

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592780

研究課題名(和文) マウス二次口蓋突起の先端上皮間接着の分子制御と口蓋裂の発症機構

研究課題名(英文) Molecular regulation governing the bilateral palatal shelf adhesion and causing cleft palate in embryonic mice

研究代表者

田谷 雄二 (TAYA, YUJI)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：30197587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマウス口蓋突起先端上皮(MEE)の細胞間接着の分子機構を遺伝子・miRNA発現解析と免疫組織化学により検討した。接着期の突起先端部では、Caskを中心とする分子群としてCaskのほかにDlg1, Tcfe2a等の発現がMEE・間葉細胞で検出されたが、接着分子F11rと増殖抑制因子Cdkn1aはMEE細胞でのみ発現し、それぞれ細胞膜下、核内の局在も確かめた。この2分子の発現制御には7個のmiRNAの寄与が示唆された。同時期のMEE細胞ではCaskの核移行も確かめられた。以上から、Cask関連分子群は特異なmiRNA制御下でMEE細胞間接着だけでなく増殖停止にも寄与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We herein focused on the molecular mechanism governing the cell adhesion of the medial edge epithelia (MEE) of secondary palatal shelves in mouse embryos. To this end, we dissected out of MEE cells of palatal shelves at E14.0-14.5. The expression levels and subcellular localizations of Cask and its related genes/proteins in MEE cells were examined using DNA microarray analysis, LMD/real-time PCR and immunohistochemistry. F11r and Cdkn1a were detected only in MEE cells at the stage of contact, while Cask, Dlg1, Lin7c, Id1 and Tcfe2a were expressed in both MEE and mesenchymal cells. 7 miRNAs regulating the expression of F11r and Cdkn1a were also identified. The nuclear translocation of Cask in MEE cells at the same stage was verified. Our data suggest that Cask and its related molecules contribute to not only the cell adhesion but also cell cycle arrest of MEE at the stage of contact and unique miRNAs may act on their events through the regulation of Cask-related gene expression.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯学 病理学 マウス胎仔 二次口蓋発生 突起間接着 口蓋裂 遺伝子発現 microRNA

1. 研究開始当初の背景

口蓋裂は全身諸器官に発生する先天性奇形の中でも発症頻度の高い疾患であり、発症機序の解明と予防の確立が重要な課題となっている。二次口蓋形成の特徴として、左右の口蓋突起が時間的・空間的な同調性と対称性を維持しながら発育を続け、舌側面に沿った下方伸長期、舌上方への挙上期、水平方向への伸長期を経て正中部で接着する。左右側の口蓋突起の接着・癒合機構として、口蓋突起先端上皮 (MEE) 細胞表面での糸状仮足 (filopodia) の形成とプロテオグリカンを介した細胞間接触に始まり、接着分子によるより強固な細胞間接着が達成される。左右側突起に由来する MEE 細胞は上皮層内での再配列を遂げて上皮索を構築した後に、上皮索が消失して間葉織の合流により二次口蓋形成が完了する。この一連の発生過程では多数の分子種が関与しており、口蓋裂のリスク因子や病態も多岐にわたる。

研究代表者らはこれまでに、文献情報に基づき遺伝子改変マウスモデルに発症する口蓋裂および顎顔面奇形の病態についてのデータベースを構築してきた。特に、顎顔面諸器官の重篤な奇形発症の一環として現れる口蓋裂と異なり、口蓋裂以外に重篤な奇形を伴っておらず、口蓋裂の発症率が 80~100% と高い遺伝子欠損モデルに注目している。これらの口蓋裂モデルでは、障害される二次口蓋の発生段階と病態に基づき、当該遺伝子の発生段階に特異的な分子機能を推定できる。現在までのデータ解析では、単独欠損あるいは重複欠損により口蓋裂 (あるいは唇裂口蓋裂) を発症させるマウスモデルは 96 例に達するが、口蓋裂発症を主な表現型とする遺伝子欠損モデルは 9 例であり、接着期を特異的に障害するのは *Tgfβ3* と *Cask* の 2 つの遺伝子欠損モデルに限られることを明らかにした。

