

2019 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	エピゲノム解析による口蓋裂の予防的治療法の開発の研究 ーエピジェネティクスの新たな可能性ー
キーワード	①口蓋裂、②TGF- β 3、③エピジェネティクス

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	スギヤマ アキコ 杉山 明子	所属等	朝日大学 歯学部 助教
プロフィール	平成9年鹿児島大学大学院歯学研究科修了（口腔細菌学専攻） 日本学術振興会特別研究員、複数の大学の教員を経て平成26年より現職。 遺伝子発現やシグナル伝達系の変化が口蓋裂発症におよぼす影響について研究を進展させていきたいと考えています。		

1. 研究の概要

口蓋裂は約 2,500 人に 1 人の頻度で発症するきわめて発生頻度の高い頭頸部領域の先天異常である。口蓋裂発症の原因は未だ不明で、遺伝要因と環境要因が組み合わされて発症するという多因子閾値説で説明されている。種々の口蓋裂を発症する遺伝子欠損 (KO) マウスが作成されたが、なかでも TGF- β 3 KO マウスは頭頸部に口蓋裂以外の異常を認めない口蓋裂のモデルマウスとして広く研究に使用されている。しかし、同じ TGF- β 3 KO マウスでもマウスの系統により表現型が異なる。二次口蓋が部分的に癒合した不完全口蓋裂を示す系統や全く癒合を起ささない完全口蓋裂を発症する系統が存在する。我々はこれまでの研究で ICR 系統の *Tgfb3*^{-/-}胎児は不完全口蓋裂を呈し、C57BL/6J 系統の *Tgfb3*^{-/-}胎児は完全口蓋裂を呈することを明らかにした。同じ遺伝子欠損でも表現型が異なる原因は系統の違い、すなわち遺伝的背景の違いによると考えられる。一つの遺伝子の発現はすべての遺伝子が互いに影響しあった結果によって起こる。従って、遺伝的背景による遺伝子の発現の違いが表現型の違いを引き起こすと考えられる。そこで、ICR 系統と C57BL/6J 系統の *Tgfb3*^{-/-}胎児の口蓋から RNA を抽出し、マイクロアレイによって遺伝子発現を解析した。また、エピジェネティクス制御化合物である DNA メチル化酵素 (DNMT) 阻害剤を投与して遺伝子発現の変化を調べた。さらに、口蓋の癒合に係わると考えられる上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR) 阻害薬を投与して遺伝子の発現を調べた。

2. 研究の動機、目的

口唇裂・口蓋裂は発生頻度の高い先天異常であるが、人種によってその発生頻度は異なる。黄色人種での発生率は高く、黒人では低いことが知られている。しかし、人種による発生率の違いは環境要因によるものなのか、遺伝要因によるものかは明らかになっていない。また、ヒトの口蓋裂の裂型は完全口蓋裂から不完全口蓋裂、口蓋垂裂、粘膜下口蓋裂までさまざまである。口蓋裂の発生には多くのシグナル伝達経路と転写因子が係わっており、たいへん複雑でその分子機構は解明されていない。実験動物では近交系マウスに口蓋裂の自然発生率が高い系統が存在する。また、同じ遺伝子を欠損したマウスでも系統の違いによって口蓋裂の表現型が異なることから、遺伝的背景の違いが口蓋裂の発症に関与していると考えられた。近年、DNA 配列の変異を伴わない遺伝子発現調節機構としてエピジェネティクスが注目されている。エピジェネティクスは癌の発症にも関係していると考えられるようになってきた。エピジェネ

ティクスによる遺伝子発現調節機構の実体は、ゲノム DNA のメチル化の変化、ヒストンの修飾の変化である。口唇口蓋裂の患者に対してもエピジェネティクスの関与が疑われるのではないかとの仮説から、DNA のメチル化を調査する研究も行われている。マウス系統の違いによる表現型の違いにはエピジェネティクスが関係していると考えられる。遺伝子発現を変化させる機序を解明し、口蓋裂の発症や病態の違いを生じさせる遺伝子を特定して、その発現を薬理的に制御して口蓋裂の発症を予防する薬剤を開発することを目的とする。

3. 研究の結果

遺伝的背景（マウス系統）の違いが遺伝子の発現の違いを引き起こし、口蓋裂表現型の違いを生じさせるとの仮説を検証するため、ICR系統マウスとC57BL/6J系統マウスの妊娠母獣にDNMT阻害剤あるいはEGFR阻害薬を投与して、胎児の口蓋を取り出し、DNAとtotal RNAを抽出した。total-RNAのマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現の違いを解析した。

