

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32622  
 研究種目：研究活動スタート支援  
 研究期間：2015～2016  
 課題番号：15H06610  
 研究課題名(和文)口蓋形成過程におけるCdc42遺伝子の機能解析

研究課題名(英文)Function of Cdc42 during palatogenesis

## 研究代表者

大島 睦子(Oshima, Mutsuko)

昭和大学・歯学部・普通研究生

研究者番号：10756399

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)：生後0日齢のCdc42<sup>fl/fl</sup>;P0-Creマウスは短頭の特徴的な顔貌を呈しており、顔面裂、口蓋裂および頭蓋内出血の表現型が認められた。また、口蓋裂にともなう哺乳障害が認められ、生後2-3日で致死となった。骨格標本の解析より、上顎骨および口蓋突起の形成に不全が認められた。走査型電子顕微鏡解析および組織染色解析より、胎生15.5日齢におけるCdc42<sup>fl/fl</sup>;P0-Creマウスは口蓋突起の伸長に異常があり、その後の正中部の癒合および舌の下方移動が認められなかった。以上の結果より、Cdc42は口蓋形成過程を含む頭蓋顎顔面領域の形成において重要な遺伝子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cdc42, part of the Rho protein family with Rho and Rac, is known to play critical roles in organogenesis of various tissues. To investigate the physiological functions of Cdc42 during craniofacial development, we generated cranial neural crest-derived cell-specific inactivated Cdc42 mutant mice (Cdc42<sup>fl/fl</sup>; P0-Cre). Most of the Cdc42<sup>fl/fl</sup>; P0-Cre neonates were viable at birth, though they appeared weaker and no milk was found in their stomachs, and all died within a few days because of suckling and breathing disorders. Cdc42<sup>fl/fl</sup>; P0-Cre neonates had characteristics of a short face and intracranial bleeding. For anatomical analysis, we demonstrated that these mice had abnormal calcification of the craniums, including frontal, parietal, and interparietal bone, as also seen in micro-computed tomography images. Our results suggested that Cdc42 is crucial for facial and palatal organogenesis during craniofacial development.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：口唇口蓋裂

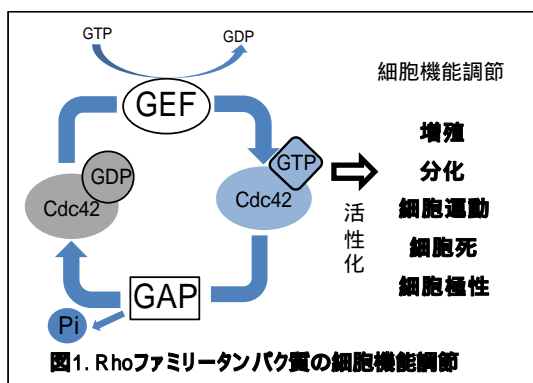
1. 研究開始当初の背景

1) 口唇口蓋裂について

口唇口蓋裂は日本において500人に1人の割合で発症する顎顔面領域において最も頻発する先天性疾患のひとつであり、その発症機序は、遺伝的要因・環境的要因など、さまざま報告されているが不明な点が多く、口蓋の形態学的・機能的不全に起因して、嚥下・発音障害が起こることから、治療法の確立にあたりその原因究明は肝要である。口蓋裂発症モデルマウスは従来、自然発生的、X線誘導突然変異および化学変異誘導剤などにより口蓋裂を発症したマウスについて、その原因遺伝子を同定し、作用機序の解明を行う方法(フォワードジェネティクス法)が行われてきたが、近年では分子生物学の進歩により、口蓋裂への関与が予想される遺伝子を、時期および部位特異的に欠損させるコンディショナルノックアウトマウスを作製しその作用機序の解明を行う方法(リバースジェネティクス法)を用いて解析を行っている。

2) 低分子量Gタンパク質 Cdc42 について

Cdc42はRhoファミリータンパク質に属する低分子量Gタンパク質であり、細胞内シグナル伝達における分子スイッチとしての機能を持つ。アクチン細胞骨格の再編成が関与する細胞機能の調節、例えば、細胞の増殖、分化、細胞運動、細胞死、細胞極性など、それらの機能制御にとって非常に重要な役割を果たしており、生体内において、胎生期器官形成において重要であると報告されている(図1)。



3)

申請者らの研究グループはCdc42の四肢形成における機能を検討するために、主に胚芽未分化間葉系細胞でCre遺伝子を発現するトランスジェニックマウス(Prx1-Cre Tg)と、Cdc42遺伝子にloxP配列を組み込んだ

floxマウス(Cdc42 flox)をそれぞれ交配させ、Cre発現領域でCdc42を特異的に欠損させたコンディショナルノックアウトマウス(Cdc42<sup>f/f</sup>;Prx1-Cre)を作製した。その結果、Cdc42<sup>f/f</sup>;Prx1-Creマウスは四肢、胸骨、頭蓋骨、口蓋に形成不全が認められ、生後間もなく死亡する。四肢は野生型マウスと比較し短く、成長板における増殖軟骨層の柱状配列の乱れ、肥大軟骨層の肥厚などが認められた。また、胸骨、頭蓋骨に癒合不全が認められた。しかし、Cdc42<sup>f/f</sup>;Prx1-Creマウスにおける口蓋裂の発現頻度は100%ではなく、その発症原因を特定するのは困難であった(Aizawa R. et al. Mech Dev; 129:38-50,2012)。

2. 研究の目的

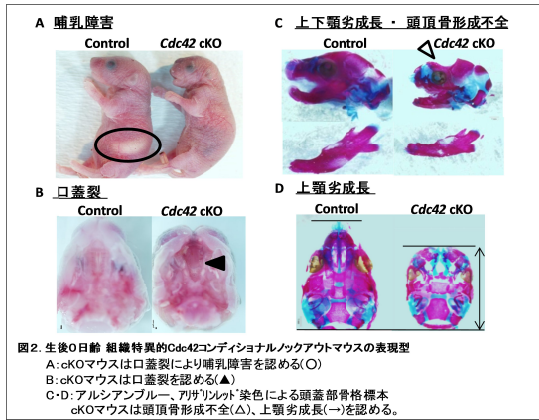
- 1) Cdc42の口蓋における上皮および間葉組織の細胞増殖・細胞死への関与についての解析
- 2) Cdc42コンディショナルノックアウトマウスの口蓋形成過程における遺伝子発現の解析

3. 研究の方法

Cdc42の口蓋形成における機能を検討するために、主に神経堤由来細胞でCre遺伝子を発現するトランスジェニックマウス(P0-Cre Tg)と、Cdc42遺伝子にloxP配列を組み込んだfloxマウス(Cdc42 flox)をそれぞれ交配させ、Cre発現領域でCdc42を特異的に欠損させたコンディショナルノックアウトマウス(Cdc42<sup>f/f</sup>;P0-Cre)を作製し、このマウスの表現型および組織解析を行った

4. 研究成果

生後0日齢のCdc42<sup>f/f</sup>;P0-Creマウスは短頭の特徴的な顔貌を呈しており、顔面裂、口蓋裂および頭蓋内出血の表現型が認められた。また、口蓋裂にともなう哺乳障害が認められ、生後2-3日で致死となった。骨格標本の解析より、上顎骨および口蓋突起の形成に不全が認められた。マウス胎生期における口蓋形成過程は、胎生10.5日齢頃より発生する内側鼻突起および外側鼻突起と上顎突起および下顎突起の癒合形成後、胎生12.5日齢より上顎突起から生じる口腔突起同士が正中線で癒合し、胎生15.5日齢までに口蓋が形成される。走査型電子顕微鏡解析および組織染色解析より、胎生15.5日齢におけるCdc42<sup>f/f</sup>;P0-Creマウスは口蓋突起の伸長に異常があり、その後の正中線の癒合および舌の下方移動が認められなかった。以上の結果より、Cdc42は口蓋形成過程を含む頭蓋顎顔面領域の形成において重要な遺伝子であることが示唆された(図2)



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 1 件)

- 1) Oshima-Nakayama M, Yamada A, Kurosawa T, Aizawa R, Suzuki D, Saito Y, Kassai H, Sato Y, Yamamoto M, Shiota T, Aiba A, Maki K, Kamijo R. Cdc42 is crucial for facial and palatal formation during craniofacial development. *Bone Reports*, 5: 1-6, 2016 (査読あり).

[学会発表](計 4 件)

- 1) Mutsuko Oshima, Atsushi Yamada, Dai Suzuki, Koutaro Maki, Ryutaro Kamijo: Cdc42 in neural crest derived cells is essential for palatal development. ANZBMS 25th Annual Scientific Meeting Handbook, p43, 2015 ANZBMS 25th Annual Scientific Meeting, 2015年11月1日~4日、オーストラリア・タスマニア
- 2) 大島睦子、山田篤、鈴木大、榎宏太郎、上條竜太郎: 神経堤由来細胞に発現する Rhoファミリー低分子量Gタンパク質 Cdc42は口蓋形成に必須である第57回歯科基礎医学会学術大会・総会プログラム・抄録集, p263, 2015 (第57回歯科基礎医学会学術大会・総会、2015年9月11日~13日、新潟)
- 3) 大島睦子、山田篤、鈴木大、榎宏太郎、上條竜太郎: 低分子量Gタンパク質Cdc42は口蓋形成において重要な遺伝子である第33回日本骨代謝学会学術集会プログラム・抄録集, p185, 2015(第33回日本骨代謝学会学術集会、2015年7月23日~25日、東京)

- 4) 大島睦子、山田篤、榎宏太郎、上條竜太郎: Cdc42遺伝子の口蓋形成過程における機能解析第69回日本口腔科学会学術集会プログラム・抄録集, p223, 2015年5月13日~15日、大阪

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 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 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

大島(中山)睦子(Oshima-Nakayama Mutsuko)  
 所属 昭和大学・歯学部・普通研究生  
 研究者番号: 10756399

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4)研究協力者

( )