

研究種目：基盤研究 (C)  
研究期間：2007～2008 年  
課題番号：19592362  
研究課題名 (和文) 顔面の初期発生を制御する分子機構  
研究課題名 (英文) Molecular regulation in craniofacial patterning and development at chick embryo.  
研究代表者  
川上正良 (KAWAKAMI MASAYOSHI)  
奈良県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：20244717

## 研究成果の概要：

顎顔面は複雑な構造から成り、その形成パターンも複雑であり、不明な点も多い。しかし顎顔面の先天異常の治療を行っていくうえで、顎顔面の形成メカニズムを理解することは必要である。L3/Lhx8 は、LIM homeobox の transcription factor であり、個体発生のボディプランとされている。本研究では、Chick embryo を用いて、L3/Lhx8 遺伝子発現を制御する生体のシグナル応答について検討したものである。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 矯正・小児系歯学

キーワード：歯科矯正学、形態発生

## 1. 研究開始当初の背景

矯正歯科が対象とする歯列咬合や顎骨の形態異常は、歯の萌出異常によるものと上下顎骨の成長発育の不調和によるものがある。これらの咬合異常を診断し、治療を行っていくために、異常の原因ならびに異常発生のメカニズムを理解しておく必要がある。

顎顔面の先天異常の原因を解明するには、

胎生期にさかのぼって顎顔面の形成メカニズムを明らかにする必要がある。申請者は、発生過程がヒトと共通で、胚操作がしやすい chick embryo を用いて顔面発生の解明を試みてきた。顎顔面は、神経堤細胞由来の顔面突起が癒合し、分化・増殖を繰り返すことで形成される。上顎を形成する前頭鼻突起は、部

位によって軟骨形成能が異なっており、これがのちの上顎骨の複雑な形態に関係していることを明らかにした(Kawakami, et al., 2006)。

LIM homeobox 遺伝子は個体発生のボディプランとされており、L3/Lhx8 は、LIM homeobox の transcription factor である。われわれは、顔面突起の形成期から突起癒合完了までの chick の L3/Lhx8 遺伝子発現を検討したところ、L3/Lhx8 は上顎突起、下顎突起に限局して発現し、上顎突起と前頭鼻突起が癒合する直前に発現が最も強くなることが明らかにし、L3/Lhx8 遺伝子は顎顔面の形態形成に深く関与していることが示唆した (Inoue et al., 2006)。

顔面の発生期に発現する様々な成長因子や transcription factor は単独で作用するのではなく、相互に作用することで、組織パターンが形作られる。これまでの研究で L3/Lhx8 シグナルは、顔面の形成に深く関与することが示されてきたが、その発現機構および相互作用は明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究では L3/Lhx8 遺伝子の顎顔面の形成における働きと相互作用を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) Chick embryo

ニワトリ受精卵を湿潤下インキュベーターで、stage 22 (顔面突起癒合前) まで発育させる。Chick embryo の発育ステージ分類は、Hamburger and Hamilton (1951)による。

### (2) Beads implantation

L3/Lhx8 は、上皮下の間葉細胞に発現し、上皮性因子によって発現が誘導される。そこで、L3/Lhx8 発現を誘導する上皮性因子として FGF-8b (Fibroblast growth factor) を、Heparin

acrylic beads に浸潤させ(1mg/ml)、stage22 の chick embryo の上顎突起に埋入した (図 1)。24 時間あるいは 48 時間 embryo の発育を継続させた後、embryo を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定した。whollemount あるいは組織切片上で L3/Lhx8 遺伝子プローブを用いた in situ hybridization を行った。

同様に、FGF の antagonist である SU5402、BMP4 (Bone morphogenetic protein) やその阻害因子 Noggin、retinoic acid (RA) についても beads を用いて上顎突起に投与した。

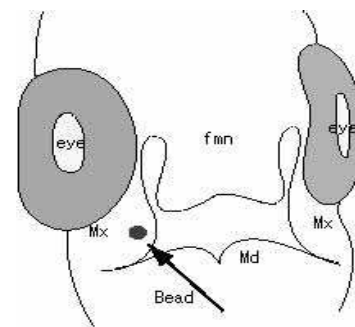


図 1 Beads implant

Stage 22 の上顎突起 (矢印) に acrylic beads を埋入した。

### (3) RT-PCR

Beads implant 24 時間後の上顎突起を摘出し、Sepazol (Invitrogen) を用いて RNA を抽出した。SYBR Green Realtime PCR Master Mix (Toyobo) と QuatiTect Reverse Transcription kit (Qiagen) を用いて、L3/Lhx8 遺伝子の半定量を行った。

## 4. 研究成果

Stage22 chick embryo の上顎突起に recombinant Fgf-8b(1mg/ml) を投与すると、24 あるいは 48 時間後 beads 周囲に L3/Lhx8 の発現誘導が認められた。一方 Fgf レセプターの antagonist である SU5402 を投与すると、beads 周囲の L3/Lhx8 発現が減少し、8 日後には唇裂を伴う上顎の欠損を生じた。

Beads を投与した上顎突起から RNA を抽出し、RT-PCR により L3/Lhx8 発現量を半定量すると、SU5402 を投与した上顎突起で有意に L3/Lhx8 発現量が低下していた。

RA を過剰投与すると口唇裂を発症することが知られており、RA は Fgf シグナルを低下することが報告されている (Development 134:2125-35, 2007)。そこで Fgf-8b と同様に beads を用いて RA(10,mg/ml)を上顎突起に投与した。RA を投与すると beads 周囲の L3/Lhx8 発現の低下が認められ、7 日後には著明な上顎の劣成長と欠損、唇裂を発症した (図 2)。

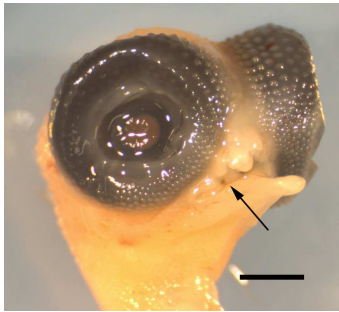


図 2 RA 投与による上顎劣成長と口唇裂  
Stage 30 chick embryo Bar=1.0mm

また BMPs は上顎形成の中心的な役割をもち、Fgf とは相互に密接な作用が報告されている (Dev Dyn 237:1500-08, 2008)。そこで、BMP2, BMP4 あるいは BMP の antagonist である Noggin を上顎突起に投与し、L3/Lhx8 発現を調べたが、いずれも発現パターンに差が認められなかった。

以上の結果より、L3/Lhx8 は上顎突起において FGF によってコントロールされ、L3/Lhx8 発現には FGF シグナルが必要であることが明らかとなった。FGF を阻害すると上顎の劣成長と欠損、口唇裂を引き起こすが、L3/Lhx8 の発現低下によるものと考えられた。また過剰な RA による上顎の劣成長と口唇裂は、Fgf を介して L3/Lhx8 が低下するこ

とによって、上顎突起の増殖と発育が抑制され発症することが考えられた。BMPs は L3/Lhx8 シグナル伝達に直接関与せず、別の標的遺伝子を介して間接的に上顎の形成に関与していることが示唆された。

## 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 4 件)

1. **Kawakami M, Yamamoto K, Inoue T, Kajihara A, Fujimoto M Kirita T.** Disk position and temporomandibular joint structure associated with mandibular setback in mandibular asymmetry patients. *Angle Orthodontist.* 79: 521-527, 2009.
2. **Fujii R, Kawakami M, Hyomoto M, Ishida J, Kirita T.** Panoramic findings for predicting eruption of mandibular premolars associated with dentigerous cyst after marsupialization. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 66: 272-276, 2008.
3. **Manabe T, Tatsumi K, Inoue M, Matsuyoshi H, Makinodan M, Yamauchi T, Makinodan E, Yokoyama S, Sakumura R, Wanaka A.** Knockdown of the L3/Lhx8 gene suppresses cholinergic differentiation of murine embryonic stem cell-derived spheres. *International Journal of Developmental Neuroscience.* 26:249-252, 2008.
4. **Manabe T, Tatsumi K, Inoue M, Makinodan M, Yamauchi T, Makinodan E, Yokoyama S, Sakumura R, Wanaka A.** L3/Lhx8 is a pivotal factor for cholinergic differentiation of murine embryonic stem cells. *Cell Death Differentiation.*

14:1080-1085, 2007.

6. 研究組織

(1)研究代表者

川上 正良 (KAWAKAMI MASAYOSHI)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20244717

(2)研究分担者

和中 明生 (WANAKA AKIO)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90210989

(3)研究協力者

Joy M. Richman

Department of Oral Health Sciences, Life  
Sciences Institute, University of British  
Columbia, Vancouver, BC, Canada

Associate professor

藤井 亮介 (FUJII RYOSUKE)

奈良県立医科大学・医学部・研究生

奥田 洋明 (OKUDA HIROAKI)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40453162

辰己 晃子 (TATSUMI KOHKO)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90208033