

令和元年6月26日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19754

研究課題名（和文）多因子遺伝子疾患である非症候性口蓋裂の新たな治療・予防法に向けた応用基盤の構築

研究課題名（英文）Etiology of cleft palate as multifactorial inheritance disease

研究代表者

山城 隆 (yamashiro, takashi)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：70294428

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：口蓋裂の原因の一つとして、Tgfb3は口蓋上皮の癒合に重要であることは知られている。本研究によって、Stat3のリン酸化はTgfb3の発現を相方向で制御し、上皮の癒合に関与することが明らかになった。また、このStat3のリン酸化に、Jakの発現を負に制御するSocs3の発現が関与することが見出された。さらに、葉酸は、Cbfb上皮特異的ノックアウトマウスにおいて生じる口蓋前方部の口蓋裂を、pStat3レベルとTgfb3の発現が回復することで、口蓋裂をレスキューする。これらの所見から、今回、我々は新たに、Stat3-Tgfb3経路が口蓋の癒合に重要な役割を果たすことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口蓋裂の原因遺伝子は遺伝子改変動物の解析から多数の遺伝子が同定されている。それにも関わらず、口蓋裂が多因子遺伝子疾患であることを説明する分子機構は解明されていない。本研究によってStat3-Tgfb3シグナルが口蓋の癒合に関与することを明らかにした。このシグナルは、様々な分子経路や環境要因によって活性化される可能性があるため、口蓋裂が多因子遺伝子疾患である分子機序に関与していると示唆される。

研究成果の概要（英文）：It is established that Tgfb3 is important in the palatal fusion. The present study demonstrated that Stat3 phosphorylation regulated the Tgfb3 mRNA expression at the fusion palatal epithelium and was consequently involved in the epithelial fusion. Furthermore, Socs3, an inhibitor of Stat3, regulated the region of Stat3 phosphorylation in palatogenesis. On the other hand, maternal folic acid supplementation has been shown to be as an effective intervention for reducing the risk of non-syndromic cleft palate. The present study showed that the anterior cleft palate in Cbfb mutants was rescued by pharmaceutical application of folic acid that activates suppressed Stat3 phosphorylation and Tgfb3 expression in vitro. Together, the rescue of the mutant cleft palate using folic acid may elucidate potential therapeutic targets by Stat3 modification for the prevention and pharmaceutical intervention of cleft palate.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：Stat3 Tgfb3 口蓋裂 癒合 口蓋上皮 葉酸 レスキュー

1. 研究開始当初の背景

上皮特異的 Runx1 ノックアウトマウス、上皮特異的ノックアウト Cbfb マウスのいずれにおいても、一次口蓋に相当する前方部特異的に口蓋裂が生じる。このマウスでは、一次口蓋部において Tgfb3 の発現が特異的に減少した(図1)。TGFB3 タンパクを加えると、口蓋裂が *in vitro* で改善することから、Runx1/Cbfb が Tgfb3 の発現を制御することで、口蓋前方部の癒合が制御されることが明らかになった。しかし、一方、Runx1 の遺伝子発現パターンは、前方部に限局しておらず、表現型が口蓋の前方部に特異的に限局する分子機構は未だ不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的はいまだ解明されていない多因子遺伝子疾患の根底にあるメカニズムを明らかにすることである。特に、様々な誘因因子による生体への影響が蓄積し、その影響がいかにして病態発症の閾を超えるのか Jak/Stat3 情報伝達系に着目して討する。さらに、ここで得られた知見をもとに次世代の口蓋裂の治療法予防法としての用基盤を構築することを目標とする。

3. 研究の方法

本研究はで、上皮基底特異的 Runx1 ノックアウトマウス (K14-Cre;Runx1^{f1/f1};以降 Runx1 マウス)、上皮基底特異的 Cbfb ノックアウトマウス (K14-Cre;Cbfb^{f1/f1};以降 Cbfb マウス) を用いる。これらの組織を使ったマウス器官培養系や *in vivo* 実系を用いて口蓋突起の癒合のメカニズム検討した。また、蓋組織の器官培養系にて、口蓋裂の環境要因であるアルコール、ニコチン、フェニトイン、ダイオキシシン等が Jak/Stat3 情報伝達系を制御する可能性があるかを検討する。さらに、口蓋裂の発症を抑える環境要因である葉酸が Jak/Stat3 情報伝達系に及ぼす影響についても検討した。

4. 研究成果

Runx1 マウス、Cbfb マウスのいずれにおいても、一次口蓋に相当する前方部特異的に口蓋裂が生じる。これは過去に我々が報告した Runx1 の遺伝子改変動物における口蓋裂の表現型と同様であった。

このマウスにおいては、一次口蓋部において Tgfb3 の発現が特異的に減少した(図1)。一方、Runx1 の遺伝子発現パターンは、前方部に限局しておらず、何らかの分子が Runx1 による Tgfb3 の発現制御に関与していると考えられた。そこで、ガンの発症において Runx1 の下流で作用する Stat3 のリン酸化について検討したところ、興味深いことに、1 次口蓋相当部における Stat3 のリン酸化が著しく減弱することを見出した(図2)。

