

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592610

研究課題名（和文） 顔面骨格の形態パターンニングを制御する分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism to regulate the patterning of craniofacial skeleton.

研究代表者

川上正良（KAWAKAMI MASAYOSHI）

奈良県立医科大学・医学部・学内講師

研究者番号：20244717

研究成果の概要（和文）：顎顔面は、胎生期に顔面突起の増殖と癒合により形成される。様々な転写因子やシグナル分子が正確かつダイナミックに伝達され、顔面突起の成長をコントロールしている。LIM homeobox は、個体発生のボディプランとされる遺伝子群で、そのうち *Lhx8* 遺伝子は、上唇の癒合時に上顎突起と前頭鼻突起に特異的に発現することが明らかとなっている。今回われわれは、上顎突起における *Lhx8* 遺伝子発現のメカニズムを chick embryo を用いて、in situ hybridization と RT-PCR を用いた遺伝子定量を行って検討した。その結果、*Lhx8* 遺伝子は、上顎の形成に関与し、Retinoic acid や FGF を介した経路によって発現制御されていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Expression of the LIM homeodomain transcription factor *Lhx8* is restricted to and up-regulated in the mesenchyme of the upper face prominence before lip fusion. Since retinoid is a potential patterning influence on the developing face, we examined the regulation of *Lhx8* through retinoic acid (RA) in the maxillary prominence and detected signals that induce or repress *Lhx8* expression. Application of exogenous RA caused severe defects of the maxilla. Citral also induced a specific loss of derivatives from the maxillary prominences by blocking RA synthesis. In situ hybridization and RT-PCR analysis of the maxillary mesenchyme revealed that the expression of *Lhx8* was significantly down-regulated by RA as well as by Citral and FGF-8b whereas SU5402, a pan-FGF family antagonist, down-regulated the gene and caused defective maxillary morphogenesis and cleft lip. Our data suggest that *Lhx8* is regulated by RA signaling through FGF signals during tissue interactions of maxillary morphogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 矯正・小児系歯学

キーワード：歯科矯正学、形態発生

1. 研究開始当初の背景

唇顎口蓋裂をはじめとする顎顔面の形成異常について、これまで診断および治療に関する臨床的検討を行ってきた(Kawakami M, 2004)。顎顔面の形態異常患者を治療するには、これらの原因と発症のメカニズムを理解しておく必要がある。

顎顔面の形態異常は、個体発生のきわめて初期に求めることができる。脊索の神経堤細胞が腹側に遊走後、顔面突起を形成し、増殖と癒合を繰り返し、複雑な顔面骨格を形成していく。申請者は、上顎を形成する前頭鼻突起は、部位によって軟骨形成能が異なっており、後の上顎の形態に影響していることを明らかにした (Kawakami M, et al., 2006)。

LIM homeobox 遺伝子は、ボディプランとなる遺伝情報を考えられており、研究分担者の和中は、LIM 遺伝子のうち *Lhx6* と *Lhx8* は、脳底部と上顎・下顎に特異的に発現することから、顔面骨格の形成に関与することを示唆した(Wanaka A, et al, 1997)。申請者は、*chick* の *Lhx6*、*Lhx8* 遺伝子プローブを作成し、顔面突起の形成期から突起癒合完了までの遺伝子発現を検討した。その結果、*Lhx6*、*Lhx8* は上顎突起、下顎突起に限局して発現し、上皮直下の間葉細胞に認められた。また、*Lhx8* 遺伝子の発現は、前頭鼻突起と上顎突起が癒

合し口唇の形成が始まる時期に最も強くなり、上皮性の因子である FGF-8 や TGF-β3 により発現誘導されていることも明らかにした(Inoue M. et al., 2006)。

形態発生は、ボディプランとなる情報をもった遺伝子群によるものであり、欠損すると形態形成異常を引き起こす疾患遺伝子もいくつか発見されている。しかし、形態形成は、単一の遺伝子によるものではなく、いくつかの遺伝子や制御因子の相互作用によるものである。顎顔面は複雑な形態をとるため、これら遺伝子や制御因子の相互作用が強く示唆される。顎顔面の発生メカニズムについては、これまで形態的な観察が主で、分子レベル、遺伝子レベルの相互作用についてはあまり解明されていない。本研究は、複雑な顎顔面の形態形成のメカニズムを明らかにし、口唇裂や口蓋裂をはじめとする顎顔面の先天異常の発症機序を探るものである。

