

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18753

研究課題名（和文）強直症の発症メカニズム解明

研究課題名（英文）Clarification of mechanism in ankyloglossia

研究代表者

藤田 瑛（Fujita, Akira）

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：90847188

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：舌小帯は、発音や歯列形成に影響を与える非常に重要な構造体であり、その異常は強直症などの疾患を引き起こす。しかし、舌小帯がどのように形成されるかは全く明らかとなっていない。その理解には、分子レベルでの検索が必要である。本研究結果から、Lgr5、Tbx22、Osr2の発現が重なった最も近心部位が小帯形成細胞群であり、それらの細胞が、lingual-buccal axisで移動することで、舌小帯が形成されることが明らかとなった。その細胞移動が障害されると、異常な舌小帯形成が生じ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

歯列、発音、口腔清掃は、舌小帯の形態に大きな影響を受ける。舌小帯が高位であったり、短い場合には、発音障害や歯列不正など様々な問題を引き起こす。舌小帯の治療後に、発音障害、歯列不正が残存した場合、その処置には長い時間を要することがある。将来、異常な舌小帯を予測し、早期に対処することが望ましいが、舌小帯の形成メカニズムは全く明らかとなっていない。分子レベルでの本研究結果は、今まで分子生物学的知見がほとんどなかった舌小帯に新たな展開をもたらし、舌小帯異常の新たな治療法や再生療法の基盤的知見となる。

研究成果の概要（英文）：The tongue frenum is crucial structure, since it is involved in pronunciation and formation of dentition. Aberrant tongue frenum induce several diseases including ankyloglossia. However, it remains unclear how tongue frenum is formed. Understanding molecular level of tongue frenum formation is important for elucidating mechanisms of tongue frenum formation. Cells in most anterior part of Lgr5/Tbx22/Osr2 expressing region were found to migrate along lingual-buccal axis to form the tongue frenum. Disruption of the cell migration resulted in aberrant tongue frenum.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：舌小帯

1. 研究開始当初の背景

舌小帯は、歯列、発音、口腔清掃などの歯科において重要な因子に影響を与える構造体である。舌小帯が短い場合には舌の機能が障害され、発音、咀嚼に大きな影響を与える。いわゆる強直症である。強直症に対する処置は、小帯の切除となる。処置そのものは簡単であるが、切除によって即座に症状が緩和する場合もあれば、切除しても歯列不正や発音障害が残存する場合もある。残存する際には、矯正治療や発音指導が必要となり、時に長い治療期間を要する。処置そのものが簡単であるが故、乳児期に予防的に切除してしまえば小帯がないため、強直症による歯列不正や発音障害は生じない。しかし、全ての乳児の全ての小帯を盲目的に切除することは現実的ではない。強直症による歯列不正や発音障害を回避するような方策が期待されている。将来、強直症となる小帯を識別できれば、1歳児検診などの際に選択的に切除することで、強直症による弊害は世の中から消滅する。そのためには、舌小帯の発生メカニズムの把握が重要となるが、その報告はほとんどない。強直症に対する治療が小帯の切除と極めて簡単であったため、強直症を大きな問題と捉えることはなかったことが原因と考えられる。このように、舌小帯は基礎研究から興味をもたれることのなかった構造体である。一方、Ehlers-Danlos 症候群、Infantile hypertrophic pyloric stenosis、Oro-facial-digital 症候群、Ellis-van Creveld 症候群などの複数の遺伝性疾患の患者に強直症が認められ、強直症が、偶然引き起こるものではなく、分子レベルでの不具合によって、必然的に引き起こるものであることを示している。つまり、小帯は厳密な遺伝子のコントロールによって形成されるものであることを意味する。

2. 研究の目的

舌小帯の形成分子メカニズムは、いかなるものであるのか？どのような不具合が強直症の原因となる小帯を引き起こすのか？を明らかにすることを、本研究の目的とした。

3. 研究の方法

Oral-facial-digital type I 症候群の患者にも強直症は認められる。原因遺伝子として、Ofd1 という遺伝子が同定されている。Ofd1 を全ての細胞から欠損させたマウスでは、胎生期の非常に初期に致死となり、舌小帯研究には使用できない。そこで、Ofd1 の欠損部位を局限させるために、Cre-LoxP システムを用いて、Ofd1 欠損マウスを作成し、形態的、分子的検索を行った。また、Cre の発現の検索のために、R26R マウスも Cre-LoxP システムへと使用した。

