

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K15737

研究課題名(和文)次世代口蓋裂治療のための口蓋癒合分子機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of mechanism of palatal fusion for new therapy of cleft palate

研究代表者

阪井 丘芳 (Sakai, Takayoshi)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：90379082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：口蓋裂に対する治療法は手術療法が主体であり、効果的な予防法や治療法が確立されていない。口蓋癒合の仕組みを明らかにし、新しい治療法を確立するために本計画を推進した。胎生期口蓋上皮に発現する遺伝子を網羅的に含む遺伝子のデータベースを作成し、その中から口蓋癒合期に発現する遺伝子を探索した。同定したPeriostinとTenascinCは細胞外マトリックスタンパクであり、癒合前後の口蓋後方の間葉組織に広く発現していた。本研究の結果から、PeriostinとTenascinCは、軟口蓋形成に重要であり、その発現はTGFシグナルによって制御されていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唇顎口蓋裂とは、口唇、歯槽部、口蓋などの口腔顎顔面領域に披裂を生じる先天異常であり、遺伝的要因と環境的要因の両者が複雑に関係していると言われている。胎生期に口蓋が癒合する仕組みを明らかにし、新しい治療法を確立するために本計画を推進した。まず胎生期口蓋上皮に発現する遺伝子を網羅的に含む遺伝子のデータベースを作成し、その中から口蓋癒合前後に発現する遺伝子を探索した。PeriostinとTenascin Cは、癒合前後の口蓋後方の間葉組織に広く発現しており、口蓋形成に重要なTGF-シグナルによって制御されていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Cleft palate results from a mixture of genetic and environmental factors and occurs when the bilateral palatal shelves fail to fuse. The objective of this study was to search for new genes involved in mouse palate formation. Gene expression of murine embryonic palatal tissue was analyzed at various developmental stages before, during, and after palate fusion using GeneChip microarrays. Periostin and Tenascin C were highly up-regulated before and after palate formation. We have focused on characterized expression of extracellular matrix during soft palate development, including Periostin and Tenascin C. The immunohistochemical expression of Postn and TnC appeared to be wider and more clearly defined in posterior palatal mesenchyme before/after palatal fusion. These results indicate that TnC is an important extracellular matrix protein in soft palate development and is paracrine regulated by TGF- in the palatal epithelium.

研究分野：外科系歯学

キーワード：口蓋裂

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

唇顎口蓋裂とは、口唇、歯槽部、口蓋などの口腔顎顔面領域に披裂を生じる先天異常であり、遺伝的要因と環境的要因の両者が複雑に関係していると言われている。研究代表者らは、大阪大学歯学部附属病院にて唇顎口蓋裂患者の一環治療を行っている。現在のところ、患者に対して、手術を行う治療法が主体である。新しい治療法が期待されているが、未だに発展していないのが現状である。口蓋の発生機序は両側の上顎突起より口蓋突起が発生し、癒合する際に、口蓋板の成長と水平転移または挙上、上皮細胞の接着と自己分解、間葉の癒合という段階を経ると言われているが、このうちのいずれかで障害が起こると口蓋裂が発生する。先行研究では、胎仔マウスをモデルとして用い、口蓋癒合時に口蓋突起に著しく発現する遺伝子群を同定した。本研究では、このデータベースを活用して、口蓋癒合のメカニズムを明らかにし、組織工学的に口蓋閉鎖をはかる、新しい口蓋裂治療法・予防法を探究したいと考えている。

### 2. 研究の目的

本研究では、口蓋癒合の分子機構を明らかにし、次世代の口蓋裂治療法と予防法を確立することを目的とする。先行研究では、胎仔マウス口蓋形成をモデルとして用い、口蓋癒合時に口蓋突起に著しく発現する遺伝子群を同定した。このデータを有効に活用して、口蓋癒合時に発現が上昇する遺伝子を中心に機能解析し、治療へのアプローチを探索する。将来的には、口蓋癒合のメカニズムを明らかにして、癒合時に発現する遺伝子を誘導する薬剤を妊婦に投与するなど、新しい治療法の開発へ応用していきたい。

### 3. 研究の方法

#### 1) 口蓋閉鎖に関わる遺伝子のスクリーニング

口蓋上皮から閉鎖の初期段階に関する遺伝子を発見するために、胎生 13 日目のマウス胎児上顎を器官培養した。口蓋突起が接近した段階(癒合前)、口蓋突起が癒合している段階(癒合中)、口蓋突起が癒合した段階(癒合後)で上顎の組織切片を作製し、レーザーマイクログアイセクションを行い、微小组織から細胞を採取した。Total RNA から cDNA を合成し、マイクロアレーを用いて、それぞれ口蓋突起癒合時期における口蓋突起上皮に発現する遺伝子のプロファイルを作成した。

