  
口蓋裂を伴った Prader-Willi 症候群の1例  
第38回日本口蓋裂学会総会・学術集会、北海道、2014年5月29日

三上友理恵、松村香織、新井伸作、光安岳志、久保田恵吾、辻口友美、笹栗正明、森悦秀、中村誠司  
九州大学病院顎口腔外科における口唇裂口蓋裂患者の臨床統計的検討  
第38回日本口蓋裂学会総会・学術集会、北海道、2014年5月29日

Keigo Kubota, Shinsaku Arai, Kaori Matsumura, Takeshi Mitsuyasu, Yurie Mikami, Tomomi Tsujiguchi, Masaaki Sasaguri, Sachiyo Hasegawa, Yoshihide Mori, Seiji Nakamura  
A case of Prader-Willi syndrome with cleft palate.  
The 55th congress of Korean Association of Oral & Maxillofacial Surgeons, Busan, Korea, April 26, 2014.

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松村 香織 (KAORI MATSUMURA)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：20615794

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし