

令和元年6月26日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02577

研究課題名(和文)ゲノム編集を用いた口蓋裂と歯の形成不全の病原遺伝子を探る新たなアプローチ

研究課題名(英文)Elucidation of the pathogenesis of cleft palate and tooth development problems using new molecular technology.

研究代表者

山城 隆 (Yamashiro, Takashi)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：70294428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,300,000円

研究成果の概要(和文)：口唇口蓋裂や歯の形成異常は複数の病原遺伝子が関与し、病原遺伝子の同定とともに、その分子間ネットワークを理解することが重要である。本研究では、Runx1やCbfbなどの遺伝子改変動物やゲノム編集などの新規技術を用いて分子間ネットワークの解明と、その機能の解析を行ったところ、口蓋の形成において、新規のRunx1-pStat3-Tgfb3シグナル伝達経路が、口蓋上皮の癒合に関与することを見出した。さらに、Socs3がこのpStat3を制御することを見出した。また、切歯において、Runx1-pStat3-Lgr5シグナル伝達経路が、切歯のサービカルループにおける幹細胞の維持に関与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口唇口蓋裂や歯の欠損・形成不全等の口腔の先天性疾患の分子機構の解明は、将来の診断・予防・治療の発展のために不可欠である。口唇口蓋裂や歯の形成異常は複数の病原遺伝子が関与し、病原遺伝子の同定とその分子間ネットワークの理解は重要である。本研究によって、Statシグナルをはじめ、形態形成で重要な役割を果たす分子が明らかになった。そして、これらを制御することで、疾患の治療につながる基盤的な所見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Craniofacial development including palatogenesis and tooth development is regulated by various genes and by complicated molecular pathway. In this research project using various mutant mice and new methodology including genome editing, we found the following new findings. In palatogenesis, we found a new signaling axis of Runx1/Cbfb-pStat3-Tgfb3, which regulated the epithelial fusion in the anterior regions. Furthermore, Socs3, a negative regulator of Stat3 phosphorylation, was regulated by Runx1 signaling. We also found that Stat3 phosphorylation is important in the maintenance of the stem cell in the growing incisors. Our study showed that Runx1-pStat3-Lgr5 signaling pathway maintained the stem cells in the cervical loop. Interestingly, activation of Stat3 phosphorylation rescued the incisor phenotypes of Runx1/Cbfb mutants that demonstrated the disturbed continuous growth of the dental epithelium. Together, we found novel roles of Stat3 phosphorylation in craniofacial morphogenesis.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：口蓋裂 Runx1 Cbfb Stat3 Tgfb3 Lgr5 サービカルループ

## 1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂や歯の欠損形成不全等の口腔の先天性疾患における病態の分子機構の解明は、予防治療の発展のために不可欠である。

一方、口唇口蓋裂や歯の形成異常は複数の病原遺伝子と環境因子が発症に関与する多因子遺伝性疾患である。そのため、多因子遺伝性疾患の病原遺伝子の同定とともに、その分子間ネットワークを理解することが重要である。そして病原遺伝子の同定には、遺伝子改動物の表現型の解析は最も直接的で有効な方法である。しかし、遺伝子改動物の作製にかかる多大なコストと時間が全容解明の障害となっていた。次世代遺伝子改技術であるゲノム編集は遺伝子改を劇的に簡素化する。