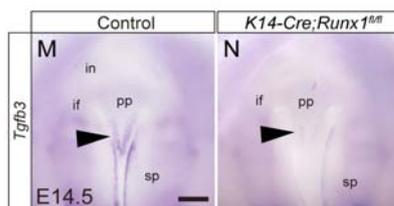


図1 Runx1 マウスにおける Tgfb3 の発現

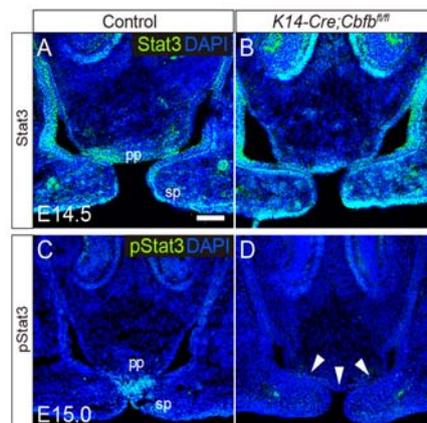


図2 Runx1 マウスにおける Stat のリン酸化

一方、TGFB3 タンパクは Stat3 のリン酸化を異所性に誘導した(図3)。このことから、Stat3 のリン酸化と Tgfb3 の発現は双方向に制御していることが明らかになった。さらに、Stat3 の阻害剤を用いた実験から、Stat3 シグナルを阻害すると Tgfb3 の発現が抑制され、器官培養系において口蓋の癒合を阻害した。このことから、Stat3 のリン酸化が Tgfb3 を制御することが明らかになった(図4)。

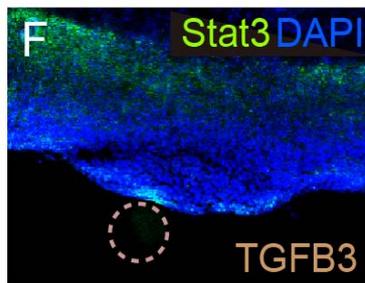


図3 TGFB3 による pStat3 の誘導

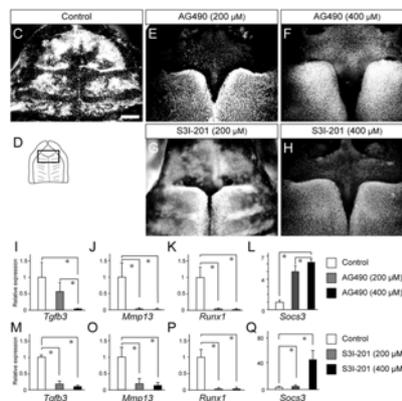


図4 Stat3 阻害剤と Tgfb3 の発現

しかしながら、Runx1 のノックダウンによって、なぜ Stat3 のリン酸化が抑制されるのかは、やはり不明であった。そこで、過去にマイクロアレイ解析によって、Runx1 のノックダウンによって亢進した Socs3, Socs4 に着目した。これらの分子は JAK に作用することで、Stat シグナルを負に制御することが知られている。その結果、Socs3 は野生型マウスにおいて一次口蓋に特異的に発現しており、Runx1 のノックダウンによって、その発現がさらに亢進することが in situ hybridization および qPCR で確認された(図5)。

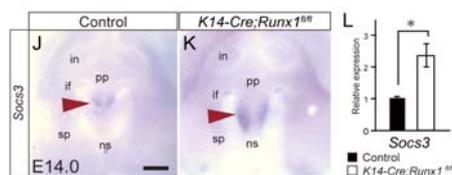


図5 Runx1 マウスにおける Socs3 の発現

Stat3 は様々な生命機能の中継する分子として知られており、さまざまな遺伝子改変動物において、そのリン酸化が変動することが知られている。一方、Stat3 のリン酸化は、細胞外環境によって影響を受けることが知られており、環境要因によってその働きが制御されている。

葉酸は口蓋裂の発症を予防することが知られているが、最近では Stat3 を活性化することが報告されている。そこで Cbfb マウスで生じる口蓋裂について、葉酸の投与によって回復を試みた。その結果、葉酸の投与は有意に口蓋裂の発症を回復し、さらに Stat3 のリン酸化と Tgfb3 の発現を亢進させることを見出した(図6-1、-2)。

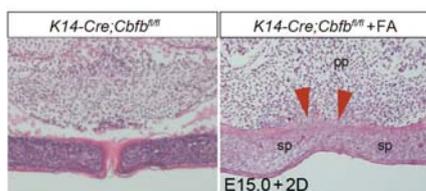


図6-1 葉酸による Cbfb マウスの口蓋裂の回復

Treatment	Rescue ratio
<i>Cbfb</i> mt	0% (0/6)
<i>Cbfb</i> mt + FA	67% (4/6)

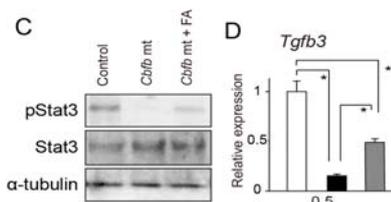


図6-2 葉酸による Cbfb マウスの口蓋裂の回復

本研究によって Stat3-Tgfb3 シグナルが口蓋の癒合に関与することを明らかにした。このシグナルは、様々な分子経路や環境要因によって活性化される可能性があるため、口蓋裂が多因子遺伝子疾患である分子機序に関与していると示唆される。さらに、この Stat3 のリン酸化に、Jak の発現を負に制御する Socs3 の発現が関与することを見いだした。興味深いことに、アルコール等の投与は Socs3 の発現レベルを動かせることから、口蓋裂の癒合に、Socs3 を介した、pStat3-Tgfb3 シグナル路が重要な役割を果たすことが示唆された (図 7)。

これらの所見から、今回、我々は新たに、Stat3-Tgfb3 経路が口蓋の癒合に重要な役割を果たすことを見出し、さらにこれを制御する Socs3 分子を同定した。この成果は口蓋裂の新たな治療法・予防法の確立のための基盤となることが期待される。

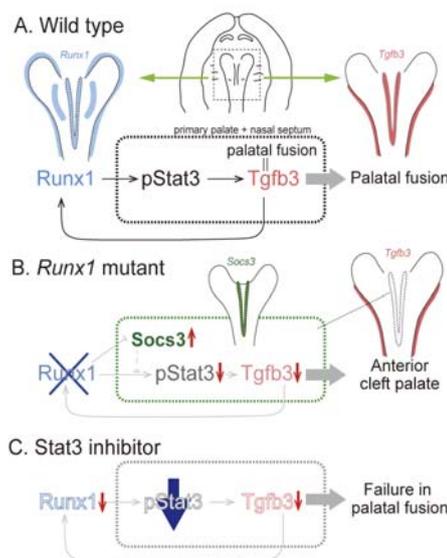


図 7 Stat3 による Tgfb3 の発現制御

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

- ① Anterior Cleft Palate due to Cbfb deficiency and its rescue by folic acid. Sarper SE, Inubushi T, Kurosaka H, Ono Minagi H, Murata Y, Kuremoto K, Sakai T, Taniuchi I, Yamashiro T, Dis Model Mech, 査読有, 2019, in press.
doi: 10.1242/dmm.038851.
- ② Observation of dynamic cellular migration of the medial edge epithelium of the palatal shelf in vitro. Aoyama G, Kurosaka H, Oka A, Nakatsugawa K, Yamamoto S, Sarper SE, Usami Y, Toyosawa S, Inubushi T, Isogai Y, Yamashiro T, Frontiers Physiology, 査読有, 2019 in press.
doi.org/10.3389/fphys.2019.00698.
- ③ Sarper SE, Kurosaka H, Inubushi T, Ono Minagi H, Kuremoto KI, Sakai T, Taniuchi I, Yamashiro T. Runx1-Stat3-Tgfb3 signaling network regulating the anterior palatal development. Sci Rep, 査読有, 2018 25:8(1):11208.
doi: 10.1038/s41598-018-29681-3.
- ④ Sarper SE, Inubushi T, Kurosaka H, Ono Minagi H, Kuremoto KI, Sakai T, Taniuchi I, Yamashiro T. Runx1-Stat3 signaling regulates the epithelial stem cells in continuously growing incisors. Sci Rep, 査読有, 2018 19:8(1):10906.
doi: 10.1038/s41598-018-29317-6.

〔学会発表〕 (計 4 件)

- ① Sarper SE, Kurosaka H, Mihara K, Ono H, Yamashiro T: Cbfb is involved in the

anteriorly Specific Palatogenesis, 97th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research. March 22-25, 2017, San Francisco.

- ② Sarper SE, Kurosaka H, Ono Minagi H, Sakai T, Yamashiro T: Runx/Cbfb signaling regulating Stat3 during enamel formation, Oral and Craniofacial Development and Disease 2017, November 17, 2017, Osaka
- ③ Sarper SE, Kurosaka H, Ono Minagi H, Sakai T, Yamashiro T: Runx1-Stat3-Tgfb3 signaling network regulating the anterior palatal development, Oral and Craniofacial Development and Disease 2017, November 17, 2017, Osaka
- ④ Safiye Esra Sarper、黒坂 寛、小野皆木瞳、山城 隆 : Runx signaling is specifically involved in the fusion anterior palate by regulating Tgfb3 signaling、第40回日本分子生物学会年会、2017年、12月6-9日、兵庫

〔図書〕（計 0件）

なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

なし

○取得状況（計 0件）

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

黒坂 寛（大阪大学）

KUROSAKA, Hiroshi

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：20509369

三原 聖美（大阪大学）

MIHARA, Kiyomi

大阪大学・大学院歯学研究科・招へい教員

研究者番号：00551920

(2) 研究協力者

なし