

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593046

研究課題名(和文) 二次口蓋成長発育における TGF-β シグナル伝達についての解明

研究課題名(英文) Identification of TGF-beta signaling during palatal fusion

研究代表者

中嶋 昭 (NAKAJIMA, Akira)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：50297842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：TGF-β 受容体(TbR-I, -IIおよび-III)の発現様式は、二次口蓋の癒合に深く関わっていると報告されている。本研究目的は、siRNAを使用し二次口蓋癒合時の3種の受容体の機能を比較することである。siRNA治療群では、受容体の発現を約85%以上抑制した。siTbR-IもしくはsiTbR-II、治療群の前方および後方部の二次口蓋は口蓋裂を呈していた。siTbR-III治療群の口蓋は、正中上皮が残存していた。また、受容体の機能を抑制した結果、SMAD2のリン酸化を阻害し、MMP-13の発現にも影響を及ぼした。二次口蓋癒合時において、受容体の機能がそれぞれ異なることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Reported expression patterns for TGF-β receptors (TbR-I, -II, and -III) during palatogenesis suggest that they play essential roles in the mechanisms leading to palatal fusion. This study was to compare the functions of the TbRs during palatal fusion. Using organ culture of mouse palate, TbR-I, -II, and -III expressions were suppressed by the siRNAs of TbR-I, -II, and -III, respectively. Phospho-SMAD2 and MMP-13 expressions also measured. The siRNA treatment decreased the expression level of each receptor. When treated with either siTbR-I or -II, palatal shelves were complete clefting. Treatment with siTbR-III resulted in a persistent midline seam of medial edge epithelium (MEE). Treatment with all siTbRs altered the pattern of phosphor-SMAD2. Treated with siTbR-I or -II showed altered MMP-13 expression levels. The ability to identify and recover MEE cells during palatal fusion will aid in the evaluation of the different mechanistic events regulated by each TbR during palatogenesis.

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：TGF-beta 口蓋裂 二次口蓋 分子生物学 成長・発育

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の二次口蓋は、顎顔面の成長発育において、特異的な成長を行う。マウスでは胎生 12 日から舌の左右両側に垂直的に成長し、やがて下顎が前方へ成長するとともに、舌が沈下し、口蓋は舌の上方へ水平位をとる(胎生 14 日)。水平位をとった両側二つの口蓋はお互いに近づくように伸びていき、最終的にマウスでは 16 日までに口蓋は一塊となり上顎を形成する(Griffith et al., 1992)。

日本人の四百人に一人とされている、唇顎口蓋裂、特に口蓋裂の病因は、この胎生期における、二次口蓋の癒合および成長不全により発生する。具体的には、1) 二次口蓋突起が十分に成長しない場合、2) 成長してもなんらかの原因で水平位をとらない場合、3) 水平位をとっても正中口蓋上皮(Medial edge epithelium: MEE)が癒合しない場合、口蓋裂となる。

この MEE について、申請者らは TGF- β が口蓋癒合上皮に強い遺伝子発現を認めたことを明らかにし(Nakajima et al., 2010)、さらに申請者らは、受容体についても TGF- β type II 受容体(T β R-II)の conditional knock out マウスの generation に成功し、その phenotype は口蓋裂を呈していたことを明らかにした(Ito et al., 2003)。また、TGF- β type III 受容体(T β R-III)と二次口蓋癒合については、small interfering RNA (siRNA)を使用し、T β R-III の機能を knock down した際の phenotype について口蓋癒合の遅延を認め、down stream である SMAD-2 の phosphorylation を阻害していたことを明らかにした(Nakajima et al., 2007)。

しかし、二次口蓋成長発育時に、TGF- β から伝達された signal が、downstream 遺伝子にどのように影響しているか、さらに MMPs に代表される Extracellular matrix (ECM)の発現との関係については十分明らかとなっていない。

2. 研究の目的

近年、Transforming Growth Factor (TGF) - β superfamily の signaling pathway は、二次口蓋成長発育時に強い遺伝子合成タンパクの発現を示すことが明らかとなってきた(Ito et al., 2003; Nakajima et al., 2007, 2010)。TGF- β 受容体には type-I, -II, -III の 3 種あり、それぞれの機能の相違や downstream 遺伝子との関連性、すなわち二次口蓋成長発育における TGF- β のシグナル伝達については十分明らかとなっていない。また、関連する Extracellular matrix との関係についても十分明らかとなっていない。したがって、3 種の TGF- β 受容体をそれぞれ small interfering RNA にて knock down させた際の TGF- β dependent の二次口蓋成長発育に及ぼす影響について解明する。

- (1) 研究費の交付を希望する期間内の目的
各 TGF- β 受容体の siRNA を二次口蓋に

transfect し knock down させた際に生じる、二次口蓋の癒合についての観察、Western blot 法および real time RT-PCR 法にて各受容体および downstream 遺伝子発現について解明することを目的とする。

- (2) 当該分野におけるこの研究(計画)の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

近年、siRNA の技術開発により、特定遺伝子の機能低下させた際の signaling pathway や表現型について、null-mutant マウスを generate することなく、遺伝子情報の解析および観察することが可能となった(Nakajima et al., 2007)。そのため、本研究は siRNA を使用し二次口蓋に強く発現する TGF- β 受容体を knock down した際の、二次口蓋の phenotype および downstream signaling pathway の遺伝子伝達について解明することを目的とする。さらに、二次口蓋成長発育のみならず、他臓器や Cancer research における TGF- β 遺伝子 signaling pathway のメカニズムをも明らかにすることが可能となり、発生学・分子生物学的な成果に寄与するものと考えられる。また、顎顔面 defect の表現型を有する syndrome の病因の一部についても明かにできる可能性が示唆され、得られた成果は国内外とも関心が高い評価を得られるものと考えられる。

3. 研究の方法

- (1) Small interfering RNA (siRNA) 処理下における二次口蓋成長発育の観察

胎生 13 日目の ICR マウス口蓋突起のみ摘出し、フィルター上に両口蓋突起を合わせるように Grobstein organ culture mesh 上に試料をのせ、濃度 100, 200, 300nM の siRNA を含有した BGjb medium (Gibco) 溶液にて organ culture を行う。なお、organ culture は、37°C、5% CO₂-air atmosphere の環境下で、24, 48, 72 時間後まで行う(Nakajima et al., 2007, 2010)。

- (2) *In vitro* 凍結切片の作製

Organ culture にて siRNA 処理したマウスの二次口蓋を 4% paraformaldehyde 固定液にて固定した後、PBS にて洗浄を行う。その後、10% Sucrose in PBS で 4°C、over night で試料を浸透攪拌し、30% Sucrose in PBS にて同様に、4°C、overnight で試料を浸透攪拌した後、Tissue-Tek OCT にて凍結試料を作製し、-80°C で保存する。凍結試料は、本学生理学教室所有のクライオスタットにて凍結切片を作製する。切片の厚みは、10 μ m とし、スライド試料は-20°C に保存する(Nakajima et al., 2007)。それぞれ固定処理した後、HE 染色を行い Phenotype について観察を行う。

- (3) Real-time RT-PCR による mRNA 発現の定量解析

胎生 13 日目のマウス二次口蓋を siRNA 処

理し、24, 48, 72 時間後まで organ culture した sample を、実体顕微鏡下で口蓋正中癒合部を摘出し MEE 細胞の単離を行う。次に mRNA extraction kit (Quiagen) を使用し、MEE 細胞の mRNA の抽出を行う。抽出した mRNA より 1 st strand RT-PCR 法で cDNA 合成を行う。マウス TGF- β および受容体の塩基配列より 5' および 3' primer を設計合成し、Quantitative real time RT-PCR 法により、上記遺伝子の増幅を行い、遺伝子発現を検討する。なお、TGF- β およびその受容体発現量の Standard として、すでに報告されているマウス GAPDH の primer を使用し、各 culture 後の TGF- β 遺伝子および受容体の反応を定量的に比較検討する。

(4) Western blot 法によるタンパク質定量解析

siRNA 処理し、24, 48, 72 時間後まで organ culture した sample を、実体顕微鏡下で口蓋正中癒合部摘出し lysis buffer にて homogenize を行い、SDS-page 法にて、loading を行う。その後、semi-dry 法にて membrane に sample を transfer し、blocking 処理し、一次抗体および二次抗体を反応させた後、Western blot detecting kit (Roche)にて、X-ray film に発色させる。Target 遺伝子の siRNA が transfect しているかどうかについて、タンパク発現量をコントロールと比較し確認を行う。また、濃度依存性であるかどうかについても検討を加える。

(5) Down stream 遺伝子発現の定量解析

siRNA の transfect 確認後、down stream 遺伝子発現および ECM 遺伝子について、タンパク定量は Western blot 法、遺伝子解析は real time RT-PCR 法にて、GAPDH standard 遺伝子との比較を行い定量解析を行う。さらに Target 遺伝子の distribution および発現量については、前述した凍結切片にて免疫染色を行う。

(6) 統計処理による総合評価

以上を総合的に評価し、遺伝子の発現時期および量について、Standard に GAPDH を使用し、relative amount を計算した後、統計処理ソフトウェア SPSS を使用し、ANOVA 分散分析法を用い、その後 Tukey's HSD もしくは Student's t-test にて有意差検定を行う。

4. 研究成果

(1) 各受容体を siRNA 処理したマウス口蓋の T β R-I, -II, -III の発現

Figure 1 に示したように、各受容体の発現は siRNA の濃度依存的に抑制され、300nM の濃度でコントロールに比較し約 80%減少した。

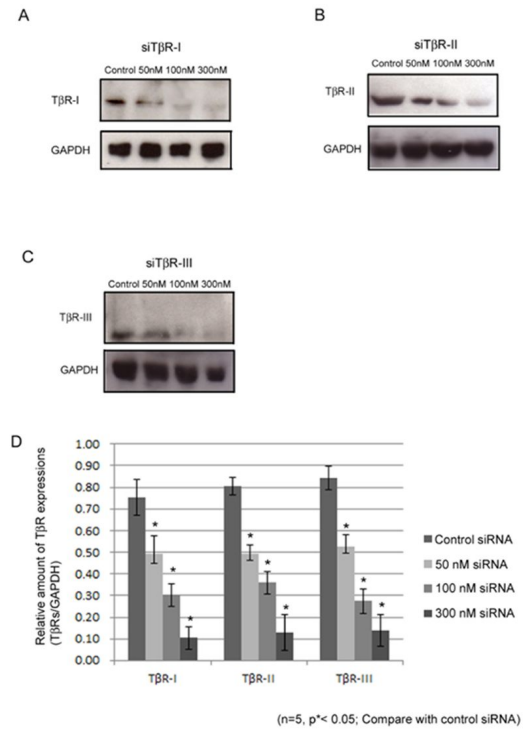


Figure 1. A: siT β R-I 治療した際の抑制効果, B: siT β R-II 治療した際の抑制効果, C: siT β R-III 治療した際の治療効果, D: 各治療群の発現効果の比較。

(2) 蛍光免疫染色の結果

Figure 2 に示した器官培養の口蓋は、E13+72h であり、免疫染色の結果についても治療群のターゲット遺伝子は明らかに発現の減少を認めた。

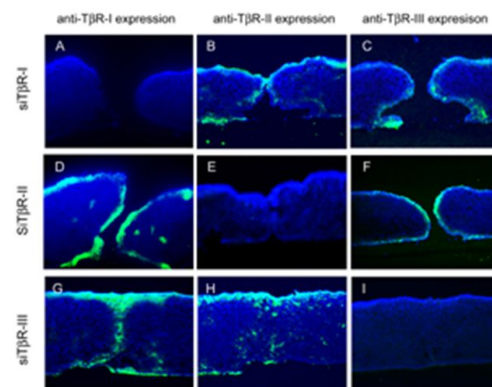


Figure 2. A: siT β R-I 治療群の T β R-I 発現, B: siT β R-I 治療群の T β R-II 発現, C: siT β R-I 治療群の T β R-III 発現, D: siT β R-II 治療群の T β R-I 発現, E: siT β R-II 治療群の T β R-II 発現, F: siT β R-II 治療群の T β R-III 発現, G: siT β R-III 治療群の T β R-I 発現, H: siT β R-III 治療群の T β R-II 発現, I: siT β R-III 治療群の T β R-III 発現。

(3) siRNA にて transfect した際の二次口蓋癒合の表現型分類 (Figure 3)

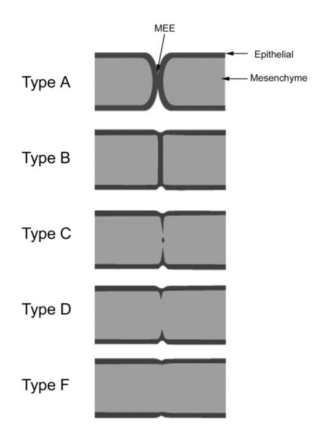


Figure 3. Type A: 口蓋棚が分離もしくは接触のみ。Type B: 口蓋正中上皮 (MEE) が 1 層もしくは 2 層残存。Type C: MEE が正中部に島状に残存。Type D: MEE が口腔側もしくは鼻側に三角形状に残存。Type E: 左右の口蓋棚が完全に癒合。

(4) 口蓋器官培養 24 時間後の表現型

コントロール群の二次口蓋の MEE については、1 層か 2 層の上皮の存在が認められた。siTβR-I および治療群は約 90% で Type A の表現型であった。siTβR-III 治療群は Type A もしくは Type B の表現型であった (Figure 4)。

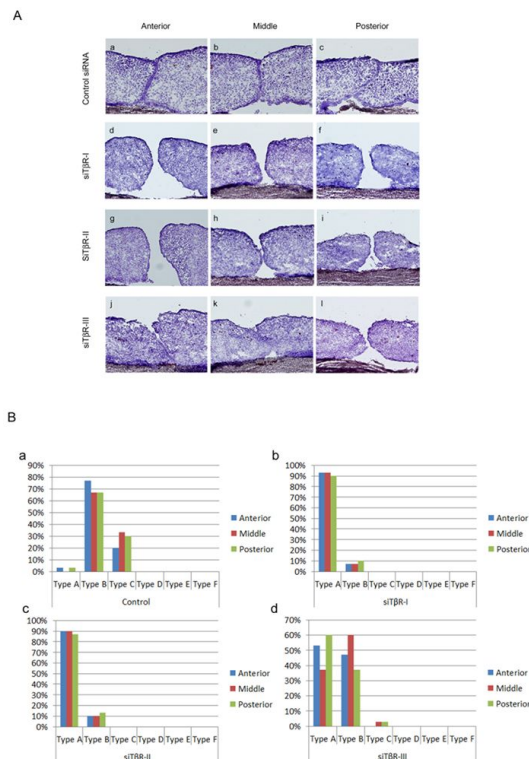


Figure 4. A: コントロール群および siRNA 治療群 24 時間後の二次口蓋。B: 表現型分類における比率 (a: コントロール群, b: siTβR-I 治療群, c: siTβR-II 治療群, d: siTβR-III 治療群)。

(5) 口蓋器官培養 48 時間後の表現型

コントロール群の口蓋は Type C もしくは Type D を示し、siTβR-I および TβR-II では約 80% の確率で Type A を示した。TβR-III では Type B もしくは Type C を示した (Figure 5)。

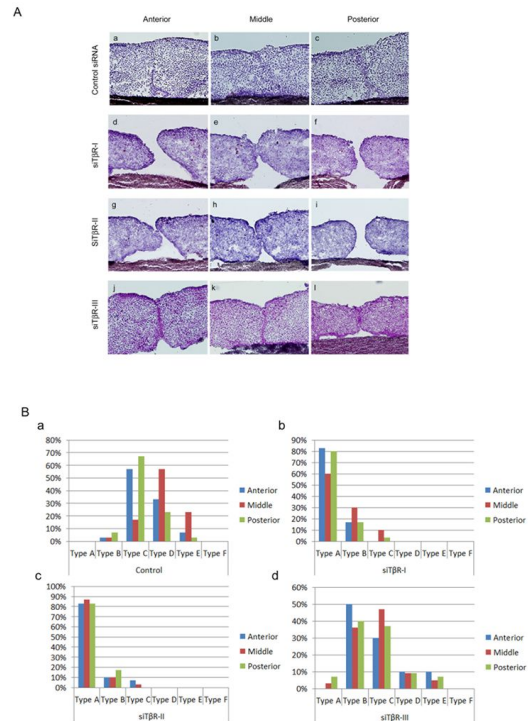


Figure 5. A: コントロール群および siRNA 治療群 48 時間後の二次口蓋。B: 表現型分類における比率 (a: コントロール群, b: siTβR-I 治療群, c: siTβR-II 治療群, d: siTβR-III 治療群)。

(6) 口蓋器官培養 72 時間後の表現型

コントロール群の口蓋は完全癒合し、siTβR-I および siTβR-II 治療群では口蓋前方部および後方部で Type A、中央部は Type B を示した。TβR-III では Type C もしくは Type D を示した (Figure 6)。

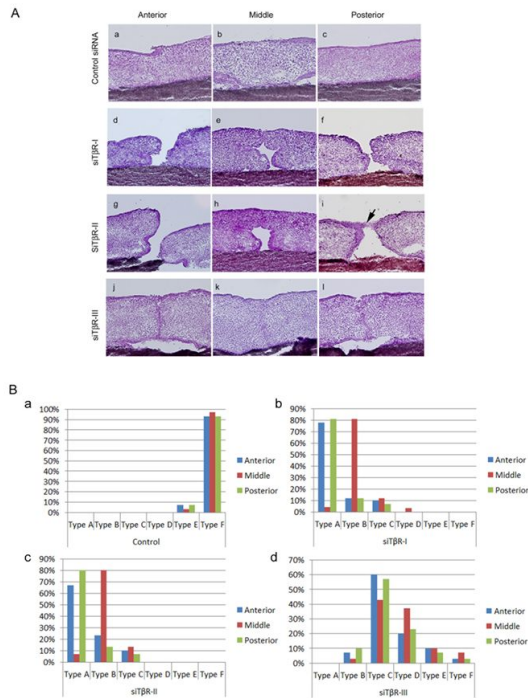


Figure 6. A: コントロール群および siRNA 治療群 72 時間後の二次口蓋. B: 表現型分類における比率 (a: コントロール群, b: siTBR-I 治療群, c: siTBR-II 治療群, d: siTBR-III 治療群).

(7) siRNA 治療を行った際の SMAD2 のリン酸化(p-SMAD2)および MMP-13 発現への影響
 SMAD2 のリン酸化(p-SMAD2)発現は、すべての siTBRs の transfect により減少した。MMP-13 では、siTBR-I および siTBR-II 治療群で有意に減少したが、TBR-III 機能抑制下では影響を及ぼさなかった。

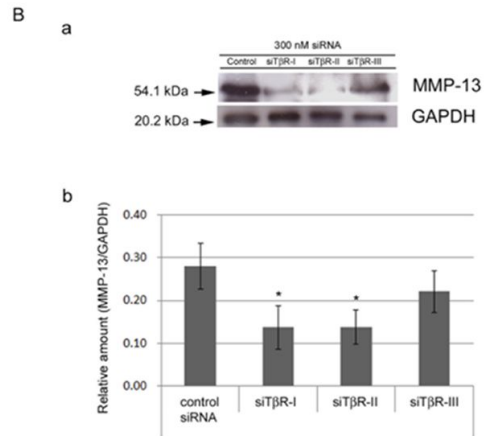
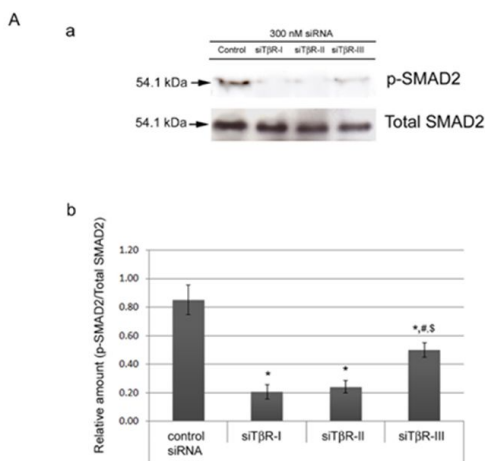


Figure 7. 各 TBR を siRNA 処理した場合の p-SMAD2 および MMP-13 の発現

A-a: Western blot 法による p-SMAD2 および SMAD2 発現. A-b: p-SMAD2 の比較発現量 (p-SMAD2 /total SMAD2) (* $p < 0.05$; コントロール群との比較, # $p < 0.05$; siTBR-I および siTBR-III との比較, § $p < 0.05$; siTBR-II および siTBR-III との比較). B-a: MMP-13 および GAPDH の発現. B-b: MMP-13 の比較発現量 (MMP-13/GAPDH) (* $p < 0.05$; コントロール群との比較).

【引用文献】

Griffith CM, Hay ED. Epithelial- mesenchymal transformation during palatal fusion. Carboxyfluorescein traces cells at light and electron microscopic levels, *Development*, 1992, 116, 1087-1099.

