

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：平成 19 年度 ～ 平成 21 年度

課題番号：19592365

研究課題名（和文）

口蓋および口蓋裂発生における熱ショック蛋白質の役割

研究課題名（英文）

A role of heat shock protein (Hsp) in the palatogenesis and cleft palatine formation

研究代表者

鐘ヶ江 晴秀 (明海大学歯学部教授)

研究者番号：90199173

研究成果の概要（和文）：

マウス胎仔口蓋の各発生段階における熱ショック蛋白質 Hsp25 の局在を免疫組織化学的に明らかにした。さらに Hsp25 の主要な働きである抗アポトーシス機能との関連を調べるため、TUNEL 法を用いてアポトーシスの局在を組織化学的に明らかにした。

その結果、口蓋発生の下方形では、Hsp25 は口蓋粘膜上皮の peridermal cell 層に局在し、基底層には認められなかった。水平期になると口蓋突起先端部の peridermal cell 層から Hsp25 の免疫活性が消失し、消失部同士で両側口蓋突起の接合が起こった。接合すると再び封入された上皮層に強い Hsp25 免疫活性が復活したが、TUNEL 陽性のアポトーシスに陥った細胞が上皮層に出現すると、同部位から Hsp25 は次第に消失した。以上の結果から、接合する部位では Hsp25 の発現が一旦消失すること、および癒合後は封入された上皮層における Hsp25 の発現とアポトーシスの発現が反転的であることが示された。これらの結果は、上皮層は Hsp25 により制御されたアポトーシスにより消失しすることが強く示唆された。

さらに口蓋突起の接合・癒合が起こらない条件で片側の口蓋突起の器官培養を行ったところ、先端部の上皮層に Hsp25 の発現と反転的なアポトーシスの局在が見られた。さらに先端部の上皮層は癒合が起こらなくてもほぼ消失することがわかった。以上のことから、口蓋正中部に封入された上皮層の消失は Hsp25 に制御されたアポトーシスにより消失するが、この過程は接合により誘導されるものではないことがわかった。

本研究の正常発生および器官培養の結果から、正常な口蓋発生に Hsp25 が重要な役割を果たすことが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, the localization of Hsp25 was investigated immunohistochemically at a variety of developmental stages of the palatine formation in mouse embryos. In addition, the localization of apoptotic cells was also clarified by TUNEL method in order to examine the relation to an anti-apoptotic function of Hsp25.

Hsp25 was localized in the peridermal cell layer but not in the basic layer of palatine mucosa epithelium during the descending period of palatogenesis. In the subsequent horizontal period, Hsp25-immunoactivity disappeared from the peridermal cell layer in the tip of palatine processes. Mutual adhesion of bilateral palatine processes occurred by Hsp25-negative epithelia. Furthermore, it was also found that, when the adhesion was completed, intense Hsp25 immunoactivity was restored in the embedded epithelial layer. However when TUNEL-positive apoptotic cells appeared in the epithelial layer, Hsp25 gradually disappeared from the same region. In in vivo palatogenesis, the expression of Hsp25 was temporarily disappears at the site of adhesion and showed a reversed manner of the expression of apoptosis in the embedded epithelial layer.

These results strongly suggested that the disappearance of epithelial layer is likely to be attributable to apoptosis which is controlled by Hsp25.

When the unilateral palatine process was organ-cultured under the condition that does not allow adhesion/fusion, the expression of Hsp25 and the reversed localization of apoptosis were confirmed in the tip of epithelial layer. The epithelial layer in the tip region was found to have almost disappeared subsequently without a bilateral fusion. Based on the evidences mentioned above, it was revealed that the disappearance of epithelial layer embedded in the medial palate is attributable to apoptosis controlled by Hsp25 but this process is not induced by adhesion of palatine processes.

From the result of both studies in vivo and in vitro, Hsp25 was strongly suggested to play important roles in palatogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,300,000円	690,000円	2,990,000円
20年度	900,000円	270,000円	1,170,000円
21年度	100,000円	30,000円	130,000円
年度			
年度			
総計	3,300,000円	990,000円	4,290,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：(1) 口蓋発生 (2) Hsp25 (3) アポトーシス (4) Hsp (5) 口唇口蓋裂

1 研究開始当初の背景

口蓋裂の発症機序

口唇口蓋裂は、古くからよく知られた先天異常の一つであり、顎顔面に発症すること、構音障害を有すること、出現頻度の高い外表奇形であることなどの理由で临床上重要視されている。近年の口唇口蓋裂治療の主流は各専門科の協力によるチーム治療で、それにより障害はほとんど後遺することなく、健常人と同様の生活ができるようになっている。また、口唇口蓋裂発生機序・病因については、主に疫学的研究から多くの仮説が提唱され、それらの一部は動物実験による基礎的研究によって検証されているが、定説を得るに至っていない。

口蓋裂の局所的原因

想定されている発生機序として、①神経堤細胞の段階で生じていて症候性に発生するもの（顎顔面間葉組織の欠損）、②二次口蓋発生における段階で発症するもの（口蓋突起の癒合不全）、③いったん歯形態形成がなされてから組織の破断を生ずるもの（二次的破

裂）、などが考えられている。

口蓋裂の全身的要因

口蓋裂の原因の一つには遺伝的なものもあり、遺伝子異常あるいは染色体異常により症候性に発症することも知られているが、妊娠中の母体が摂取した化学物質やストレスなども原因と考えられている。

口蓋突起上皮細胞の動態

口蓋突起の癒合に関しては、口蓋突起を覆う上皮細胞層の動態が大きな研究上の課題となっており、癒合によって内部に迷入することとなる上皮細胞の消失に関して、アポトーシスによる細胞死、間葉細胞への移行的分化 transdifferentiation すること、上皮細胞が口腔・鼻腔を覆う上皮部分に遊走すること、等が挙げられているが不明な点が多い。

口腔上皮発生とストレス蛋白質

ストレスによって誘導されるタンパク質（ストレスタンパク質）に熱ショック蛋白質がある。この一つである Hsp25 は熱ショック蛋白質の共通した性質として、熱刺激や化学

物質により発現が誘導されるが、口腔上皮を構成する重層扁平上皮には恒常的に発現している。

申請者らは口腔上皮の発生における Hsp25 の発現・局在を調べる研究の過程で (Tani et al, 2006)、Hsp25 が成体とは異なった分布を示すこと、口腔上皮と鼻腔上皮では発現が異なることを見出した。

口蓋発生と Hsp25

Hsp25 は口腔上皮細胞においては細胞分化、増殖および細胞死の調節に関わっていると考えられている。上述の口蓋突起上皮の動態に関しても、重要な役割を担っていると推測される。さらに、口蓋裂を引き起こす原因として考えられているストレスや局所の化学物質刺激で Hsp25 が誘導されると推測される。以上のことから口蓋発生および口蓋裂発生との関連を明らかにするため、発生段階における Hsp25 の発現・局在を調べ、さらにその変動と口蓋裂発生の有無を検討することとした。

2 研究の目的

1) Hsp25 発現・局在と変動

タンパクレベルおよび遺伝子発現レベルにおいて、マウス胎児口蓋発生期の Hsp25 の局在およびその変動について、生化学的および組織化学的に詳細に検索する。これによって口蓋上皮の発生において Hsp25 がどのような発現パターンを示すかを明らかにする。

2) Hsp25 の発現と細胞増殖、細胞分化、細胞死との関連

口蓋発生における Hsp25 の発現局在と細胞増殖活性、との関連を組織化学的に解析する。同様に、上皮細胞の分化およびアポトーシスとの関連についても組織化学的に解析する。これによって、Hsp25 の発現が口蓋発生における上皮細胞の動態との関連を明らかにできる。

3) 口蓋裂発症マウスにおける Hsp25 の発現・局在

口蓋裂自然発症モデルを用い、口蓋裂症例における Hsp25 の発現局在および細胞増殖・分化・細胞死との関連を組織化学的に解析する。1) 正常発生で調べた結果と比較することにより、Hsp25 の局在が正常と異常時でいかなる変化を示すかを明らかにできる。

4) Hsp25 の発現抑制に対する口蓋発生の影響

マウス胎児口蓋突起の器官培養系を用い、培地中に Hsp25 遺伝子に対するアンチセン

スオリゴまたは Si-RNA を投与して Hsp25 の機能を抑制した場合の影響を組織学的に解析する。

5) Hsp25 の発現誘導に対する口蓋発生の影響

マウス胎児口蓋突起の器官培養系を用い、熱刺激などを加えて Hsp25 の発現を誘導、亢進させた場合の影響を組織学的に解析する。4)および 5)の実験により、口蓋発生における Hsp25 の役割を明らかにできる。

6) 総合的検討

以上の 1)~5)の結果を総合的に検討し、口蓋発生における Hsp25 の機能的役割および口蓋裂発生との関連を判定する。

3 本研究の特色

本研究は Hsp25 の機能的役割について口蓋および口蓋裂発生に的を絞って調査研究するもので、現在のところ類似の研究は国内外において行われていない。組織レベルにおける Hsp25 の発現に関し、形態学的のみならず、機能との関連を明らかにし、これらの正常発生におけるデータに基づいて、異常発生ともいえる口蓋裂発生との関連までをも一連の研究として解明しようとするものである。

現在までの多くの研究によって、口蓋・口蓋裂発生の局所的要因のいくつかは明らかにされ、具体的な遺伝子や化学物質の例が報告されてきたが、臨床的に原因と考えられてきたストレスなどとの関係はまったく不明のままである。ストレスタンパクである Hsp25 はこのような各種の全身のおよび局所的ストレスとの関係において因果関係が解析しやすいので、Hsp25 の役割を解明することは、以前から行われてきた疫学的研究と最新の分子レベルの研究成果を結びつけ、口蓋裂の発症機序に関する研究を一段と推進することが期待される。

3 研究の方法

本研究では初年度 (平成 19 年度) は主にマウス口蓋発生に関する in vivo 実験を、次年度 (平成 20 年度) 移行に口蓋裂発症動物を用いた実験および器官培養実験を予定する。基本的な解析方法として次の様な実験を行う。正常の動物には ddy マウスを使用するが、比較のため他系統マウスおよびラット組織についても一部の解析を行う。

1) 平成 19 年度

1-1 Hsp25 の時間的空間的局在の解析

①免疫組織化学

抗 Hsp25 抗体を用いて、口蓋発生の各段階における HSP25 発現細胞、特に上皮細胞の検出を光学顕微鏡的並びに電子顕微鏡的な免疫組織化学法によって行う。

②in situ hybridization 法

同様に、mRNA レベルでの発現局在を解析する。

1-2 Hsp25 の遺伝子発現量/蛋白質量の時間的変化の解析

①RT-PCR 法

口蓋発生の各段階において HSP25 の遺伝子発現を RT-PCR 法により解析する。微量の遺伝子発現量の変化は real-time thermal cycler を用いた RT-PCR 法で解析する。さらにマイクロダイセクション装置を用い、口蓋上皮の各部（口腔側・鼻腔側・尖端側）を切片上で切り出し、RT-PCR 法で解析し、微小区域における遺伝子発現の有無と量を比較する。

②ウェスタンブロット法

Hsp25 の蛋白質量の相対的变化を抗 HSP25 抗体を用いたウェスタンブロット法で解析する。

1-3 Hsp25 陽性細胞の腔面側細胞膜形態の観察

口蓋突起融合時における癒合面同士の細胞膜形態は、癒合と関連して変化すると言われているので、口蓋突起の固定組織ブロックに免疫反応を施した後に走査型電子顕微鏡で観察する。

1-4 細胞増殖との関連の解析

口蓋発生における Hsp25 陽性細胞と細胞増殖活性の関連を、抗 PCNA 抗体または BrdU/抗 BrdU 抗体を用いた免疫組織化学法で解析する。

1-5 アポトーシス細胞の検出

Hsp25 陽性細胞と HSP の基本的役割であるアポトーシス抑制との関係を調べるため、TUNNEL 法または単鎖 DNA に対する特異抗体を用いた免疫組織化学法で、アポトーシス細胞を検出する。

1-6 Hsp25 遺伝子導入口腔上皮培養細胞の解析

GFP タグを付加した Hsp25 遺伝子を分離した口腔上皮細胞株に導入し、強制的に発現した Hsp25 が口腔上皮細胞の動態にいかなる影響を及ぼすかを解析する。HeLa 細胞をもちい

た予備実験により、細胞内に Hsp25 が発現して GFP により発色が認められることを確認している。

平成 19 年度は、正常マウス口蓋発生の各段階の組織試料について、1-1), 1-2), 1-3), 1-4), 1-5), を実施する。現在までに、予備実験として一部の発生段階においての Hsp25 免疫組織化学を実施して、一部の発生段階において局在が変化するなどの有望で興味深い結果を得ている。本研究ではより詳細な発生段階の試料についてタンパクレベルおよび遺伝子レベルで解析し、予備実験の結果の確認と暫定的な結論および仮説を得る。

本実験については、申請者鐘ヶ江の他、分担者で組織学発生学が専門の天野とその指導のもとに歯科矯正学分野大学院生が担当する。

2) 平成 20 年度以降

2-1 器官培養系における Hsp25 の遺伝子発現抑制による影響の解析

マウス胎児 14 日齢の口蓋を無血清培地を用いて器官培養し、培地中にマウス Hsp25 遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは Si-RNA を投与することにより、口蓋組織中の Hsp25 発現量を抑制することができるので、これによる口蓋突起の成長と癒合への影響を組織学的に解析する。分担者の天野は胎児組織の器官培養法に精通して、この方法を利用した実験結果を論文で発表している（Amano et al. 1999a, 1999b, 2001b, 2002, Kim et al. 2001, Shimada et al. 2003, Kobayashi et al. 2004）、実験遂行に問題はない。

2-2 Hsp25 の遺伝子発現誘導による影響の解析

2-1) の器官培養系を用いる。熱ショックタンパクは熱刺激によりその発現が誘導されるので、加温培地中での口蓋突起の成長・癒合の状況を組織学的に解析する。加温条件と Hsp25 の発現誘導との関連については本格実験前に各種条件による予備実験を行って条件を定める。

2-3 催奇形性物質と Hsp25 との関係

今までに報告のある口蓋裂関連の催奇形性物質を投与した場合の Hsp25 の発現や局在の変化を調べ、催奇形性物質と Hsp25 との関連を解析する。

2-4 細胞レベルと組織レベルでの Hsp25 の機能的役割の関連の解析

2-2) の結果と、1-6) の結果を比較検討し、口蓋上皮における細胞レベルと組織レベル

での Hsp25 の機能的役割の関連を解析する。

4 研究成果

1) マウス胎仔における Hsp25 の局在

マウス胎仔口蓋の各発生段階における熱ショック蛋白質 Hsp25 の局在を免疫組織化学的に明らかにした。さらに Hsp25 の主要な働きである抗アポトーシス機能との関連を調べるため、TUNEL 法を用いてアポトーシスの局在を組織化学的に明らかにした。

その結果、口蓋発生の下方形では、Hsp25 は口蓋粘膜上皮の peridermal cell 層に局在し、基底層には認められなかった。水平期になると口蓋突起先端部の peridermal cell 層から Hsp25 の免疫活性が消失し、消失部同士で両側口蓋突起の接合が起こった。接合すると再び封入された上皮層に強い Hsp25 免疫活性が復活したが、TUNEL 陽性のアポトーシスに陥った細胞が上皮層に出現すると、同部位から Hsp25 は次第に消失した。

以上の結果をまとめると、①接合する部位では Hsp25 の発現が一旦消失すること、および②癒合後は封入された上皮層における Hsp25 の発現とアポトーシスの発現が反転的である、ことが分かった。

これらの結果は、上皮層は Hsp25 により制御されたアポトーシスにより消失しすることが強く示唆された。

2) マウス胎仔口蓋突起器官培養実験

口蓋突起の接合・癒合が起こらない条件下で片側の口蓋突起の器官培養を行った。

その結果、③先端部の上皮層に Hsp25 の発現と反転的なアポトーシスの局在が見られた。さらに④先端部の上皮層は癒合が起こらなくてもほぼ消失すること、がわかった。

器官培養実験の結果から、口蓋正中部に封入された上皮層の消失は Hsp25 に制御されたアポトーシスにより消失するが、この過程は接合により誘導されるものではないことがわかった。

3) 結果の総括

本研究の正常発生および器官培養の結果から、正常な口蓋発生に生ずるアポトーシスは口蓋突起の癒合に必要な現象であり、Hsp25 はアポトーシスの発現を調節することにより口蓋発生に重要な役割を果たすことが強く示唆された。

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)

[著書] (計1件)

1. Shida H, Amano O, Takado T, Sakashita H. Neural crest cells in the development of cleft lip and palate. Current Experimental Study for Treatment of Cleft Lip and Palate (Eds; Natato M, Kawai T, Precious DS) Neomedic, Nagoya p178-184, 2008

[雑誌論文] (計2件)

1. 佐々木会, 山田 亨, 土居孝資, 岡安麻里, 徳永寛司, 鐘ヶ江晴秀, 天野 修
マウス胎児の臼歯歯胚における熱ショックタンパク質 Hsp27 の局在
明海歯科医学 38 : 58-66, 2009
2. Amano O, Doi T, Yamada T. Sasaki A, Sakiyama K, Kanegae H, Kindaichi K
Meckel's Cartilage: Discovery, Embryology and Evolution
J Oral Biosci 52: in press, 2010