2. 研究の目的

本研究ではボディプランとなる遺伝情報とされる LIM homeobox 遺伝子のうち *Lhx8* について、顎顔面の形成時における機能と発現制御のメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

顎顔面の初期発生における *Lhx8* 遺伝子の働きを調べるため、*Lhx8* 遺伝子発現に関与するさまざまな制御因子の影響を検討した。

(1) Beads implantaion

Lhx8 遺伝子発現に影響を及ぼすと思われるさまざまな転写因子を beads に浸潤させ、*Lhx8* 遺伝子発現と顔面骨格形成の様相を観察した。

これまでの研究により、*Lhx8* は、stage 22HH 以降上顎突起での発現が強くなり、上顎突起と前頭鼻突起が癒合する時期に減弱することから、beads の埋入は stage 22HH の上顎突起に行った。作用させる因子は；

- ① Retinoic acid (RA)
- ② Citral (RA inhibitor)
- ③ FGF-8b
- ④ SU5402 (FGF antagonist)
- ⑤ DMSO (Control)

とした。

購入した種卵を Stage 22HH まで incubate したのち、卵殻に小窓を開け embryo を明示する。上記の因子成分を Beads (AG1X-2(Bio-Rad)) あるいは Affi-Gel-Blue beads (Bio-Rad) に浸潤させておき、実体顕微鏡下で、embryo の上顎突起に埋入した。埋入 6 時間後、24 時間後、48 時間後に embryo を摘出し、4%パラホルムアルデヒドに浸漬固定し、-20℃ 100%メタノール中に保存した。

(2) in situ hybridization

Henrique の方法に準じて wholemount in situ hybridization を行った。Probe はすでに作成済みの chick *Lhx8* probe (Inoue M, et al., 2006) あるいは、海外研究協力者 J.M. Richman より恵与された chick *Msx1*, *Msx2* probe を用いた (Kawakami M, et al., 2006)。

また、摘出した embryo を凍結標本あるいはパラフィン薄切標本を通法どおり作成し、組織標本上で in situ hybridization を行い、*Lhx8*

遺伝子発現の変化を観察した。

Lhx8 遺伝子発現が変化することにより、顎顔面形態にどのような影響があるか検討するため、embryo の発育をさらに継続させ、ほぼ顔面骨格が完成する Stage38HH の embryo を摘出した。TCA (trichloroacetic acid) で固定後 Alcian Blue と Alizarin Red の染色を行い、水酸化カリウムで軟組織を透明化し、顔面骨格および骨形成の状態を観察した。

また、Beads 埋入による器械的細胞障害の有無を検討するため、Nile Blue sulfate 染色を施し、beads 周囲の細胞死の様相を観察した。

(3) RT-PCR および real time RT-PCR

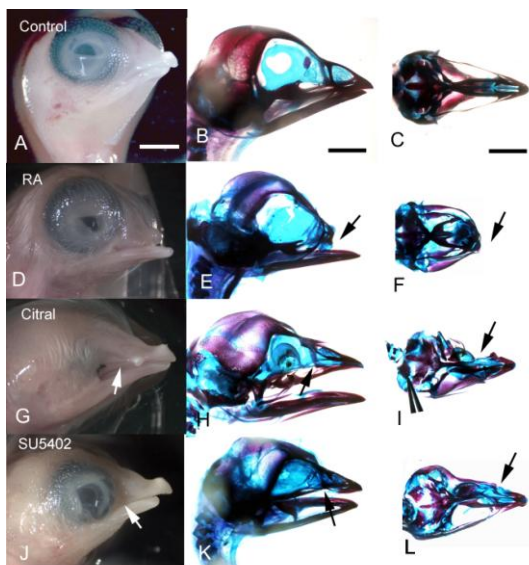
in situ hybridization で示された *Lhx8* 遺伝子発現の違いを定量評価するために、Beads 埋入 24 時間後の上顎突起を摘出し、Sepazol (Invitrogen) を用いて RNA を抽出した。SYBR Green Realtime PCR Master Mix (Toyobo) と QuatiTect Reverse Transcription kit (Qiagen) を用いて、GAPDH と *Lhx8* 遺伝子の発現比を算出した。

4. 研究成果

(1) 顔面形態への影響

RA、Citral、SU5402 beads を埋入したときの、Stage 38HH (孵卵直前) の Chick embryo の顔面形態を示す。

RA 投与した embryo では、上顎骨の前方が欠損し、著明な唇裂を呈していた (図 1 D,E,F)。RA の合成阻害剤 Citral を投与すると、投与側の上顎骨と口蓋骨が形成不全をおこし、眼球が陥没しているのが観察された (図 1 G,H,I)。また、FGF-8b の阻害剤 SU5402 を投与すると、上顎骨と口蓋骨の欠損を生じ、顎偏位を呈した (図 J,K,L)。しかし、FGF-8b を投与しても Chick embryo の顔面形態に著明な変化は見られなかった。



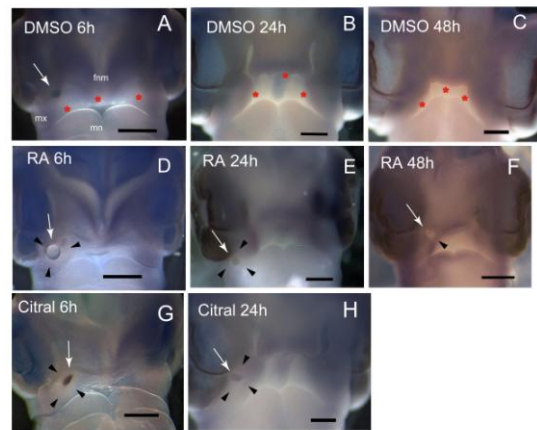
【図 1】

(2) RA、FGF-8b、BMP-4、SU5402 による遺伝子発現

(1) の形態変化のメカニズムを明らかにするために、Beads 埋入後の *Lhx8* 遺伝子発現の様相を in situ hybridization を用いて検討した。

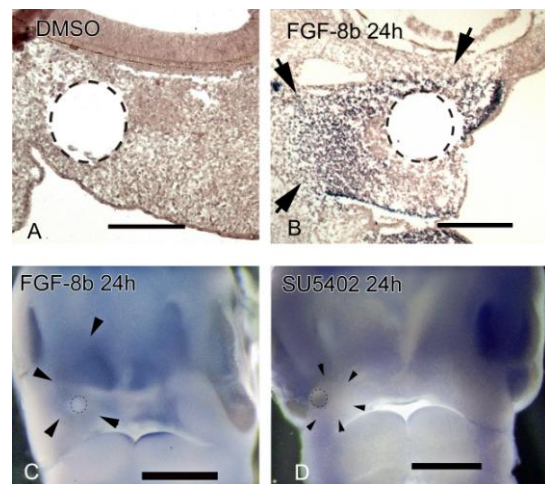
RA を投与すると、6、24、48 時間後の上顎突起における *Lhx8* 遺伝子の発現が減少した (図 2 D,E,F)。また、RA の合成阻害剤 Citral を投与すると 6、24 時間後の *Lhx8* 発現が減

少した。



【図 2】

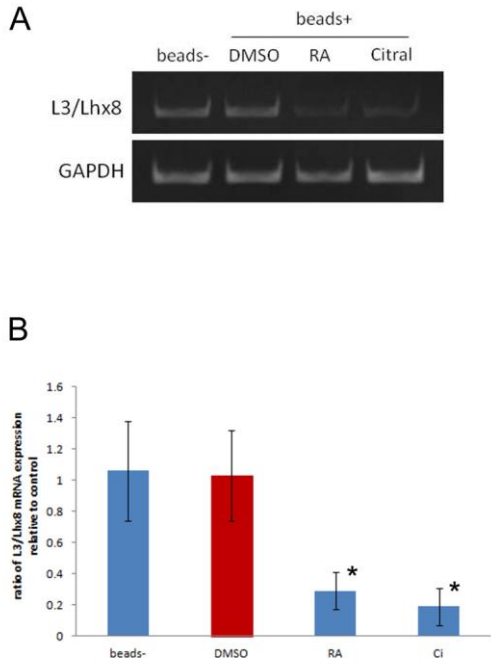
FGF-8b を投与すると 24 時間後の上顎突起における *Lhx8* の発現が増加したが (図 3 B,C)、FGF-8b の阻害剤である SU5402 を投与すると減少した (図 3 D)。



【図 3】

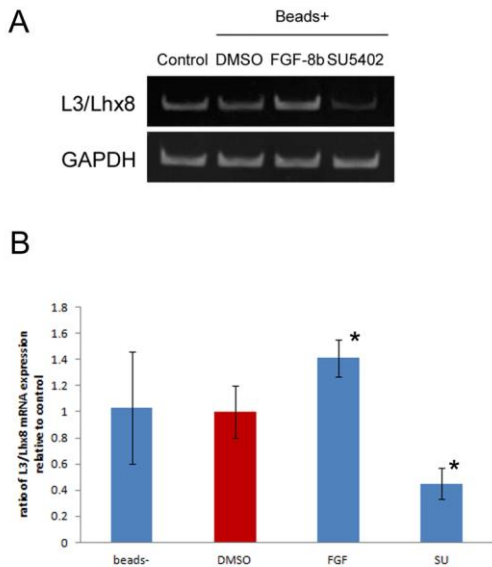
(3) RT-PCR 及び real time RT-PCR による遺伝子定量

(2) の結果に基づいて、Beads を埋入した上顎突起における *Lhx8* 遺伝子を RT-PCR もしくは real time RT-PCR で定量した。その結果、RA もしくは Citral 投与により *Lhx8* は有意に減少していることが明らかとなった (図 4)。



【図 4】

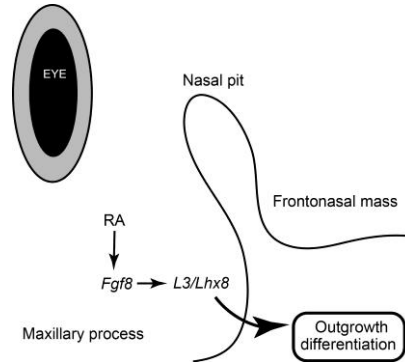
同様に、FGF-8b を投与した場合、有意に *Lhx8* 遺伝子発現は増加し、逆に SU5402 を投与すると有意に減少することが明らかとなった。



【図 5】

以上の結果、*Lhx8* 遺伝子は、上顎の形成に関与し、RA-FGF を介した経路によって発現制御されていることが考えられた。すなわち、

Lhx8 発現には、至適濃度の RA が必要であり、RA→FGF-8b→*Lhx8* のシグナル伝達によって上顎の発育分化と形態形成が行われることが示唆された (図 6)。



【図 6】

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Murakami K, Sugiura T, Yamamoto K, Kawakami M, Kang YB, Tsutsumi S, Kirita T. Biomechanical analysis of the strength of the mandible after marginal resection. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 69(6): 1798-1806, 2011. [doi.:10.1016/j.joms.2010.07.052](https://doi.org/10.1016/j.joms.2010.07.052)
- ② Kawakami M, Okamoto K, Fujii R, Kirita T. Orthodontic rehabilitation for anterior teeth lost due to trauma with crowding malocclusion. *Dental Traumatology* 26(4): 357-359, 2010. [doi:10.1111/j.1600-9657.2010.00876.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.2010.00876.x)
- ③ Manabe T, Wanaka A. Regulation and/or repression of cholinergic differentiation of murine embryonic stem cells using RNAi directed against transcription factor L3/Lhx8. *Methods in Molecular Biology*

650(2): 101-109, 2010. doi:
[10.1007/978-1-60761-769-3_8](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-769-3_8)

- ④ Tatsumi K, Okuda H, Makinodan M, Yamauchi T, Makinodan E, Matsuyoshi H, Manabe T, Wanaka A. Transient activation of Notch signaling in the injured adult brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 39(1):15-19, 2010.
[doi:10.1016/j.jchemneu.2009.09.003](https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2009.09.003)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 藤井亮介、川上正良、奥田洋明、和中明生、桐田忠昭. 口唇形成時の Wnt シグナリングが Msx 遺伝子発現に及ぼす影響. 第 70 回日本矯正歯科学会大会・第 4 回国際会議 2011 年 10 月 17~20 日、名古屋
- ② 川上正良、藤井亮介、奥田洋明、和中明生、桐田忠昭. 口唇形成における L3/Lhx8 遺伝子発現と Wnt シグナルの役割. 第 69 回日本矯正歯科学会大会 2010 年 9 月 27~29 日、横浜.
- ③ 藤井亮介、川上正良、奥田洋明、和中明生、桐田忠昭. 上顎形成時における L3/Lhx8 遺伝子の発現機構. 第 68 回日本矯正歯科学会大会 2009 年 11 月 16~18 日、福岡.

6. 研究組織

(1)研究代表者

川上 正良 (KAWAKAMI MASAYOSHI)
奈良県立医科大学・医学部・学内講師
研究者番号：20244717

(2)研究分担者

和中 明生 (WANAKA AKIO)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：90210989

(3)研究協力者

Joy M. Richman

Department of Oral Health Sciences, Life Sciences Institute, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

Professor

藤井 亮介 (FUJII RYOSUKE)

奈良県立医科大学・医学部・研究生

奥田 洋明 (OKUDA HIROAKI)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40453162

辰己 晃子 (TATSUMI KOHKO)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90208033