#### 2) 口蓋突起上皮に特異的に発現する遺伝子の発現量確認

リストアップした遺伝子を中心に、RT-PCR (Reverse transcription -polymerase chain reaction)法で、癒合前、癒合中、癒合後における mRNA レベルでの遺伝子発現を確認する。

#### 3) 口蓋突起癒合部に特異的に発現する遺伝子の発現分布確認

*in situ* hybridization を用いて mRNA レベルの発現分布、あるいは、既知の遺伝子であれば、既存する抗体を使用し免疫組織染色法を用いて、口蓋突起の癒合時期における発現分布を確認する。組織学的に発現分布を調べて特徴づけることにより、機能を予測する

#### 4) 器官培養を用いた RNA 干渉 (siRNA)法による阻害実験

マイクロアレー、RT-PCR 法、*in situ* hybridization 法あるいは免疫染色法にてその遺伝子が口蓋突起癒合部に特異的に高く発現し、癒合に必要なことが示唆された場合は、RNA 干渉法で機能的阻害実験を行い、口蓋形成を実際に制御しているかを検討する。

#### 5) 器官培養を用いた遺伝子導入実験と治療モデルの開発

口蓋突起癒合部に強く発現した遺伝子の full length cDNA を哺乳類の発現ベクターに挿入し、口蓋上皮細胞にマイクロインジェクション、エレクトロポレーションにて過剰発現させる。その遺伝子が直接的に口蓋閉鎖に関与しているかを検討する。また、4)の siRNA でノックダウンされた口蓋に TGF $\beta$ 3 の発現減少が認められる場合には、TGF $\beta$ 3 のペプチドをその器官培養に添加する。遺伝子発現の調節とサイトカインの誘導の両方から新しい治療モデルを試みる。

### 4. 研究成果

研究方法 1) 2) において、口蓋突起先端部において、口蓋癒合前、癒合中、癒合後にかけ発現が上昇する Tenascin C と Periostin の遺伝子を見出した。3) において、既知の遺伝子であったため、免疫組織染色法を用いて発現分布を調べると、Tenascin C と Periostin タンパクは、癒合前後の口蓋後方の間葉組織に広く発現していた。4) の RNA 干渉法に関する実験は、条件設定が困難であったため、研究時間を要したために明確な結果を得ておらず、研究は継続中であるが、5) において、Tenascin C は TGF $\beta$ 3 による制御を受けていることが明らかになった。本成果を中心に報告する。

#### 1) Tenascin C は口蓋癒合中の後方口蓋棚に広範囲に発現する

口蓋突起の癒合前、癒合中、癒合後における Tenascin C と Periostin の発現を real-time RT-PCR にて確認後、抗 Tenascin C 抗体と抗 Periostin 抗体を用いて、癒合前、癒合中、癒合後における分布局在を調べた。Tenascin C と Periostin は口蓋形成中の口蓋突起の間葉組織に発現していた。その発現は、硬口蓋の前方・中央・後方領域と比較したところ、軟口蓋に相当する後方領域に広く発現していた。その結果より、Tenascin C と Periostin は軟口蓋の発達に重要であることが示唆された。

2) TGF $\beta$ 3 は胎生期マウス口蓋間葉系細胞に細胞外マトリックス遺伝子の発現を上昇させる

TGF $\beta$ 3 の細胞外マトリックス発現に対する影響を調査するために、胎生期マウス口蓋間葉系細胞に 50 ng/ml の TGF $\beta$ 3 を添加し、Tenascin C、Fibronectin、Periostin、Collagen I の発現を real-time RT-PCR にて確認した。TGF $\beta$ 3 添加直後の遺伝子発現を 1.0 として標準化したところ、Tenascin C は 3.7 倍、Fibronectin は 2.3 倍、Periostin は 0.5 倍、Collagen I は 0.7 倍に変化しており、TGF $\beta$ 3 は胎生期マウス口蓋間葉系細胞における Tenascin C の発現を誘導することが示された。さらに、Tenascin C 遺伝子の発現上昇は、TGF $\beta$  シグナルの阻害剤、Smad と p38 シグナルの阻害剤によって著しく阻害され、TGF $\beta$  と Smad、p38 シグナルを介していることが明らかになった。

3) Tenascin C タンパクの発現は TGF $\beta$ 3 の阻害剤で制御される

胎生期マウス口蓋間葉系細胞に 50 ng/ml の TGF $\beta$ 3 を添加し、Tenascin C タンパクの発現を ELISA にて確認した。未添加のコントロールと比較して、2.7 倍の Tenascin C の発現上昇を認めた。Tenascin C の発現上昇は、TGF $\beta$  シグナルの阻害剤、Smad と p38 シグナルの阻害剤によって著しく阻害され、TGF $\beta$  と Smad、p38 シグナルを介していることが明らかになった。