4. 研究成果

Osr2Cre マウスを使用して Ofd1 欠損マウス ($Ofd1^{fl/fl}; Osr2Cre$) を作成した所、舌小帯の欠損を認めた (図 1)。つまり、舌小帯の形成に、Osr2Cre の発現領域の細胞が関与している事を示している。そのことを確認するために、Osr2Cre と R26R マウスを交配し、Osr2Cre 発現細胞を検索した。初めに、舌小帯が形成された直後の胎生 12 日の形成された舌小帯を確認したところ、舌小帯部に

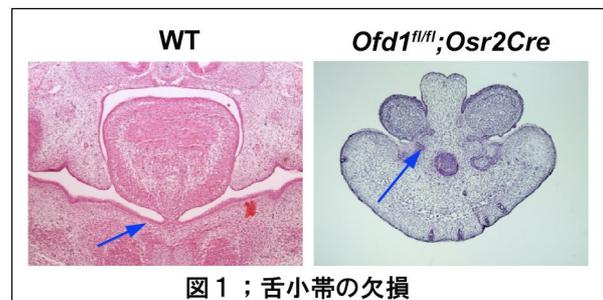


図 1 ; 舌小帯の欠損

Osr2Cre 発現細胞が確認された (図 2)。次に、舌小帯形成以前における Osr2Cre 発現細胞の部位を検索したところ、胎生 10 日の下

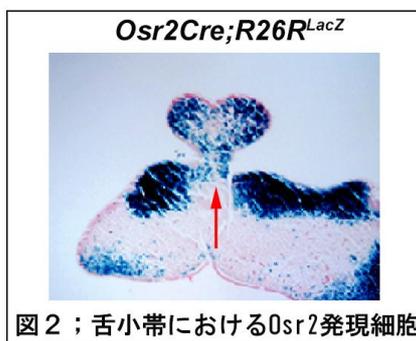


図 2 ; 舌小帯における Osr2 発現細胞

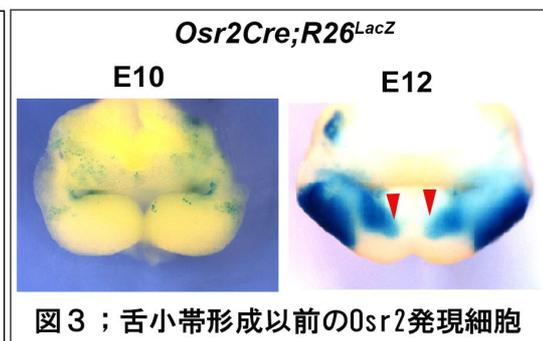


図 3 ; 舌小帯形成以前の Osr2 発現細胞

顎に Osr2Cre 発現細胞は認められず、舌小帯形成直前の胎生 11 日に、Osr2Cre 発現細胞が観察された (図 3)。舌小帯のある正中での Osr2Cre の発現は観察されなかった。Lgr5 または Tbx22 の欠損が、舌小帯の異常を引き起こすことが過去に報告されている (Lgr5; Mol Cell Biol. 2004

Nov;24(22):9736-43., Tbx22; Hum Mol Genet. 2002 Oct 15;11(22):2793-804.)。つまり、Lgr5 と Tbx22 発現細胞が舌小帯の形成に関わっていることを示している。そこで、Lgr5 と Tbx22 の whole mount in situ hybridization を行なったところ、Lgr5、Tbx22、Osr2Cre の 3 つがオーバーラップする部位が胎生 11 日の下顎突起に認められた(図 4)。この Lgr5/Tbx22/Osr2 発現部位の細胞が舌小帯を形成していると考えられる。

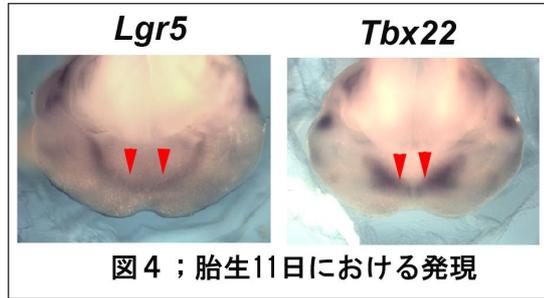


図 4 ; 胎生11日における発現

興味深いことに、図 1 で示した舌小帯が欠損している Ofd1^{fl/fl};Osr2Cre マウスの同一個体の遠心部で、舌小帯が形成されているのを認めた(図 5)。舌は、antero-



