

## 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 4 月 1 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792076

研究課題名（和文） 軟口蓋発生における分子メカニズムの解明

研究課題名（英文） The molecular mechanism of soft palate development

研究代表者

岡 暁子（OKA KYOKO）

福岡歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60452778

研究成果の概要（和文）：軟口蓋裂に対する新しい治療法を模索する目的で、軟口蓋発生メカニズムを解析した。胎生期の硬口蓋と軟口蓋に発現している遺伝子をマイクロアレイにて網羅的に比較し、軟口蓋において発現が高かったType I collagen, Periostin に着目した。これら蛋白質の発現局在を免疫組織化学染色法にて経時的に観察した。Periostinは、軟口蓋間葉に広く、強く発現すること、Type I collagenと共に口蓋腱膜に発現することが明らかとなった。また、器官培養を用いて外因性にTGF-beta作用させると、口蓋間葉にType I collagen, Periostin 発現が促進され、TGF-betaは、Type I collagen, Periostin を共に発現させる働きがあることがわかった。

研究成果の概要（英文）：The experiment was performed for understanding of the mechanism of soft palate development. We demonstrated a unique pattern of periostin expression during soft palate development, which was closely related to that of collagen type I (Col I) in palatine aponeurosis. Furthermore, organ culture analysis showed that exogenous transforming growth factor- $\beta$  (TGF-b) induced the expression of both periostin and Col I. TGF-b signaling appears to be one of the mediators of Col I and periostin expression in the formation of functional structures during soft palate development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児系歯学

キーワード：口蓋裂・軟口蓋・TGF-beta シグナル

## 1. 研究開始当初の背景

これまでにも口蓋裂発症のメカニズムを解明するために、口蓋発生に関わる遺伝子についての報告は、数多く存在している。口蓋

裂発症の主たる原因としては、両側口蓋組織の癒合不全といった上皮組織の問題、そして口蓋組織そのものの成長不全といった間葉組織での細胞増殖能の低下などがあげられ

る。近年では、口蓋裂を発症する遺伝子改変マウスの表現型、遺伝子発現領域等から、口蓋裂発症原因遺伝子とそのシグナルネットワークが明らかとなってきた。しかしながら、軟口蓋組織に注目して解析している研究は殆どなく、軟口蓋発生については特異的な遺伝子や分子メカニズムには、不明な点が多く残されている。

## 2. 研究の目的

軟口蓋組織に着目し、胎生期マウスを用いて軟口蓋発生の分子メカニズムを明らかにすることで軟口蓋発生に重要な遺伝子を探索する。さらに、出生後マウスの軟口蓋組織に存在する組織幹細胞の局在とそれらの増殖・分化制御機構を解明し、口蓋裂という疾患に対して、形態だけでなく正常な機能の獲得を目指した組織工学的な側面からの新規治療法開発の可能性を探ることを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) マイクロアレイ解析による軟口蓋に特徴的に発現する遺伝子の解析

胎生 15 日齢の ICR マウスより口蓋組織を採取し、硬口蓋、軟口蓋のそれぞれの組織に分け RNA を抽出した。Low-Input Quick Amp Labeling Kit, one-color (Agilent) によりラベリング反応を行い、Whole Mouse Genome オリゴ DNA マイクロアレイ (Agilent) にて、マイクロアレイを施行した。解析は、Quantile 法による正規化後のシグナル値から Z score と Ratio を算出し、発現変動遺伝子を抽出して行った。抽出した遺伝子に関しては、Real time PCR による定量的解析 (Mx3000P Agilent) による定量的確認を行った。

### (2) 抽出された遺伝子の蛋白発現の免疫組織化学染色法による確認

胎生 13.5, 14.5, 16.5 日齢のマウスより頭部を採取し、10% 中性ホルマリンにて固定後、パラフィン切片を作成した。1 次抗体に Rabbit polyclonal anti Periostin (Abcam) Rabbit polyclonal anti Collagen I (Abcam) Mouse monoclonal anti Collagen I (Abcam) を使い、2 次抗体には、Alexa Fluor, Goat anti Rabbit IgG または、Mouse IgG (Molecular probe) を用いて可視化した。

### (3) 細胞増殖活性解析

胎生 13.5, 14.5, 16.5 日齢のマウスに、BrdU (100  $\mu$ g/g 体重) を腹腔内に投与し、1 時間後に頭部を採取し 10% 中性ホルマリンにて固定、パラフィン切片を作成した。BrdU 陽性の細胞の同定には、BrdU Detection Kit (Roche Applied Science) を用いた。

### (4) TGF-beta シグナルとの関係の明確化

胎生 15 日齢のマウス口蓋を採取、器官培養下にて器官培養を施行し、ゲルビーズを用いて外因性に TGF-beta を作用させ、ビーズ周囲に蛋白発現が誘導されるかを確認した。確認の方法としては、免疫組織化学的手法を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) マイクロアレイ解析による軟口蓋に特徴的に発現する遺伝子の解析

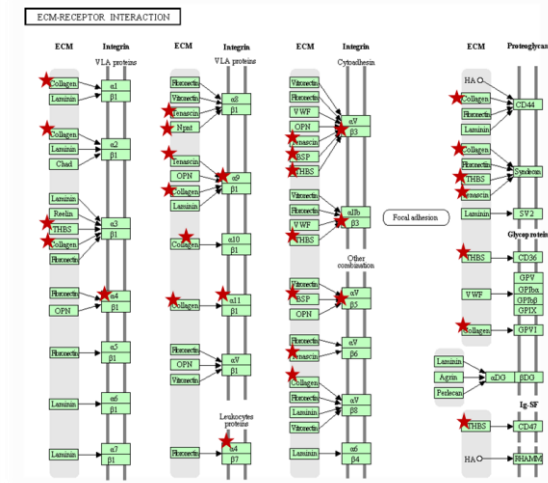


図 1・細胞外基質 Pathway のうち変化のあった遺伝子 (赤星)

硬口蓋・軟口蓋から抽出したマイクロアレイ解析の結果のうち、軟口蓋で高く発現を示す細胞外基質に着目し、Type I collagen と Periostin をターゲットとした (図 1)。

### (2) 抽出された遺伝子の蛋白発現の免疫組織化学染色法による確認

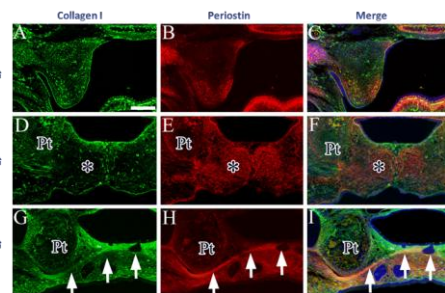


図 2・軟口蓋発生における Type I collagen と Periostin 蛋白の発現パターン

Type I collagen, Periostin 蛋白発現を硬口蓋、軟口蓋で比較した。興味深いことに Periostin は、蛋白の発現においても軟口蓋が高い傾向を示していた。また、これら 2 つの蛋白は、軟口蓋において対照的な発現パ

ーンを示し(\*)、胎生 16.5 日齢において、口蓋腱膜を境として、Type I collagen は鼻腔側に、Periostin は口腔側に発現しており、さらにこの 2 つの蛋白は、口蓋腱膜で強く共発現していた(↑↑↑)(Pt: Pterygoid process)。

### (3) 細胞増殖活性解析

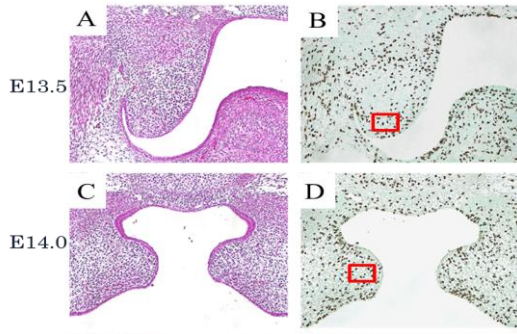


図 3・軟口蓋における細胞増殖活性

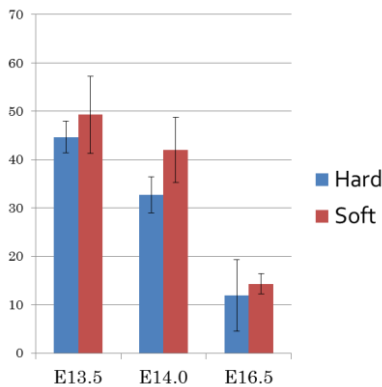


図 4・硬口蓋と軟口蓋における細胞増殖活性の比較

胎生 13.5, 14.0, 16.5 日齢のいずれにおいても、軟口蓋間葉細胞の増殖活性は、硬口蓋よりも高い値を示した。また、軟口蓋間葉細胞の増殖活性は、Periostin 発現領域で高い傾向にあるものの、Type I Collagen との共発現が認められる口蓋腱膜では、細胞増殖活性が殆ど観察されなかった(図 3・4)

### (4) TGF-beta シグナルとの関係の明確化

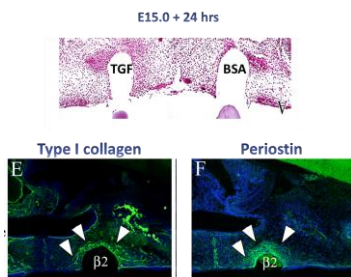


図 5・外因性 TGF-β の影響  
TGF-beta ビーズの周囲には、Type I collagen

と Periostin の発現が観察され、外因性 TGF-beta は、Type I collagen と Periostin の発現を口蓋の間葉組織で促進することが明らかとなった(図 5)。

Periostin は、口蓋発生時、軟口蓋間葉に特徴的に発現しており、Type I collagen と共発現し、口蓋腱膜の形成に関与していることが示唆された。TGF-beta シグナルは、両蛋白の発現を促進することから、軟口蓋形成において重要な役割を果たすことが明らかとなった。

### 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 Oka k, Honda MJ, Tsuruga E, Isokawa k, Sawa Y. Roles of collagen and periostin expression by cranial neural crest cells during soft palate development. 2012 J Histochem Cytochem. 60:57-68.

[学会発表] (計 4 件)

① 岡 暁子 他

『軟口蓋発生時に特徴的にあらわれる細胞外基質とその役割』第 49 回小児歯科学会大会 2011 年 11 月 29 日 岩手県民情報交流センター

② 岡 暁子

『The role of TGF-beta signaling during soft palate development』大韓民国 解剖学会 Craniofacial Morphology and Development シンポジウム 2010 年 10 月 12 日～15 日 大韓民国・済州島

③ 岡 暁子 他

『TGF-beta シグナルは、軟口蓋間葉細胞の細胞増殖と基質産生を促進する』第 32 回 歯科基礎医学会学術大会・総会 2010 年 9 月 20～22 日 東京

④ 岡 暁子 他

『The role of TGF-beta signaling during soft palate development in mouse』Gordon Research Conferences Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration 2010 年 4 月 10 日～17 日 イタリアルッカ

[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

**岡 暁子 (OKA KYOKO)**  
**福岡歯科大学・歯学部・講師**  
**研究者番号：60452778**

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：