我々は、これまでの研究から Runx ファミリー遺伝子が口蓋裂や歯の形成不全の原因遺伝子の一つであることを見出し、その遺伝子改動物におけるマイクロアレイ解析から Runx シグナリングの下流で発現が動する分子を多同定している。しかし、口蓋裂や歯の形成不全は多遺伝子疾患であり、多くの病原遺伝子の同定とその分子ネットワークの解明が期待されるものの、遺伝子改動物の作製にかかる多大なコストと時間が問題であった。この所見を更に発展させ、Runx シグナルを介した口蓋裂と歯の形成不全が生じる分子機構の全貌を明らかにすることが期待されていた。我々は、これまでの研究から Runx ファミリー遺伝子が口蓋裂や歯の形成不全の原因遺伝子の一つであることを見出し、その遺伝子改動物におけるマイクロアレイ解析から Runx シグナリングの下流で発現が動する分子を多同定している。しかし、口蓋裂や歯の形成不全は多遺伝子疾患であり、多くの病原遺伝子の同定とその分子ネットワークの解明が期待されるものの、遺伝子改動物の作製にかかる多大なコストと時間が問題であった。この所見を更に発展させ、Runx シグナルを介した口蓋裂と歯の形成不全が生じる分子機構の全貌を明らかにすることが期待されていた。

## 2. 研究の目的

本研究は多因子遺伝性疾患である口蓋裂や歯の形成不全の分子機構を探ることが目的である。特に、Runx1 シグナルをはじめ、口蓋裂や歯の形成に関わる分子経路を探索し、多因子遺伝性疾患の原因遺伝子を同定するとともに、疾患モデル作製の基盤技術を整備する。その際、ゲノム編集による次世代遺伝子改変技術による遺伝子変異を用いて、効率的に疾患モデルマウスを作成する。最終的に、口蓋裂が多因子遺伝性疾患であることを示す分子機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

以下の課題について検討を行った。

- 1) Runx1 遺伝子改動物を用いた、口蓋裂が発症する原因の探索。
- 2) Runx1 遺伝子改動物を用いた、切歯における幹細胞の維持機構の探索。
- 3) Cbfb 遺伝子改動物を用いた、口蓋裂が発症する原因の探索。
- 4) 口蓋裂を発症する患者の原因遺伝子の網羅的な探索と、遺伝子編集による機能解析。

本研究はで、上皮基底特異的 Runx1 ノックアウトマウス (K14-Cre;Runx1f1/f1) から得られた唾液腺、切歯、臼歯、口蓋組織をもちいて、mRNA の遺伝子発現を用いてその変動を確認した。

また、得られた所見より、Stat3 のリン酸化が Runx1 シグナルによる形態形成に関与することが見出された。そこで、器官培養系を用いて薬理的に Stat3 を阻害、活性化することで、Runx1-Stat3 シグナルの機能を検討した。

一方、家族性の口蓋裂について網羅的な遺伝子解析によって、我々はこれまでに報告がなされ

ていない遺伝子が口蓋裂に関与することを見出した。そこで、この遺伝子について、ゲノム編集にて遺伝子発現をノックダウンし、その機能を検討した。

#### 4. 研究成果

##### 1) Runx1 遺伝子改変動物を用いた、口蓋裂が発症する原因の探索。

上皮基底特異的 Runx1 ノックアウトマウスでは1次口蓋と2次口蓋の境界部において、Tgfb3の発現が限局的に抑制されること、また Stat3 のリン酸化が抑制されることを見出した(図1)

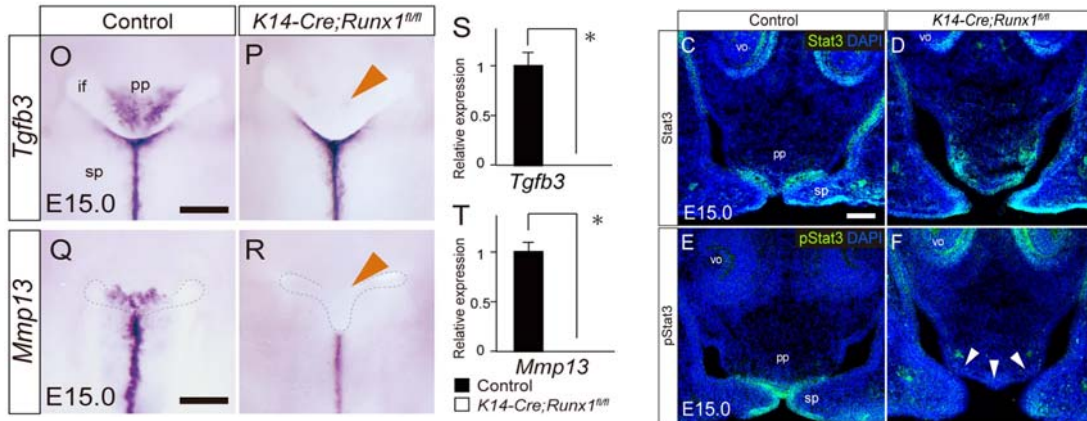


図1 Runx1 ノックダウンによる Tgfb3 と Mmp13 の発現(左図)と pStat3 の発現 (右図)

また Stat3 の阻害剤である AG490 あるいは S3I-201 を加えると口蓋の癒合が阻害され、Tgfb3 の発現が抑制されることを見出した(図2)。これらの成果により、Runx1 は Stat3 のリン酸化の制御を介して Tgfb3 の発現を部位特異的に制御し、その結果上皮の癒合が制御されることを見出した(図3)

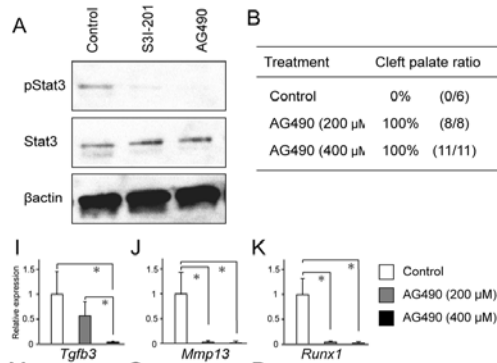


図2 Stat3 阻害剤による口蓋癒合の影響

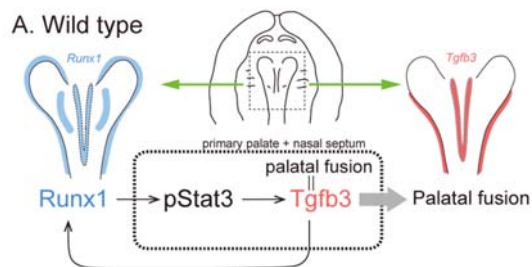


図3 口蓋の癒合を制御する Runx1-Stat3-Tgfb3 経路

##### 2) Runx1 遺伝子改変動物を用いた、切歯における幹細胞の維持機構の探索。

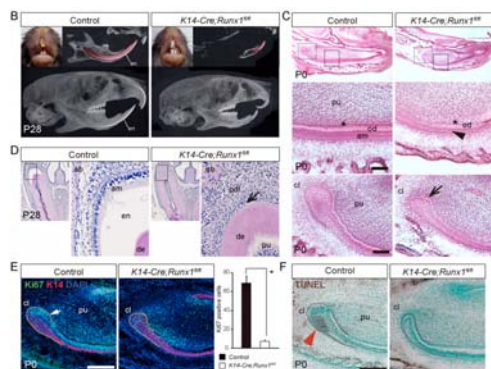


図4 Runx1 上皮特異的ノックアウトマウスにおける切歯

Runx1 の上皮特異的ノックアウトは切歯の上皮幹細胞の領域(サービカルループ)の低形成とエナメル質形成不全と切歯の低形成を生じさせることを見出した(図4)。このマウスにおいては幹細胞マーカーである Sox2 と Lgr5 の発現が著しく抑制された。またエナメル芽細胞の分化マーカーである Amelogenin の発現も同様に抑制された(図5)。

口蓋と同様、Stat3のリン酸化の領域を pStat3 の発現レベルを検討したところ、Runx1 ノックアウトマウスでは、サービカルループ特異的に pStat3 の発現の減弱が顕著であった (図6)。

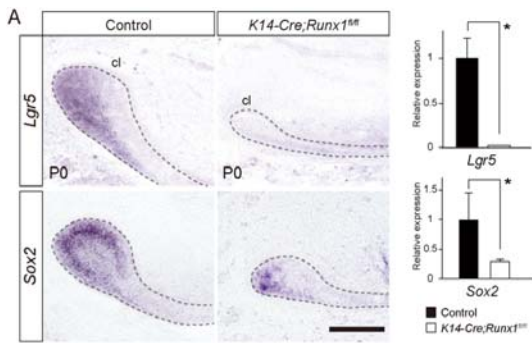


図5 サービカルループにおける Lgr5 と Sox2 の発現

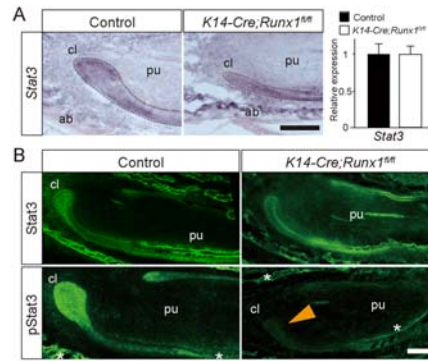


図6 サービカルループにおける pStat3 の発現

そこでさらに、Stat3 を活性化させると上皮特異的ノックアウトマウスの表現型が回復するかどうかを検討した。その結果、ZnCl2 を投与することで、Runx1 ノックダウンによって抑制されていた幹細胞マーカーである Lgr5 の発現と、エナメル芽細胞の分化マーカーである Amelogenin の発現が有意に抑制された (図7)。これらの結果より、切歯においても Runx1-Stat3-Lgr5 というシグナル経路が存在し、これが切歯の幹細胞の維持に関与することが明らかになった (図8)。

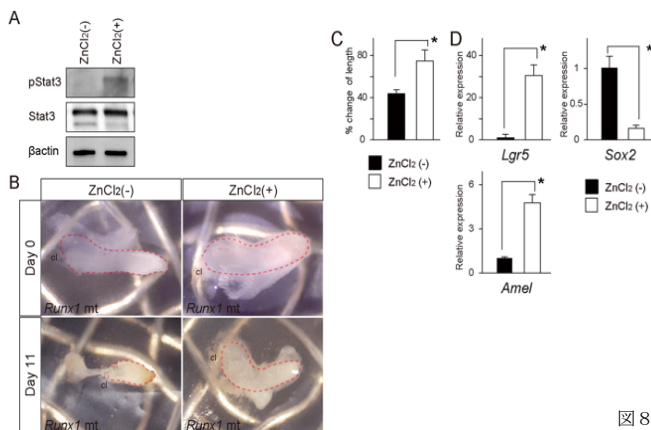


図7 ZnCl2 による表現型の改善

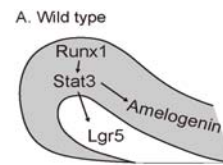


図8 切歯における Runx1-pStat3-Lgr5 経

### 3) Cbfb 遺伝子改変動物を用いた、口蓋裂が発症する原因の探索。

Cbfb は Runx1 をはじめとする Runx 遺伝子の cofactor である。Cbfb が Runx1 と同様、口蓋形成に関与するかを検討するために、上皮特異的 Cbfb ノックアウトマウス (K14-Cre;Cbfbf1/f1) における表現型を検討した。

その結果、Cbfb ノックアウトマウスにおいても Runx1 ノックアウトマウスと同様、口蓋前部のみ、口蓋の癒合不全が生じることを明らかにした (図9)。このマウスにおける遺伝子発現ならびに Stat3 のリン酸化を検討したところ、Runx1 マウスと同様、Tgfb3 の発現と Stat3 のリン酸化が一次口蓋部に限局して発現が抑制されることを見出した。

