

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05687

研究課題名(和文) 口唇口蓋裂及び後鼻孔閉鎖症の発症機序にレチノイン酸シグナルが果たす役割の解明

研究課題名(英文) The role of retinoid signaling in pathogenesis of choanal atresia and stenosis

研究代表者

黒坂 寛 (Kurosaka, Hiroshi)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：20509369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,300,000円

研究成果の概要(和文)：過去の多くの研究から胎生期のRAシグナルの異常な不足や亢進は様々な先天性奇形を誘発する事が知られている。その中でも口唇口蓋裂はRAシグナル異常によって引き起こされる事が知られている代表的な疾患である。今回の我々の研究から胎生期のRAシグナル低下が口唇裂と後鼻孔閉鎖を併発する原因となる事、またその病態に至る分子メカニズムが繊維芽細胞成長因子(Fgf)を介するものである事を見出した(Kurosaka et al. Hum Mol Genet. 2017)

研究成果の概要(英文)：Craniofacial development is a complex process that involves sequential growth and fusion of the facial prominences. When these processes fail, congenital craniofacial anomalies can occur. For example, choanal atresia (CA) is a congenital craniofacial anomaly in which the connection between the nasal airway and nasopharynx is completely blocked. In this study, we discovered that mice with mutations in retinol dehydrogenase 10 (Rdh10), which perturbs Vitamin A metabolism and retinoid signaling, exhibit fully penetrant CA. Interestingly, we demonstrate Rdh10 is specifically required in non-neural crest cells prior to E10.5 for proper choanae formation, and that in the absence of Rdh10, Fgf8 is ectopically expressed in the nasal fin. Taken together, our findings demonstrate that RDH10 is essential during the early stages of facial morphogenesis for the formation of a functional nasal airway, and furthermore establish Rdh10 mutant mice as an important model system to study CA.

研究分野：顎顔面発生

キーワード：顎顔面形成不全 後鼻孔閉鎖 口唇口蓋裂 レチノイン酸シグナル

1. 研究開始当初の背景

顎顔面の発生には様々な顔面突起の適切な成長及び癒合が必要不可欠である。異常な顔面突起の成長や癒合は顎顔面形成異常の原因となり、その中でも口唇口蓋裂や後鼻孔閉鎖症は最も高頻度で発生する疾患である。これらの疾患は矯正歯科医療領域との関連が非常に強く、国内外問わず多くの研究者が様々な分子メカニズムと同疾患の関連性について研究を行っている。今回我々が着目するレチノイン酸 (以下 RA) シグナルは上記疾患との関連が示唆されてはいるものの、双方の疾患発症のメカニズムを包括的に理解するには至っていない。RA は生体内にてビタミン A (レチノール) を基に様々な酵素により生成される事が知られており、その酵素の一つである Rdh10 は RA 生成の初期過程に必要な分子である。我々の過去の研究結果から同遺伝子が正常な顔面発生に重要な役割を果たす事は知られており (Sandell et al. Genes Dev. 2007 May 1;21(9):1113-24)、興味深い事に Rdh10 の機能阻害を行ったマウスは過去に報告された他の RA シグナル分子の機能阻害とは異なる表現型を示している。よって、その表現型を詳細に解析する事により今までには得られなかった口唇口蓋裂や後鼻孔閉鎖症の新たな知見が得られる可能性が高い。

2. 研究の目的

口唇口蓋裂や後鼻孔閉鎖症は顎顔面形成異常の中でも頻度の高い先天性異常である。過去の基礎研究から RA シグナルがこれらの病態に関与する事が示唆されているが詳細なメカニズムは未だ不明である。応募者らは RA 代謝に重要な役割を果たす Rdh10 遺伝子を機能阻害したマウスで口唇裂及び後鼻孔閉鎖症が同時に起こる事を既に見出しており、本研究ではこの Rdh10 遺伝子を中心に口唇口蓋裂や後鼻孔閉鎖症の発症に対する RA シグナルの詳細な (時期及び組織特異的な) 機能解析を行う。本研究を遂行する事により、上記疾患等に対する基礎的理解が深まり、予防法や治療法の確立に貢献する結果を出す事が目的である。