Ito Y, Yeo JY, Chytil A, Han J, Bringas P, Nakajima A, Shuler CF, Moses HL, Chai Y. Conditional inactivation of Tgfb2 in cranial neural crest causes cleft palate and calvaria defects, *Development*, 2003, 130, 5269-5280.

Nakajima A, Ito Y, Asano M, Maeno M, Iwata K, Mitsui N, Shimizu N, Cui XM, Shuler CF. Functional role of transforming growth factor-beta type III receptor during palatal fusion, *Dev Dyn*, 2007, 236, 791-801.

Nakajima A, Tanaka E, Ito Y, Maeno M, Iwata K, Shimizu N, Shuler CF. The expression of TGF-β3 for epithelial-mesenchyme transdifferentiated MEE in palatogenesis, *Journal of Molecular Histology*, 2010, 41, 343-55.

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)

Hirai M, Nakajima A, Kawai N, Tanaka E,

Igarashi Y, Sakaguchi M, Sameshima GT, Shimizu N. Measurements of the torque moment in various archwire-bracket-ligation combinations, European J Orthodontics, Eur J Orthod, 34, 374-80, 2012. (査読有)

Nakajima A, Tsuboi Y, Suzuki I, Honda K, Shinoda M, Kondo M, Matsuura S, Shibuta K, Yasuda M, Shimizu N, Iwata K. PKCgamma in Vc and C1/C2 is involved in trigeminal neuropathic pain, J Dent Res, 90, 777-81, 2011. (査読有)

Shimada K, Nakajima A, Ikeda K, Ishibashi K, Shimizu N, Ito K. CD47 regulates the TGF- β signaling pathway in osteoblasts and is distributed in Meckel's cartilage, J Oral Sci, 53, 169-75, 2011. (査読有)

〔学会発表〕(計5件)

中嶋 昭, 齋藤瑛子, 田中栄二, 前野正夫, Charles F Shuler, 清水典佳, 二次口蓋癒合時における T β Rs を介した TGF- β signaling pathway の解明, 第 72 回日本矯正歯科学会大会, 2013 年 10 月 7 日(月) ~ 9 日(水), 長野県松本市(松本市総合体育館).

中嶋 昭, 前野正夫, 田中栄二, Charles F Shuler, 清水典佳, 二次口蓋癒合時における T β RII および T β RIII を介した TGF- β signaling pathway の解明, 第 71 回日本矯正歯科学会大会抄録, 2012 年 9 月 26 日 ~ 28 日 岩手県盛岡市(盛岡市アイスアリーナ).

Nakajima A, Shimizu N, Kawai Y, Murata M, Nishi Y. The influence of torque moment for stress distribution comparing between three different materials of bracket using non-linear finite element analysis during tooth movement, 112th Annual Meeting of the American Association of Orthodontists, 4th May-8th May, 2012, Hawaii, USA.

中嶋 昭, 前野正夫, Charles F Shuler, 清水典佳, 二次口蓋癒合時における T β RII/III を介しての細胞外マトリックスおよび ZFYVE9 の発現, 第 70 回日本矯正

歯科学会大会, 2011 年 10 月 17 日 ~ 20 日 愛知県名古屋市(名古屋国際会議場).

中嶋 昭, 嶋田浩一, 嶋田京子, 伊藤八一, 前野正夫, 鈴木直人, 大塚吉兵衛, 清水典佳, CD47 は TGF- β 1 シグナル伝達を調整し骨形成に関与する, 第 20 回硬組織再生生物学会, 2011 年 8 月 27 日, 日本大学歯学部.

〔図書〕(計1件)

中嶋 昭, 清水典佳. Part 4 歯科矯正用アンカースクリュー この症例にこの方法; 後藤滋巳, 清水典佳, 森山啓司, 宮澤 健, 榎宏太郎, 石川博之 編集, 安全・安心 歯科矯正用アンカースクリュー この症例にこの方法, 第 1 版, 医薬出版, 東京, p.p. 72-79, 200-207, 2013.

〔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

中嶋 昭 (NAKAJIMA, Akira)
日本大学・歯学部・助教
研究者番号: 56297842

(2) 研究分担者

()
研究者番号:

(3) 連携研究者

()
研究者番号: