

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19629

研究課題名（和文）FAT1遺伝子変異がもたらす顎顔面形成不全分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism of maxillofacial hypoplasia caused by FAT1 gene mutation

研究代表者

工藤 保誠（KUDO, Yasusei）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・教授

研究者番号：50314753

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト口腔がん患者で高頻度に認められる遺伝子変異を有するFat1 KIマウスを作製し、ホモ接合体が重度の下顎・舌形成障害を示すことを見出した。下顎や舌は第1咽頭弓から発生することから、Fat1 KIマウス第1咽頭弓の形態学的解析およびトランスクリプトーム解析を行った。胎齢9.5から10.5日の間に、第1咽頭弓の中央部に位置するmidline structureの消失、同部位における遺伝子発現パターンの異常を見出した。さらに、Fat1の下流にあるYAP/TAZの活性化を介した転写因子であるTEADによるヘッジホッグシグナル経路の異常が第1咽頭弓の形態学的異常に関わることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Fat1 KIマウスにおける顎顔面形成異常に、Fat1シグナル下流のTEADによる遺伝子発現抑制がShh遺伝子発現を低下させ、第1咽頭弓の形成不全を引き起こすことを明らかにした。ヒトFAT1の遺伝子変異は、頭頸部扁平上皮癌のみならず、顔面の形態異常、目および手足の指に形態異常を示すことが知られている。本研究成果は、頭頸部扁平上皮癌の診断・治療への応用や遺伝性疾患の理解に貢献できると考える。

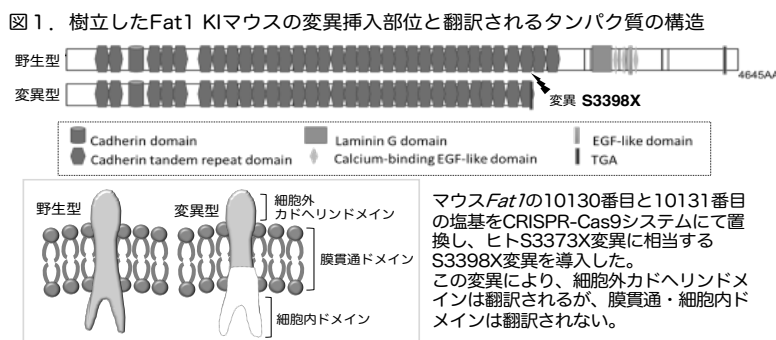
研究成果の概要（英文）：We generated Fat1 KI mice mimicking gene mutations frequently observed in oral cancer patients and found that they exhibit severe mandibular and tongue formation defects. Since the mandible and tongue develop from the first pharyngeal arch, we conducted morphological and transcriptome analyses. Between embryonic days 9.5 and 10.5, we observed the disappearance of the midline structure in the central region of the first pharyngeal arch and abnormal gene expression patterns in this region. Furthermore, we clarified that abnormalities in the Hedgehog signaling pathway, mediated by YAP/TAZ activation downstream of Fat1, are involved in the mandibular and tongue formation defects.

研究分野：腫瘍学

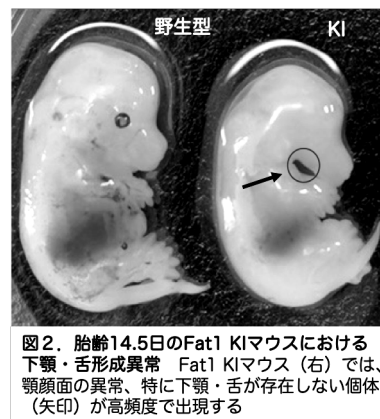
キーワード：FAT1 顎顔面形成 ソニックヘッジホッグ

1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域の発生の理解は、日常生活に基本となる「食べる」、「話す」などの機能に直結する重要な課題である。顎顔面の形態不全や機能不全は、著しくQOLを低下させる。下顎および舌は第1咽頭弓から発生し、頭部神経堤 (Cranial Neural Crest: CNC) 由来の間葉細胞がその発生に重要な役割を果たしている。CNC由来細胞におけるHedgehogなどの上皮シグナルの欠損により下顎および舌の形成障害が報告されているが (Elife 8:e40315, 2019)、下顎・舌形成に関わるシグナル経路や分子制御機構は未だ不明な点が多い。



