

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11705

研究課題名(和文)唇顎口蓋裂マウスにおける転写因子DEC2-Twist1分子制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanism of transcription factor DEC2-Twist1 in cleft lip and palate mice

研究代表者

鈴木 正敏 (SUZUKI, Masatoshi)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：60366614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：自然発生する口蓋裂の発生様式については解明されていない。そこで、本研究は、口蓋形成期における種々の形態学的変化のうち、細胞増殖活性、上顎骨の初期発生、血管系の形成に着目し、マウスを用いて口蓋の発生過程を比較検討した。これらの点が口蓋裂発生にどの様に関与しているか、また、口蓋裂における転写因子DEC1、DEC2およびTWIST1遺伝子発現制御機構を明らかにすることを目的とし、それらの発現量の関連を検討した。その結果、口蓋組織形成は口蓋突起癒合後に開始し、さらに、組織形成過程においてDEC-TWIST1相互作用が増殖因子を遊離・活性化させることから、硬口蓋形成にかかわる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口蓋裂は、顔面構造に影響を与える最も一般的な先天性異常の一つであり、顔の審美性、機能、子どもの社会的および経済的課題に対する影響のため、世界保健機関によって関連する公衆衛生問題と見なされている。自然発生する口蓋裂の発生様式について、口蓋形成期に関与する遺伝子発現制御がどの様に関与しているかを明らかにするため、マウスを用いて口蓋の発生過程を比較検討した。口蓋組織形成は口蓋突起癒合後に開始し、さらに、組織形成過程において転写因子DEC-TWIST1相互作用が増殖因子を遊離・活性化させる可能性があるため、DECとTWIST1の相互作用が硬口蓋の形成に不可欠であることを示唆しています。

研究成果の概要(英文)：The mode of spontaneous cleft palate has not been clarified. In this study, we focused on cell proliferative activity, early development of maxilla, and formation of vasculature, and compared the development process of palate using mice among various morphological changes during palate formation. To clarify how these points are involved in the development of cleft palate, the regulatory mechanism of the transcription factors DEC1, DEC2 and TWIST1 gene in cleft palate and the relationship between their expression levels was examined. Palatal tissue formation was initiated after fusion of the palatal process, and DEC-TWIST1 interaction may release and activate growth factors during the tissue formation process. Our data suggest that the interaction between DEC and TWIST1 is essential in the formation of hard palate.

研究分野：歯科麻酔学、生化学・分子生物学

キーワード：転写因子DEC1 転写因子DEC2 転写因子TWIST1 口蓋裂

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス型転写因子(以下:bHLH)である DEC2 は、細胞分化や概日リズム調節に関与する時計遺伝子であると同時に、細胞周期、細胞増殖、分化、アポトーシス、癌化および低酸素応答に関与している。申請者らは最近の研究で、低酸素によって誘導された DEC2 が VEGF (Vascular endothelial growth factor, 血管内増殖因子) 発現を負に制御することを報告した 1)。

(2) bHLH 転写因子の間葉系マーカーである Twist1 は、上皮間葉転換において重要な役割を果たすと同時に、間葉系細胞の分化抑制に関わることや筋形成および骨形成を含むいくつかの分化系統に関係し、初期胚発生における原腸陥入、神経提細胞の運動や器官形成過程特に、心臓や腎臓また口蓋形成での重要性が報告されている。申請者はこれまでの報告で、ルシフェラーゼ・リポーター・アッセイにより、DEC2 の強制発現により正常酸素条件下および低酸素条件下で有意に Twist1 プロモーター活性を抑制したことを確認した。また、クロマチン免疫沈降分析により、DEC2 を介する抑制が、Twist1 プロモーター領域での E-box 結合によって主に達成されることを確認した 2)。

(3) DEC2 のプロモーター領域の上流にある smad binding element (SBE) に TGF- $\beta$  によって活性化した Smad3 が結合することで DEC2 の転写が亢進し、誘導された DEC2 が間葉系マーカーである Slug 上の E-box と結合することで、Slug 発現を抑制し、ヒトの膵癌の進行を抑制することも確認した 3)。

また、申請者らは、ヒト歯肉繊維芽細胞および間葉系幹細胞で、DEC2、Snail および Smad3 が概日リズムを示すこと 4)、さらに、C57BL/6 マウス肝臓にて、DEC2 と Twist1 が概日リズムを示し、逆相関しているデータも得ている。

以上のことより口蓋骨組織においても DEC2 と Twist1 は逆相関のリズムを有し、DEC2 が Twist1 を負に制御していることが予想されるため、マウス胎仔における口唇口蓋裂の発症に関わる DEC2-Twist1 機構の解明研究を立案した。

1) Sato F, Bhawal UK et al. Genes Cells 13; 131-144: 2008

2) Suzuki M, Sato F, Bhawal UK. Biochem Biophys Res Commun 455: 390-395: 2014

3) Sato F, Bhawal UK et al. International Journal of Molecular Medicine 2012; 30: 495-501

4) Sato F, Bhawal UK et al. BBRC 2012; 419: 441-446

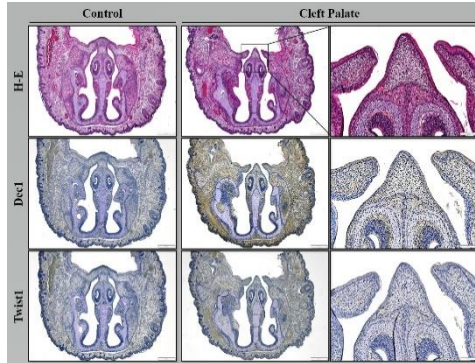
## 2. 研究の目的

転写因子である Differentiated embryo chondrocytes 2 (以下:DEC2)は、全身に発現がしており、様々な生理現象に関わることが報告されている。申請者らは DEC2 が癌伸展に重要な血管内皮増殖因子 vascular endothelial growth factor (以下:VEGF)の発現を負に制御することを報告している。一方、bHLH 転写因子の間葉系マーカーである Twist1 は、上皮間葉転換において重要な役割を果たし、いくつかの分化系統に関係している。また、申請者はこれまでに、DEC2 が Twist1 の発現を調節することを明らかにし、DEC2 が細胞機能を調節するメカニズムの重要な因子であることを報告した。本研究は、胎仔期の DEC2- Twist1 の細胞調節機構に焦点を置き、口蓋裂の発症に関わる新たな遺伝子の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 口蓋裂モデルマウスの作製する、病体解析、免疫組織科学染色

6 週齢の A/JJm s Slc マウスを購入し、妊娠後 18.5 日目の母体の胎仔を実験モデルとして使用し、その胎仔を 4%パラホルムアルデヒドにて浸漬固定した。固定終了後、胎仔を正中方向で切り出し、常法に従いパラフィン包埋後、薄切し、H-E 染色を用いて組織病体の解析を行った。口蓋裂モデルマウスにおける DEC1、DEC2 および 6 週齢の A/WySn マウスを国立遺伝学研究所より購入し、A/WySn 妊娠マウスに対し、妊娠 11 日目から 14 日目までの 4 日間コルチゾンを投与



する。妊娠後 18.5 日目の胎仔を実験モデルとし、その胎仔を 10%中性緩衝ホルマリン液にて浸漬固定する。固定終了後、胎仔を正中方向で切り出し、常法に従いパラフィン包埋後、薄切、H-E 染色を用いて組織病変の解析を行う。口蓋裂モデルマウスにおける DEC1、DEC2 および Twist1 の発現を明らかにした (左図)。

### (2) DNA マイクロアレイおよび miRNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

採取した組織から RNA を miRNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出し、DNA マイクロアレイおよび miRNA マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。DNA マイクロアレイは Low Input Quick Amp Labeling kit (Agilent) を用いて蛍光標識 cRNA を合成する。標識 cRNA を SurePrint G3 Mouse GE マイクロアレイ (Agilent) にてハイブリダイズさせ、また、miRNA マイクロアレイ解析は、Agilent Complete Labeling and Hyb Kit (Agilent) を用いて蛍光標識 miRNA を合成した。蛍光標識 miRNA を SurePrint G3 Mouse (Agilent) にてハイブリダイズを行った。その後 Agilent Technologies Microarray scanner (Agilent) で画像を取り込み、Agilent Feature Extraction Software (Agilent) で蛍光強度を数値化した。DNA マイクロアレイおよび miRNA マイクロアレイの解析は GeneSpring 解析ソフト (Agilent) を用いる。さらにマイクロアレイで得られたデータは IPA (Ingenuity Pathway Analysis) 解析から予測される生物学的過程、転写経路およびネットワークの探索を行った。

### (3) リアルタイム RT-PCR 法による mRNA および miRNA の定量

RNA は逆転写酵素 VIL0 SuperScript™ (Invitrogen) で cDNA を合成後、特異的 TaqMan® プローブを用いて QuantStudio 6 Flex リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) により定量化した。TaqMan® ケミストリーを使用して miRNA を定量するための設計済みプライマーセットで、前駆体ではなく成熟 miRNA のみを標的とした。TaqMan Reverse Transcription Kit、TaqMan MicroRNA Assays (いずれも Applied Biosystems)、QuantStudio 6 Flex リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を用いて miRNA をリアルタイム RT-PCR で定量し、miRNA を基準として相対量を算出した。

### (4) Western blot 法によるタンパクの検討

タンパク抽出には RIPA Lysis Buffer (Pierce) を用いる。抽出したタンパク質をポリアクリルアミドゲルで分離 (SDS-PAGE) し、PVDF 膜へ電氣的に転写したのち、5% BSA を用いて 1 時間ブロッキングを行う。TBS (-) - 0.1% Tween 20 (TBS-T) で洗浄した後、5% BSA で希釈した一次抗体を加え、4°C オーバーナイトインキュベートする。TBS-T で洗浄した後、5% BSA で希釈した二次抗体を加え、室温で 1 時間反応させた。TBS-T で洗浄した後、ECL-Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Japan Corporation) により検出し、ImageQuant

Las 4000 Mini で観察した。

#### (5) DNA マイクロアレイ解析により同定された遺伝子の免疫組織科学染色

一次抗体はウサギポリクローナル抗 DEC2 抗体 (1:100; 広島大学大学院医歯薬総合研究科 加藤幸夫教授より寄贈)およびウサギポリクローナル抗 Twist1 抗体 (1:100; abcam)を使用した。二次抗体は CSA system (DAKO)を使用した。断片は 12 分間 97 °C 10×Citrate buffer (abcam)に浸し、製造元の説明書に準じて行った。口蓋裂モデルマウスの mRNA の発現解析を行った。組織・臓器の mRNA 発現を可視化する方法として In situ hybridization (ISH)法を行った。4%パラホルムアルデヒド(PFA)で室温で一晩固定した後、胎仔を正中方向で切り出し、凍結切片の作製を行った。検出プローブの選択は最も感度が良いと考えられる RNA プローブを用い、標識には非放射性同位元素識[ジゴキシゲン(digoxigenin, DIG)標識]を用いた方法を使用した。DIG(抗原)を RNA プローブに標識させ、さらに抗 DIG 抗体を用いてその抗体に標識した酵素(HRP)と反応させることで mRNA 局在の可視化を行った。

#### 4. 研究成果

口蓋裂マウスでの骨組織分化は、切歯歯胚外側および眼窩下神経外側の間葉にアルカリホスファターゼ活性が出現し、臼歯歯胚の正中側に沿って口蓋突起内を拡張し上顎骨が形成された。血管分布は水平転位前には鼻腔側に比して口腔側で密であり、口腔側・鼻腔側移行部には毛細血管の拡張像が観察されるが正常群に比して遅延していた。また、口蓋突起自由縁の球状塊は認められなかった。転写因子 DEC1 および DEC2 は中枢のみでなく、末梢組織で概日リズムを持った発現をしていた。これらの発現は時計遺伝子 CLOCK の変異体では大きく影響を受けており、時計機構における CLOCK の重要性を示した。また、転写因子 Twist1 は上皮間葉転換において重要な役割を果たすとともに、間葉系細胞の分化抑制に関わることが知られる。本研究では、自然発生する口蓋裂における DEC1、DEC2 および Twist1 遺伝子発現制御機構を明らかにすることを目的とし、それらの発現量の関連を検討した。DEC 誘導における転写制御について検討を加えた結果、DEC の発現誘導の際の転写制御機構を明らかにした。口蓋突起癒合後に口蓋組織形成予定域に細胞の集積を認め、組織形成は正常マウスに観察された。以上のことから、口蓋組織形成は口蓋突起癒合後に開始し、さらに、組織形成過程において DEC-Twist1 相互作用が増殖因子を遊離・活性化させ、硬口蓋形成に与る可能性が推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Bhawal UK, Li X, Suzuki M, Taguchi C, Oka S, Arikawa K, Tewari N, Liu Y	4. 巻 1
2. 論文標題 Treatment with low-level sodium fluoride on wound healing and the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dental Traumatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/edt.12532	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bhawal UK, Yoshida K, Kurita T, Suzuki M, Okada Y, Tewari N, Oka S, Kuboyama N, Hiratsuka K.	4. 巻 28(4)
2. 論文標題 Effects of 830 nm low-power laser irradiation on body weight gain and inflammatory cytokines in experimental diabetes in different animal models.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laser Therapy	6. 最初と最後の頁 257-265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5978/islsm.19-0R-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 パワール・ウジャール, 張 鳳洙, 鈴木 正敏, 藤田 裕, 小林 良喜, 平塚 浩一, 渋谷 鑛
2. 発表標題 転写因子DEC1は実験的に誘導された歯周炎の制御に重要である
3. 学会等名 第18回日本大学口腔科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Bhawal UK, Suzuki M, Uchiyama T, Arikawa K, Hiratsuka K, Shibutani K
2. 発表標題 Basic helix-loop-helix transcription factors DEC1 and DEC2 modulates P. gingivalis-induced inflammation
3. 学会等名 Penn Periodontal Conferense (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Bhawal UK, 鈴木 正敏, 藤田 裕, 内山 敏一, 有川 量崇, 渋谷 鑣, 平塚 浩一
2. 発表標題 DEC1が示す老化マウス肝臓におけるFGF21の抑制作用
3. 学会等名 第58回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 鈴木正敏、パワール ウジャール、藤田 裕、平塚浩一、渋谷 鑣
2. 発表標題 塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 転写因子DEC2はE-box配列を介して抑制的にTwist1を調整する
3. 学会等名 日本歯科麻酔学会総会・学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Bhawal UK, Suzuki M, Arakawa H, Shibutani K, Nasu I, Hiratsuka K
2. 発表標題 Micromolar sodium fluoride mediates anti-osteoclastogenesis in Porphyromonas Gingivalis-induced alveolar bone loss
3. 学会等名 95th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ujjal K Bhawal, Xiaoyan Li, Fengzhu Zhang, Masatoshi Suzuki, Lijia Guo, Yi Liu, Koh Shibutani
2. 発表標題 Role of basic helix-loop-helix transcription factor DEC2 in alveolar bone resorption
3. 学会等名 4th Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fengzhu Zhang, Ujjal K Bhawal, Masatoshi Suzuki, Michiharu Shimosaka, Koichi Hiratsuka, Koh Shibutani
2. 発表標題 Basic helix-loop-helix transcription factors DEC1 and DEC2 modulates P. gingivalis-induced inflammation
3. 学会等名 97th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	B h a w a l U j j a l  (BHAWAL Ujjal)  (50433339)	日本大学・松戸歯学部・助教    (32665)	