

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11829

研究課題名(和文) 口蓋突起誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文) The Mechanism of Palatal Shelf Induction

研究代表者

川崎 真依子 (Kawasaki, Maiko)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：40584587

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)：本研究は、一次繊毛の機能と形成に関わるOdf1とIft88の欠損マウスを用いて、一次繊毛の口蓋形成メカニズムへの役割を解明することを目的とする。Odf1とIft88の神経堤由来細胞特異的欠損マウスで口蓋裂を認めた。さらに両欠損マウスの口蓋突起予定領域には、異所性の骨形成とアポトーシスが認められた。しかしながら、アポトーシスを抑制して異所性の骨形成は消失しても、口蓋裂に変化は認められなかった。以上より、Odf1とIft88は、アポトーシスを抑制することにより、上顎骨形成過程において骨形成を制御しており、この機構は口蓋突起の形成とは独立したものであることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで停滞していた口蓋突起形成開始ポイントにおける分子レベルでの解析が、Odf1欠損マウスを使用する事により、初めて大幅な発展が望める。さらに、本研究課題は、分子単位、細胞単位、細胞小器官単位、動物単位からという様々な角度の切り口からのアプローチであり、歯科領域にとどまらない結果が期待できる。そして、哺乳類の口蓋の特殊性は、分子レベルでまったく証明されていない。本研究課題が哺乳類誕生に対する長年の疑問への回答となる可能性が高い。このようにOdf1による口蓋形成メカニズム研究は、他の器官研究へも広がる要素を持つ。基礎研究としてのみならず、生物学や臨床分野と幅広く分野への貢献が可能となる。

研究成果の概要(英文)：The role of the primary cilia in maxillary bone development is not fully understood. We generated mice with a mesenchymal conditional deletion of Ift88 and Odf1 using the Wnt1Cre mice. These proteins involved in the function and formation of primary cilia. It has been shown that Ift88 and Odf1 KO mice exhibit cleft palate and ectopic bone. We also found ectopic apoptosis in the both mutants maxillary process at an early stage of development. To investigate whether the ectopic apoptosis is related to the both maxillary phenotypes, we generated Ift88 and p53 WK0 mutants to reduce apoptosis. These mice showed no excess bone formation, suggesting that the cells evading apoptosis by the presence of Ift88 in wild-type mice limit bone formation in maxillary development. On the other hand, the palatal cleft was retained in this mice, indicating that the excess bone formation or abnormal apoptosis was independent of the cleft palate phenotype in Ift88 mutant mice.

研究分野：発生生物学

キーワード：一次繊毛 口蓋裂

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口蓋は進化の過程で哺乳類が獲得した特殊な構造で、一次口蓋および二次口蓋の形成を経て、完成される。その形成不全である口蓋裂は、ヒトにおける先天異常の中で最も頻度の高い疾患の一つであり、この高い発症率は「生体の中で口蓋形成が、分子レベル、環境レベルでの変異に最も敏感な構造体」であることを示している。

一次口蓋の形成後に引き続いておこる二次口蓋の形成は、口蓋突起の I:舌の側面での下方増殖、II:舌上への挙上、III:水平方向への増殖、IV:正中部での癒合という複数の連続したステップを経て進行していく。口蓋の発生学は古くから臨床研究者のみならず、基礎研究者の興味をひいてきたが、その解析手法には古典的な形態学的手法が用いられてきた。それに対して、近年の遺伝子欠損マウス作成の発明は、この口蓋の発生学的研究を大きく変貌させた。つまり、口蓋裂をもつ遺伝子欠損マウスの解析である。口蓋裂をもつ欠損マウスは、ある特定の発生段階で口蓋形成が停止する。これは遺伝子欠損により次の口蓋形成段階へ進めないこと、つまり欠損させた遺伝子が、その形成段階に必須である事を意味する。この遺伝子の機能解析によって、その発生段階のメカニズム解明は大きく前進する。このような遺伝子の同定を、正常マウスで検索する事は極めて難しく、分子レベルの口蓋形成メカニズム研究には、遺伝子欠損マウスが不可欠である。しかし一方、このことは遺伝子欠損マウスで異常の認められない口蓋形成の段階については解析できない事も意味する。

一次繊毛は真核生物の進化の過程で高く保存されている細胞小器官であり、哺乳類においてもほぼ全ての種類の細胞に存在する。この一次繊毛は、今まで進化の過程で機能を失った細胞小器官と考えられてきたが、近年の分子生物学の発展により、シグナル経路の調整など多くの機能を有することが明らかとなってきている。事実、一次繊毛の機能不全は、繊毛病という疾患を引き起こすことが知られている。この繊毛病には口蓋裂も認められ、一次繊毛が口蓋形成に関与することが示唆されている。しかし一次繊毛の口蓋形成における役割は明らかにされていない。

2. 研究の目的

一次繊毛の構成分子である *Odf1* や *Ift88* の組織特異的欠損マウスを作成し、その解析から一次繊毛の口蓋形成における役割を解析する。

3. 研究の方法

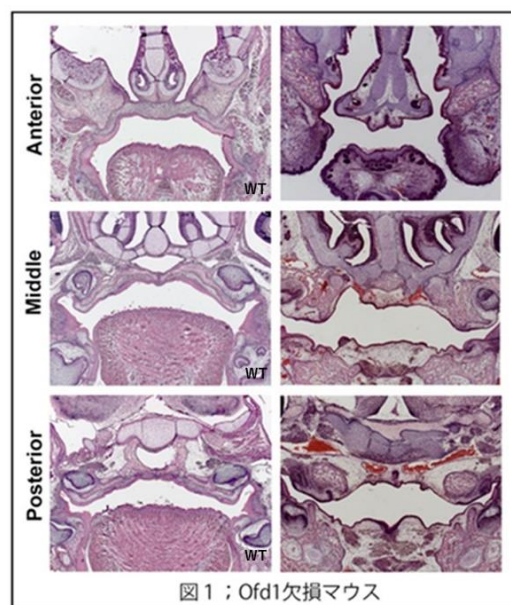
Odf1 や *Ift88* の組織特異的欠損マウスを作成するために、Cre-LoxP システムを使用した。マウス作成後は、表現型の解析を多角的な手法を用いて行う。

4. 研究成果

はじめに *Odf1* を神経堤由来細胞でのみ欠損させたマウス (*Odf1*^{fl/fl};Wnt1Cre マウス) を作成し解析を行った。口蓋形成は、近心部、遠心部、その中間部でその分子機構が大きく異なることが知られているため、*Odf1*^{fl/fl};Wnt1Cre マウスの口蓋も、近心部、中間部、遠心部それぞれで解析した。それぞれの部位で、口蓋突起の欠損による口蓋裂が認められた (図1)。

次に、*Odf1* と同様に神経堤由来細胞で、他の一次繊毛の構成分子である *Ift88* を欠損させたマウス (*Ift88*^{fl/fl};Wnt1Cre マウス) を作成し解析を行った。*Ift88*^{fl/fl};Wnt1Cre マウスも、*Odf1*^{fl/fl};Wnt1Cre マウスと同様の表現型を示した (図2)。これにより、両方の分子は、口蓋形成において一次繊毛全体の機能を担っていると考えられた。*Odf1* は性染色体上にあるため、X-inactivation などの影響が考えられる。そこで、*Ift88* 欠損マウスを使用して解析を行うこととした。*Ift88*^{fl/fl};Wnt1Cre マウスの口蓋突起予定領域に、異所性の骨形成が認められた (図3)。

いかなるシグナルに変化が生じているか確認するために、各種シグナルのマーカー分子の発現を *in situ hybridization* や免疫染色などで確認した。*Bmp*、*Fgf*、*Wnt* シグナルのマーカーの発現に変化は認められなかった。それに対して、*Hh* シグナルは、優位に減少していた (図4)。そこで、異所性の骨形成や口蓋裂の原因が *Hh* シグナルの低下によるものか確認するために、神経堤由来細胞でのみ *Hh* シグナルが欠損したマウス (*Smo*^{fl/fl};Wnt1Cre マウス) を作成し解析を行った。*Smo*^{fl/fl};Wnt1Cre マウスにも、口蓋裂は認められたが、その表現型を大きく異なる



ものであった(図5)。さらに、*Ift88* 欠損マウスと異なり、異所性の骨形成も *Smo^{fl/fl};Wnt1Cre* マウスには認められなかった(図6)。一方、*Ift88^{fl/fl};Wnt1Cre* マウスの口蓋突起予定領域には、多くのアポトーシス陽性細胞が認められた(図7)。このアポトーシス活性が、異所性の骨形成や口蓋裂の原因であるかを確認するために、*Ift88^{fl/fl};Wnt1Cre* マウスからアポトーシス活性を除去することを目的に、*p53* 欠損と *Ift88* の欠損を両方有する compound マウスの作成を行い、検索した。その結果、*Ift88* の欠損によって引き起こした異所性の骨形成は消失していた。一方で、口蓋裂はそのままであった。

このことより、*Ift88* の欠損によって引き起こした異所性の骨形成は、口蓋裂の原因ではないことが示された(図8)。このように、一次繊毛は、口蓋突起形成の開始点で重要であることが示された。

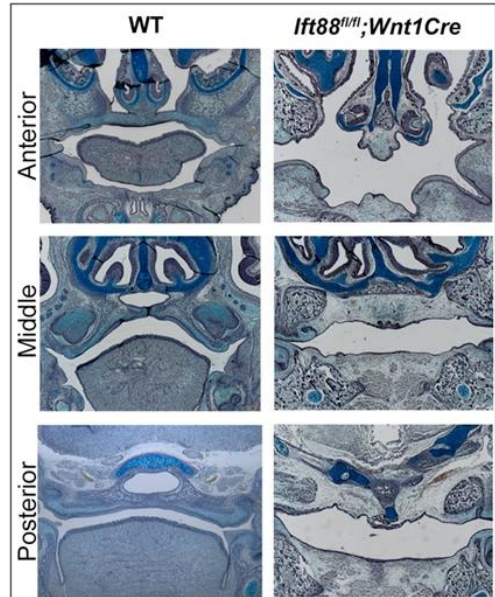


図2 ; *Ift88*欠損マウス

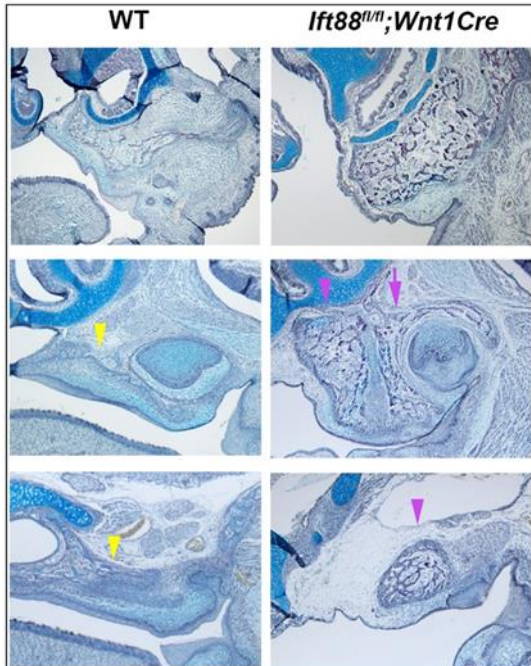


図3 ; *Ift88*欠損マウスにおける異所性の骨形成

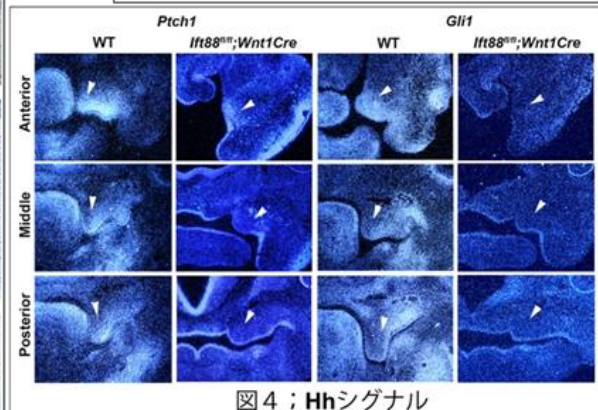


図4 ; Hhシグナル

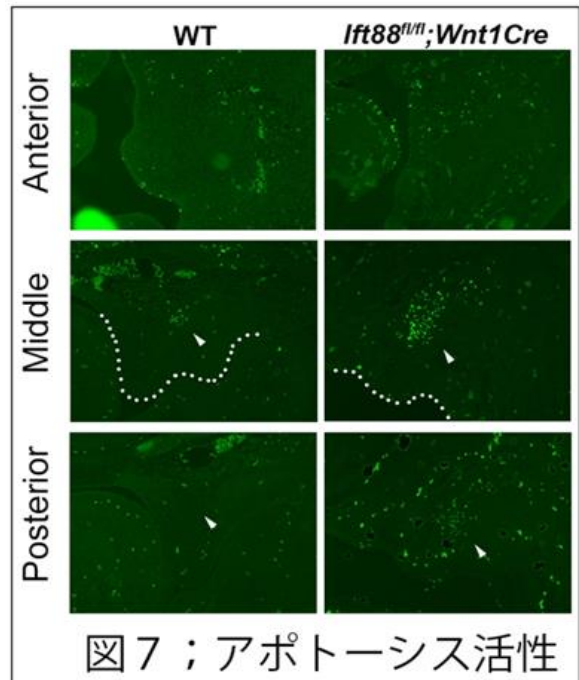


図7 ; アポトーシス活性

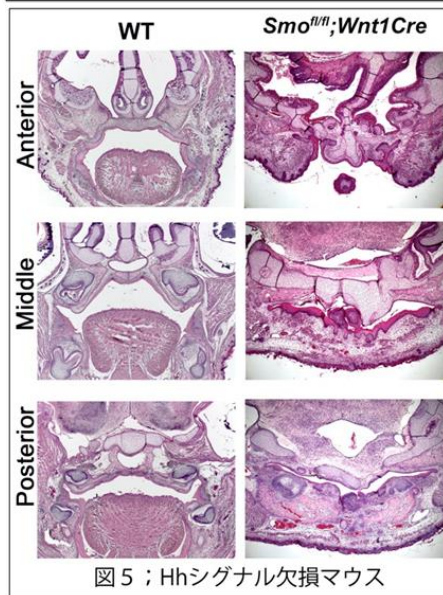


図5 ; Hhシグナル欠損マウス



図6 ; 異所性の骨形成

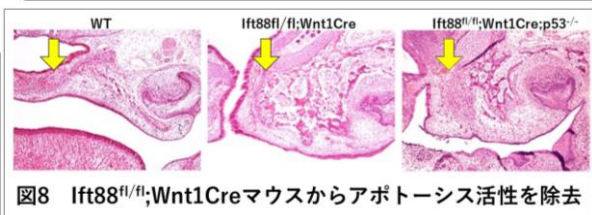


図8 *Ift88^{fl/fl};Wnt1Cre*マウスからアポトーシス活性を除去

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Watanabe M, Kawasaki M, Kawasaki K, Kitamura A, Nagai T, Kodama Y, Meguro F, Yamada A, Sharpe PT, Maeda T, Takagi R, Ohazama A.	4. 巻 101
2. 論文標題 Ift88 limits bone formation in maxillary process through suppressing apoptosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arch Oral Biol.	6. 最初と最後の頁 42-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.archoralbio.2019.02.017.	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 該当する

〔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 Kawasaki M, Kawasaki K, Ohazama A.
2. 発表標題 The Role of Primary Cilia in Craniofacial Development.
3. 学会等名 International Collaborative Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and treatment (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究分担者	前田 健康 (Maeda Takeyasu) (40183941)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	大峽 淳 (Ohazama Atsushi) (40266169)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	川崎 勝盛 (Kawasaki Katsushige) (40529640)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	