研究代表者らは、これまでに口腔がんの増殖異常や浸潤・転移メカニズムに着目して研究を行ってきた。研究代表者らは、ヒト口腔がんでは*TP53*に次いで遺伝子変異の頻度の高い*FAT1*に着目し、ヒトで高頻度に認められる*FAT1*遺伝子変異「S3373X (stop codon)」を再現したノックイン (KI)マウスを作製した。*Fat1* KIマウスは、細胞外カドヘリンドメインは翻訳されるが、膜貫通・細胞内ドメインは翻訳されない (図1)。*FAT*カドヘリンは、非典型的カドヘリンに分類され、Hippoシグナル経路と平面内細胞極性の制御を介して細胞分化や発がんに関わっている。興味深いことに、Fat1 KIマウスがホモ接合体のときに、高率で重度の下顎・舌形成障害を示すことを見出した (図2)。これまでに*Fat1*ノックアウト (KO)マウスが眼球形成異常を示すことが報告されているが (Development 142:2781,2015)、*Fat1* KIマウスで観察される下顎および舌の形成異常は未だに報告されていない。



2. 研究の目的

本研究は、下顎および舌の形成における*FAT1*の機能を解明することを目的としており、本研究成果は下顎・舌形成の分子制御機構の解明につながることを期待される。また、本研究成果は、顔面異形症や口唇・口蓋裂などの先天性口腔形成異常や口腔がんの発症機序の解明・治療法の確立にも応用できる。

3. 研究の方法

本研究では、第1咽頭弓における*Fat1*の機能を明らかにするために、研究分担者である毛利安宏博士 (徳島大学) と研究代表者が主催する研究室の大学院生の協力を得て、有機的に連携して研究を遂行した。研究計画の詳細は次に示す。

(1) 胎齢10.5日および9.5日の*Fat1* KIマウスの形態学的解析

研究代表者らは、胎齢14.5日の*Fat1* KIマウスは「外観上正常な下顎および舌を有する個体」と「下顎欠損を示す個体」が混在することを確認している。まず、胎齢10.5日の*Fat1* KIマウスの第1咽頭弓の形態学的異常をHE染色やマイクロCTスキャンを用いて形態学的に解析した。さらに、胎齢9.5日の*Fat1* KIマウスの第1咽頭弓の解析も行った。

(2) 胎齢10.5日および9.5日の*Fat1* KIマウスのトランスクリプトーム解析

胎齢10.5日および9.5日の「異常を示すもの」と「正常」の2グループの変異マウスおよび対照の野生型マウスから第1咽頭弓を分離し、RNAシーケンスによるトランスクリプトーム解析を行った。得られたデータは主成分分析を行い、異なる遺伝子発現パターンを示す変異マウスのクラスターが存在するかを解析した。また、変異マウスと野生型マウスの差次的発現解析

を行い、変動遺伝子群を同定し、その遺伝子群を対象とした pathway 解析・ネットワーク分析を行い、Fat1 が制御するシグナル経路を同定した。

(3) Fat1 被制御因子の *in vivo* 解析と Fat1 修飾因子の同定

同定した Fat1 被制御遺伝子群の *in vivo* における発現パターン変動および発現局在を whole mount *in situ* hybridization 法を用いて第 1 咽頭弓における被制御遺伝子群の染色を行い、その局在や変異マウスにおける発現変動を可視化する。ここまでの変異マウス解析時に蓄積しておいた親マウスの遺伝子をエクソーム解析し、Fat1 KI マウスの表現型に影響を与える修飾因子の同定を行う。この知見は、Fat1 変異マウスの表現型が 2 パターン存在する理由を明らかにするとともに、Fat1 変異に基づく各種疾患の発症リスクを予測する上でも重要であると考えられる。

4. 研究成果

これまでに、Fat1 ノックアウト(KO)マウスにおいて眼球形成や四肢末端の形成異常は認められるが (Development 2015)、Fat1 KI マウスで観察される下顎や舌の形成異常は報告されていない。下顎および舌は第 1 咽頭弓から発生し、CNC 由来の間葉細胞がその発生に必須であることから、第 1 咽頭弓における細胞分化・組織形成に Fat1 が重要な役割を果たすことが予想される。