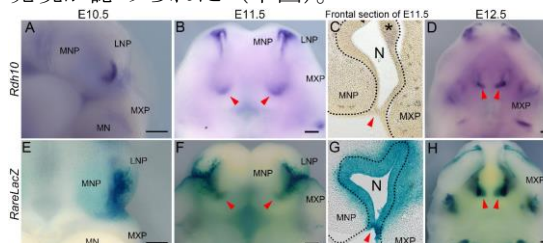
3. 研究の方法

タモキシフェン投与により全身で Cre 遺伝子を発現するマウス (Ert2Cre マウス) (Ventura A et al, Nature. 2007 Feb 8;445(7128):661-5. Epub 2007 Jan 24) と Rdh10 の exon2 の両側に loxP site を持つマウス (Rdh10^{flx} マウス) それらのマウスを掛け合わせ、胎生時期特異的に Rdh10 をノックアウト出来るマウスを作製した (Ert2Cre;Rdh10^{flx} マウス)。また同じ方法で神経堤細胞特異的 (Danielian PS et al, Curr Biol. 1998 Dec 3;8(24):1323-6) に Rdh10 をノックアウトするマウス(Wnt1Cre;Rdh10^{flx})

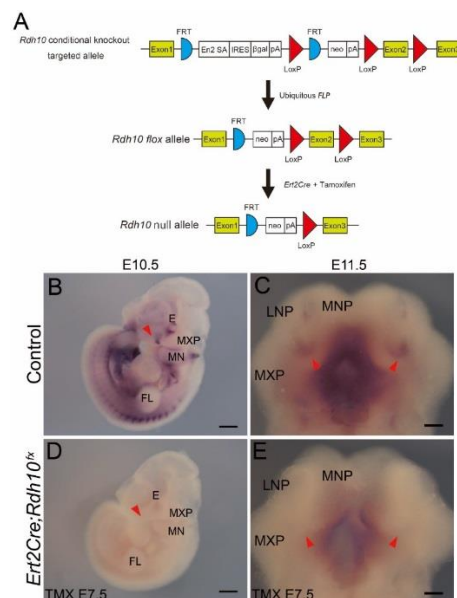
を作製し異なる胎生時期にてマウスを回収し、Whole mount nuclear fluorescent imaging (Sandell LL, Kurosaka H et al, Genesis. 2012 Nov;50(11):844-50)を用いて観察を行った。またそれぞれの胎生ステージにおいて組織切片も作製し組織学的な解析も行った。また、表現型が認められたノックアウトマウスについては上顎複合体を摘出し、RNAseqを用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。発現に変化が認められた遺伝子群については発現パターンを In situ hybridization や免疫化学染色を用いて解析した。

4. 研究成果

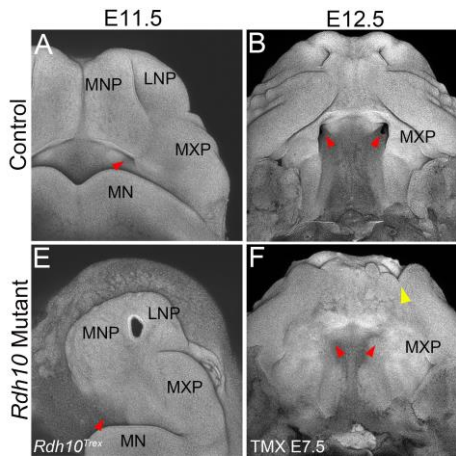
胎生期 (E10.5-E12.5) の顎顔面発生時、特に上顎複合体の前方部において Rdh10 及び RareLacZ (RA シグナルのレポーター) の強い発現が認められた (下図)。



Rdh10 の機能解析を行う為にコンディショナルノックアウトマウスを作製し、タモキシフェンの投与後に Rdh10 が著しく低下する事を確認した。この事より同マウスは胎生期の Rdh10 の機能解析を行うのに適したモデルとなる事が確認された (下図)。



