

## 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25年 5月29日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591991

研究課題名（和文） 頭蓋顎顔面骨形成におけるレチノイン酸の役割

研究課題名（英文） Role of retinoic acid in craniofacial bone formation

研究代表者

細川 互 (HOSOKAWA KO)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20181498

研究成果の概要（和文）：レチノイン酸（RA）の不活化酵素であるCYP26B1を軟骨前駆細胞特異的に遺伝子欠損させたマウスを解析した。このマウスは正常に出生するが、生後3～4週頃より著明な成長障害を呈した。顔面骨は全体的に丸く小さな形態であり、上下顎のバランス異常のため咬合不全をきたした。また、四肢関節における成長軟骨板において増殖軟骨細胞層の著明な減少を認め、小児の白血病治療におけるレチノイドの合併症と類似しており、臨床的にも大変興味深い結果であった。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the CYP26B1 conditional knockout mice driven by cartilage precursor specific Cre. The mice were normally born, but revealed severe growth impairment at three or four weeks after birth. The facial bone was rounder and smaller in shape, including the deficiency of dental occlusion caused by the imbalance between the maxilla and the mandible. The decrease of chondrocytes in the growth plate resembled a phenotype of complications induced by retinoid therapy, which was thought to be clinically important.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：レチノイン酸、骨発生、軟骨発生、頭蓋顎顔面骨、CYP26

## 1. 研究開始当初の背景

発生段階における骨形成のメカニズムを探索することは、骨の形成異常、先天性あるいは後天性による欠損、頭蓋骨における早期癒合症などの治療に直結している。レチノイ

ン酸（retinoic acid; RA）不活化酵素であるCYP26B1遺伝子欠損（CYP26B1-KO）マウスは、短肢、口蓋裂、頭蓋顎顔面骨形成不全、鎖骨欠損など全身における骨形成異常を呈する。CYP26B1が欠損すると局所的にRA濃度

が上昇し、RA 標的遺伝子のかく乱が生じるために表現型異常が起きる。本研究では、CYP26B1-KO マウスを用いて骨形成における RA の意義を解析することを企画した。

## 2. 研究の目的

(1) RA はビタミンAの誘導体で、その活性の主体をなす物質である。内在性のRA濃度は、RA LDH (合成酵素) とCYP26 (分解酵素) のバランスによって調節されている。RAを不活化するCYP26はA1、B1、C1の3種類が存在しており、それぞれが時期および組織特異的に発現している。研究開始時には全てのCYP26に関して遺伝子欠損マウスが作製され報告されている。その中で、CYP26B1-KOマウスは、著しい短肢、頭蓋顔面形成異常、口蓋裂、眼瞼癒合不全、皮膚形成異常など多岐に渡る異常が認められた。骨に関しては骨染色が行われ、四肢での中樞遠位軸に沿ったpatterning異常につき解析されていたが、骨形成本体に関する解析は手つかずの状態であった。

(2) 近年、zebrafishの骨化異常を呈するstocksteif変異体の原因遺伝子がCYP26B1であることが判明した。stocksteifは、頭蓋顔面骨の著しい形成不全とともに脊椎骨から尾に渡る全身の骨化亢進が認められる。CYP26B1-KOマウスでは、脊椎骨の形態的異常は認められないが、頭蓋顔面骨の形態は近似しており、解析にあたり有用な情報と考えられた。

(3) CYP26B1-KOマウスは頭蓋顔面骨の形成不全に鎖骨欠損を合併する。頭蓋骨と鎖骨は共に膜性骨化を呈し、発生学的にも他の骨とは違う系譜をたどっている。ヒトにおける鎖骨頭蓋異形成症 (cleidocranial dysplasia) の原因遺伝子は、Runx2/Cbfa1である。Runx2はRunxファミリーに属する転写因子であり、遺伝子欠損マウスは全身の骨化が起らず軟骨のみとなる。すなわちRunx2は骨化(骨芽細胞への分化)に必須の因子である。骨化には内軟骨性骨化と膜性骨化の2種類がある。内軟骨性骨化は、間葉系幹細胞が軟骨内に侵入し骨芽細胞に分化することにより骨が形成される。また膜性骨化は、骨芽細胞より直接骨形成がなされる。ここで興味深いことは、Runx2の発現はRAにより誘導される点である。stocksteifにみられる骨化亢進は、RA濃度の上昇によりRunx2が過剰発現することによるものと推察される。しかしヒトでの鎖骨頭蓋異形成症はRunx2の欠損に起因されており、CYP26B1-KOに生じる鎖骨欠損の説明がつかない。それが骨化の異常によるものか、またはpatterningの異常によるものかは、本研究での課題の1つであった。

(4) 頭蓋顔面骨の発生的成り立ちに関しては、前頭骨と顔面骨が神経堤細胞由来であり、頭蓋骨の癒合の状態もそれぞれの骨間で違いがみられる。CYP26B1-KOマウスによる頭蓋顔面異常は神経堤細胞の形成不全によるものであった。本研究では、頭蓋骨間の癒合部分が正常とどう違うのかにも注目して解析した。

(5) 従来の RA を用いた催奇性実験では、非生理的な高濃度の RA が母体を通じて胚全体に投与されるため、局所的な RA の影響が不明であった。CYP26B1-KOマウスの解析は、この問題を大きく改善させるものである。CYP26B1が欠損することにより内在的 RA の濃度が時期および局所特異的に上昇し、RA の標的組織に合致した異常が認められる。この点は、本研究が従来のものとは違う独創的な面であった。

## 3. 研究の方法

(1) CYP26B1 (+/-)、RARE-lacZ マウスの繁殖・維持

CYP26B1-KO マウスは、口蓋裂などの先天異常のために生直後致死である。CYP26B1 (-/-) 胚を得るためには、CYP26B1 (+/-) のオスとメスを繁殖させ、胚を採取の際にメスを安楽死させる必要がある。繁殖により得られた産仔は、4週あたりに全て尾から抽出する DNA より PCR 法を用いて genotyping を行った。また、生体内の RA 濃度を間接的に測定するレポーター遺伝子を導入させるため RARE-lacZ マウスを交配させた。RARE-lacZ は RA 濃度が相対的に高い部分が、X-gal 染色により青染される。

(2) RA 投与実験

ICR 妊娠マウスを購入し、胎生 10.5~17.5 日にかけて 100mg/kg の RA を経口投与した。RA 投与は通常 1 回であるが、病態の変化に乏しい場合は 2~3 回投与も考慮した。RA が引き起こす骨の形態的变化を見る場合は胎生 18.5 日の時点で、また関連物質の変化を見る場合は RA 投与後 8 時間の時点で胚を採取した。

(3) In situ hybridization, RT-PCR

間葉系幹細胞は、前骨芽→未熟骨芽→成熟骨芽細胞を経て骨細胞へと分化する。Runx2、Osterix は前骨芽→未熟骨芽の過程に必須の誘導因子である。また後期の分化には、Runx2 は抑制的に働き、誘導するものとして Dlx5、Dlx6、ATF4 などの物質が知られている。これらに注目して mRNA の発現変化を解析した。In situ hybridization 法では主として切片作成を行い、RT-PCR 法では組織塊より RNA を抽出して鋳型として用いた。なお、RALDH s (RA

合成酵素) や CYP26s の骨での発現に関する報告は極めて少ない。胎生 14.5 日では CYP26B1 は骨芽細胞に一致した発現をしているが、他の CYP26 や別の時期での発現を確認した。

#### (4) 抗体染色

(2) で得られた mRNA の情報を考慮しながら、各種抗体を購入して抗体染色を行った。

#### 4. 研究成果

CYP26B1-KO マウスは生直後致死のため、成体を含めた解析には適当な conditional KO マウスを作製する必要があった。そこで軟骨前駆細胞特異的に発現する Col11a2-Cre を使用して目的の個体を得ることに成功した。Col11a2; CYP26B1-KO マウスは正常に出生するが、生後 3～4 週頃より著明な成長障害を呈した。頭蓋顎顔面骨は成長バランス異常がみられた。顔面は全体的に丸みをおびた小さな形態であり、上下顎のバランス異常のため歯の過伸長が生じ咬合不全をきたしていた。これにより、成長期に十分な摂食ができなかった。また、四肢関節における成長軟骨板において増殖軟骨細胞層の著明な減少を認めた。この表現型は、小児の白血病治療におけるレチノイドの合併症として報告されているものと類似しており、臨床的にも大変興味深い結果であった。RA は骨形成において、発生のみならず生後の成長段階においても局所濃度の精密な制御が必要であることが判明した。

#### 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 3 件)

① Kanazawa S et al. (Hosokawa K: 11 名中 10 番目, Sakai Y: 11 名中 8 番目), bFGF regulates P13-kinase-Rac1-JNK pathway and promotes fibroblast migration in wound healing. PLoS One, 査読有, 5 巻, (2010), e12228

② Tomita K, Hosokawa K, Yano K, Reanimation of reversible facial paralysis by the double innervation technique using an intraneural-dissected sural nerve graft. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 査読有, 63 巻, (2010), e535-539.

③ Okano J et al. (Sakai Y: 9 名中 8 番目) Increased retinoic acid levels through ablation of Cyp26b1 determine the processes of embryonic skin barrier formation and peridermal development. 査

読有, 125 巻, (2012), 1826-1836.

[学会発表] (計 3 件)

① 坂井靖夫、細川互、発生学を基盤とした先天異常疾患に対するアプローチ (主題シンポジウム)、第 19 回日本形成外科学会基礎学術集会、2010.9.17、横浜

② 峯岸芳樹ほか (細川互、坂井靖夫)、内軟骨性骨化におけるレチノイン酸の役割、第 20 回日本形成外科学会基礎学術集会、2011.10.6、東京

峯岸芳樹ほか (細川互、坂井靖夫)、レチノイン酸は生体内において成長板増殖軟骨細胞の細胞増殖を抑制する、第 21 回日本形成外科学会基礎学術集会、2012.10.5、猪苗代

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

細川 互 (HOSOKAWA KO)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：20181498

(2) 研究分担者

坂井 靖夫 (SAKAI YASUO)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：50272315

松田 健 (MATSUDA KEN)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50423166

菊池 守 (KIKUCHI MAMORU)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20437677

(H22 まで分担者として参画)

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：