

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20587

研究課題名(和文) Runx/Cbfbを用いた頭蓋顔面部先天奇形の発生機序解明を目的とした基礎的研究

研究課題名(英文) Research for developmental mechanism of congenital craniofacial anomalies with Runx/Cbfb signaling

研究代表者

伊藤 慎将 (Itoh, Shinsuke)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：40633706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：鎖骨頭蓋異形成症(CCD)および頭蓋顔面奇形の原因として、Runx/Cbfbの関与を解析した。神経堤細胞におけるRunx/Cbfbが、顎顔面発生に果たす役割を解析するため、神経堤細胞由来領域において、Cbfbを不活化させたマウス(Wnt1Cre;Cbfbfl/fl)を作成した。

その結果、変異マウスは出生後早期に哺乳障害により死に至った。頭蓋顔面部には、頭蓋骨形成異常、鼻周囲中顔面領域の骨化異常、口蓋裂、小下顎が生じることが分かった。このことはCCDにおける泉門閉鎖不全や中顔面低形成、口蓋裂等の症状が、神経堤細胞におけるRunx/Cbfbの機能不全と深く関わることを示唆していた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the functional role of Runx/Cbfb in the craniofacial formation, using conditional knockout (cKO) mice in which Cbfb gene was inactivated in cranial neural crest cells specifically (Wnt1Cre; Cbfbfl/fl). We found that cKO mice exhibited delayed ossification in carvalia and midfacial region around nose, cleft palate and mandibular micrognathia. These results suggest that Runx/Cbfb signaling in neural crest cells is involved in the craniofacial abnormality with cleidocranial dysplasia.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：Runx/Cbfb 神経堤細胞 頭頸部発生 鎖骨頭蓋異形成症 頭蓋冠形成 口蓋裂 小下顎

### 1. 研究開始当初の背景

鎖骨頭蓋異形成症 (CCD) は膜性骨の形成異常による鎖骨欠如や泉門閉鎖遅延と、中顔面部低形成に加えて、多数の埋伏歯を伴う永久歯の萌出障害を主徴とする。本疾患は顎顔面骨格の発育異常と、永久歯萌出遅延による歯列不正が併発することで、咀嚼・発音等の口腔機能障害と、顔貌の審美障害をきたす。口蓋裂を伴うことも多く、これらの症状から、本疾患の治療において歯科矯正学は中心的役割を担う分野である。現在のところ CCD の原因の多くは Runx2 遺伝子の変異であることが知られている。一方で、鑑別診断が必要となる全く別の遺伝子突然変異が CCD と類似した症状を発症する報告も存在し、その病態は依然として未解明の部分が多い。

核内転写因子である Runx 遺伝子ファミリー (Runx/Cbfb) は、Runx 1~3 とその共役因子である Cbfb からなり、造血、骨形成、発癌などに重要な役割を持つことが知られている。我々は Runx/Cbfb が顎顔面における様々な器官発生に重要な役割を果たすことを見出してきた。本研究ではさらに詳細な頭蓋顔面部の形成における Cbfb の役割を解析するとともに、CCD および頭蓋顔面奇形の原因として、Runx/Cbfb の関与を解析する。

### 2. 研究の目的

CCD は 100 万人に 1 人の確立で発症する常染色体優性遺伝の先天奇形であり、顔面奇形と不正咬合を呈することから、矯正歯科治療は本疾患の医療管理に必須の分野である。本疾患の分子診断および分子治療の基礎を確立することは、基礎医学のみならず、臨床歯科医学においても極めて重要である。CCD の原因としては、Runx2 遺伝子の突然変異が広く知られているが、我々は新たに、Cbfb の欠失が、CCD の主徴と重複する奇形を誘発する可能性の一端を見出している。よって本研究では Cbfb を介して頭蓋顔面奇形発症に至るシグナル経路を新たに解明する。そして Runx/Cbfb を用いた CCD および頭蓋顔面奇形の、新しい分子診断あるいは分子治療へと繋がる基礎とすべく本研究を行う。

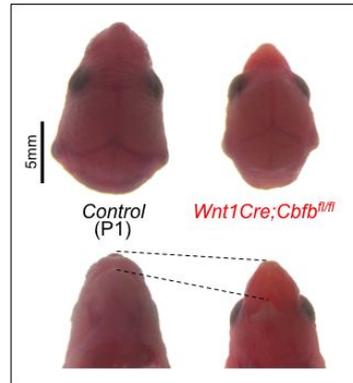
### 3. 研究の方法

- (1) 神経堤細胞由来領域において、Cbfb を不活化させたマウス (Wnt1Cre;Cbfb<sup>f1/f1</sup>) を作成した。
- (2) 出生直後 (P1) の神経堤細胞特異的 Cbfb ノックアウトマウスの形態解析を行った。
- (3) 出生直前 (E19.5) の神経堤細胞特異的 Cbfb ノックアウトマウスのマイクロ CT 撮影および骨格標本により、頭頸部領域の網羅的な形態解析を行った。
- (4) 出生直後 (P0) の神経堤細胞特異的 Cbfb ノックアウトマウスの頭頸部の前頭断組