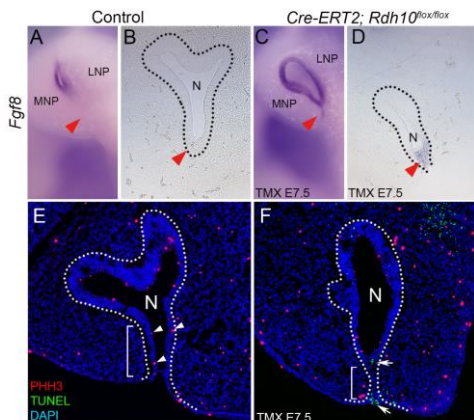
胎生 7 日目にタモキシフェンを投与した Ert2Cre;Rdh10^{flx} マウスにおいて口唇裂と後鼻孔閉鎖が併発する事を見出した (下図)。



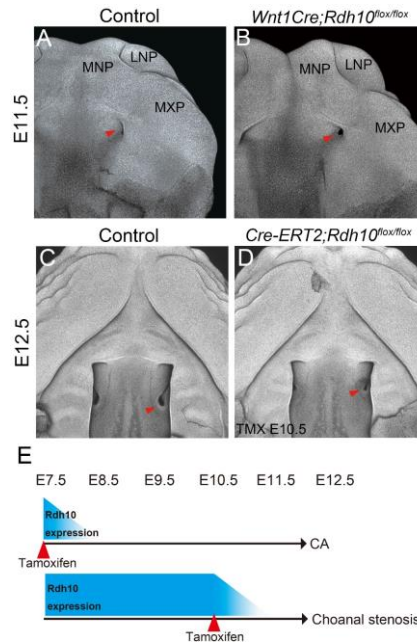
この事は胎生時の Rdh10 が RA シグナルを活性化させる事が通常の上顎複合体を形成する上で非常に重要であることを示唆する新しい所見である。
次に表現型が見られた *Ert2Cre;Rdh10^{flx}* マウスの発生中の上顎複合体を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果ノックアウトマウスにて著しい発現変動を認める遺伝子を多数同定した (下図)

| Gene | Normalized gene expression (FPKM) | | Adjusted P value (FDR) |
|---------------|-----------------------------------|--------------|------------------------|
| | Control | Rdh10 mutant | |
| <i>Fgf8*</i> | 2.24 | 4.00 ↑ | 2.64E-08 |
| <i>Fgf10*</i> | 0.20 | 0.17 ↓ | 0.04 |
| <i>Fgf9</i> | 0.23 | 0.25 ↑ | 0.71 |
| <i>Fgf15</i> | 0.46 | 0.38 ↓ | 0.57 |
| <i>Fgf17</i> | 1.28 | 1.66 ↑ | 0.11 |
| <i>Fgfr1</i> | 3.92 | 3.85 ↓ | 0.91 |
| <i>Fgfr2</i> | 0.30 | 0.30 → | 0.99 |
| <i>Dlx1*</i> | 2.33 | 3.88 ↑ | 0.0003 |
| <i>Dlx2*</i> | 5.32 | 8.28 ↑ | 1.01E-05 |

その中でも特に口唇裂と後鼻孔閉鎖の表現型と関連が深いと考えられる *Fgf8* の発現範囲がノックアウトマウスにて顕著に拡大している事を発見した (下図)。



これらの事は顎顔面の胎生発生時の Rdh10 と Fgf8 の相互作用が口唇や後鼻孔の発生と非常に密接に関連しており、それらのシグナル経路が阻害される事で口唇口蓋裂や後鼻孔閉鎖症を引き起こす可能性がある事を強く示唆している。また非常に興味深い事に Rdh10 の機能阻害を胎生 8.5 日に遅らせた場合や神経堤細胞特異的に行った場合には口唇口蓋裂や後鼻孔閉鎖症が起こらない事も確認した。この事は Rdh10 が口唇や後鼻孔の発生に深く関与するのは胎生 7.5 日以前であり、更には胎生上皮における発現が非常に重要であることを示す新しい所見である (下図)。



今後はこれらの発見を元に Rdh10 と顎顔面形成不全を引き起こす事が知られている様々な環境要因との相互関係を解明していく予定である。

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 7 件)

