

平成 23 年 5 月 16 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010 年度

課題番号：20592415

研究課題名（和文） 二次口蓋融合におけるトランスフォーミング成長因子のシグナリングの解明

研究課題名（英文） Identification for TGF-beta signaling during palatal development

研究代表者 中嶋 昭 (NAKAJIMA AKIRA)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：50297842

研究成果の概要（和文）：口蓋形成に TGF- $\beta$ 3 が極めて重要な働きをしている。しかし、T $\beta$ RII と T $\beta$ RIII を介した signaling については、十分に明かとなっていない。そこで、NIH3T3 細胞およびマウス口蓋を試料とし、各受容体の siRNA を用いて情報伝達経路について検討した結果、T $\beta$ RII および T $\beta$ RIII の発現は、それぞれ siRNA transfection により発現抑制された。siRNA 条件下で TGF- $\beta$ 3 刺激を行った結果、T $\beta$ RII/III を knock down を行った細胞では、それぞれの受容体単独を knock down した場合に比較し、p-Smad2 が抑制されていた。したがって、 $\beta$ RII および T $\beta$ RIII 両 receptor の相互作用の関与によつて下流遺伝子に情報伝達を行っている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The molecular mechanisms regulating palatogenesis remain incompletely characterized but are most likely to be involved in the molecular etiology for cleft palate. The objective was to investigate TGF- $\beta$ 3 signaling when both TGF- $\beta$  type II and III receptors (T $\beta$ R-II/III) were knocked down an NIH3T3 cell line and palatal organ culture in vitro. Treatment with siT $\beta$ R-II/III reduced the expression of the target genes. The treated palates were partially fused at E13+72 h when T $\beta$ R-II/III were knocked down, although all control palate were completely fused. The downstream genes was decreased in the siT $\beta$ R-II/III treated NIH3T3 cells and palatal shelves. The present study demonstrated that knocking down both T $\beta$ R-II and III could affect the downstream signaling pathway of TGF- $\beta$  by reducing the levels of phospho-Smad2. The siT $\beta$ R-II/III treatment resulted in persistent MEE cell proliferation, which has been shown to be linked to a failure to complete palatal fusion events.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,110,000	1,570,000	4,680,000

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：TGF-beta, 口蓋裂, 二次口蓋, 分子生物学, 成長・発育

1. 研究開始当初の背景

二次口蓋の成長・発育とトランスフォー

ミング成長因子 (Transforming Growth Factor-beta: TGF- $\beta$ ) family との関係が近年注目されてきている。TGF- $\beta$ には、従来 Type-I, II, III receptor が報告されており、申請者らは、二次口蓋融合時における TGF-type II 受容体(T $\beta$ R-II) の conditional knock out マウスの generation に成功し、その phenotype は口蓋裂を呈していたことを明らかにした (Ito Y *et al.*, 2003)。また、TGF- $\beta$  type III receptor (T $\beta$ R-III)は、従来 type I, II receptor の escort receptor として知られ、細胞体ドメインに signaling pathway に関与するモチーフがないとされていた (Brown *et al.*, 1999)。しかし、申請者らは、small interfering RNA を使用し、T $\beta$ R-III の機能を knock down した際、二次口蓋融合の遅延を認めたことを報告した(Nakajima *et al.*, 2007)。さらに、receptor の down stream である Smad-2 の phosphorylation を阻害していたため、signaling pathway が存在すると報告した (Nakajima *et al.*, 2007)。したがって、TGF- $\beta$  およびその receptor は、二次口蓋の融合に深く関与してきていることが明らかとなってきた。

## 2. 研究の目的

Transforming Growth Factor-beta (TGF- $\beta$ ) および受容体は、二次口蓋融合上皮 (Medial Edge Epithelium: MEE) に強い遺伝子合成蛋白の発現を示すことが明らかとなってきたが、口蓋融合時の signaling pathway の全容は、未だ十分に解明されているとはいえない。したがって、今回申請者は、MEE における TGF- $\beta$ 、その受容体、downstream 遺伝子、TGF- $\beta$ に関係する transcription factor の発現についての検討、さらに small interfering RNA (siRNA)を使用し、遺伝子 knock down を行い、二次口蓋融合と TGF- $\beta$  signaling pathway の関

係について解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) NIH3T3 細胞 culture および *in vitro* organ culture の手順および凍結切片の作製

