

令和元年6月10日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11772

研究課題名(和文) 口蓋突起の基底膜の代謝機構および遺伝子からの口蓋裂発症機構の解明

研究課題名(英文) Research on metabolic mechanism of palatal processes and cleft palate onset mechanism from genes

研究代表者

菅原 利夫 (SUGAHARA, Toshio)

愛知学院大学・歯学部・客員教授

研究者番号：10116048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：口蓋形成は、上皮間葉相互作用と口蓋突起の細胞外マトリックスのリモデリングが関与している。口蓋突起が正中部で癒合した後、内側上皮シーム(MES)の形成と消失がおこる。そのため、MESの基底膜内のECM成分(例えば、IV型コラーゲン、ラミニン、およびパーレカン)の分布の変化を検討したが、それらの消失につながるメカニズムは不明である。ヘパラーゼはパーレカン中のヘパラン硫酸(HS)鎖を切断し、放出されたHS複合体は細胞増殖および遊走を促進する。そこで、我々は、基底膜のMES成分の機能明らかにするために、マウス口蓋の発育におけるMES成分の分布及びその遺伝子について解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で行った口蓋裂発生機序の解析は、従来から行われていた口蓋突起の最表面でみられる上皮層の動態、すなわちapoptosisやprogrammed cell deathなどの機序の解析ではなく、その最下層に位置する基底膜パーレカンの動態とヘパラーゼ局在、セロトニン、セロトニントランスポーターの局在を基底膜の代謝機構、遺伝子レベルから検討したものである。また口蓋裂の発生に關与する口蓋の骨形成の観点から口蓋裂の発症のメカニズムを検討口蓋発生メカニズムを検討する極めて独創的な発想であり、口蓋裂発生のメカニズムの要因を解明する上で大きく貢献すると思われる。

研究成果の概要(英文)：Palatogenesis is directed by epithelial-mesenchymal interactions and results from remodeling of the extracellular matrix (ECM) of the palatal shelves. After adhesion of the bilateral palatal shelves in the midline, formation and subsequent disappearance of the medial epithelial seam (MES) is essential for complete palatal fusion. Changes in the distribution of the ECM components within the basement membrane of MES (e.g., type IV collagen, laminin, and perlecan) have been examined.

However, mechanisms leading to their disappearance are controversial. Heparanase cleaves the heparan sulfate (HS) chains in perlecan and released HS complexes promote cell growth and migration. Here, we assessed the basement membrane of MES distribution in developing mouse palate to determine whether MES might function in palate formation.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口蓋裂 口蓋形成 基底膜 骨芽細胞 ヘパラーゼ セロトニン

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

1. 研究開始当初の背景

歯の発生において、外基質、血管基底膜の骨格形成などに重要な役割を果たしているプロテオグリカン(ヘパラーゼ)が基底膜のパールカンを介して、Hertwig 上皮鞘基底膜を消失させることを明らかにし、歯の発生に基底膜の消長が極めて重要であることを報告した。このことから、口蓋裂発症メカニズムを解明する基礎研究として、口蓋の発生過程での「口蓋突起基底膜の動態」に注目して検討した。

また、口蓋突起癒合の前段階である口蓋突起の水平転移の時期にだけ、Homeobox 遺伝子が過剰に発現することを明らかになり、口蓋形成との深いかわりが予測された。

一方、Arikawa 等はパールカンノックアウトマウスの解析を行い、パールカンが口蓋裂発症に深くかかわっていることを報告した。これらの研究の結果から、口蓋裂発症のメカニズムを解明には、パールカンが関与する口蓋突起の基底膜の代謝機構の解明、口蓋突起の水平転移、そして癒合に関わる Homeobox 遺伝子等の役割、さらに口蓋突起の伸張、及び水平転移に関与している基底膜の構築状態などが鍵になるものと考えられ、本研究を遂行することにした。

2. 研究の目的

二次口蓋形成は、1) 口蓋突起の下方への伸長、2) 口蓋突起の舌の上方へ水平転移、3) 左右側の口蓋突起の接触と、その後起きる基底膜消失による突起の癒合、4) 口蓋間葉組織の結合による癒合の完了という発育段階に分けられる。この中で3) 口蓋突起の癒合期における多彩な細胞、分子レベルの相互作用をカスパーゼや、TUNEL 法を用いた apoptosis に関する研究、そして上皮細胞の間葉系細胞への形質転換(EMT)や細胞接着因子に関する研究などが行なわれているが、口蓋突起の発育・癒合に関与する基底膜の動態および遺伝子からの口蓋裂の発症メカニズムは十分に解明されていない。

