

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24071

研究課題名(和文) 下顎骨の発生過程におけるヒアルロン酸の役割の解明

研究課題名(英文) The role of hyaluronic acid during mandibular development

研究代表者

吉川 浩史 (Yohikawa, Hiroshi)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：10848253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、神経堤細胞特異的(Wnt1-Cre)あるいはタモキシフェン誘導性(CreERT2)のヒアルロン酸合成酵素2(Has2)のコンディショナルノックアウト(CKO)マウスを作製した。神経堤細胞特異的Has2 CKOマウスではE15.0～出生時において上下顎骨の劣成長が認められた。また、タモキシフェンにてE12.5で誘導したE14.5のCKOマウスで軟骨原基等に形成阻害は認められなかったが、E15.5で誘導したE17.5のCKOマウスでは上下顎骨・四肢・肋骨の短小化を認めた。これらにより、下顎骨を含む全身骨格の内軟骨骨形成過程にヒアルロン酸が大きな役割を担っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小顎症は咬合異常や審美障害のみならず、気道閉塞によって生死に関わる重大な疾患である。下顎骨は分子生物学的に時空間的に多様な制御を受けて複雑な成長様式を示しており、小顎症発症のメカニズムの全容は未だ明らかになっていない。近年、機能的糖鎖ともいわれるヒアルロン酸の、器官形成における役割が着目されている。本研究においても、HA合成の欠失が下顎骨を含む全身骨格の内軟骨骨形成過程を阻害することがわかった。今後、これらの分子制御メカニズムの解明がさらに進んでいくことで、分子診断方法の確立だけでなく、補充療法や遺伝子治療等の新規治療法の開発の糸口となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated hyaluronan synthase 2 (Has2) conditional knockout (CKO) mice with neural crest cell-specific (Wnt1-Cre) or tamoxifen-induced (CreERT2). In neural crest cell-specific CKO mice, undergrowth of the maxilla and mandibular was observed from E15.0 to birth. In addition, no inhibition of cartilage primordia formation was observed in E10.5-induced tamoxifen-induced E14.5 CKO mice. But in E15.5-induced tamoxifen-induced E17.5 CKO mice, their maxilla and mandibular and limbs shortened. These results suggest that hyaluronic acid synthesis plays a major role in the endochondral ossification process throughout body, including the mandibular.

研究分野：矯正・小児系歯学

キーワード：ヒアルロン酸 HAS2 下顎骨 軟骨 発生学 ゲノム医科学 分子生物学

1. 研究開始当初の背景

小顎症は咬合異常や審美障害のみならず、下顎の後退位に起因する気道閉塞を併発するリスクがある。気道閉塞は乳児死亡の原因となり、睡眠時無呼吸症候群(OSAS)によるQOLの著しい低下や全身疾患を合併するリスクが増加するという問題がある。下顎骨は発生段階において多様な分子制御メカニズムの影響を受けながら、三次元的に複雑な成長過程を経る器官である。そのため、小顎症発症のメカニズムの全容は未だ明らかになっていない。歯科臨床医学の見地だけでなく基礎医学的にも、これら先天異常の原因究明とさらなる病態解明は極めて重要である。

近年、ゲノムワイド関連解析の進歩により、一定の症候を持つ家系のゲノムを網羅的に探索することが可能となった。ヒアルロン酸分解酵素であるヒアルロニダーゼ2(HYAL2)をコードする遺伝子に欠失が生じている家系において、特徴的な臨床症状として小顎症があることが報告された(引用文献)。

ヒアルロン酸(以下,HA)は、分子量800~900 kDaの多糖体で、生体内の多くの組織や器官に分布している。HA合成酵素(HAS)が同定されて以来、*Has*のノックアウト(KO)マウスを用いた研究により、HAの生物学的機能が明らかになってきた。HAは単なる組織のショックアブソーバーではなく、遊走、増殖、分化といった細胞機能の制御に関与していると考えられている。特に、四肢特異的*Has2*コンディショナルノックアウト(CKO)マウスでは関節軟骨の形成異常による四肢の著しい短小化が認められることが報告されている(引用文献)。このことから、内軟骨性骨化を介した骨格形成においてHAが極めて重要な働きをしていることが示唆される。そのため、下顎の発生過程においてもHAが重要な役割を果たしていると考えられるが、軟骨原器の形成からなる一連の下顎骨の発生過程において、HAがどのような役割を担っているかについて報告はない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、HAの欠損が下顎骨の形成に与える影響を明らかにすることである。下顎骨の発生過程におけるHAの時空間的な関与を解明することにより、小顎症の発症における分子制御メカニズムの一部を解明する。それにより分子診断方法の確立だけでなく、補充療法や遺伝子治療等の新規治療法の開発の糸口とすることを目標とする。

3. 研究の方法

胎生期における*Has2*の発現・局在の確認

下顎骨の発生過程において*Has2*遺伝子が発現していることを確認するために、胎生9.5日(E9.5)、10.5の野生型マウス胎児を用いた*In situ hybridization*法にて解析した。

Has2 CKOマウスを作製

*Has2*のKOマウスはE9.5頃において心臓の形成不全により胎生致死であることが報告されているため、部位特異的あるいは時期特異的に*Has2*をKOする必要がある。Cre/loxPシステムを用いて*Has2*を選択的にKOするため、*Has2*のfloxedマウスとCre発現マウスを交配させて*Has2*CKOマウスを作製した。研究開始当初はタモキシフェン誘導性軟骨細胞特異的(Col2a1-CreERT2)*Has2*CKOマウスを作製する予定であったが、下顎骨は神経堤細胞から分化した軟骨細胞や骨芽細胞によって形成されるため、予定を変更して神経堤細胞特異的(Wnt1-Cre)*Has2*CKOマウスを作製した。また、心臓の形成期以降の任意の時期に*Has2*をKOするために、タモキシフェン誘導性(CreERT2)*Has2*CKOマウスを作製した。

HAS2の欠失が下顎骨の形成に及ぼす影響の解析

作製した*Has2*CKOマウスを、様々なステージ(E11.5~E17.5, P0)で解析した。採取したサンプルの表現型を確認した。

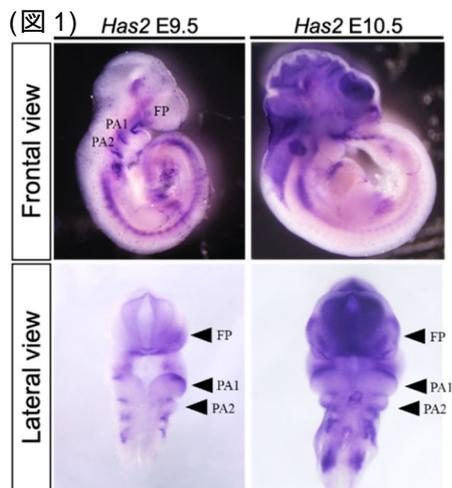
アルシアンブルー・アリザリンレッド二重染色による骨格標本作製し、下顎骨を含む全身骨格を解析した。

4. 研究成果

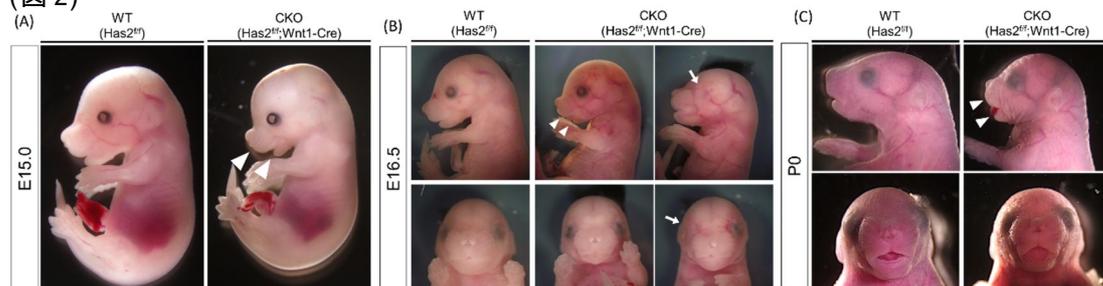
結果 . E9.5, E10.5の野生型マウス胎児における*Has2*遺伝子の発現を*In situ hybridization*法にて解析した。その結果、E9.5では顔面突起(FP)、下顎骨の由来となる第一鰓弓(PA1)および

第二鰓弓(PA2)において発現が見られた。E10.5ではE9.5に比べて発現は強くなっており、顔面突起(FP)、第一鰓弓(PA1)、第二鰓弓(PA2)などで強発現が認められた(図1)。

結果 . $Has2^{f/f}; Wnt1-Cre^{+/-}$ と $Has2^{f/f}; Wnt1-Cre^{-/-}$ のマウスを交配させた同腹子について比較した。E15.0において神経堤細胞特異的CKOマウス($Has2^{f/f}; Wnt1-Cre^{+/-}$)はコントロールマウス($Has2^{f/f}; Wnt1-Cre^{-/-}$)と比較して上下顎の劣成長が認められた(図2A)。E16.5においても神経堤細胞特異的CKOマウスでは、既に著明な上下顎骨の低形成を認め、一部では目の形成不全や外脳症を認めた(図2B)。また、出生後すぐ(P0)の神経堤細胞特異的CKOマウスは死亡しており、上下顎の著しい劣成長が認められた(図2C)。

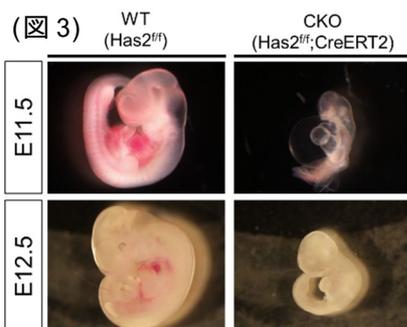


(図2)

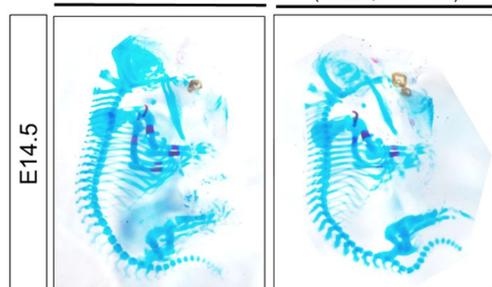


結果 , $Has2^{f/f}; CreERT2^{+/-}$ と $Has2^{f/f}; CreERT2^{-/-}$ のマウスを交配させた同腹子について比較した。妊娠8.5日の母体マウスにタモキシフェンを投与し、E11.5およびE12.5のマウスを確認したところ、タモキシフェン誘導性CKOマウス($Has2^{f/f}; CreERT2^{+/-}$)はコントロールマウス($Has2^{f/f}; CreERT2^{-/-}$)と比較して、心臓や全身骨格の形成が明らかに阻害されていた(図3)。

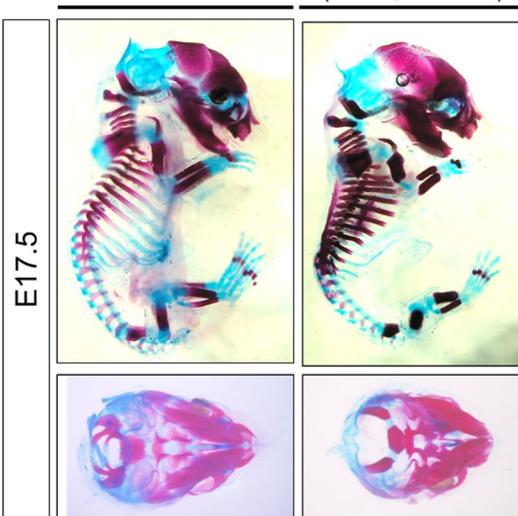
また、妊娠12.5日目の母体マウスにタモキシフェンをoral gavageにより投与してE14.5の、妊娠15.5日目の母体マウスにタモキシフェンを投与してE17.5の、それぞれの骨格標本を作製して全身骨格を比較した。 $Has2$ CKOマウスの骨格形成に関して、胎生14.5日目における軟骨原基の形成に大きな差はみられなかった(図4)。また胎生17.5日目のマウスにおいては、四肢の長管骨、肋骨および上下顎骨の短小化がみられた(図5)。下顎骨に関して、長径は減少するが、幅径は増加する傾向を認めた。



(図4) WT ($Has2^{f/f}$) CKO ($Has2^{f/f}; Wnt1-Cre$)



(図5) WT ($Has2^{f/f}$) CKO ($Has2^{f/f}; Wnt1-Cre$)



以上の結果から、下顎頭を含む全身骨格の内軟骨骨形成過程における成長方向について、HAS2が大きな役割を担っていることが示唆された。現在さらに細かなステージにおける解析を進めており、HAによる下顎骨形成過程に対する制御機構に関して、今後さらなる組織学的・三次元形態学的解析検討を進める必要がある。

<引用文献>

Muggenthaler MMA, Chowdhury B, Hasan SN, Cross HE, Mark B, Harlalka GV, et al. , Mutations in *HYAL2*, Encoding Hyaluronidase 2, Cause a Syndrome of Orofacial Clefting and Cor Triatriatum Sinister in Humans and Mice. *PLoS Genet* 13(1) 2017: e1006470-1006486

Kazu Matsumoto, Yingcui Li, Caroline Jakuba, Yoshinori Sugiyama, Tetsuya Sayo, Misako Okuno, Caroline N. Dealy, Bryan P. Toole, Junji Takeda, Yu Yamaguchi, Robert A. Kosher; Conditional inactivation of Has2 reveals a crucial role for hyaluronan in skeletal growth, patterning, chondrocyte maturation and joint formation in the developing limb. *Development*. 136 (16) 2009; 2825-2835.

Muggent Moffatt P, Lee ER, St-Jacques B, Matsumoto K, Yamaguchi Y, Roughley PJ. Hyaluronan production by means of Has2 gene expression in chondrocytes is essential for long bone development. *Dev Dyn*. 240(2) 2011: 404-12.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hiroshi Yoshikawa , Chihiro Tanikawa , Jae Yoen Lim , Toshihiro Inubushi , Yosuke Tsukiboshi , Takashi Yamashiro
2. 発表標題 3D Analysis of Characteristics in Class II Patients
3. 学会等名 The 9th Internatinal Orthodontic Congress (9th IOC), Online (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroshi Yoshikawa, Chihiro Tanikawa, Jae Yoen Lim, Yosuke Tsukiboshi, Shinsuke Ito, Toshihiro Inubushi, Takashi Yamashiro
2. 発表標題 A Landmark-based Analysis of Three-dimensional Images in Class II Patients
3. 学会等名 2020 IADR/AADR/CADR General Session (Washington, D.C., USA), 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉川 浩史, 谷川 千尋, 伊藤 慎将, 月星 陽介, 石井 瞳, 嘉ノ海 龍三, 山城 隆
2. 発表標題 日本人における三次元セファロ分析 標準値の作製と顎変形症患者の手術前後の変化
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会学術大会
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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------