

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791785

研究課題名（和文） 頭蓋顔面形成におけるレチノイン酸代謝酵素の役割の解析

研究課題名（英文） Role of retinoic acid catabolising enzyme in craniofacial development

研究代表者

阿部 真土（アベ マコト）

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：40448105

研究成果の概要（和文）：レチノイン酸代謝酵素の一つである Cyp26B1 の遺伝子欠損マウスは頭蓋顔面形成不全を示すが、この異常に先立ち多くの遺伝子発現の変化がマイクロアレイによる解析で判明した。転写抑制因子である Trps1 はその発現が Cyp26B1 ノックアウトマウス胎仔鰓弓で低下していたもののひとつであった。Trps1 ノックアウトマウスの頭蓋顔面形成を解析したところ、下顎近位部の発生が極めて貧弱であることが分かった。この領域は Cyp26B1 ノックアウトマウスにおいても重度の形成異常がみとめられた。しかし Trps1 の培養細胞における遺伝子発現やマウス Trps1 のプロモーター配列はレチノイン酸の添加により影響を受けなかった。これらのことから Trps1 は頭蓋顔面発生の過程で（直接的ではないものの）レチノイン酸によるシグナルの下流に位置し、特に下顎部の正常発生に必須の因子であることが分かった。

研究成果の概要（英文）：In order to understand the molecular mechanisms of normal craniofacial development, microarray analysis was performed using pharyngeal arches from wild type and Cyp26B1 knockout embryos. Number of molecules was identified to be up- or down-regulated. Trps1 was one of the molecules those were down-regulated in Cyp26B1 knockout mice. Trps1 knockout mice showed craniofacial deformities partially overlapping the defects observed in Cyp26B1 knockout mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔解剖学・口腔顔面発生・レチノイン酸・Trps1

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物における頭頸部の形態形成は多くの分泌因子、転写因子により厳密に制御されたシグナリングにより遂行される。神経管背側から遊走し、鰓弓の間葉細胞をみたく頭部神経堤細胞は、口腔上皮、頭部中胚葉、咽頭

嚢から分泌される因子により鰓弓内の適切な場所に誘導され、その場で増殖する。細胞がいったん鰓弓内に到達した後は、上皮-間葉-内皮組織の相互作用により、最終的に頭頸部の骨、軟骨、結合組織、あるいは歯胚などへの分化が起こる。これらの過程は数々の器官形成の中においても最も精巧に制御さ

れているもののひとつといえる。ところで妊娠中におけるレチノイン酸（脂溶性ビタミン A の活性型誘導体；RA）の過剰・欠乏いずれの状態においても胎児に DiGeorge syndrome 様の強力な催奇形性を示すことは古くからよく知られている。症状としては副甲状腺の発生異常により起こる低カルシウム血症、胸腺の発生異常により生じる免疫不全、心臓血管奇形、口蓋裂などを含む顔面骨格の形成異常などがある。また、RA の投与時期を変えることで異常の生じる部位が変化することも知られている。頭蓋顔面に起こる異常は鰓弓上皮、頭部神経堤細胞、鰓弓内皮の発生異常に起因すると考えられている。以前は RA の催奇形性の起こる機序解明に興味集中していたが、最近の複数の知見より RA は正常発生においても必須の作用をすることが証明された。まず、生体において内因性の RA の活性部位を同定できるトランスジェニックマウス (RARE-Gal マウス) が Rossant らにより作成され、発生中のマウス胎仔において極めて限局した領域において RA が活性化されていることが報告された。ビタミン A は細胞内に取り込まれた後、二つの脱水酸化反応を経て活性型の RA となり核内レセプターである RA 受容体 (RAR および RXR) と結合し染色体上の RA 応答配列 (RARE) に結合して転写を制御するが、この活性化の過程における律則段階の脱水酸化酵素の一つであるレチナル脱水酸化酵素 2 (Raldh2) を決失させた遺伝子改変マウスは頭部・心臓の異常、第 3 鰓弓より尾側の鰓弓形成不全を示すことが報告された。

## 2. 研究の目的

生体には RA を代謝・分解する酵素として A1、B1、C1 の 3 種類のチトクローム p450 水酸化酵素 (Cyp26A1~C1) が存在し RA を 4-ヒドロキシ RA などに変換して RA 不活化の最初の段階を担う。Cyp26B1 ノックアウトマウスの頭蓋形態形成異常の起こるメカニズムを解明する事を目的とする。

## 3. 研究の方法

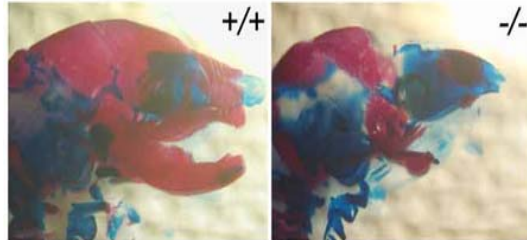
1) 胎生後期の Cyp26B1<sup>-/-</sup>マウス胎仔の頭蓋顔面骨格を詳細に解析する。また、Cyp26B1 遺伝子の欠損による胎生中期~後期にかけての内因性の RA 活性部位の変化を詳細に解析する。さらに、胎生中期の Cyp26B1<sup>-/-</sup>マウス胎仔の鰓弓における遺伝子発現を詳細に解析する。

2) RA 過剰投与した際のマウスと頭蓋顔面骨格と同様の表現型を示す *Dlx5/6* ダブルノックアウトマウス胎仔における内因性 RA 活性

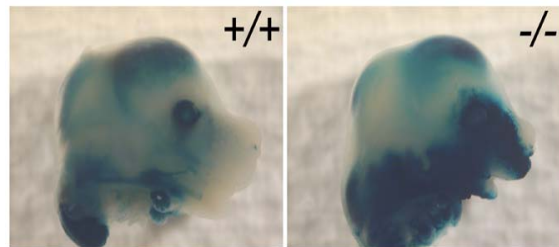
部位を野生型のものとは詳細に比較する。

## 4. 研究成果

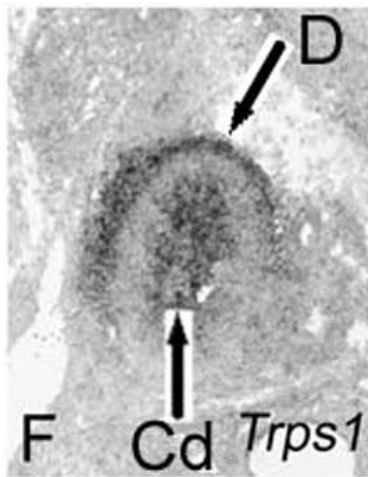
生体内のレチノイン酸の代謝酵素である Cyp26B1 の遺伝子ノックアウトマウスは胎生 18.5 日において頭蓋顔面を構成する全ての



骨格に形成不全が認められ (上図; 骨・軟骨をアリザリンレッド・アルシアンブルーにて染色したものの側面像。Cyp26B1<sup>+/+</sup> (左) および Cyp26B1<sup>-/-</sup> (右) マウス胎仔)、この形成不全に先立ち胎生 11.5 日齢より急激な第 1 鰓弓領域への内因性レチノイン酸活性の増加が認められた (下図; 胎生 14.5 日齢の Cyp26B1<sup>+/+</sup>;RARE-Gal (左)、および

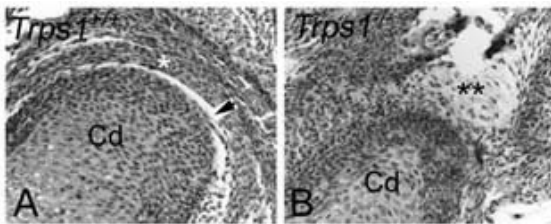


Cyp26B1<sup>-/-</sup>;RARE-Gal (右) マウス胎仔を全頭で X-gal を基質として染色したものの側面像。青く染色されている部位が内因性の RA 活性の認められる部位を示す。前脳部における X-gal 染色の程度は両遺伝子型とも同程度に認められるが顔面頸部の染色は Cyp26B1<sup>-/-</sup>マウス胎仔において強く認められる)。胎生 11.5 日齢マウス胎仔の鰓弓にお