4) Tenascin C の発現は口蓋癒合時の上皮において、TGF $\beta$ 3 シグナルによって制御される。

Wnt1-cre;Tgfr2fl/fl CKO (口蓋間葉組織の Tgfr2 を KO), K14-cre;Tgfr2fl/fl CKO mice (口蓋上皮組織の Tgfr2 を KO), TGF- $\beta$ 3 KO (TGF $\beta$ 3 を KO) を用いて、シグナル解析したところ、Tenascin C は K14-cre;Tgfr2fl/fl CKO mice で発現が消失したが、Wnt1-cre;Tgfr2fl/fl CKO では消失しなかった。TGF- $\beta$ 3 KO では Tenascin C の発現が消失していた。

本計画から Tenascin C と Periostin は軟口蓋形成時に重要な細胞外マトリックスタンパクであり、Tenascin C は口蓋上皮側の TGF- $\beta$  シグナルによってパラクライン的に間葉組織を制御していることが明らかとなった。今後、口蓋裂予防・治療のためのターゲット分子の一つとして、研究を推進していきたいと考えている。

(参考資料)

1) 口蓋癒合上皮における TGF- $\beta$ 3 は、軟口蓋 Tenascin C 発現と促進する、第 41 回日本口蓋裂学会総会・学術集会、2017 年 5 月 18-19 日、東京

2) 口蓋上皮 TGF- $\beta$  および Shh は、口蓋間葉の TenascinC 発現を誘導する、第 60 回歯科基礎医学会学術大会、2018 年 9 月 5-7 日、福岡

3) Epithelial TGF- $\beta$  Signaling Regulates Characterized Extracellular Matrix Expression in Soft Palate Development. 76th Annual Meeting of American Cleft-Palate Association, April 9-13, 2019, Tucson, Arizona, USA

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 16 件)

Okuno K, Ono Minagi H, Ikai K, Matsumura Ai E, Takai E, Fukatsu H, Uchida Y, Sakai T. The efficacy of nasal airway stent (Nastent) on obstructive sleep apnoea and prediction of treatment outcomes. J Oral Rehabil 46(1): 51-57, 2019 (査読有)  
DOI: 10.1111/joor.12725

Tanaka J, Ogawa M, Hojo H, Kawashima Y, Mabuchi Y, Hata K, Nakamura S, Yasuhara R, Takamatsu K, Irie T, Fukada T, Sakai T, Inoue T, Nishimura R, Ohara O, Saito I, Ohba S, Tsuji T, Mishima K. Generation of orthotopically functional salivary gland from embryonic stem cells. Nat Commun 9(1): 4216, 2018 (査読有)  
DOI: 10.1038/s41467-018-06469-7

Matsushita T, Sakai M, Yoshida H, Morita S, Hieda Y, Sakai T. Grhl2 regulation of