織切片を作成し組織学的に解析した。

### 4. 研究成果

- (1) 神経堤細胞特異的 Cbfb ノックアウトマウスの形態的特徴

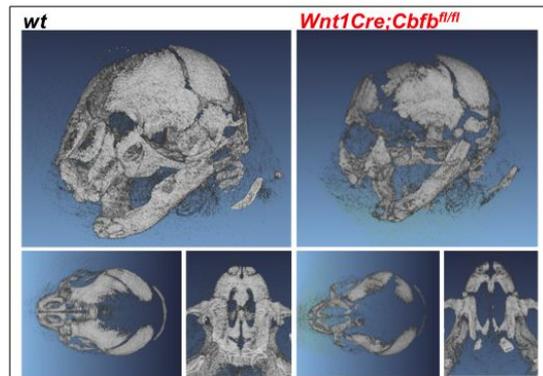


今回作成したコンディショナルノックアウトマウスは正常に出生するものの、24 時間以内に死に至った。呼吸や拍動に異常はみられ

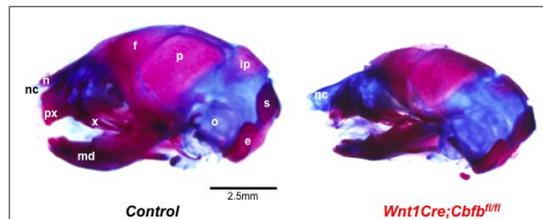
なかった。出生後母乳を摂取する様子がみられなかったことから、死因は哺乳障害によるものと考えられた。

頭頸部の形態的特徴は、野生型と比較して全体的に小さかった。また下顎骨の著しい低形成がみられ、口裂は常に離開していた (上図)。

- (2) 神経堤細胞特異的 Cbfb ノックアウトマウスの頭蓋骨格の形態学的解析



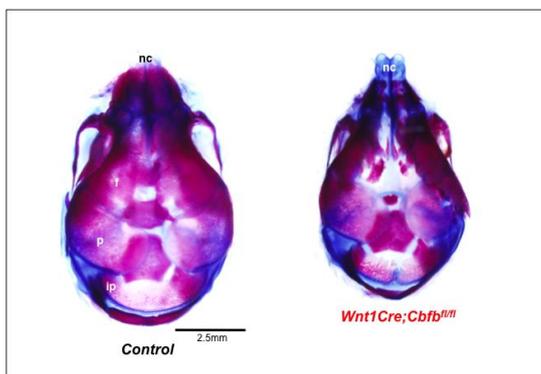
胎生 19.5 日齢の神経堤細胞特異的 Cbfb ノックアウトマウスのマイクロ CT を撮影した (上図)。野生型と比較して頭頸部全体の低形成および骨化不良を認めた。頭蓋冠の骨化は乏しく、口蓋裂を有していた。



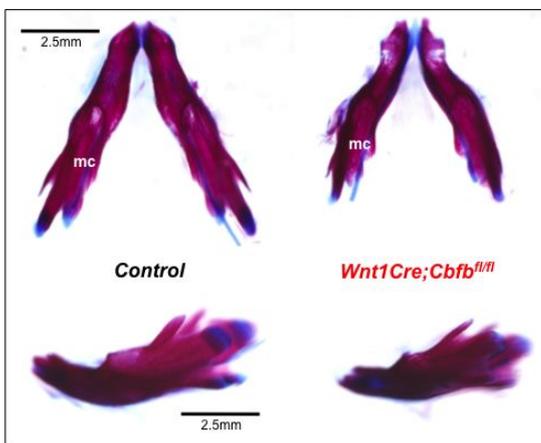
アルシアンブルー (青: 軟骨) およびアリザリンレッド (赤: 骨) 染色を施した骨格標本で、より詳細な骨格形態の解析を行った。