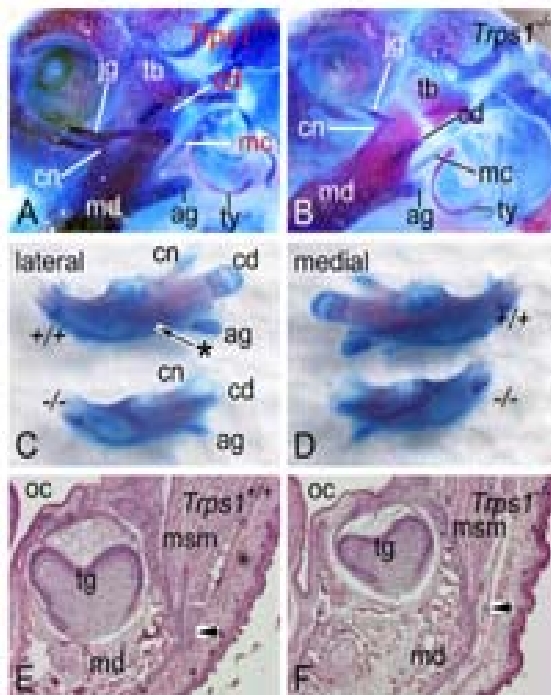


ける網羅的な遺伝子発現の解析を行い、野生型と比べ発現の変化 (増加・減少している因子が複数同定された。同定された因子の中でも特に Zinc finger タイ

プの転写因子である *Trps1* はその後の解析で胎生 11.5 日～胎生 13.5 日まで発現が常に低下していることが判明した。また、*Trps1* および *Cyp26B1* の遺伝子ノックアウトマウスの表現型が一部重複していることからレチノイン酸シグナルの下流に *Trps1* が存在することが強く示唆された。左図において胎生 15 日齢マウスで *Trps1* の発現を *in situ* hybridization 法にて検出したところ *Trps1* は下顎頭軟骨ならびに関節円板発生領域の間葉系細胞に限局して発現が認められた (D: 関節円板形成部位、Cd: 下顎頭)。さらに *Trps1* ノックアウトマウス頭部を詳細に解析したところ、顎関節の形成不全が認められることが分かった (下図; 胎生 18 日齢野生型 (左) および *Trps1* KO マウス (右) 顎関節の組織像。 *Trps1* KO マウスの顎関節骨格要素は形成されるものの、関節円板、関節腔、滑膜細胞の形成が全く認められない。Cd: 下顎頭、\*: 関節円板、矢頭: 下関節腔、\*\* : 異常な関節円板領域)。



また、*Trps1* ノックアウトマウスの頭蓋顔面骨を更に詳しく解析すると下顎頭のみならず筋突起 (cn)、下顎角 (ag) も形成不全



を起こしていることが分かった (上図)。下顎骨の外側面に認められる咬筋粗面がノックアウトにおいてきわめて貧弱であり、咬筋の形成不全が伺われた。前頭断切片のヘマトキシリン・エオシン染色の像から予想されたとおり咬筋の断面積は約 30% の減少を認め、胎仔性の顎運動の低下が顎関節の成熟を遅延させている可能性が示唆された。

## 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 1 件)

1. Abe M, Michikami I, Fukushi T, Abe A, Maeda Y, Ooshima T, Wakisaka S. "Hand2 regulates chondrogenesis in vitro and in vivo." Bone (2010) 46(5) 1359-68 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. 阿部真土、福士暁也、栗栖浩二郎、脇坂聡、Klf4 は骨芽細胞分化を制御する、第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2011 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜 (紙上開催に変更)
2. 道上郁美、阿部真土、Kruppel-like Factor 4 represses osteoblast differentiation、第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 8 日、神戸ポートアイランド
3. 阿部真土、伊藤俊治、村垣泰光、道上郁美、Trps1 contributes to normal temporomandibular joint formation、第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 7 日、神戸ポートアイランド
4. 阿部真土、道上郁美、大嶋隆、脇坂聡、転写抑制因子 *Trps1* はマウス顎関節の正常発生に必須である、第 52 回日本歯科基礎医学会学術大会、2010 年 9 月 22 日、タワーホール船堀
5. 道上郁美、阿部真土、脇坂聡、bHLH 型転写因子 *Hand2* は in vivo において軟骨分化を制御する、日本歯科基礎医学会学術集会、2009 年 9 月 11 日、新潟コンベンションセンター
6. 道上郁美、福士暁也、江草宏、阿部真土、Kruppel like factor 4 (*Klf4*) は骨芽細胞分化を抑制する、日本骨代謝学会学術集会、2009 年 7 月 24 日、大阪国際会議場

7. 阿部真土、道上郁美、福士暁也、bHLH 型  
転写因子 Hand2 は軟骨分化を抑制する、日  
本骨代謝学会学術集会、2009年7月23日、  
大阪国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 真土 (ABE MAKOTO)  
大阪大学・歯学研究科・助教  
研究者番号：40448105