ICR系統とC57BL/6J系統の *Tgfb3*^{-/-} の比較

細胞外基質の分解に係わるMMP-13とMMP-12の発現がICR系統で著しく高かった。

C57BL/6J系統の野生型（Wild type, WT）と *Tgfb3*^{-/-} の比較

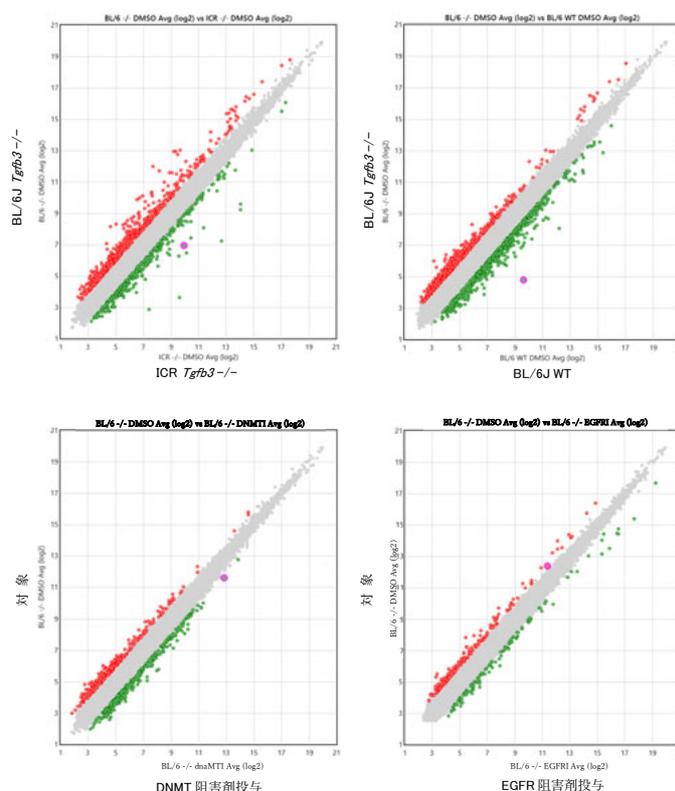
WTでMMP-13とMMP-12の発現が著しく高かった。

C57BL/6J系統 *Tgfb3*^{-/-} のDNMT阻害剤投与、非投与の比較

DNMT阻害剤投与ではkeratin13の発現が増加した。

C57BL/6J系統 *Tgfb3*^{-/-} のEGFR阻害剤投与、非投与の比較

EGFR阻害剤投与ではKeratin4の発現が低下した。



マイクロアレイ解析の結果

細胞外基質の消失を促すと考えられるMMP-12とMMP-13がWTや不完全口蓋裂を呈するICR系統の *Tgfb3*^{-/-} で著しく高かった。DNMT阻害剤やEGFR阻害剤の投与、非投与の比較ではKeratinの発現に差がみられた。さらに解析結果を検討し、口蓋裂発症に係わる遺伝子を探究していく予定である。

4. 研究者としてのこれからの展望

研究結果を踏まえたこれからの研究

1. DNAメチル化解析

系統の違いによる遺伝子発現の違いにエピジェネティクスが関与していることを明らかにするためにDNAメチル化解析を行う。メチル化されている領域をみだし、不活化された遺伝子を同定することで、口蓋を癒合させる因子を解明する。

2. シグナル伝達系の解析

口蓋の発生時における遺伝子の発現は複雑な経路で制御されており、遺伝子発現に至るシ

グナル伝達系の解析を行うことで予防法や治療法の開発へ展開されることが期待される。

研究者としての展望

マウスでは口蓋突起の癒合にはTGF- β 3遺伝子が必須であるが、ヒトの口蓋裂の発症はTGF- β 3遺伝子の変異で説明できない。マウスでの研究を通してヒトの口蓋裂の発症の機序を解明して行きたい。

5. 社会に対するメッセージ

2019年度女性研究者奨励金に採択いただき感謝申し上げます。大学院での専攻とは異なる分野で職に就いたことで無力さや研究資金を獲得できないことで焦りを感じていました。奨励金をいただき、贈呈式・懇親会で支援者さまや目標に向かって研鑽を積んでいらっしゃる研究者の方々と交流することができたことは大変励みになりました。

口蓋裂の患者は口蓋裂の治療だけでなく、耳疾患による聴覚障害、鼻咽腔閉鎖不全による構音障害などで複数の診療科で長期間、治療を行わなくてはならず、負担は非常に大きいです。口蓋裂を薬理的に治療できれば患者のQOLが向上します。薬理的な治療法の開発を目標に本研究を継続して行い、研究成果を発表することで社会に貢献していきたいと思っております。