図3. 胎齢10.5日のFat1 KIマウスにおける第1咽頭弓の形態

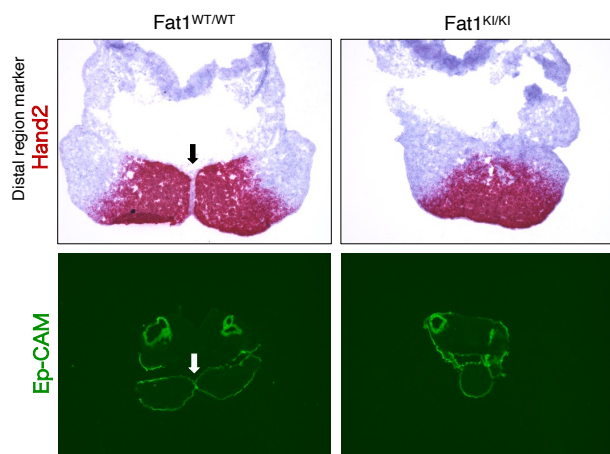


図4. Fat1 KIマウスにおけるmidline structureの消失

まず、胎齢 10.5 日の Fat1 KI マウスの第 1 咽頭弓の形態学的異常を検討した。図 3 に示すように、Fat1 KI マウスは野生型マウスに比べて、異常な形態を示していた。組織学的に、中央部 (distal region) のマーカーである Hand2 の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法により検討したところ、midline structure が消失していることが明らかになった (図 4)。midline structure の消失は、上皮マーカーである Ep-CAM の発現でも確認された。

次に、胎齢 10.5 日の Fat1 KI マウスおよび野生型マウスの第 1 咽頭弓の RNA シークエンスによる遺伝子発現の網羅的解析を行ったところ、主として distal region に位置する遺伝子の発現低下が認められた (図 5)。Fat1 KI マウスの第 1 咽頭弓において、細胞構成や増殖の異常が認められなかった。

さらに、胎齢 9.5 日の Fat1 KI マウスの第 1 咽頭弓の解析を行ったところ、形態に異常はみられず、左右対称の状態を保っていた (図 6)。胎齢 9.5 日の Fat1 KI マウスおよび野生型マウスの第 1 咽頭弓の RNA シークエンスによる遺伝子発現の網羅的解析を行ったところ、

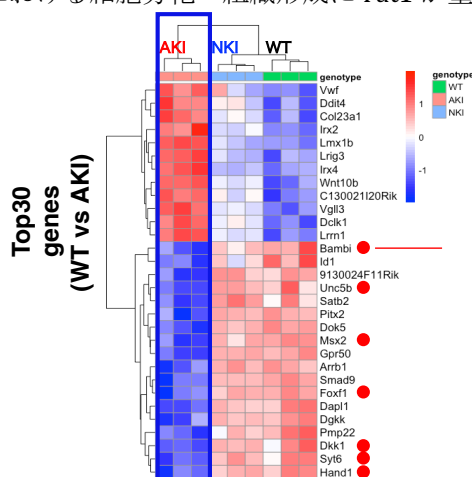


図5. Fat1 KIマウスおよび野生型マウスにおける第1咽頭弓のRNAシーケンスによる遺伝子発現の網羅的解析. ヒートマップは、野生型とKIマウスで最も差があった30遺伝子を示す。

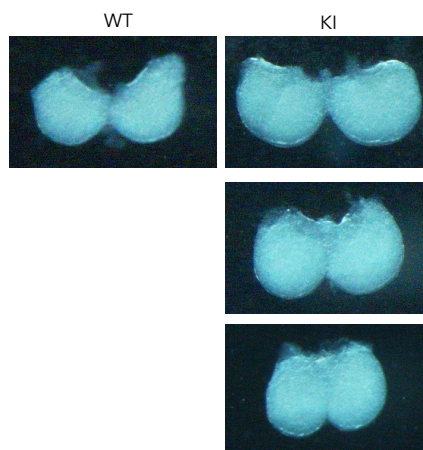


図6. 胎齢9.5日のFat1 KIマウスにおける第1咽頭弓の形態

distal region に位置する遺伝子はあまり変動していないことが明らかになった。このことから、Fat1 KI マウスにおける第1咽頭弓の異常は、胎齢9.5日から10.5日の間に起こることが予想された。胎齢10.5日と胎齢9.5日のFat1 KI マウスにおける第1咽頭弓において共通して発現低下する遺伝子を調べたところ、42遺伝子が共通して発現低下しており、パスウェイ解析を行ったところ、ヘッジホッグシグナルが関与していた。興味深いことに、ソニックヘッジホッグ (Shh) ノックアウトマウスは、Fat1 KI マウスと同様に顎顔面形成異常を示し、第1咽頭弓においてmidline structureの消失を認める。実際に、Fat1 KI マウスではShh遺伝子の発現低下を認める(図7)。第1咽頭弓の顕著な形態異常を認める個体と軽微な形態異常を示す個体で、Shh遺伝子発現に違いがあることから、Fat1 KI マウスにおけるShh遺伝子の発現はphenotypeを反映している。E10.5とE9.5のKIにおいて共通して発現低下する遺伝子のプロモーターに存在するTF結合モチーフを検討したところ、Fat1シグナルの下流にあるYAP/TAZによって誘導される転写因子であるTEADの結合モチーフをもつものが多かった。

以上より、Fat1 KI マウスにおける顎顔面形成異常に、Fat1シグナル下流のTEADによる遺伝子発現抑制がShh遺伝子発現を低下させ、第1咽頭弓の形成不全を引き起こすことを明らかにした。ヒトFAT1の遺伝子変異は、頭頸部扁平上皮癌のみならず、顔面の形態異常、目および手足の指に形態異常を示すことが知られている(Nature Commun, 2019)。本研究成果は、頭頸部扁平上皮癌の診断・治療への応用や遺伝性疾患の理解に貢献できると考える。