1. Kohei Nakatsugawa, Hiroshi Kurosaka*, Kiyomi Mihara, Susumu Tanaka, Tomonao Aikawa, Mikihiro Kogo and Takashi Yamashiro. Orthodontic- surgical approach for treating skeletal Class III malocclusion with severe maxillary deficiency in isolated cleft palate. Cleft Palate Craniofac J. 2018. (in press)
2. Oka A, Kurosaka H, Yashiro K, Haraguchi S, Lee D, Yamashiro T: Skeletal Class II open-bite malocclusion with idiopathic condylar resorption: A case report, Australasian Orthodontic Journal 2017 (in press)
3. Iulianella A, Sakai D, Kurosaka H,

Trainor P. Ventral neural patterning in the absence of a Shh activity gradient from the floorplate. *Dev Dyn.* 2018 Jan;247(1):170-184.

4. 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.* 2017 Sep 6;12(9):e0184395.

5. Kurosaka H*, Wang Q, Sandell L, Yamashiro T and Trainor PA, Rdh10 loss-of-function and perturbed retinoid signaling underlies the etiology of choanal atresia. *Hum Mol Genet.* 2017 Apr 1;26(7):1268-1279.

6. Conley ZR, Hague M, Kurosaka H, Dixon J, Dixon MJ, Trainor PA, A quantitative method for defining high-arched palate using the Tcof+/- mutant mouse as a model. *Dev Biol.* 2016 Jul 15;415(2):296-305.

7. Kurosaka H*. The roles of Hedgehog signaling in upper lip formation. *Biomed Res Int.* 2015. doi:10.1155/2015/901041. (Review article)

[学会発表] (計 9 件)

1. Kurosaka H, Trainor P, Leroux-Berger M, Iulianella A.: Cranial nerve development requires co-ordinated Shh and canonical Wnt signaling, Tripartite Conference on Tooth and Bone; Development & Regeneration, June 12-15, 2015, Chiba

2. Wang Q, Sandell L, Kurosaka H, Trainor P: The role of Rdh10 in etiology of choanal atresia, Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration Gordon Research Conference, March 13-18, 2016, Ventura

3. Wang Q, Yamashiro T, Kurosaka H: Retinoic-acid-induced cleft palate by regulating Sim2 and sonic hedgehog signaling, International Symposium Oral and Craniofacial Development and Diseases 2016, December 12, 2016, Osaka

4. Wang Q *, Yamashiro T, Kurosaka H: Retinoic-acid-induced defective branchiomic muscle by downregulation of Pitx2, Japanese Association for Dental Research, November, 17, 2017, Tokyo

5. Kurosaka H: The role of retinoid signaling for maxillary development, Oral and Craniofacial Development and Disease 2017, November 17, 2017, Osaka

6. Wang Q, Yamashiro T, Kurosaka H: Retinoic-acid-induced cleft palate and defective branchiomic muscle, Oral and Craniofacial Development and Disease 2017, November 17, 2017, Osaka

7. 黒坂 寛: Rdh10 の時期特異的な機能障害は口唇口蓋裂や後鼻孔閉鎖の原因となる

第 41 回日本口蓋裂学会総会・学術大会、2017 年 5 月 18 日、東京

8. Wang Qi, 山城 隆、黒坂 寛: レチノイン酸シグナルと Shh シグナルの相互作用が口蓋裂及ぼす役割 第 59 回歯科基礎医学会学術大会、2017 年 9 月 16、17、18 日、長野県

9. Wang Qi, Kurosaka H, Yamashiro T. Retinoic-Acid-Induced Defective Branchiomic Muscle by Downregulation of Pitx2. Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration Gordon Research Conference, Feb 10-11, 2018, Italy.

[図書] (計 件)

[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：
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
黒坂 寛 (Hiroshi Kurosaka)
大阪大学大学院・歯学研究科・講師
研究者番号：20509369

(2) 研究分担者 ()
研究者番号：

(3) 連携研究者
山城 隆 (Takashi Yamashiro)
大阪大学大学院・歯学研究科・教授
研究者番号：70294428

(4) 研究協力者
中谷 明弘 (Akihiro Nakaya)