本研究は口蓋突起の伸長、水平転位、骨形成などに関わる基底膜消失の代謝機構及び遺伝子の変化から口蓋裂発症のメカニズムを解明しようとするものである。

3. 研究の方法

(1) 口蓋突起の基底膜をはじめ、細胞膜表面、細胞外基質に局在するプロテオグリカンおよびその分解酵素であるヘパラーゼ、パールカン、そしてプロテオグリカンの発現により遊離、活性化されると考えられている増殖因子 bFGF とそのレセプター-FGFR-1,2,3,4 の局在を免疫組織化学、in situ hybridization 法によって明らかにし、基底膜の消失と口蓋突起癒合との関連を解析した

(2) 口蓋突起器官培養によるヘパラーゼ活性の検証を行い、各ステージでの口蓋発症メカニズムを検討した。

(3) また、発生過程において胎児の前後軸方向の形態発育に重要な役割を担い、口蓋突起の増殖・分化に関与すると考えられる Homeobox family HOX 遺伝子の口蓋形成への関与関連について検討した。

(4) セロトニンはニューロトランスミッターとしての機能に加え、神経堤細胞の遊走や頭蓋・顔面などの初期発生への関与、骨代謝、血管拡張などの生理機能、上皮の代謝調節因子としての作用など、多岐にわたる機能を持つことが知られている。口蓋形成期には、セロトニンレセプターを介して口蓋突起の拳上に係ることが報告されているものの、その詳細は明らかで

ない。本研究では、セロトニンの口蓋形成への関与を明らかにするために、セロトニン (5-HT)、セロトニントランスポーター (SERT) および代謝酵素であるモノアミン酸化酵素(MAO) 局在について検討した。

4. 研究成果

(1) 口蓋突起基底膜におけるパールカン、ヘパラーゼの動態についての解析:

上皮索基底膜において他の基底膜成分に先んじてパールカンおよびコラーゲンが消失すること、

口蓋突起細胞が分泌したヘパラーゼはパールカンの増殖因子を遊離、活性化して間葉細胞の分泌・増殖を惹起すること、

口蓋突起上皮細胞が分泌した MMP はコラーゲンを細分化し、上皮索基底膜を分解・断裂させることなどから口蓋癒合時の基底膜の動態が極めて重要であることを明らかになった。

(2) Homeobox family HOX 遺伝子の口蓋形成への関与

野生型マウスでは、Hoxc は口蓋形成初期には口蓋突起間葉系細胞に、口蓋突起水平位時には口蓋突起上皮および口蓋突起基部に集積する骨芽細胞に観察された。

口蓋突起癒合期には上皮索、上皮島、上皮トライアングルに Hoxc が観察され、癒合期上皮組織の消失に Hoxc が関与する可能性が示唆された。

Eh/Eh マウスでは、水平位にある両側口蓋突起は接着、癒合せず口蓋裂を呈していた。

Hoxc はその局在を上皮あるいは間葉組織へと変化させることにより口蓋形成に関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

Chisato Sakuma, Hideto Imura, Tomohiro Yamada, Toshio Sugahara, Azumi Hirata, Yayoi Ikeda, Nagato Natsume, :Cleft palate formation after palatal fusion occurs due to the rupture of epithelial basement membranes. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 46(12):2027-2031, 2018.(査読あり)

Azumi Hirata, Kentaro Katayama, Takehiro Tsuji, Hideto Imura, Nagato Natsume, Toshio Sugahara, Tetsuo Kunieda: Homeobox family Hoxc localization during murine palate formation. *Congenital Anomalies*, 56:172-179, 2016.(査読あり)

[学会発表](計 4件)

佐久間千里, 井村英人, 山田朋弘, 池田やよい, 菅原利夫, 夏目長門: 口唇口蓋裂に関する実験的研究(第130報)CDD投与マウスにおける口蓋突起癒合後の離開による口蓋裂発生. 第58回日本先天異常学会学術集会(東京), 2018.7.28.

Hideto Imura, Chisato Sakuma, Tomohiro Yamada, Yayoi Ikeda, Toshio Sugahara, Nagato Natsume: Morphological observation of cleft palate after palatal fusion in mice. 12th World Congress of the International Cleft Lip and Palate Foundation (Leipzig, Germany), 2018.4.20

Katsuhiro Minami, Toshio Sugahara, Azumi Hirata, Nagato Nsume: Localization of

serotonin and serotonin transporter during palate formation in mice. 12th World Congress of the International Cleft Lip and Palate Foundation (Leipzig, Germany), 2018.4.20.

Katsuhiro Minami, Toshio Sugahara, Hideto Imura, Maya Yoshida, Nagato Natsume: Long term result of dental implant treatment for the patients with cleft lip and/or palate. 12th World Congress of the International Cleft Lip and Palate Foundation (Leipzig, Germany), 2018.4.19.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：井村 英人

ローマ字氏名：IMURA, Hideto

所属研究機関名：愛知学院大学

部局名：歯学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：10116048

研究分担者氏名：平田 あずみ

ローマ字氏名：HIRATA, Azumi

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：40263587

研究分担者氏名：南 克浩

ローマ字氏名：MINAMI, Katsuhiro

所属研究機関名：愛知学院大学

部局名：歯学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：70346162

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。