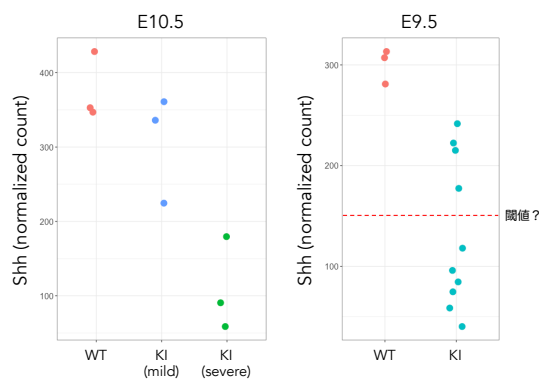


図7. 胎齢10.5日および9.5日のFat1 KIマウスにおけるShh遺伝子の発現量

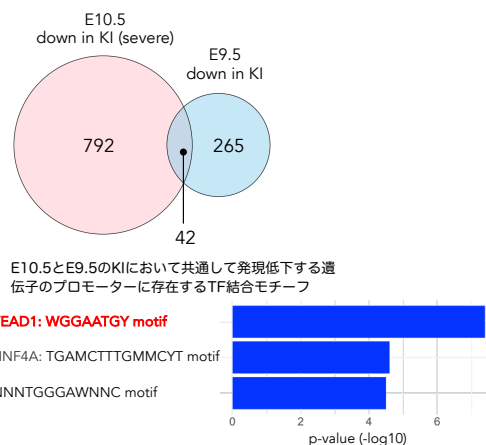


図8. 胎齢9.5日および10.5日のFat1 KIマウス第1咽頭弓に共通して発現低下する遺伝子のプロモーターに存在するTF結合モチーフ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sarubo Motoharu, Mouri Yasuhiro, Moromizato Akira, Yamada Azusa, Jin Shengjian, Shao Wenhua, Hagita Hiroko, Miyoshi Keiko, Kudo Yasusei	4. 巻 14
2. 論文標題 Involvement of TGFBI-TAGLN axis in cancer stem cell property of head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6767 ~ 6767
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-024-57478-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hirata Reika, Iwata Tomoyuki, Fujita Tsuyoshi, Nagahara Takayoshi, Matsuda Shinji, Sasaki Shinya, Taniguchi Yuri, Hamamoto Yuta, Ouhara Kazuhisa, Kudo Yasusei, Kurihara Hidemi, Mizuno Noriyoshi	4. 巻 66
2. 論文標題 Periostin regulates integrin expression in gingival epithelial cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 170 ~ 178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2023.11.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Jin Shengjian, Tsunematsu Takaaki, Horiguchi Taigo, Mouri Yasuhiro, Shao Wenhua, Miyoshi Keiko, Hagita Hiroko, Sarubo Motoharu, Fujiwara Natsumi, Qi Guangying, Ishimaru Naozumi, Kudo Yasusei	4. 巻 12
2. 論文標題 Involvement of the OTUB1 YAP1 axis in driving malignant behaviors of head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 22156 ~ 22169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.6735	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Narwidina A, Miyazaki A, Iwata K, Kurogoushi R, Sugimoto A, Kudo Y, Kawarabayashi K, Yamakawa Y, Akazawa Y, Kitamura T, Nakagawa H, Yamaguchi-Ueda K, Hasegawa T, Yoshizaki K, Fukumoto S, Yamamoto A, Ishimaru N, Iwasaki T, Iwamoto T	4. 巻 650
2. 論文標題 Iroquois homeobox 3 regulates odontoblast proliferation and differentiation mediated by Wnt5a expression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 47 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.02.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 邵 文華, 毛利 安宏, 工藤 保誠
2. 発表標題 The role of Fat1 in maxillofacial development
3. 学会等名 第 39 回分子病理学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 邵 文華, 毛利 安宏, 工藤 保誠
2. 発表標題 FAT1遺伝子変異による顎顔面形成異常
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 邵 文華, 毛利 安宏, 工藤 保誠
2. 発表標題 The novel function of Fat1 in maxillofacial development
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 工藤 保誠
2. 発表標題 口腔癌の発生・進展機構について
3. 学会等名 第4回 SGH がん研究者ワークショップ
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 工藤 保誠
2. 発表標題 口腔がんの発生と進展機構
3. 学会等名 第 65 回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Siqi Chen, Yasusei Kudo
2. 発表標題 Oral cancer microenvironment for the growth of Fusobacterium nucleatum
3. 学会等名 2023 Tokushima Bioscience Retreat
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jiansheng Jin, Yasusei Kudo
2. 発表標題 Involvement of OTUB1-YAP1 axis in driving malignant behaviors of head and neck squamous cell carcinoma
3. 学会等名 2023 Tokushima Bioscience Retreat
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Wenhua Shao, Yasuhiro Mouri, Yasusei Kudo
2. 発表標題 The role of Fat1 in maxillofacial development
3. 学会等名 第 112 回 日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北島 正二郎, 工藤 保誠
2. 発表標題 がん幹細胞の代謝特性と幹細胞性維持メカニズム
3. 学会等名 第 65 回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 猿棒 元陽, 工藤 保誠
2. 発表標題 TGFB1-TAGLN axis regulates cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第 65 回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 猿棒 元陽, 諸見里 昭, 山田 梓紗, 邵 文華, Jin Shengjian, 毛利 安宏, 工藤 保誠
2. 発表標題 頸部扁平上皮癌の partial-EMT における TGFB1 の役割
3. 学会等名 第 82 回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jin Shengjian, 常松 貴明, 堀口 大吾, 毛利 安宏, 邵 文華, 三好 圭子, 水澤 典子, Hagita Hiroko, 猿棒 元陽, 吉田 佳世, 吉田 賀弥, 藤原 奈津美, 尾崎 和美, 石丸 直澄
2. 発表標題 頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) の進行における脱ユビキチン化酵素 OTUB1 の役割
3. 学会等名 第 82 回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

〔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
研究 分担者	毛利 安宏 (MOURI Yasuhiro) (80464353)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・講師 (16101)	
研究 分担者	北島 正二郎 (KITAJIMA Shojiro) (00452590)	慶應義塾大学・政策・メディア研究科(藤沢)・特任講師 (32612)	

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			
中国	桂林医学院			