まず特徴的なのは、鼻胞 (nc) 周囲の軟骨が変異マウスでは多く染まっており、野生型と比較して骨化が遅れていた。鼻骨および上顎

骨の低形成は CCD にみられる特徴的な所見の1つである(上図)。

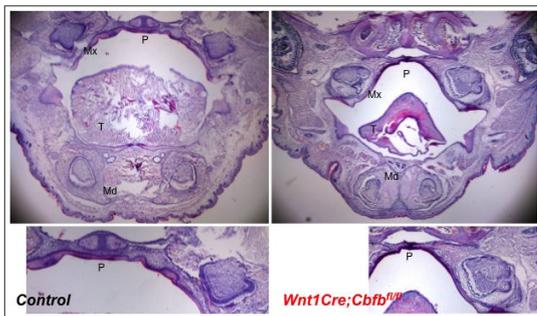


頭蓋冠では頭頂骨(p)の形態は野生型と変異マウスで明らかな差がないが、前頭骨(f)の形成不全が変異マウスにおいて特徴的にみられた(上図)。



また、下顎骨の低形成いわゆる小下顎が特徴的にみられた(上図)。

### (3) 神経堤細胞特異的 Cbfb ノックアウトマウスの組織学的解析



出生直後のマウス頭頸部の前頭断組織雪片を作成し HE 染色を施した。その結果、野生型と比較して変異マウスでは上顎骨(Mx)、下顎骨(Md)がともに歯槽部の幅径が小さく、口腔全体が狭小化しており、舌(T)の大きさは小さかった。変異マウスの口蓋は軟組織で繋がっているように見えるが、野生型にみられるような口蓋骨はなかった。

上下顎の臼歯は変異マウスにおいても正常に発生しているが、エナメル芽細胞層は

変異マウスで菲薄化していた。

以上をまとめると、本研究で解析した神経堤由来細胞特異的 Cbfb 欠損マウスは、出生後早期に哺乳障害により死に至った。哺乳障害の原因は、口蓋裂、小下顎、舌の形成不全が関与していると考えられた。

頭蓋顔面領域において、頭蓋骨の形成異常、また鼻周囲の中顔面領域の骨化異常、さらに口蓋裂、小下顎が生じることが分かった。これらの所見は、CCD に特徴的なものと重複しており、泉門閉鎖不全や中顔面の低形成、口蓋裂等の症状が、神経堤細胞における Runx/Cbfb の機能不全と深く関わることが、強く示唆された。

### 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4件)

伊藤慎将、竹内優斗、森田知里、吉川浩史、黒坂浩、山城隆、当科における歯科矯正用アンカースクリュー植立成功率に関する研究、近畿東海矯正歯科学会雑誌、2017(51):25-31

Takako Hattori, Shinsuke Itoh, Masaharu Takigawa, Generation and Analysis of Cartilage-Specific CCN2 Overexpression in Transgenic Mice. Methods in Molecular Biology, 2017(1489):391-403, doi 10.1007/978-1-4939-6430-7\_32

Ishimoto K, Hayano S, Yanagita T, Kurosaka H, Kawanabe N, Itoh S, Ono M, Kuboki T, Kamioka H, Yamashiro T., Topical application of lithium chloride on the pulp induces dentin regeneration. PLoS One. 2015 Mar 26;10(3):e0121938.

doi:10.1371/journal.pone.0121938.

Islam MN, Itoh S, Yanagita T, Sumiyoshi K, Hayano S, Kuremoto K, Kurosaka H, Honjo T, Kawanabe N, Kamioka H, Sakai T, Ishimaru N, Taniuchi I, Yamashiro T. Runx/Cbfb signaling regulates postnatal development of granular convoluted tubule in the mouse submandibular gland. Dev Dyn. 2015 Mar;244(3):488-96. doi:10.1002/dvdy.24231.

(学会発表)(計3件)

伊藤慎将、山城隆：上顎骨前方部骨延長術施術後、歯科矯正用アンカースクリューの有効性が示された成人人口唇口蓋裂患者の一症例、日本歯科矯正用アンカースクリュー研究会第1回学術大会、2016年10月2日、東京、優秀賞受賞

伊藤慎将、山城隆：上顎骨前方部骨延長

術を用いた口唇口蓋裂患者の矯正歯科治療における歯科矯正用アンカースクリューの有用性、第 40 回日本口蓋裂学会総会・学術集会、2016 年 5 月 26-27 日、大阪、ランチョンセミナー

伊藤慎将、黒坂寛、柳田剛志、上岡寛、山城隆：Runx/Cbfb シグナリングはアンドロゲン代謝を介した唾液腺の雌雄二形性発現を制御する 第 74 回日本矯正歯科学会大会、2015 年 11 月 18-20 日、福岡、優秀演題賞受賞

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

伊藤 慎将 ( ITOH, Shinsuke )

大阪大学大学院歯学研究科・顎顔面口腔矯正学教室・助教

研究者番号：40633706