

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20572

研究課題名(和文) 頭蓋顔面の形成を制御する分子ネットワークの解明

研究課題名(英文) Elucidation of a molecular network which regulates craniofacial formation

研究代表者

天野 克比古 (AMANO, Katsuhiko)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：20448129

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)：頭蓋骨は正常な膜性骨化と頭蓋縫合の維持により形成され、その発生異常は頭蓋・顎顔面における形態異常や審美障害、咬合異常、脳神経系の発達遅延など様々な臨床的問題を生ずる。頭蓋骨の発生を制御する分子ネットワークは複雑であり詳細な分子機序の解明が望まれる中、申請者はIhh/Pth1rという2つの分子に着目して研究を実施した。頭蓋未分化間葉系細胞特異的なconditional knockout マウス、Prx1-Cre; Ihhf1/fl およびPrx1-Cre;Pth1rf1/flを作成し生後以降の頭蓋骨の表現型を解析した結果、Prx1-Cre; Pth1rf1/flで顕著な表現型が見出された。

研究成果の概要(英文)：Cranium is formed through intramembranous ossification and cranial sutures, which abnormalities lead to several clinical issues such as Cranio-maxillofacial deformity, esthetic problems, malocclusion, and growth retardation of neurocerebral system. While there is a complicated molecular network which regulates craniofacial development, we focused to study the role of Ihh/Pth1r. We have successfully established Prx1-Cre;Ihhf1/fl and Prx1-Cre;Pth1rf1/fl which enables us continuous observation from perinatal to postnatal stage. As a result, we found that Prx1-Cre;Pth1rf1/fl caused severe cranial phenotype.

研究分野：口腔外科

キーワード：頭蓋顎顔面 発生生物学 部位特異的遺伝子改変マウス Indian hedgehog Pth1r

1. 研究開始当初の背景

頭蓋骨の正常な発生は脊椎動物の個体発生において必須の生物学的事象であり、脳神経系の発達に協調して起こっている。頭蓋骨は正常な膜性骨化と頭蓋縫合の維持という2つの不可欠な生物学的なプロセスにより形成され、ホルモンやサイトカイン、転写因子など多くの分子により時空間的に制御されている(1)。その複雑ではあるが綿密に調節された発生過程において発症する異常は頭蓋・顎顔面における形態異常や審美障害を引き起こすだけでなく正常な脳神経系の発達を阻害する。臨床においては、症候性、非症候性の頭蓋縫合早期癒合症や頭蓋異形成として診断され、重症度や年齢等を考慮し外科的治療の適応となっている。また頭蓋骨は顎顔面と一体となっておりその発生は特に中顔面の発育や咬合関係に影響を及ぼすため、歯科口腔外科領域の観点からも、詳細な分子機序の解明が望まれる。

膜性骨化は骨芽細胞と破骨細胞が造骨と骨吸収を良好に調節する骨代謝によって制御され、Indian hedgehog (Ihh) および Parathyroid hormone 1 receptor (Pth1r)は骨代謝で重要な役割を果たすことが既に知られている。Ihh は *in vitro* において骨芽細胞分化を促進する(2)。しかし、これまでの *in vivo* における Ihh の頭蓋骨形成に関する研究は *Ihh*^{-/-}を用いて行われており、Ihh は関与しないとする報告(3)、正または負に制御しているという論文(4,5)があり、それらの結論は一致していない。さらに *Ihh*^{-/-}は周産期に死亡するため、頭蓋形成における Ihh の作用や機序に関し長期的な観察は不可能であった(3,6)。一方、Pth1r は Parathyroid hormone (Pth) および Parathyroid hormone-related peptide (Pthrp) の受容体であり、後者の分子は内軟骨性骨化における軟骨細胞分化に対して Ihh と正の feedback loop を形成しており、Ihh と Pth1r は密接に関係していると考察される

(7,8)。Pth1r は骨芽細胞と破骨細胞の両者に作用し骨リモデリングを制御しており、活性型 Pth1r を骨細胞特異的に強制発現したマウスでは骨芽細胞と破骨細胞の両者の増加を伴う骨密度の顕著な増加が認められる(9)。しかしながら、Pth1r が *in vivo* において具体的にどのような頭蓋の発生異常、疾病状態および病理に結びつくのか解明されていない。

2. 研究の目的

上記の研究開始当初の背景を鑑みると、Ihh や Pth1r は骨代謝における必須の因子であることは示されているが、*in vivo* でのそれらの遺伝子の欠損や機能不全が生じる(可能性のある)頭蓋骨の表現型や頭蓋縫合の維持に及ぼす影響については解明されていないため、本研究計画において部位特異的遺伝子欠損マウスを樹立しそれらを検討することとした。

<引用文献>

1, Zhao H et al. 2015 2, Shimoyama A et al. 2006. 3, St-Jacques B et al.1999. 4, Abzhanov A et al. 2007. 5, Lenton K et al. 2011. 6, Razzaque MS et al. 2005. 7, Lanske B et al. 1996. 8, Vortkamp A et al. 1996. 9, O'Brien CA et al. 2008.

3. 研究の方法

上記の研究の目的に基づき、部位特異的遺伝子欠損マウスの作成と解析を行った。まず Prx1-Cre、*Ihh*^{fl/fl}、*Pth1r*^{fl/fl} のマウスを購入または輸入し、施設内でライン化した。Prx1-Cre は Jackson Lab より、*Ihh*/*Pth1r* floxed mice は本研究の海外共同研究者である Beate Lanske 教授(Harvard School of Dental Medicine)からコロニーの分与を受けた。具体的な Mating の方法は問い合わせの上、開示可能である。

次に部位特異的遺伝子欠損マウスの作成で得られた変異体頭蓋骨の解析を実施した。

解析方法は形態学的、分子生物学および組織学的手法を用いて行った。具体的に本研究の期間内で実施できた実験を以下に列挙する。

< 形態学的分析 >

- ・ 頭蓋骨の幅径と長径の計測
- ・ MicroCT を用いた頭蓋骨のサイズの計測や縫合の骨化状態の評価
- ・ Alcian Blue/ Alizarin Red 染色を用いた頭蓋の骨格標本の作製と計測

< 分子生物学的解析 >

- ・ 頭蓋骨からの RNA 抽出と骨芽細胞分化マーカーの発現解析

< 組織学的手法 >

頭蓋骨のパラフィン切片（冠状断）の作成と基本組織染色（HE 染色や Von Kossa 染色）。

4 . 研究成果

まず Prx1Cre;Ihh^{fl/fl} の作成を行い変異体を得られ、なおかつ四肢の表現型については我々が以前発表した形態変化が再現されることを確認した(10)。すなわち部位特異的 Ihh 遺伝子欠損マウスで Fostering することで生後も生存可能となりより長期の観察を行うことができた。Prx1Cre;Ihh^{fl/fl} の新生仔の頭蓋骨では頭蓋縫合の閉鎖遅延が観察された。1 週齢（Alcian Blue/ Alizarin Red 染色）もしくは 3 週齢（MicroCT）の観察では表現型は回復し、明確な形成異常は見出されなかった。

次に平行して Prx1Cre;Pth1r^{fl/fl} の作成を行った。変異体を得られ、なおかつ四肢の表現型については以前我々が発表した形態変化が再現されることを確認した(11)。このマウスについても四肢において著明な表現型を生ずるも Fostering することで長期の観察を行うことができた。Prx1Cre;Pth1r^{fl/fl} の頭蓋骨を新生仔（Alcian Blue/ Alizarin Red 染色）、1 週齢（Alcian Blue/ Alizarin Red 染色）、3 週齢（MicroCT）で評価を行った結果、頭蓋骨で

明らかな形成異常が見出された。現在組織学的手法を用いて詳細を検討中である。

最後に Prx1Cre;Ihh^{fl/fl};Pth1r というダブルコンディショナルノックアウトマウスの作成を行った。本研究計画期間中に最終段階の Mating Pair の樹立まで進み、現在変異体の検体収集を行っている。

< 引用文献 >

10, Amano K et al. 2015. 11, Amano K et al. 2016.

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)

Komaba H, Kaludjerovic J, Hu DZ, Nagano K, **Amano K**, Ide N, Sato T, Densmore MJ, Hanai JI, Olauson H, Bellido T, Larsson TE, Baron R, Lanske B. (2017 Apr 8); Klotho expression in osteocytes regulates bone metabolism and controls bone formation. *Kidney Int.* 2017 Sep;92(3):599-611. doi: 10.1016/j.kint.2017.02.014. Epub 2017 Apr 8. PMID:28396120

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 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0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

特になし

6．研究組織

(1)研究代表者

天野 克比古（AMANO, Katsuhiko）

大阪大学歯学部附属病院、医員

研究者番号：20448129

(2)研究分担者 なし

（ ）

研究者番号：

(3)連携研究者 なし

（ ）

研究者番号：

(4)研究協力者

古郷 幹彦（KOGO, Mikihiko）

相川 友直（AIKAWA, Tomonao）

宮川 和晃（MIYAGAWA, Kazuaki）

Beate Lanske