

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861545

研究課題名(和文) エピジェネティクスから探る口唇・口蓋の発生分子機構

研究課題名(英文) The role of microRNAs in lip and palate development.

研究代表者

川崎 真依子 (KAWASAKI, Maiko)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：40584587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、microRNAの口唇口蓋形成における役割を検索した。microRNA形成に必須のタンパクであるDicerを欠損させることで、microRNAの機能を解析した。Dicerの上皮特異的欠損マウスに、口唇、口蓋に著しい異常は認められなかった。一方、Dicerの神経堤由来細胞特異的欠損マウスで、口唇裂、口蓋裂が観察され、神経堤由来細胞のmicroRNAが口唇・口蓋形成に重要であることが示唆された。口蓋裂は口蓋突起の舌上への挙上不全、口唇裂は下顎突起の近心部の形成不全によって引き起こることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The role of microRNAs in lip and palate development was investigated in this study. In order to examine microRNA function, we generated mice with mutation of Dicer, which is an essential molecule for microRNA processing. Mice with epithelial conditional mutation of Dicer exhibited no significant anomalies in the lip or palatal tissues. However, mice with neural crest-derived cell conditional mutation of Dicer showed clefting of the lip and palate, suggesting that microRNAs in neural crest-derived cells play a critical role in lip and palate development. The palatal cleft was found to be caused by failure of palatal shelf elevation, with defects in anterior mandible process formation leading to clefting of the lip.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：miRNA 口蓋裂 口唇裂

1. 研究開始当初の背景

口唇・口蓋裂は、歯科領域で最も頻度の高い先天性疾患の一つである上、出生後の治療の後も摂食障害、構音障害、審美障害を招くことが多いため、口唇・口蓋裂の出生前診断や口唇・口蓋の再生療法などの開発が待たれている。しかし、それらの実現に必須の口唇・口蓋裂の原因や口唇・口蓋形成のメカニズムがまだ明らかにされておらず、それらの解明が急務となっている。

個体は多様な組織から構成されているが、一つの個体内のすべての細胞は同一のゲノムを有している。このゲノムは、タンパクの設計図であり、各細胞は必要に応じ、必要なタンパクを発現させ、細胞として機能している。このタンパクをコードする遺伝子の異常は、複数の器官に異常を生じる症候群としてとらえられ、家族性として子孫にも現れる。しかし、口唇・口蓋裂のほとんどは、単独で孤立した異常として生じる非家族性、非症候群性であるため、タンパクをコードする遺伝子の異常によるものではないことが多くを占めると指摘されている。近年、DNA からタンパクへの転写・翻訳の各過程を選択的に活性化もしくは不活性化することで特定の遺伝子の発現を調整するエピジェネティックな概念が明らかにされてきている。このエピジェネティックの制御不調が、口唇・口蓋裂を始めとする多くのタンパクコード遺伝子の欠損を伴わない非家族性、非症候群性の先天性疾患を引き起こすと推察され、注目されている。しかし、口唇・口蓋の発生におけるエピジェネティックの役割は、まったく知られていない。

エピジェネティックな制御には、DNA メチル化、ヒストン修飾、ノンコーディング RNA (ncRNA) の3つの因子が存在する。それぞれの因子間での複雑なクロストークも報告されている。DNA メチル化はDNAのマーキングと言われ、DNAのCpG配列にメチル基がつき、複雑な生物の体を正確に形づくりに寄与するとされている。一方、ヒストン修飾は、DNAが巻き付くヒストンのN末端領域の化学修飾により、染色体の高次構造に大きな変化を引き起こし、転写を調整する。

それに対しncRNAは、タンパクに翻訳されずに機能するRNAの総称であり、その中でmiRNAは、長さ25塩基ほどの小さなRNAで、相補的な配列を有する遺伝子に結合し、翻訳を阻害することで、その発現量を調節する。哺乳類では約1000種類存在するとされている。1:1の関係で作用するのではなく、「1:多」として機能するため、個々のmiRNAが数十の遺伝子を直接的に抑制することが可能であるため、細胞機能の統制役と考えられている。miRNAは複数のステップを経て形成されるが、形成最終段階で活性化するDicerを欠損させることにより

miRNA前駆体までしか形成されず、miRNAの機能が失活することが知られている。

申請者は、Dicer欠損マウスにおいて、歯の発生がその初期段階で停止し、miRNAが歯の発生に必須であること(Dev Dyn. 241:1465-72, 2012) また口腔粘膜が異常肥厚し、miRNAが口腔粘膜形成に重要であること(J Dent Res 92: 229-234, 2013)を報告した。さらに、同Dicer欠損マウスにおいて、口唇裂および口蓋裂の存在を確認しており、ヒトにおける口唇・口蓋裂の原因が、miRNAを介したエピジェネティックの異常である可能性をうかがわせる結果となっているが、miRNAの口唇・口蓋形成における機能は、全く知られていない。

2. 研究の目的

本研究ではmiRNAが欠損するDicer欠損マウスにおける形態的・分子的变化の解析から、口唇・口蓋形成におけるmiRNAの機能を明らかにすることを目的とした。顎顔面の発生学の進展に寄与するばかりでなく、その成果は口唇・口蓋裂の生前診断や再生療法に直結する可能性がある。本研究のゴールはmiRNA欠損マウスにおける形態的・分子的变化の解析から口唇・口蓋形成におけるmiRNAの機能を解明し、それを元に口唇・口蓋形成を制御するエピジェネティックの役割を明確にすることである。その結果、本研究のアウトカムは「口唇・口蓋の再生療法、口唇・口蓋裂の原因解明と出生前診断の確立の基盤的知見の構築」を得ることとなる。

3. 研究の方法

miRNAはすべての細胞で発現すると考えられている。口唇および口蓋の発生においては、各種の細胞でのmiRNAの機能が異なると予想され、全細胞のmiRNA欠損によるアプローチは非常に複雑な解析となる。さらに、全ての細胞からのmiRNAの機能除去は、胎生の非常に初期での胎生致死を引き起こすことが報告されており、口唇、口蓋研究には不向きである。口唇および口蓋の発生には、神経堤由来、外胚葉由来、内胚葉由来、中胚葉由来細胞が関与すると考えられるが、その中でも、口唇・口蓋原器の上皮は外胚葉由来細胞、間葉は神経堤由来細胞にほとんど占められる。そこで本研究では、各細胞でのmiRNAの機能を理解することから、全体のmiRNAの役割を明らかにするため、神経堤由来細胞、外胚葉由来細胞のみからmiRNAを欠損させたマウスを作成し、そのマウスの解析を行った。

(1) Dicer 組織特異的欠損マウスの作成とその形態的解析

Dicer 組織特異的欠損マウスの作成には、

Cre-LoxP システムを使用した。これにより、細胞特異的欠損マウスの作成が可能となり、それぞれの細胞種での miRNA の機能が解析できる。

(2) Dicer 組織特異的欠損マウスの分子レベルでの解析

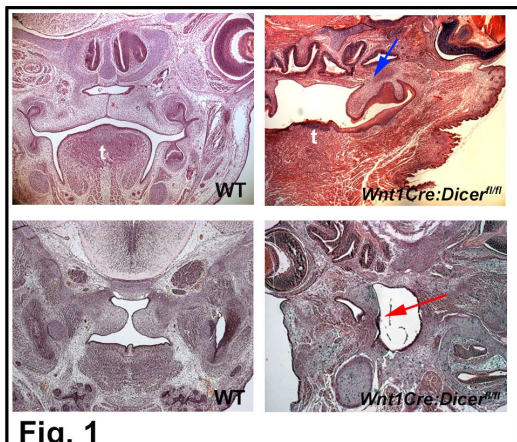
口唇・口蓋裂の認められた欠損マウスにおける分子レベルでの変化を解析するため、in situ hybridization、qPCR、免疫染色法、microarray を行った。BrdU による細胞増殖、TUNEL アッセイによるアポトーシスの活性も検索した。

4. 研究成果

(1) Dicer 組織特異的欠損マウスの作成とその解析

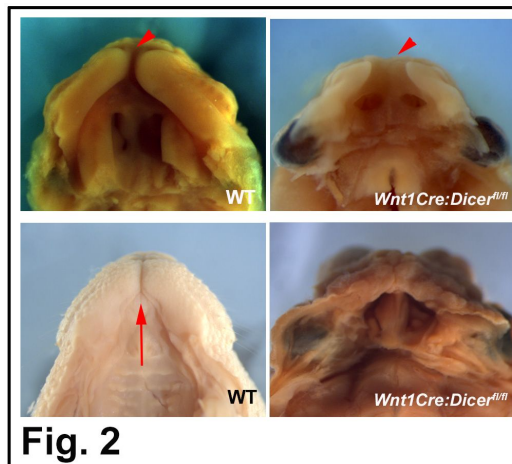
Dicer を神経堤由来細胞からのみ欠損させたマウスを作成するために Dicerfloxed マウスを Wnt1Cre マウスと交配させた (Dicer;Wnt1Cre)。同様に、Dicer を外胚葉由来細胞から欠損させたマウスを作成するために、K14Cre マウスを、Dicerfloxed マウスと交配させた (Dicer;K14Cre)。上皮から Dicer を欠損させた Dicer;K14Cre マウスに口唇・口蓋裂は認められなかったのに対し、Dicer を神経堤由来細胞から欠損させた Dicer;Wnt1Cre マウスで口唇裂と口蓋裂を認めた。このことは、口唇口蓋発生において、神経堤由来細胞の miRNA が、重要であることを示している。そこで、Dicer;Wnt1Cre マウスにおける口唇、口蓋それぞれの形態的検索を行った。

口蓋；口蓋形成は、2対の口蓋突起の舌上への挙上、水平方向への成長と、癒合で特徴づけられる。Dicer;Wnt1Cre マウスでは、口蓋突起の舌上への挙上が生じなかった。また、向上しない口蓋突起のうち、遠心の口蓋突起は、胎生 (E) 15.5 日以降、下顎と癒合していた。(Fig. 1)

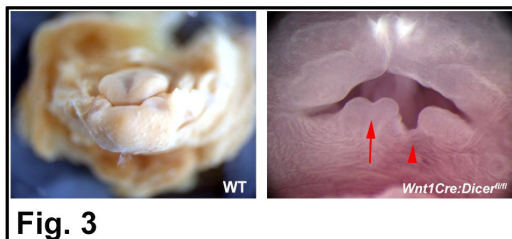


口唇；上顎口唇は左右の突起の癒合により形成される。E13.5日からE16.5日にかけて、上顎の正中部に口唇裂が認められたが、出生までに癒合し、上顎の正中部に認められ

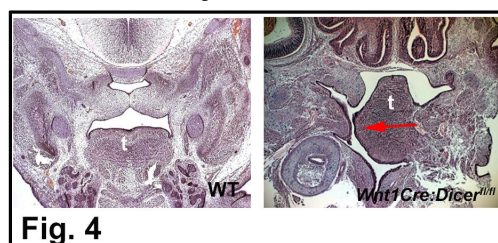
た口唇裂は発生の遅延によるものであることが示唆された。(Fig. 2)



一方、下顎も左右の下顎突起の癒合により形成される。発生の初期から下顎の正中部に口唇裂が認められ、出生時まで癒合することはなかった。さらに、E14.5日以降、正中の口唇裂の側方に別の裂が観察された。(Fig. 3)



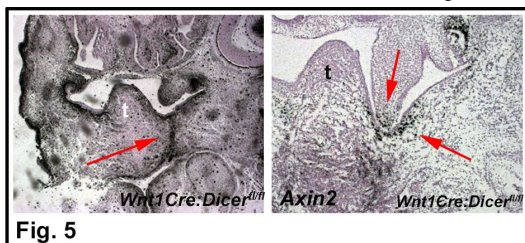
口唇、口蓋とは別に、遠心の舌下底にも裂が認められた。(Fig. 4)



(2) Dicer 組織特異的欠損マウスの分子レベルでの解析

口蓋；Dicer;Wnt1Cre マウスにおいて、Shh シグナルのマーカである Ptch1、Fgf シグナルのマーカである Etv5、Bmp シグナルのマーカである p-Smad1/5/8 の発現に変化は認められず、口蓋裂の原因が、Shh, Bmp, Fgf シグナルの変化ではないことが示された。BrdU による細胞増殖、TUNEL アッセイによるアポトーシスの活性にも大きな変化は認められなかった。Irf6 の欠損は、舌、口蓋突起、下顎の癒合を引き起こす。しかし、Dicer;Wnt1Cre マウスの口蓋突起と下顎との癒合部において、Irf6 の発現に著しい変化は認められなかった。一方、Dicer;Wnt1Cre マウスで認められた口蓋突起と下顎との癒合部位では、canonical Wnt シグナルのマーカである Axin2 の発現が向上することが確認された。この Axin2 の過剰発現は、舌下底裂

領域でも認められた。口蓋と下顎形成において、canonical Wnt シグナルが miRNA にて制御されていることを示している。(Fig. 5)



口唇；下顎に認められる裂のうち、正中に認められる口唇裂における分子レベルでの検索のために、E12.5日のDicer;Wnt1Creマウスの下顎正中部から mRNA を抽出し、microarray による解析を行った。その結果、E12.5日では、口唇裂を引き起こした分子の特定を行っていくには、時期が遅いことが示唆された。そこで、形態的には、異常の認められないE10.5日のDicer;Wnt1Creマウスの遺伝子発現の解析を行った。Dicer;Wnt1Creマウスの口蓋と違い、Axin2の発現に大きな変化は認められなかった。下顎はE10.5日付近で、近遠心的パターンニングの決定が行われている。近心の間葉に発現するMsx1と遠心の間葉に局限するBarx1との拮抗関係が、近遠心的パターンニングに重要であることが知られている。正中の口唇裂がそのパターンニングの異常によるものかを検索するために、Msx1とBarx1の発現を検索した。両遺伝子の発現を3次的に認識するために、whole mount in situ hybridizationにより解析した。その結果、近心に発現しているMsx1の発現がわずかながら減少し、その分、遠心に発現するBarx1の近心への伸展が観察された。さらに、正中に発現する遺伝子のうちAlex4、eHAND、Prx2の発現を検索した所、Alex4およびeHANDの発現が、著しく低下していた。(Fig. 6)

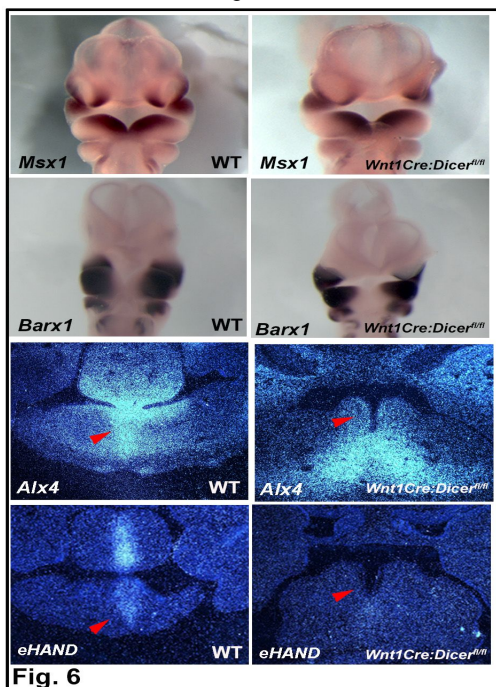


Fig. 6

以上の結果より、Dicer;Wnt1Creマウスの正中口唇裂は、近心の形成不全により引き起こされる可能性の高いことが示された。

一方、正中における口唇裂にBrdUによる細胞増殖、TUNELアッセイによるアポトーシスの活性を検索したが、大きな変化は認められなかった。一方、側方に認められる口唇裂の形成予定領域に、著しいアポトーシスの活性が認められた。これは、正中に認められる口唇裂と、その側方に形成される口唇裂の発症メカニズムが違うことを示している。(Fig. 7)

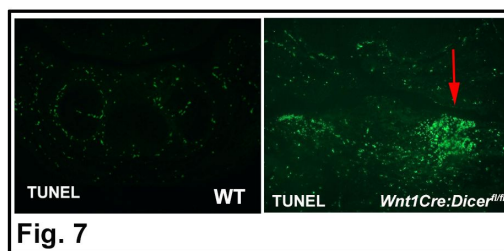


Fig. 7

Dicerを神経堤由来細胞からのみ欠損させたDicer;Wnt1Creマウスの解析から、間葉のDicerが、口唇口蓋裂形成に必須であることが示された。

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 2件)

Kawasaki K, Kawasaki M, Watanabe M, Idrus E, Nagai T, Oommen S, Maeda T, Hagiwara N, Que J, Sharpe PT, Ohazama A. Expression of Sox genes in tooth development. Int J Dev Biol. 2015;59(10-12):471-8. 査読有り

Blackburn J, Kawasaki K, Porntaveetus T, Kawasaki M, Otsuka-Tanaka Y, Miake Y, Ota MS, Watanabe M, Hishinuma M, Nomoto T, Oommen S, Ghafoor S, Harada F, Nozawa-Inoue K, Maeda T, Peterková R, Lesot H, Inoue J, Akiyama T, Schmidt-Ullrich R, Liu B, Hu Y, Page A, Ramírez Á, Sharpe PT, Ohazama A. Excess NF-κB induces ectopic odontogenesis in embryonic incisor epithelium. J Dent Res. 2015 Jan;94(1):121-8 査読有り

6. 研究組織

(1)研究代表者

川崎 真依子 (KAWASAKI, Maiko)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号：40584587