- SPINT1 expression controls salivary gland development. *Biochem Biophys Res Commun* 504(1): 263-269, 2018 ( 査読有 )  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.08.166.
- Sarper SE, Kurosaka H, Inubushi T, Ono Minagi H, Kuremoto KI, Sakai T, Taniuchi I, Yamashiro T. Runx1-Stat3-Tgfb3 signaling network regulating the anterior palatal development. *Sci Rep* 8(1):11208, 2018 ( 査読有 )  
DOI: 10.1038/s41598-018-29681-3
- Sarper SE, Inubushi T, Kurosaka H, Ono Minagi H, Kuremoto KI, Sakai T, Taniuchi I, Yamashiro T. Runx1-Stat3 signaling regulates the epithelial stem cells in continuously growing incisors. *Sci Rep* 8(1):10906, 2018 ( 査読有 )  
DOI: 10.1038/s41598-018-29317-6
- Minagi HO, Ikai K, Araie T, Sakai M, Sakai T. Benefits of long-term pilocarpine due to increased muscarinic acetylcholine receptor 3 in salivary glands. *Biochem Biophys Res Commun* 503(2):1098-1102, 2018 ( 査読有 )  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.06.125
- Araie T, Okuno K, Ono Minagi H, Sakai T. Dental and skeletal changes associated with long-term oral appliance use for obstructive sleep apnea: A systematic review and meta-analysis. *Sleep Med Rev* 41:161-172, 2018 ( 査読有 )  
DOI: 10.1016/j.smrv.2018.02.006
- Tokuhara Y, Morinishi T, Matsunaga T, Sakai M, Sakai T, Ohsaki H, Kadota K, Kushida Y, Haba R, Hirakawa E. Nuclear expression of claudin-3 in human colorectal adenocarcinoma cell lines and tissues. *Oncol Lett* 15(1):99-108, 2018 ( 査読有 )  
DOI: 10.3892/ol.2017.7281
- Minagi HO, Okuno K, Nohara K, Sakai T. Predictors of Side Effects With Long-Term Oral Appliance Therapy for Obstructive Sleep Apnea. *J Clin Sleep Med* 14(1):119-125, 2018 ( 査読有 )  
DOI: 10.5664/jcsm.6896.
- Uchida H, Nakamura TJ, Takasu NN, Obana-Koshino A, Ono H, Todo T, Sakai T, Nakamura W. The central clock controls the daily rhythm of Aqp5 expression in salivary glands. *J Physiol Sci* 68(4): 377-385, 2018 ( 査読有 )  
DOI: 10.1007/s12576-017-0540-1
- Sakai M, Matsushita T, Hoshino R, Ono H, Ikai K, Sakai T. Identification of the protective mechanisms of Lactoferrin in the irradiated salivary gland. *Sci Rep* 7(1):9753, 2017 ( 査読有 )  
DOI: 10.1038/s41598-017-10351-9
- Matsuno K, Nohara K, Fukatsu H, Tanaka N, Fujii N, Sasao Y, Sakai T. Videoendoscopic evaluation of food bolus preparation: A comparison between normal adult dentates and older adult dentates. *Geriatr Gerontol Int* 17(2):226-231, 2017 ( 査読有 )  
DOI: 10.1111/ggi.12697
- Okuno K, Nohara K, Takai E, Sakai T, Fleetham JA, Ayas NT, Lowe AA, Almeida FR. Sleep Stage Coordination of Respiration and Swallowing: A Preliminary Study. *Dysphagia* 31(4):579-86, 2016 ( 査読有 )  
DOI: 10.1007/s00455-016-9719-5
- Okuno K, Sasao Y, Nohara K, Sakai T, Pliska BT, Lowe AA, Ryan CF, Almeida FR. Endoscopy evaluation to predict oral appliance outcomes in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J*, 47(5):1410-9, 2016 ( 査読有 )  
DOI: 10.1183/13993003.01088-2015
- Ono H, Obana A, Usami Y, Sakai M, Nohara K, Egusa H, Sakai T. Regenerating Salivary Glands in the Microenvironment of Induced Pluripotent Stem Cells. *Biomed Res Int* 2015:293570, 2015 ( 査読有 )  
DOI: 10.1155/2015/293570

Taketa H, Sathi GA, Farahat M, Rahman KA, Sakai T, Hirano Y, Kuboki T, Torii Y, Matsumoto T. Peptide-modified Substrate for Modulating Gland Tissue Growth and Morphology In Vitro. Sci Rep 5:11468, 2015 ( 査読有 )  
DOI: 10.1038/srep11468

〔学会発表〕(計6件)

Ikai K, Minagi H, Sakai M, Araie T, Sakai T: Analysis of transcriptional factor p63 expression in salivary glands regeneration, Gordon Research Conference -Salivary glands & Exocrine Biology 2019-, Texas, USA, February 3, 2019

Sakai T, Sakai M, Matsushita R, Hoshino R, Ikai K, Minagi-Ono H: Lactoferrin Promotes Salivary Gland Development and Radioprotection, 96th General Session & Exhibition of the IADR, London, July 25-28, 2018

Ono H, Ikai K, Matsushita T, Sakai M, Sakai T: Pilocarpine benefit in stem cell therapy; regeneration for human and mouse salivary glands, Gordon Research Conference, February 19-24, 2017, Galveston, Texas, USA

Ikai K, Sakai M, Matsushita T, Ono H and Sakai T: Lactoferrin promotes salivary gland development and radioprotection, Gordon Research Conference -Salivary glands & Exocrine Biology-, February 19-24, 2017, Texas, USA

Sakai T: Exploration of Mechanisms of Salivary Gland and Palatal Development using Databases, Symposium on tooth Development and Regeneration, February 12, 2016, Hong Kong

Ono H, Obana A, Usami Y, Sakai M, Miura J, Egusa H, Sakai T: Models of salivary gland differentiation using induced pluripotent stem (iPS) cells, 47th Meeting of Continental European Division of the International Association for Dental Research, September 15, 2015, Antalya, Turkey

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

(1)研究分担者

研究分担者氏名：野原 幹司

ローマ字氏名：Kanji Nohara

所属研究機関名：大阪大学

部局名：歯学研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：20346167

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：教授

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。