研究代表者らは先に英国マンチェスター

大学 Ferguson グループとの共同研究において、*Tgfβ3* が口蓋突起の MEE 細胞間接着に不可欠であり、糸状仮足の形成を制御していること、*Tgfβ3* 欠損 (-/-) マウスでは 100% の発症率で口蓋裂が起こるが、*Tgfβ3* (-/-) のマウス口蓋突起の器官培養実験では、外来性 *Tgfβ3* 添加により MEE 細胞間接着プログラムを再起動できることを明らかにした。

Cask 欠損 (-/-) マウスの口蓋裂発症率は 80% であり、他に目立った形成異常を伴わない (Atasoy et al, PNAS 104, 2525-2530, 2007)。*Cask* 分子の特徴として、複数の結合ドメイン (L27, PDZ, SH3, protein4.1 など) を持ち、様々な分子間結合により多面的機能を発揮することが推定される。これまでにマウス MEE 細胞での *Cask* の局在や口蓋裂に繋がる分子機能については報告されていないが、*Cask* は上皮細胞の細胞膜下で細胞間接着分子を支持する分子複合体を構築していることや PDZ ドメインで膜貫通型のプロテオグリカン Syndecan1 と結合することが報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、口蓋裂の細胞分子レベルでの発症機序の解明を目指して、二次口蓋形成の接着期 MEE 細胞における *Cask* の分子機能に関して、以下の 3 つの作業仮説を検証するとともに、これらの分子ネットワークの制御に働く microRNA (miRNA) について検討した：

① *Tgfβ3* シグナルの制御下で Syndecan1 は Cdc42 などと協働して糸状仮足の形成と糸状仮足間での初期接触に働く。キナーゼ活性をもつ *Cask* は Syndecan1 の細胞内ドメインと結合して、リン酸化を介した情報伝達に関与する。② プロテオグリカンを介した初期接触に継続する MEE 細胞間の接着現象では、*Cask* は細胞膜直下で分子複合体を形成して接着分子と連結する。③ 接着期 MEE 細胞は細胞周期から外れているが、この増殖停止に

は Cask の核内移行による転写制御が関わっている。

3. 研究の方法

日本歯科大学生命歯学部動物実験委員会のガイドラインに従って、実験動物として ICR 妊娠マウスを使用し、所定の妊娠時期まで飼育した。試料採取に際しては、胎生 14.0～14.5 日の妊娠マウスを麻酔による安楽死後、速やかに胎仔個別に突起位置に基づき水平伸長期 (P1)、接着期 (P2)、断裂・間葉合流期 (P3) に相当する正中部 (前方 1/3 付近長さ約 400 μ m・幅約 200 μ m) を採取した (各時期の胎仔約 30 個体を使用)。

DNA マイクロアレイ解析には、45,101 プローブ (全遺伝子数 22,402 個に相当) をプロットした GeneChip®アレイ (Mouse Expression 430 2.0 Array, Affymetrix) と Gene Spring (ver. 7.3.1, Silicon Genetics Inc., USA) により時期・部位別に発現変動を示す遺伝子リスト (Gene Lists) を作成するとともに、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 解析 (Ingenuity Systems, USA) を使って gene profiling を実施した。遺伝子相互のパスウェイ解析には IPA のほかに、KEGG パスウェイ (京都大学, www.genome.jp/kegg) と Bioscripts library を使用した。また、遺伝子改変による口蓋裂発症マウスモデルのデータベースとして、MGI (Phenotypes & Mutant alleles) を利用した。DNA マイクロアレイ法で検出された遺伝子発現レベルを検証する目的では、アレイ分析用試料をリアルタイム PCR で定量分析した。遺伝子発現の部位特異性を検証する目的では、免疫組織化学による翻訳産物の局在を確認するとともに、EMAGE/MGI (mRNA in situ hybridization database) データベースの ISH 画像から遺伝子発現部位を確認した。さらに、両突起の微細領域での遺伝子発現を確認する目的で、組織顕微切断 (laser microdissection; LMD) とリアルタ

イム PCR による解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 二次口蓋突起の接着・癒合段階における時期特異的な発現を示す遺伝子群

水平伸長期 (P1)、接着期 (P2)、間葉合流期 (P3) の口蓋突起正中部試料間での DNA マイクロアレイデータに基づいた時期特異的な遺伝子発現の網羅的な解析によって、全遺伝子数 22,402 個のうち、P1 から P3 の間で時期特異的な発現を示した遺伝子 2,749 個が抽出された。BiNGO を用いた Gene Ontology (GO) 解析から、158 項目が有意 ($p < 0.05$) と検定された。その内訳として、水平伸長期で有意な遺伝子群 (P1>P2, P1>P3) は 60 個を数え、核酸代謝、中胚葉の形態形成などに関わっていた。接着期で有意な遺伝子群 (P2>P1, P2>P3; 25 個) は MAPK 系シグナルの不活性化、上皮形態形成、細胞骨格改築などに関わること、断裂期で有意な遺伝子群 (P3>P1, P3>P2; 73 個) は細胞死、貪食、細胞接着などに関わることが推定された。

さらに、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) による遺伝子群の機能・パスウェイなどのアノテーション解析から、Cask と相互作用する分子群として 103 種が抽出され、これらの分子群では、「tight junction」の pathway が有意な帰属性を示した。京都大学が運営する KEGG pathway データベースを活用し「tight junction」の経路における Cask の上下流に位置する分子種が確かめられた。この pathway 内には、Cask と結合して細胞間接着に働く分子群だけでなく、「Tgf β pathway」と「RhoA signaling」を介して「cell migration」「cell cycle」「EMT」に関連する分子群と繋がっていることが注目された。また、Cask との関係が想定される Tgf β 3, Cdc42, Syndecan1 は、口蓋突起間の接着に先立って細胞間認識に働く「糸状仮足形成」の分子ネットワークの構成分子であることが

明らかとなった。IPA と Cytoscape (プラグイン literature search および BiNGO) を用いた解析データを比較検討した結果、Cask と相互作用する分子群には F11r, Dlg1, Ebp4.1, ID1, Tbr1 などの一致した分子種が多数含まれることも確認できた。リアルタイム PCR により *Cask*, *Tgfβ3*, *F11r*, *Dlg1*, *Lin7c*, *Cadm1*, *Calml*, *Sumo1*, *Cdc42*, *Syndecan1*, *Cdkn1a*, *Id1*, *Tcfe2a* の発現について検証できた。

(2) 接着期 MEE 細胞で特異的に発現する遺伝子群の同定と定量解析

接着期二次口蓋突起の MEE 細胞と MEE 近傍の間葉細胞をマイクロダイセクション (LMD) により分離・採取することにより、両細胞種の遺伝子発現レベルを個別に定量解析することができた。その結果として、接着期口蓋突起において MEE・間葉のいずれでも発現する分子と、MEE 細胞でのみ発現する分子とを区別することができた。*Cask*, *Dlg1*, *Lin7c*, *Sumo1*, *Calml*, *Cdk5*, *Tcfe2a*, *Id1* は MEE 細胞だけでなく、間葉細胞でも発現が認められたが、接着分子の *F11r* と増殖抑制因子の *Cdkn1a* の発現は MEE 細胞だけに検出された。

(3) 水平伸長期から間葉合流期までの MEE 細胞内の分子局在

免疫組織化学による解析でも、Cask は、水平伸長期では MEE 細胞と間葉細胞の細胞質に局在していたが、接着期になると、MEE 細胞において核内の局在が観察され、核移行が確かめられた。さらに、MEE 細胞間の接着分子として想定された F11r は、接着期 MEE 細胞の細胞質に局在が認められ、Cdkn1a は MEE 細胞の核内で局在することが明らかになった。これらの発現細胞と細胞内局在の解析結果から、Epb4.1 を除き、想定されたすべての分子の発現が MEE 細胞で認められ、しかも MEE 細胞間の接着分子として想定された F11r と増殖抑制因子の Cdkn1a は MEE 細胞で発現し

ていることも確かめられた。これらのデータは、左右口蓋突起が接着する時期の MEE 細胞では細胞膜下に F11r を含む Cask を中心とした分子複合体を形成していることを示唆しており、Cdkn1a を介した負の転写制御が接着期 MEE 細胞の増殖活性の喪失に起因しているものと考えられた。

さらに、遺伝子発現解析とも考え合わせると、MEE 細胞内の Cask の核内での分子機序については、通常 Id1 の作用により Tcfe2a の転写抑制の状態にあるが、Cask が核内に移行して Id1 と結合すると、Tcfe2a の転写抑制が解除され、Cdkn1a の転写が活性化、Cdkn1a 分子の働きによって Cyclin や CDK 分子が阻害され、MEE 細胞の増殖が抑制されることが示唆された。なお、間葉細胞では口蓋突起の癒合段階に関係なく常時 Cask は細胞質に留まっており細胞増殖が維持されることが想定された。

(4) 接着期 MEE 細胞で特異的に発現する miRNA 群とその機能

遺伝子解析と免疫組織学的解析から注目された分子について、その発現を制御する、または制御される microRNA (miRNA) を検討した結果、8 遺伝子に関連する 23 個の miRNA が抽出され、このうちの 7 個の miRNA (*F11r*: miR-145-5p, *Cdkn1a*: miR-25, miR-18a-5p, miR-17-5p, miR-17, miR-503-5p, miR-92a-3p, miR-208) が *F11r* と *Cdkn1a* の発現を制御することによって MEE 細胞間接着と細胞周期の停止に寄与していることが示唆された。

以上のことから、Cask は Tgfb3 とも連携して MEE 細胞間の接着に働いているだけでなく、細胞増殖の抑制機能を持っており、いずれの機能についても特異な miRNA が働いていることが考えられた。

(5) まとめ

本研究では、Cask を中心とした口蓋突起の

接着と癒合に寄与する分子機構について、DNA マイクロアレイ、LMD とリアルタイム PCR を併用した遺伝子発現の定量解析、免疫組織化学により発生時期・部位に特異的に発現する遺伝子群と miRNA 群を同定し、その分子機能を解析した。その結果、3つの作業仮説が実証できたと考えている。今後の課題として、口蓋裂の発症機構の解明に向けて、一次障害によって二次口蓋発生に異常をきたす原因遺伝子の探索とその機能を解析し、*Cask* や *Tgfb3* 以外の遺伝子についても口蓋裂発症の分子機構を明らかにしていくことが重要と考えている。

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 3 件)

① Sasaki Y, Taya Y, Saito K, Fujita K, Aoba T, and Fujiwara T: Molecular contribution to cleft palate production in cleft lip mice. *Congenital Anomalies* (査読有) 54, 94 - 99, 2014. doi:10.1111/cga.12038.

② Fujita K, Taya Y, Shimazu Y, Aoba T, and Soeno Y: Molecular signaling at the fusion stage of the mouse mandibular arch: involvement of insulin-like growth factor family. *Int. J. Dev. Biol.* (査読有), 57: 399-406, 2013, doi:10.1387/ijdb.120110ys.

③ Soeno Y, Fujita K, Kudo T, Asagiri M, Kakuta S, Taya Y, Shimazu Y, Sato K, Tanaka-Fujita R, Kubo S, Iwakura Y, Nakamura Y, Mori S, and Aoba T: Generation of a mouse model with down-regulated U50 snoRNA (SNORD50) expression and its organ-specific phenotypic modulation.

