

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659853

研究課題名（和文）口腔粘膜上皮細胞の病的癒着に関する新規分子機構の探索

研究課題名（英文）Molecular analysis of Tbx1-mediated oral adhesion

研究代表者

船戸 紀子（FUNATO NORIKO）

東京医科歯科大学・医歯学研究支援センター・講師

研究者番号：10376767

研究成果の概要（和文）：

T-box 型転写因子をコードする TBX1 は、新生児 4000 人に 1 人に認められる 22q11.2 欠失症候群（DiGeorge 症候群、velo-cardio-facial 症候群）の疾患遺伝子である。同症候群では、胸腺形成不全による細胞性免疫異常、心血管奇形、両眼隔離、小顎症、低耳介、耳介変形の他に、口蓋裂を認める。

申請者らは、Tbx1 遺伝子欠損マウスに多様性のある口蓋裂を認め、口蓋粘膜上皮と下顎との病的癒着がおきること、上皮細胞の増殖や分化に異常があることを見いだした。また、細胞レベルの解析から、Tbx1 が細胞周期調節に関与した。以上の結果より、Tbx1 が、口蓋発生の時期に、口蓋粘膜上皮の増殖や分化の調節に必須であり、病的癒着を防ぐ分子であることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

T-box transcription factor, *Tbx1*, is the major candidate gene for 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge/ Velo-cardio-facial syndrome) characterized by facial defects, thymus hypoplasia, cardiovascular anomalies, and cleft palates.

In this project, we found that genetic disruption of *Tbx1*, a major candidate gene for the human congenital disorder 22q11.2 deletion syndrome (Velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome), led to abnormal epithelial adhesion between the palate and mandible in mouse, resulting in various forms of cleft palate similar to human conditions. Our findings suggested that *Tbx1* regulated the balance between proliferation and differentiation of keratinocytes and was essential for palatal fusion and oral mucosal differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

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：T-box 型転写因子、口蓋裂、癒合

1. 研究開始当初の背景

T-box 型転写因子をコードする TBX1 は、新生児 4000 人に 1 人に認められる 22q11.2 欠失症候群 (DiGeorge 症候群、velo-cardio-facial 症候群) の疾患遺伝子である (OMIM #188400)。同症候群では、胸腺形成不全による細胞性免疫異常、心血管奇形、両眼隔離、小顎症、低耳介、耳介変形の他に、口蓋裂を認める。

口唇・口蓋裂は日本ではおよそ 500~700 人にひとりの頻度で出現する先天異常である。新生児の 3~5% に先天異常を認め、その内 70% は顎顔面頭蓋に異常があるといわれている。一般に遺伝子改変マウスでは単独口蓋裂が認められることが多いが、*Tbx1* 遺伝子欠損マウスには、口蓋裂に加え、粘膜下口蓋裂、不完全口蓋裂という多様性を示し (船戸ら、研究開始当初未発表データ)、*Tbx1* 遺伝子欠損マウスは口蓋裂モデルマウスとしても興味深い。

Tbx1 が口腔粘膜上皮細胞に発現することは報告されていたが、*Tbx1* の口腔粘膜上皮細胞発生における役割、および口腔粘膜が病的に癒着するメカニズムは、研究開始当初は未知であった。

2. 研究の目的

口蓋裂や症候群の新たな病因、および、口腔粘膜癒着に関与するメカニズムを解明する。そのため、*Tbx1* 遺伝子改変マウスを用いて、口蓋の形態、口腔粘膜上皮細胞の増殖、分化、細胞死について検討する。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウス

以下に示す遺伝子改変マウスを交配した上で実験に用いた。

- ① *Tbx1-Cre* リコンビナーゼ トランスジェニックマウス
- ② *Tbx1* コンディショナルノックアウトマウス (*Tbx1^{loxP/loxP}*)
- ③ *R26* レポーターマウス (*R26R*)
- ④ *K14-Cre* リコンビナーゼ トランスジェニックマウス
- ⑤ *Wnt1-Cre* リコンビナーゼ トランスジェニックマウス
- ⑥ *Twist2-Cre* リコンビナーゼ ノックインマウス
- ⑦ *Mox2-Cre* リコンビナーゼ トランスジェニックマウス

(2) 形態学的観察

形態学的観察のために、上記遺伝子改変マウスを用いて、

- ① 骨軟骨染色
 - ② 一般組織染色
 - ③ Section in situ hybridization
 - ④ Whole-mount in situ hybridization
 - ⑤ ベータガラクトシダーゼ染色
 - ⑥ 免疫染色
 - ⑦ TUNEL assay
- を行った。

(3) 分子生物学的解析

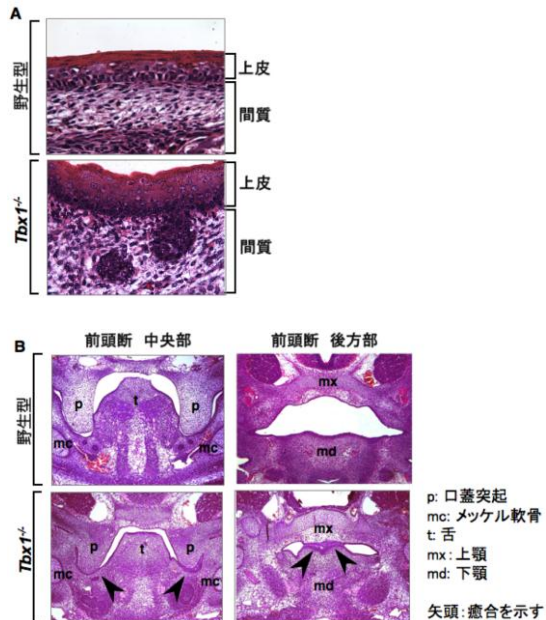
Tbx1 およびコントロールである *EGFP* (Enhanced Green Fluorescent Protein) 遺伝子を発現するアデノウイルスを作成した。

その上で、アデノウイルスを感染させた上皮細胞 MCF-7 を用いて、RT-PCR、およびフローサイトメーターにて細胞周期解析を行った。

4. 研究成果

(1) *Tbx1* 遺伝子欠損マウスの口蓋の解析

Tbx1 遺伝子欠損マウス (*Tbx1^{-/-}*) に多様性のある口蓋裂を認めた。また、口蓋粘膜上皮と下顎との病的癒着がおきることを見いだした。



また、*Tbx1* 遺伝子欠損マウスでは間葉系細胞の増殖が抑制され、口蓋突起が小さいことが分かった。

(2) *Tbx1* コンディショナルノックアウトマウスの解析

口蓋粘膜に *Tbx1* の発現を認める。そこで、*Tbx1* を上皮特異的に欠損させたコンディショナルノックアウトマウス (*Tbx1^{loxP/KO}; K14-Cre*) を作成したところ、口蓋前方部の口蓋裂を認めた。一方、*Tbx1* を口蓋間葉系特異的に欠損させたコンディショナルノックアウトマウス (*Tbx1^{loxP/KO}; Wnt1-Cre*) を作成したところ、口蓋裂は認めなかった。

(3) *Tbx1* 遺伝子欠損マウス上皮の分化・増殖・アポトーシスの解析

上皮の分化に関わる特異的抗体を用いた免疫染色から、発生過程で上皮細胞の分化に異常があることが分かった。また、*Tbx1* 遺伝子欠損マウスの胎生 14.5 日において口腔上皮の増殖も亢進していた。

アポトーシスには優位な差が認められなかった。

(4) *Tbx1* 遺伝子欠損マウスにおける口蓋形成に関わる遺伝子群の発現

Tbx1 遺伝子の欠損が、口蓋形成に関わる遺伝子群の発現に与える影響を与えるかどうか調べるために、胎生 13.5 日の野生型および *Tbx1* 遺伝子欠損マウス口蓋を用いて Whole-mount in situ hybridization を行った。その結果、*Tbx1* が *Bmp4* や *Pax9* の発現に関わることが示唆された。一方、*Jag2*, *Fgf10*, *ephrinB1*, *ephrinB2*, *EphB2*, *EphB3*, *Msx1*, *Barx1*, *Ptch1*, *Pitx2*, *Fgf8* の発現には差が認められなかった。

(5) *Tbx1* の細胞レベルでの機能解析

Tbx1 の強制発現により、上皮細胞の増殖が抑えられ、*Tbx1* が細胞周期調節に関与することが分かった。

本研究成果については、論文にて報告済みである (Funato N ら、*Hum Mol Genet.* 2012)。

さらに、口腔上皮幹細胞における *Tbx1* の役割について、上記モデルマウスを用いて現在解析中である。

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 Funato N, Nakamura M, Richardson JA, Srivastava D, Yanagisawa H. *Tbx1* regulates oral epithelial adhesion and palatal development. *Hum Mol Genet.* 2012 Jun 1;21(11):2524-2437. 査読有
doi: 10.1093/hmg/dds071.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Funato N, Nakamura M. Protein inhibitors of activated STAT (PIAS) proteins are new negative regulators of Runx2, 2012 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology in San Francisco, USA. December 15-19, 2012.
- ② Morita J, Funato N, Kobayashi Y, Nakamura M, and Moriyama K. Soluble FGFR2 with S252W prevent craniosynostosis of Apert model mouse. Japanese Association of Dental Research, Niigata, Japan, December 14-15. 2012.
- ③ Funato N, Nakamura M. Protein Inhibitors of Activated STAT (PIAS) Proteins Regulate Runx2 Transactivation Activity. San Diego, USA. Sep 19, 2011.

[図書] (計 1 件)

- ① Funato N, in *Atlas of Orthodontic Treatment for Patients with Birth Defects.* Kuroda T, Ohyama K, Motohashi N, Moriyama K Eds. Needham Press, 2012, pp.123-126, 156-166.

[その他]
ホームページ等

東京医科歯科大学 医歯学研究支援センター 疾患遺伝子部門
<http://www.tmd.ac.jp/cmn/gene/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船戸 紀子 (NORIKO FUNATO)

東京医科歯科大学・医歯学研究支援センター・講師

研究者番号：10376767