[学会発表] (計17件)

- 一般発表 (口演・ポスター)
1. 土居孝資, 佐々木会, 山田 亨, 鐘ヶ江晴秀, 天野 修
マウスメッケル軟骨の軟骨膜にけるアポトーシス
第49回歯科基礎医学会, 北海道, 2007
 2. 山田 亨, 土居孝資, 佐々木会, 鐘ヶ江晴秀, 天野 修
マウス口蓋発生時に発現する Hsp25 は癒合部の上皮索のアポトーシスを抑制する
第49回歯科基礎医学会, 北海道, 2007
 3. 佐々木会, 土居孝資, 山田 亨, 鐘ヶ江晴秀, 天野 修
ラット歯肉における熱ショック蛋白質 Hsp27 および Hsp47 の局在
第49回歯科基礎医学会, 北海道, 2007
 4. 佐々木会, 山田 亨, 天野 修, 鐘ヶ江晴秀
ラット歯周組織における熱ショック蛋白質 Hsp27 および Hsp47 の局在
第112回日本解剖学会, 神奈川, 2007
 5. 山田 亨, 佐々木会, 天野 修, 鐘ヶ江晴秀
マウス口蓋発生における Hsp25 の局在とアポトーシスの関係
第112回日本解剖学会, 神奈川, 2007

6. 佐々木会, 山田 亨, 土居孝資, 鐘ヶ江晴秀, 天野 修
口腔粘膜上皮における Hsp27 の局在と歯の萌出に伴う変化
第 113 回日本解剖学会, 大分, 2008

7. 山田 亨, 佐々木会, 土居孝資, 鐘ヶ江晴秀, 天野 修
マウス口蓋発生における 25kDa 熱ショックタンパク質の局在と変動
第 113 回解剖学, 大分, 2008

8. 土居孝資, 山田 亨, 佐々木会, 鐘ヶ江晴秀, 天野 修
マウスメッセル軟骨の軟骨膜におけるアポトーシス
第 113 回解剖学, 大分, 2008

9. 佐々木会, 真野樹子, 天野 修, 鐘ヶ江晴秀
高周波が歯の移動に及ぼす影響について
第 67 回東京矯正歯科学会, 東京, 2008

10. 土居孝資, 山田 亨, 佐々木会, 鐘ヶ江晴秀, 天野 修
マウスメッセル軟骨の軟骨膜におけるアポトーシスの役割
第 50 回歯科基礎医学会, 東京, 2008

11. 佐々木会, 山田 亨, 土居孝資, 井上勝元, 鐘ヶ江晴秀, 天野 修
口腔粘膜上皮における Hsp27、Ki67 の局在と歯の萌出に伴う変化
第 50 回歯科基礎医学会, 東京, 2008

12. 佐々木会, 真野樹子, 天野 修, 各務肇, 鐘ヶ江晴秀
超短波が歯の移動に及ぼす影響について
第 67 回日本矯正歯科学会大会, 千葉, 2008

13. 佐々木会, 山田 亨, 土居孝資, 天野修, 鐘ヶ江晴秀
口腔粘膜上皮における Hsp27 の局在と歯の萌出に伴う変化
第 67 回日本矯正歯科学会大会, 千葉, 2008

14. 桃井知子, 崎山浩司, 井上勝元, 鐘ヶ江晴秀, 天野 修
マウス Meckel 軟骨における podoplanin の局在
第 50 回日本組織細胞化学会総会, 滋賀, 2009

15. 土居孝資, 佐々木会, 井上勝元, 崎山浩司, 鐘ヶ江晴秀, 天野 修
マウスメッセル軟骨の軟骨膜におけるアポトーシス
第 51 回歯科基礎医学会, 新潟, 2009

16. 佐々木会, 山田 亨, 土居孝資, 井上勝元, 桃井知子, 鐘ヶ江晴秀, 天野 修
歯の萌出に伴う口腔粘膜上皮における Hsp27 の局在と変化と細胞増殖との関連
第 114 回日本解剖学会, 岡山, 2009

17. 土居孝資, 山田亨, 佐々木会, 井上勝元, 鐘ヶ江晴秀, 天野 修
マウス口蓋発生における 25kDa 熱ショックタンパク質の局在と変動
第 114 回日本解剖学会, 岡山, 2009

6 研究組織

(1) 研究代表者

鐘ヶ江 晴秀 (明海大学教授)

研究者番号 : 90199173

(2) 研究分担者

天野 修 (明海大学教授)

研究者番号 : 60193025