一方、葉酸は口蓋裂の発症を予防するが知られており、さらに Stat3 を活性化することが報告されている。そこで、葉酸が Cbfb 遺伝子改変動物の表現型を回復するか、検討した。その結果、葉酸は、Cbfb 遺伝子改変動物の口蓋組織において、Stat3 のリン酸化を活性化させると

もに、口蓋裂の発症を部分的に抑えた。また、Tgfb3 の発現も一部回復した (図 10)。

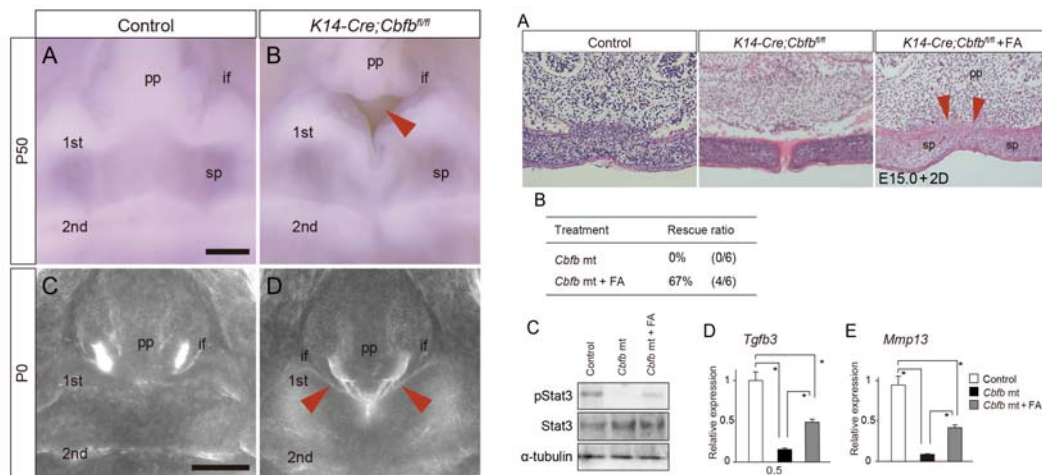


図9 上皮特異的 Cbfb ノックアウトマウスの口蓋裂 図10 葉酸による上皮特異的 Cbfb ノックアウトマウスの口蓋裂の回復

本研究によって、Stat シグナルをはじめ、形態形成で重要な役割を果たす分子が明らかになった。そして、これらを制御することで、疾患の治療につながる基盤的な所見が得られた。

#### 4) 口蓋裂を発症する患者の原因遺伝子の網羅的な探索と、遺伝子編集による機能解析。

我々は家族性に発症する口蓋裂患者における遺伝子発現を検討した結果、DLC1 が口蓋裂に関与することを示唆する結果が得られた。そのため、ゲノム編集において DLC1 のノックアウトマウスを作成したところ、口蓋裂が発症することを観察した。その成果の一部は Gordon 会議で発表した。現在、その分子機構をさらに検討している。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Anterior Cleft Palate due to Cbfb deficiency and its rescue by folic acid. Sarper SE, Inubushi T, Kurosaka H, Ono Minagi H, Murata Y, Kuremoto K, Sakai T, Taniuchi I, Yamashiro T, Dis Model Mech, 査読有, 2019, in press. doi: 10.1242/dmm.038851.
- ② Observation of dynamic cellular migration of the medial edge epithelium of the palatal shelf in vitro. Aoyama G, Kurosaka H, Oka A, Nakatsugawa K, Yamamoto S, Sarper SE, Usami Y, Toyosawa S, Inubushi T, Isogai Y, Yamashiro T, Frontiers Physiology, 査読有, 2019 in press. doi.org/10.3389/fphys.2019.00698
- ③ Nakatsugawa K, Kurosaka H, Inubushi T, Aoyama G, Isogai Y, Usami Y, Toyosawa S, Yamashiro T, Stage- and tissue-specific effect of cyclophosphamide during tooth development, Eur J Orthod, 査読有, 2019 in press. doi: 10.1093/ejo/cjz002.
- ④ Sarper SE, Kurosaka H, Inubushi T, Ono Minagi H, Kuremoto KI, Sakai T, Taniuchi I, Yamashiro T, Runx1-Stat3-Tgfb3 signaling network regulating the anterior palatal development. Sci Rep, 査読有, 2018 25:8(1):11208. doi: 10.1038/s41598-018-29681-3.
- ⑤ Sarper SE, Inubushi T, Kurosaka H, Ono Minagi H, Kuremoto KI, Sakai T, Taniuchi I, Yamashiro T, Runx1-Stat3 signaling regulates the epithelial stem cells in continuously growing incisors. Sci Rep, 査読有, 2018 19:8(1):10906. doi: 10.1038/s41598-018-29317-6.
- ⑥ Ono Minagi H, Sarper SE, Kurosaka H, Kuremoto KI, Taniuchi I, Sakai T, Yamashiro T. Runx1 mediates the development of the granular convoluted tubules in the submandibular glands. PLoS One, 査読有, 2017;12(9):e0184395. doi: 10.1371/journal.pone.0184395.

[学会発表] (計 8 件)

- ① Novel mutation of DLC1 in familial cleft palate case, Kurosaka H, Wu Y, Wang Q, Morita C, Nakaya A, Okazaki A, Kobayashi K, Kikuchi M, Mashimo T, Uno Y, Oki S, Yamashiro T, Gordon Research Conference, 2018, February 11-16, Lucca
- ② Safiye Esra Sarper, 黒坂 寛, 小野皆木瞳, 山城 隆 : Runx signaling is specifically involved in the fusion anterior palate by regulating Tgfb3 signaling, 第40回日本分子生物学会年会, 2017年, 12月6-9日, 兵庫
- ③ Sarper SE, Kurosaka H, Ono Minagi H, Sakai T, Yamashiro T: Runx/Cbfb signaling regulating Stat3 during enamel formation, Oral and Craniofacial Development and Disease 2017, November 17, 2017, Osaka
- ④ Sarper SE, Kurosaka H, Ono Minagi H, Sakai T, Yamashiro T: Runx1-Stat3-Tgfb3 signaling network regulating the anterior palatal development, Oral and Craniofacial Development and Disease 2017, November 17, 2017, Osaka
- ⑤ Sarper SE, Kurosaka H, Mihara K, Ono H, Yamashiro T: Cbfb is involved in the anteriorly Specific Palatogenesis, 97th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research. March 22-25, 2017, San Francisco.
- ⑥ Yamashiro T: Runx signaling is specifically involved in the fusion between the primary palate and the secondary palate by regulating Tgfb3 signaling, International Symposium Oral and Craniofacial Development and Diseases 2016, December 12, 2016, Osaka
- ⑦ Aoyama G, Kurosaka H, Sarper S, Oka A, Tsuchihashi R, Yamashiro T: Research of medial edge epithelial cell behavior during secondary palate fusion of mouse, International Symposium Oral and Craniofacial Development and Diseases 2016, December 12, 2016, Osaka
- ⑧ Sarper SE, Yamashiro T: Runx signaling is specifically involved in the fusion between the primary palate and the secondary palate by regulating Tgfb3 signaling, Tooth Morphogenesis and Differentiation, June 13-18, 2016, Porvoo

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

伊藤 慎将 (大阪大学)

ITOH, Shinsuke

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：40633706

黒坂 寛 (大阪大学)

KUROSAKA, Hiroshi

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：20509369

三原 聖美 (大阪大学)

MIHARA, Kiyomi

大阪大学・大学院歯学研究科・招へい教員

研究者番号：00551920

中川 一路 (京都大学)

NAKAGAWA, Ichiro

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：70294113

### (2) 研究協力者

なし