

令和 2 年 7 月 6 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：17K11954

研究課題名(和文)口蓋裂発症へのエピジェネティクスの関与の解明

研究課題名(英文)Study of the involvement of epigenetics in cleft palate

研究代表者

石田 陽子 (ISHIDA, Yoko)

新潟大学・医歯学系・特任講師

研究者番号：10377187

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)：口唇口蓋裂は最も頻度の高い先天性疾患の一つであるが、その多くが非家族性かつ非症候群であり、その非ゲノム的な原因は不明なままである。本研究ではmicroRNA形成に重要な役割を果たすDicerに着目し、間葉組織特異的Dicer欠損マウスを作成し、解析を行った。その結果、間葉組織特異的Dicer欠損マウスにおいて下顎正中に裂を認めた。この正中では、細胞死が亢進しており、遺伝子学的検索の結果、Shh関連遺伝子であるGli1の発現が有意に減少していた。以上の事からDicer間葉特異的欠損マウスの下顎正中の裂は、microRNAの欠損によるShhシグナルの活性が抑制されたことによるものと示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頻度の高い先天性疾患である口蓋裂のほとんどはゲノムの遺伝子変化を伴っておらず、その発症原因は未解明のままである。エピジェネティクスシステムの一つであるmicroRNAの異常は、ゲノム変化を伴うことなく、様々な異常を引き起こすが、microRNAの異常と口蓋裂発症の関係は明らかにされていない。本研究で確認されたmicroRNA組織特異的欠損による口唇口蓋裂形成は、エピジェネティクスシステムの顎頭蓋顔面部形成への関与を示しており、非症候群性口唇口蓋裂研究に大きく寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Non-syndromic cleft lip with or without cleft palate is one of the most common birth defects in humans. Dicer plays a critical role in the biogenesis of multiple classes of small RNAs. We generated mesenchyme-specific mutations of Dicer using the Cre/loxP-recombination system, and analyzed the role of miRNA in Non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. The cKO mice showed lower lip cleft. Real-time PCR analysis and in situ hybridization showed that Gli1 mRNA levels decreased significantly in midline in lower lip of cKO mice. We suggested that the lower lip cleft on the Dicer cKO mice associated with Shh pathway.

研究分野：小児歯科学

キーワード：口蓋裂 microRNA エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂発症は最も頻度の高い先天性疾患の一つである。これは口唇口蓋形成が、わずかな遺伝子変異や環境変化にも反応する非常に敏感なプロセスである事を意味している。ゲノム上の遺伝子異常によって引き起こる口唇口蓋裂は、家族性または症候群として観察されるものの、口唇口蓋裂のほとんどは、非家族性かつ非症候群である。つまり、口唇口蓋裂の多くは、ゲノム上の遺伝子変異が原因ではない。しかし、ゲノム以外のいかなる異常が口唇口蓋裂を引き起こすのかは、依然として不明のままである。

エピジェネティクスはゲノムと関係なく遺伝子発現を制御・伝達するシステムで、この制御には、DNAメチル化、ヒストン修飾、ノンコーディングRNA(ncRNA)の3つの因子が存在する。このうちncRNAは、タンパク質に翻訳されることなく機能するRNAの総称であり、その中のmicroRNAは約25塩基からなる小さなRNAで、相補的なメッセンジャーRNA(mRNA)に特異的に結合し、そのmRNAを分解することで、最終産物であるタンパク質の量を調整する。器官形成は、各タンパク質の発現する時期、部位、量が厳密に制御される事で進行していくが、microRNAの異常はこのタンパク質の時期、部位、量の破綻を意味する。microRNAは、哺乳類で約1000種類存在するとされている。microRNAの塩基配列は多数のmRNAに存在するため、microRNAはmRNAに対し、1:1の関係で作用するのではなく、「1:多」として機能する。そのため、1つのmicroRNAは数十の遺伝子を直接的に抑制し、逆にその1つのmicroRNAの機能不全は、それら数十のタンパク質の増加を引き起こす。これは先天性異常や疾病の誘因として十分な変化量と考えられる。さらに、それらの変化にはゲノムの変化が、まったく伴わない。しかしながら、このmicroRNAの機能不全と、口唇口蓋裂発症との関係は不明である。microRNAは複数のステップを経て形成されるが、形成最終段階で活性化するDicerを欠損させると、microRNAの機能は失活する。顔面の間葉を形成する神経堤由来細胞から特異的にDicerを欠損させたマウスで口唇口蓋裂が引き起こることから、microRNAが口唇口蓋裂に関与することは、明らかである。

2. 研究の目的

microRNAの口唇口蓋の形成における役割を解析することから、口唇口蓋の形成メカニズムを理解する。

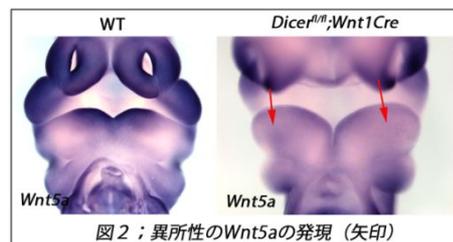
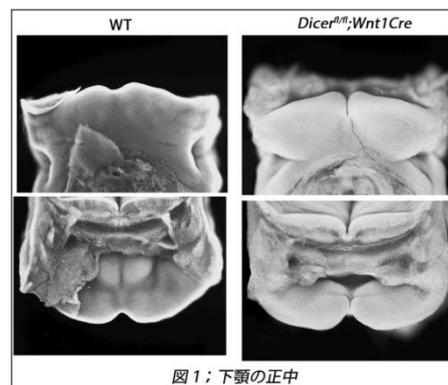
3. 研究の方法

Dicerの組織特異的欠損マウスを作成し、形態組織学的な変化、およびTunelアッセイにて細胞死を、in situ hybridizationおよび免疫染色にて各種シグナルの変化を検索した。

4. 研究成果

神経堤由来細胞で特異的にmicroRNAが欠損するマウス(Dicer^{fl/fl};Wnt1Creマウス)では口蓋裂が認められる。しかし、神経堤は顔面の多くを構成するため、Dicer^{fl/fl};Wnt1Creマウスの顔面の欠損の程度は激しく、口蓋裂の原因部位を特定することは難しい。そこで、口蓋突起のみからmicroRNAを除去することで原因部位を特定するために、口蓋突起の間葉に発現するOsr2に着目し、Osr2発現細胞特異的にDicerが欠損するマウス(Dicer^{fl/fl};Osr2Creマウス)を作成した。その結果、Dicer^{fl/fl};Osr2Creマウスに口蓋裂は認められず、Dicer^{fl/fl};Wnt1Creマウスに認められた口蓋裂が口蓋突起に発現するmicroRNAの欠損によるものではなく、他の部位のmicroRNAの欠損によって引き起こった異常による二次的な表現型であることが明らかとなった。どのような異常が口蓋裂を引き起こしたのか、同定を試みるも、Dicer^{fl/fl};Wnt1Creマウスの顔面異常が著しく、その原因部位を特定することはできなかった。

一方、Dicer^{fl/fl};Wnt1Creマウスの下顎の正中部に裂が認められた。この裂は胎生の11.5日から観察できることが明らかとなった(図1)。このように、正中部の裂は顔面の異常が確認される前に認められること、由来突起も違うことから、この裂は口蓋裂形成とは別のもと考えられる。Dicer^{fl/fl};Wnt1Creマウスの下顎は劣成長であること、その原因がWnt5aの異所性の発現によるものであることが報告されている。しかし、Wnt5aの異所性の発現は、下顎の遠心部で確認されることから、Dicer^{fl/fl};Wnt1Creマウスの下顎の正中に認められる裂は、下顎の劣成長とは別の表現型であることが示された(図2)。胎生11.5日の上顎の正中に



裂は認められず、下顎の裂は顔面の正中異常によって引き起こった表現型ではないことが示された。Dicer^{fl/fl};Wnt1Cre マウスの正中領域にアポトーシス活性が認められ(図3)、正中マーカである eHAND の発現も減少していた(図4)。いかなるシグナルが下顎正中で変化しているか検索するために、in situ hybridization と免疫染色をおこなった。Fgf と Bmp シグナルに大きな変化は認められなかった(図5)。Hh シグナルのマーカである Gli1 が Dicer^{fl/fl};Wnt1Cre マウスの下顎で著しく減少しており、qPCR でもその現象を確認した(図6)。Dicer^{fl/fl};Wnt1Cre マウスの下顎の正中領域で、Hh シグナルのインヒビターである Ptch1 の発現上昇が認められた(図6)。Dicer^{fl/fl};Wnt1Cre マウスの下顎正中の裂形成が Hh シグナルの減少によるものであるかを検索するために、Hh シグナルが神経堤由来細胞でのみ欠損しているマウス(Smo^{fl/fl};Wnt1Cre マウス)を作成し検索した。その結果、胎生 11.5 日の Smo^{fl/fl};Wnt1Cre マウスの下顎に Dicer^{fl/fl};Wnt1Cre マウスと類似した正中の表現型が認められた(図7)。これらの結果より、Dicer^{fl/fl};Wnt1Cre マウスの下顎正中の裂形成は、microRNA の欠損により、Ptch1 の発現が上昇し、それにより Hh シグナルの活性が抑制されたことによるものと示唆された。

Dicer^{fl/fl};Wnt1Cre マウスの下顎正中に裂の表現型が確認できる胎生 11.5 の直前の胎生 10.5 日の WT の下顎にいかなる microRNA が発現するか、single-channel のマイクロアレイで確認したところ、約 400 の microRNA の発現が確認された。それらのうちで、Ptch1 に結合する microRNA が存在するか PicTar, miRBase, TargetScan を用いて確認したところ、17 種類の microRNA (miR9-5p, miR3473e, miR326-5p, miR3473b, miR7647-3p, miR1199-5p, miR674-5p, miR1947-3p, miR3473d, miR181b-1-3p, miR668-3p, miR8107, miR3064-3p, miR677-3p, miR494-3p, miR6481, and miR33-3p) が、Ptch1 に結合することが明らかとなった。それらのうちで、miR-326-5p と miR-3473b の下顎正中での発現を確認した(図8)。これらの microRNA の欠損が、Dicer^{fl/fl};Wnt1Cre マウスの下顎正中に裂の表現型につながったと考えられた。

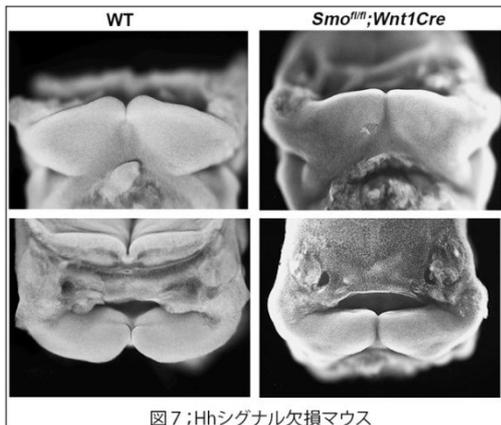


図7;Hhシグナル欠損マウス

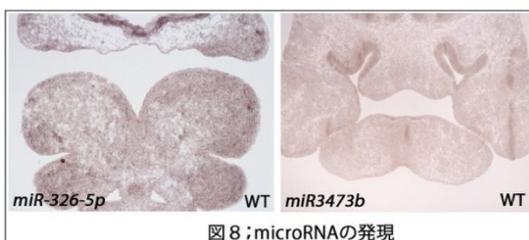


図8;microRNAの発現

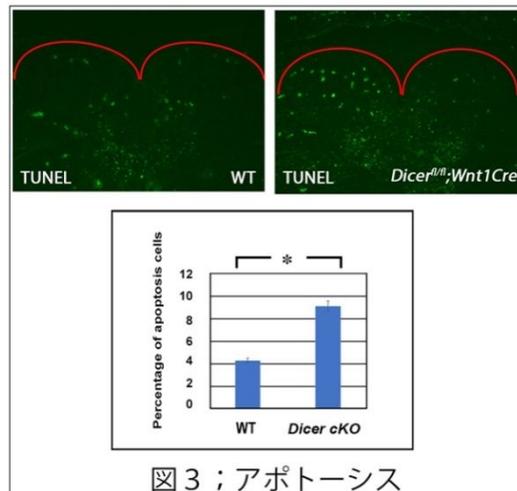


図3;アポトーシス

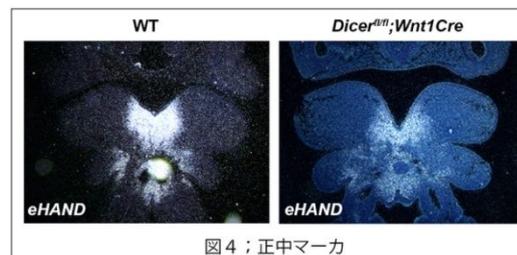


図4;正中マーカ

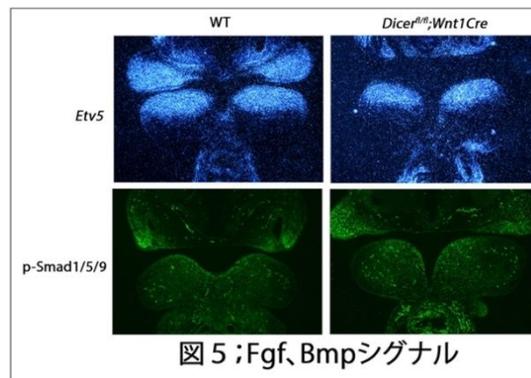


図5;Fgf、Bmpシグナル

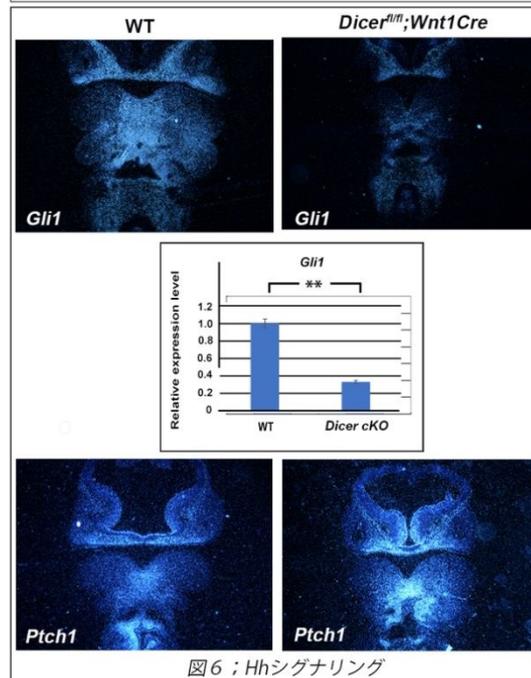


図6;Hhシグナリング

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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)	