図 5 ; 図 1 の同一個体の遠心部位における舌小帯

posterior 方向

で形成されることは知られているが、Ofd1^{fl/fl};Osr2Cre マウスの表現型は、舌小帯が lingual-buccal 方向で形成される可能性を示している。そこで、舌小帯が lingual-buccal 方向で形成されるかを検索するために、DiD による fate mapping 実験を行った。舌小帯が形成される以前の Lgr5/Tbx22/Osr2 発現部位に DiD で細胞をラベリングして、下顎突起を培養した。その結果、ラベリングされた DiD は

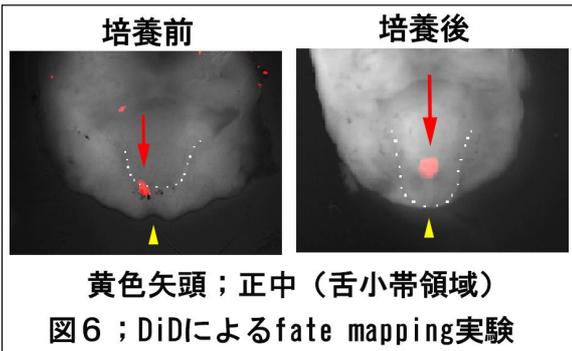


図 6 ; DiDによるfate mapping実験
黄色矢頭; 正中(舌小帯領域)

lingual-buccal 方向で移動し、舌小帯領域に集積した(図 6)。以上のことから、舌小帯は、Lgr5/Tbx22/Osr2 発現部位の細胞が、胎生 11 日から 12 日にかけて、lingual-buccal 方向で移動しながら形成されることが明らかとなった。舌小帯の欠損などによって生じる強直症が、Lgr5/Tbx22/Osr2 発現部位の細胞の移動が阻害されたことにより引き起こるかを検索するために、Lgr5/Tbx22/Osr2 発現部位と舌小帯が形成される正中部との間に、メスで溝をつけ、組織の連続性を断った状態で、下顎突起の器官培養を行った。その結果、連続性を有する下顎では、舌小帯の形成が認められたのに対し、連続性を断った下顎には舌小帯の形成は認められなかった(図 7)。

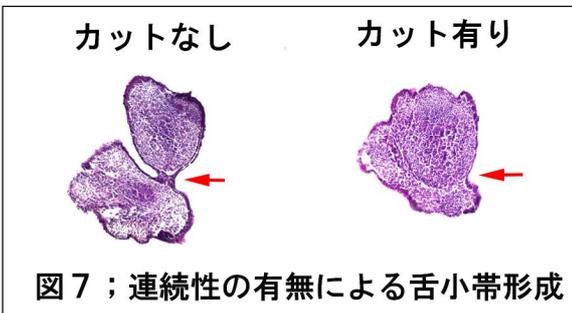


図 7 ; 連続性の有無による舌小帯形成

以上のことから、舌小帯は Lgr5/Tbx22/Osr2 発現領域の細胞が、lingual-buccal 方向で正中領域に移動しながら形成され、その移動に障害が生じた場合、強直症が生じることが示された。症候群における強直症は移動の障害を司る遺伝子欠損に原因があり、非家族性の強直症は物理的に生じた移動の障害によって引き起こされると考えられる。これらの知見は、強直症の予測のための基盤的知見となる。

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kudo Takehisa, Kawasaki Maiko, Kawasaki Katsushige, Meguro Fumiya, Nihara Jun, Honda Izumi, Kitamura Madoka, Fujita Akira, Osawa Kazuaki, Ichikawa Kaya, Nagai Takahiro, Ishida Yoko, Sharpe Paul T., Maeda Takeyasu, Saito Isao, Ohazama Atsushi	4. 巻 -
2. 論文標題 <i>regulates enamel formation via involving Shh signaling</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/odi.14162	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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------