PLoS ONE (査読有), 8(8): e72105, 2013, doi:10.1371/journal.pone.0072105

[学会発表] (計 7 件)

① 田谷雄二, 藤田和也, 添野雄一, 島津徳人, 佐藤かおり, 青葉孝昭: マウス舌形態形成におけるリンパ管発生と分子制御, *J Oral Biosci.* 55(Suppl):128(No. 0-84), 2013 年 9 月 21 日.

② 島津徳人, 田谷雄二, 添野雄一, 白子要一, 藤田和也, 佐藤かおり, 青葉孝昭: 脈管構造の組織立体構築と Virtual Reality 観察, *J Oral Biosci.* 55(Suppl):110(No. 0-14), 2013 年 9 月 21 日.

③ 島津徳人, 添野雄一, 白子要一, 藤田和也, 田谷雄二, 中右かよ, 佐藤かおり, 青葉孝昭: マウス舌脈管ネットワークの組織立体構築と仮想空間での動的観察. *日本解剖学会抄録集*, 75(1):102, 2013 年 3 月 29 日.

④ Taya Y, Shimazu Y, Fujita K, Soeno Y, Sato K, and Aoba T: Three-dimensional comprehension of developing blood vessel and nerve networks in the craniofacial region of mouse embryos. *日本解剖学会抄録集*, 75(1):151, 2013 年 3 月 29 日.

⑤ 田谷雄二, 島津徳人, 佐藤かおり, 藤田和也, 添野雄一, 青葉孝昭: マウス舌発生における舌筋前駆細胞の移住は舌下神経の軸索誘導に働く, *J Oral Biosci.* 54(Suppl): 106(No. 0-91), 2012 年 9 月 16 日.

⑥ Taya Y, Shimazu Y, Fujita K, Soeno Y, Sato K, Aoba T: Embryonic morphogenesis and organization of vascular and nervous networks in mouse craniofacial region, *Joint Meeting of The 45th Annual Meeting*

of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, Program & Abstract Book: 176 (P1-124), 2012 年 5 月 29 日.

⑦ Taya Y, Shimazu Y, Fujita K, Soeno Y, Sato K, Aoba T: Three-dimensional visualization of developing vascular-nervous networks in embryonic mice, 2012 Sino-Japan Dental Conference Proceedings: p99(No.00087) , 2012 年 4 月 26-27 日.

[図書] (計 4 件)

① 田谷雄二 (分担執筆): 歯学生のための最新・病態病理学入門 (青葉孝昭監修 佐藤かおり編集), pp1-177, 杏林社, 東京, 2014 年.

② 田谷雄二、青葉孝昭 (分担執筆): 1 章 口腔・頭蓋・顎顔面領域の発育異常, スタンダード口腔病態病理学 (第 2 版) (賀来亨, 榎木恵一編集), pp1-14, 学建書院, 東京, 2013 年.

③ 田谷雄二 (分担執筆): 今すぐ始める組織立体構築—ImageJ/Fiji の活用プロトコール—、(島津徳人編、青葉孝昭監修), 日本ビジュアルサイエンス, 東京, 2013 年.

④ 田谷雄二 (分担執筆): 日本歯科大学 病理学講座編 (青葉孝昭 監修 佐藤かおり 編集): 最新口腔病理学の整理, キタ・メディア, 東京, 2013 年.

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 件)

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

[その他]

ホームページ等

<http://www.ndu.ac.jp/~pathhome/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田谷 雄二 (TAYA YUJI)
日本歯科大学・生命歯学部・准教授
研究者番号: 30197587

(2) 研究分担者

添野 雄一 (SOENO YUICHI)
日本歯科大学・生命歯学部・講師
研究者番号: 70350139

佐藤 かおり (SATO KAORI)
日本歯科大学・生命歯学部・講師
研究者番号: 90287772

青葉 孝昭 (AOBA TAKAAKI)
日本歯科大学・生命歯学部・教授
研究者番号: 30028807

藤田 和也 (FUJITA KAZUYA)
日本歯科大学・生命歯学部・助教
研究者番号: 70549055

(3) 連携研究者

()

研究者番号: