

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：32670

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08499

研究課題名(和文) 神経堤細胞特異的Meis2欠失マウスを用いた口蓋裂と心奇形の発症機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the pathogenic mechanism of cleft palate and cardiac malformation in neural crest cell-specific Meis2 knockout mice

研究代表者

太田 正人 (OTA, Masato)

日本女子大学・家政学部・准教授

研究者番号：70313228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：米国においては、心臓奇形をともなう口蓋裂患者での候補遺伝子としてMEIS2遺伝子の関与が示唆されているが、その詳細は明らかではない。よって、Meis2遺伝子の機能を解析するために、頭部の間葉や心臓中隔形成に関与する神経堤細胞に特異的なノックアウトマウスを作成し、出生率、死亡率、表現型を解析した。得られた新生仔マウスの出生率はメンデルの法則に従い、妊娠中に死亡する“胎性致死”は観察されなかった。Meis2cKOマウスの生後1日以内の死亡率は100%であり、完全口蓋裂、頭蓋骨の形態異常、心臓の大動脈肺動脈中隔の消失が観察され、新規の心臓奇形と口蓋裂の原因遺伝子である可能性が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本の先天異常の研究から、心臓奇形をともなう口蓋裂は先天異常のなかでも高頻度であることが報告されている。これらの先天異常の原因には偶発的に発生した染色体異常や多因子遺伝のような内的因子が大部分を占めると考えられているが、同定された遺伝子やその発症機構等についての詳細は明らかではない。今回の研究では、Meis2遺伝子を生体内の一部の細胞で欠失させてはたらかない状況をマウスで実験的に作成して、その影響を調べた。その結果、口蓋裂および心臓の心房または心室の中隔の形成異常が観察され、ヒトの心臓奇形と口蓋裂の原因遺伝子としてMEIS2遺伝子が強く示唆され、好発性先天異常の発症防止に役立つ情報が得られた。

研究成果の概要(英文)：In the United States, the involvement of the MEIS2 gene has been suggested as a candidate gene in patients with cleft palate with heart malformations, but the details are not clear. In this study, the function of the Meis2 gene were studied about the birth rate, mortality rate, and phenotype using conditional knockout (cKO) mice specific for neural crest cells involved in the formation of mesenchyme of the head and cardiac septum. The birth rate of newborn cKO mice was in accordance with Mendelian law, which suggested "fetal lethality" was not observed. Meis2c KO mice had a mortality rate of 100% within the first day of life. In addition, they indicated complete cleft palate, abnormal morphology of the skull, and disappearance of the aorta-pulmonary artery septum. It is strongly suggested that the Meis2 gene is the causative gene of novel heart malformation and cleft palate.

研究分野：解剖生理学

キーワード：口蓋裂 心奇形 Meis2 神経堤細胞 コンディショナルノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

横浜市大国際先天異常モニタリングセンターによる日本の先天異常の頻度(対1万児)では、心室中隔欠損 17.4、心房中隔欠損 6.1、口唇口蓋裂 12.3、口唇裂 5.8、口蓋裂 4.3 というように心臓形態異常は先天異常のなかでも高頻度であることが報告されている。わが国では、長崎大学の近藤新二らによる『ゲノム病としての口唇口蓋裂に関する研究』によって、日本人の口唇裂・口蓋裂の発症に TGF β 3 遺伝子の関与が明らかにされた。いっぽう、米国においては、心臓奇形をともなう口蓋裂患者での候補遺伝子として MEIS2 遺伝子の関与が示唆されている。これらの先天異常の原因には偶発的に発生した染色体異常や多因子遺伝のような内的因子が大部分を占めると考えられているが、同定された遺伝子やその発症の分子機構等についての詳細は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究においては、心臓奇形をともなう口蓋裂患者での疾患関連遺伝子として示唆された MEIS2 遺伝子が、実際にこれらの先天異常の原因遺伝子として機能しうるかどうか、またその際にどのような影響が生体に生じるかを表現型の解析により明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

これまでに味蕾の組織幹細胞の分化制御因子に関する *in silico* 解析から、Meis 遺伝子ファミリーに注目し、その組織分化における機能を解析するために Cre-LoxP システムを用いて組織特異的なコンディショナルノックアウトマウス(cKO)の作製を行い、表現型の解析を行ってきた。口唇口蓋裂の形成には上皮の癒合不全という発症機構が知られているため、K5-cre マウスを用いて主に上皮特異的に Meis 2 遺伝子を欠失した cKO マウスを作製して表現型解析を行なった。また、頭部の間葉との相互作用が特異的に口蓋裂の発症に関係する可能性もあるので頭部の間葉特異的に Meis 2 遺伝子を欠失した cKO マウスを作製して表現型解析を行なった。

4. 研究成果

(1) 上皮特異的に Meis 2 遺伝子を欠失した K5-cre : Floxed-Meis2 cKO マウスにおいては口腔だけでなく、その他の器官形成や形態異常などは全く観察されなかった。すなわち、Meis2 遺伝子の機能は、上皮-間葉相互作用による口蓋形成の調節機構には関係ないことが示唆された。

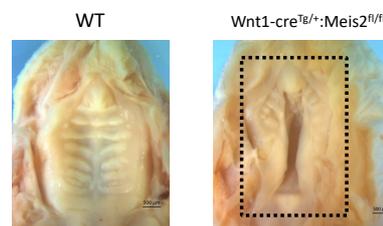
(2) 頭部の間葉特異的に Meis 2 遺伝子を欠失した Wnt1-cre : Floxed-Meis2 cKO マウスを用いて神経堤細胞特異的な cKO を作製したところ、出生直後に死亡する個体が生じ、それらの個体の全てで cre リコンビナーゼ遺伝子をもつアレルおよび LoxP 配列のホモアレルが確認され、Wnt1-cre/Meis2cKO マウスは早期新生仔死亡を生じた。

これらの Wnt1-cre/Meis2cKO マウス新生仔において口蓋裂の表現型について観察したところ、丸い頭部、短鼻、小顎という表現型が観察された(21例中21例)。

頭部以外の四肢の部分と、胴部においては、顕著な違いは観察されなかった。

(3) 口蓋裂については Wnt1-Cre^{+/-}・Meis2^{f/f} マウスは100%の割合(21例中21例)で口蓋裂を生じる一方、WT では0%でした。

また発生した口蓋裂は、2次口蓋が完全に裂けている完全口蓋裂であった。また、野生型マウスの口蓋皺壁で観察されるパターンは、この完全口蓋裂の口蓋部ではほぼ消失し、パターンの異常が生じていた。



さらに、新生仔の頭蓋のアリザリンレッドによる骨染色では、野生型マウスと Wnt1-Cre^{+/-}・Meis2^{f/f} マウスでは前頭骨と側頭骨のパターンに異常はない一方、Wnt1-Cre^{+/-}・Meis2^{f/f} マウスでは後頭骨が消失し、壁間骨の軽微な形態異常が観察された。壁間骨は神経堤細胞由来の正中成分と、中胚葉由来の側方成分で形成されており、軽微な異常があったのは、中胚葉由来の側方成分だったことから神経堤細胞特異的な Meis2 欠損の影響は、間接的に影響を与えたと考えられる。しかし、この表現型の発症機構については不明である。

(4) 心臓および大動脈弓をサンプリングし、その表現型を観察したところ、野生型マウスと Wnt1-

Cre^{+/-}・Meis2^{f/f} マウスでは心室や心房の壁の厚みなどに大きな相違は観察されなかった。しかし、Wnt1-Cre^{+/-}・Meis2^{f/f} マウスでは大動脈肺動脈の境界が明確ではなく、心房中隔欠損 (ASD) が観察された (心臓の縦断組織の黒矢印部)。

大動脈肺動脈のラセン中隔の形成には心臓神経堤細胞が関与していることが以前から報告されており、今回の Wnt1-Cre^{+/-}・Meis2^{f/f} の表現型は Meis2 遺伝子が心臓の形成に関与することを示唆している。また、胎児期に開いている卵円孔が生後の閉鎖不全により生じる心房中隔欠損症が、卵円孔の閉鎖には心臓神経堤細胞が関与する可能性が示唆された。

(5) 口蓋裂では、顎の裂け目の部分の歯が欠損することが知られており、その原因の解明と治療の方法を検討するため、歯の構造を継続的に形成できる野生型マウスの切歯の歯根部で発現している遺伝子群を解析して、歯の形成に重要な遺伝子として Amelx と Chd3 を同定することができた。

(6) 野生型マウスを用いて、歯の歯根部の形成を促進できる低分子化合物として Harmine を同定した。Wnt1-Cre^{+/-}・Meis2^{f/f} マウスでは生後1日で胎児は死亡してしまうので、歯の成長を促進する Harmine を培養液に添加することによって、上顎や下顎の歯の形成予定域を含む組織を培養して解析できる可能性が示唆された。

(7) 野生型マウスの切歯を用いて、全身の栄養状態が歯の形成に及ぼす影響について検討したところ、高脂肪食による肥満状態になると歯のエナメル質形成がうまくできないことが起こることが観察された。肥満は全身に炎症性サイトカインの影響を及ぼしうるので、そのような因子が歯の形成に関与する可能性が示唆された。

<引用文献>

- ① Ota MS, Kondo K, Li Y, Iseki S, Yamashita A, Gibson CW, Kondo T. Amelogenin X impacts age-dependent increase of frequency and number in labial incisor grooves in C57BL/6. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 496, 2018, 324-27.
- ② Date Y, Kondo H, Yamashita A, Iseki S, Kasugai S, Ota MS. Combined in silico analysis identified a putative tooth root formation-related gene, Chd3, which regulates DNA synthesis in HERS01a cells. *Odontology*, 108, 2020, 386-395.
- ③ Fujiwara N, Lee JW, Kumakami-Sakano M, Otsu K, Woo JT, Iseki S, Ota MS. Harmine promotes molar root development via SMAD1/5/8 phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 497, 2018, 924- 929.
- ④ Imai A, Yamashita A, Ota MS. High fat diet increases labial groove formation in maxillary incisors and is related to aging in C57BL/6 mice. *62*, 2020, 58-63.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujiwara N, Lee JW, Kumakami-Sakano M, Otsu K, Woo JT, Iseki S, Ota MS.	4. 巻 497
2. 論文標題 Harmine promotes molar root development via SMAD1/5/8 phosphorylation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 924-929
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2017.12.062.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamashita A, Kondo K, Kunishima Y, Iseki S, Kondo T, Ota MS.	4. 巻 495
2. 論文標題 Postnatal development of bitter taste avoidance behavior in mice is associated with ACTIN-dependent localization of bitter taste receptors to the microvilli of taste cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 2579-2583
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2017.12.126.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ota MS, Kondo K, Li Y, Iseki S, Yamashita A, Gibson CW, Kondo T.	4. 巻 496
2. 論文標題 Amelogenin X impacts age-dependent increase of frequency and number in labial incisor grooves in C57BL/6	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 324-327
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.01.073.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamashita Y, Shimamoto N, Morita K, Sugiyama H, Kimoto M, Toda K, Ota MS.	4. 巻 7
2. 論文標題 Thiamine and Quinine Differently Inhibit the Early Phase of Acetylcholine-dependent Contraction of Mouse Ileum in vitro.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int. J. Nutr. Food Sci.	6. 最初と最後の頁 94 - 99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamashita A, Shimamoto N, Morita K, Sugiyama H, Tadakuma S, Kato M, Kimoto M, Toda K, Ota M	4. 巻 6
2. 論文標題 Differential Inhibition of the Rhythm and Amplitude of Acetylcholine-dependent Contraction in the Murine Jejunum and Ileum in vitro by Thiamin and Quinine.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Food Nutr. Sci.	6. 最初と最後の頁 115-122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa R, Pornaveetus T, Kawasaki K, Kawasaki M, Blackburn J, Otsuka-Tanaka Y, Saito N, Ota M, Kessler J, Herz J, Maeda T, Cobourne M, Sharpe P, Ohazama A.	4. 巻 13:
2. 論文標題 Lrp4/Wise regulate palatal rugae development through Tuning-type reaction-diffusion mechanism.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0204126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0204126.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Date Y, Kondo H, Yamashita A, Iseki S, Kasugai S, Ota MS.	4. 巻 108
2. 論文標題 Combined in silico analysis identified a putative tooth root formation-related gene, Chd3, which regulates DNA synthesis in HERS01a cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 386-395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10266-020-00489-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imai A, Yamashita A, Ota MS.	4. 巻 62
2. 論文標題 High fat diet increases labial groove formation in maxillary incisors and is related to aging in C57BL/6 mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J.Oral Biosci.	6. 最初と最後の頁 58-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2019.12.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ota MS
2. 発表標題 Amelogenin X impacts age-dependent increase of frequency and number in labial incisor grooves in C57BL/6
3. 学会等名 The 2019 TMD meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----