NIH3T3細胞のcultureは、d-MEM mediaを使用し、37°C, 5% CO<sub>2</sub>-air atmosphereの環境下で、濃度50-100nMのsiRNAをtransfectした後、24時間後までcultureを行う。正確なMEE細胞の単離および口蓋融合時の遺伝子発現経過を明らかにするため、胎生13日目のマウス口蓋突起のみ摘出し、フィルター上に両口蓋突起を合わせるように、BGjb medium (Gibco)の浸透したGrobstein organ culture mesh上に試料をのせ、culture dishの中にてorgan cultureを行う。なお、6時間後に濃度300~500nMのsiRNAのtransfectを行い、72時間後までorgan cultureを行う。Cultureの条件はcell cultureと同様とした。経時的に採取したsampleは、4% paraformaldehydeにて固定後、凍結試料を作製し、-80°Cで保存する。凍結切片は、クライオスタットを使用し、切片の厚みを、10 $\mu$ mとし、その後-20°Cに保存する。

### (2) Real-time RT-PCR による mRNA 発現の定量解析

NIH3T3 細胞およびマウス口蓋 MEE 細胞の mRNA の抽出を行う。抽出した mRNA より 1 st strand RT-PCR 法で cDNA 合成を行う。TGF- $\beta$ 3 および receptor の塩基配列より 5'および 3' primer を設計合成し、Quantitative real time RT-PCR 法により上記遺伝子の増幅を行い、遺伝子発現を検討する。なお TGF- $\beta$ 3 およびその受容体発現量の Standard として、すでに報告されているマウス GAPDH の primer を使用し、各 culture 後の TGF- $\beta$ 3 遺伝子および受容体の反応を定量的に比較検討する。

### (3) Western blot 法による T $\beta$ R-III 遺伝子タンパク発現の定量解析

NIH3T3 細胞および胎生 13, 14, 15 日目の ICR (Wild type)のマウス二次口蓋 organ culture (24, 48, 72 時間後)の sample を Lysis buffer にて homogenize を行い、SDS-page 法にて、sample の loading を行う。その後、semi-dry 法にて membrane に loading sample を transfer し、blocking 処理を行った後、一次抗体および二次抗体を反応させた後、Western blot detecting kit (Roche)にて、X-ray film に発色させ、TGF- $\beta$ および receptor の発

現時期および量の検討を行う。siRNA が transfect しているかどうかについて、Target 遺伝子タンパク発現量をコントロールと比較し、確認を行う。また、濃度依存性であるかどうかについても検討を加える。

siRNA の transfect 確認後、同様の membrane を使用し、down stream に存在する、遺伝子発現についての定量解析を行う。さらに phospholiration した後の核内遺伝子、たとえば p-Smad2/3 の発現が siRNA により、コントロールと比較し発現量についての定量解析を行う。

#### (4) Target 遺伝子を knock down した際の MEE 細胞の cell proliferation の観察

24 時間後の Sample 回収 2 時間前に、100 $\mu$ M の 5-bromo-2deoxyuridine (BrdU) を反応させ、回収後、固定した後、BrdU detecting kit (Zymed) にて染色を行い、positive cell にてカウントし、コントロールと比較することで receptor を knock down した際の MEE の性質と機能について明らかにする。

また、apoptosis の detection には、in situ TUNEL cell death detecting kit (Rosche) を使用し、同様に positive cell カウントを行い、コントロールと比較検討する。したがって、得られた結果は、cell proliferation が多く行われていれば、二次口蓋融合の時期がコントロールと比較し遅延する可能性があるとして評価できるものと考えられる。

#### (5) 統計処理による総合評価

以上の総合的に評価し、遺伝子の発現時期および量について、Standard に GAPDH を使用し、relative amount を計算した後、統計処理ソフトウェア SPSS を使用し、ANOVA 一元配置分散分析法を用い、その後 Tukey's HSD にて有意差検定を行う。

### 4. 研究成果

(1) NIH3T3 細胞 culture および口蓋の organ culture を行い各サンプルについて、siRNA の濃度依存的に receptor のタンパク発現は減少し、500nM の濃度の siRNA transfection 条件下で、両 receptor を約 75% 発現抑制することが確認できた (図 1A B, 2A B)。RT-PCR 法による定量解析においても、NIH3T3 細胞および口蓋の organ culture の両サンプルにおいて、receptor の発現抑制を確認できた (図 1C, 2C)。また、マウス口蓋については、T $\beta$ R-III は、T $\beta$ R-II の発現を rescue する傾向を認め、T $\beta$ R-II を knock down すると、T $\beta$ R-III の

発現が上昇する興味深い結果が得られた。また、両 receptor の knock down により口蓋発育を遅延させる傾向を示した (Fig. 2C)。

(2) siT $\beta$ R-II/III を transfect した際のマウス二次口蓋の癒合について、E13+72h 後の organ culture の結果において、control palate は完全に癒合しているにもかかわらず、T $\beta$ R-II/III の両 receptor を knock down した際には二次口蓋癒合の遅延を認め、MEE 細胞の残存を認めた (図 3 A B)。

(3) BrdU の結果では、コントロール群で siRNA treatment 群に比較し有意に少ない傾向を示したことから、Treatment 群の方が MEE 細胞の cell proliferation が多く行われ、上皮が残存することが示唆された (図 4 A a, b および図 4 B)。In situ TUNEL の結果では、positive 細胞はコントロール群の方が有意に多い傾向を認めため、Control 群の MEE 細胞は PCD により上皮は減少する傾向を認めた (図 4 A c d および図 4 B)。

(4) 両 receptor の knock down により、下流遺伝子である Smad2 のリン酸化に影響を及ぼした (図 5)。

(5) Transcription factor については、両 receptor の knock down により Tbx22 および Runx1 ともに有意に約 50~70% の発現抑制されていることが明らかとなった (図 6)。この傾向は NIH3T3 細胞においても、Palatal 細胞においても同様な傾向を認めた (図 6 A, B, C, D)。

(6) 上記の結果より、図 7 に示したような TGF- $\beta$  の signaling pathway が示唆された。

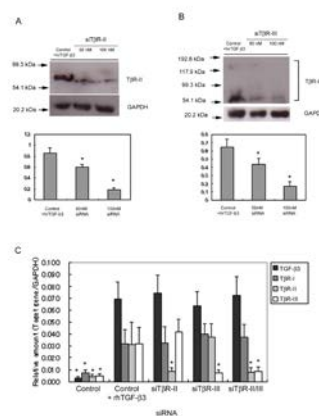


Figure 1. Nakajima et al.

図 1 : NIH3T3 細胞における siT $\beta$ R-II/III の結

果 (n=5, \*p<0.05)

A: siTβR-II を transfect した結果濃度依存的に receptor の発現が減少している。B: siTβR-III を transfect した結果濃度依存的に receptor の発現が減少している。C: Real time RT-PCR の結果を示し, rhTGF-β3 の刺激により, receptor の発現が増加している傾向を認めた。また, siTβR-II, siTβR-III, siTβR-II/III の各 siRNA の transfection により target となる遺伝子発現が減少している結果が明らかとなった。

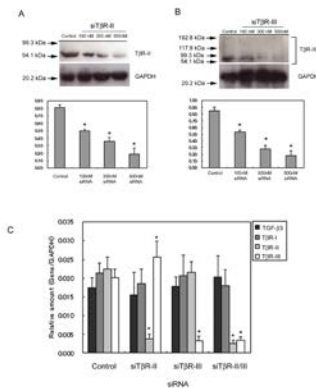


Figure 2. Nakajima et al.

図 2 : マウス二次口蓋における siTβR-II/III の結果(n=5, \*p<0.05)

A: siTβR-II を transfect した結果濃度依存的に receptor の発現が減少している。B: siTβR-III を transfect した結果濃度依存的に receptor の発現が減少している。C: Real time RT-PCR の結果を示し, マウス二次口蓋において, siTβR-II, siTβR-III, siTβR-II/III の各 siRNA の transfection により target となる遺伝子発現が減少している結果が明らかとなった。興味深い結果として, siTβR-II の knock down により, TβR-III の発現が増加している傾向を認めた。

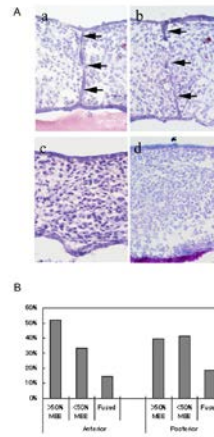


Figure 3. Nakajima et al.

図 3: siTβR-II/III を transfect した際の二次口蓋の表現型および MEE 細胞の残存状態

A: マウス二次口蓋の E13+72h 後の organ culture の phenotype を示す。A a は siTβR-II/III を transfect した際の二次口蓋前方部を示し, Ab は後方部を示している。コントロール群の前方部(C)および後方部 (d) を示す。コントロール群と比較し, treatment 群では MEE 細胞の残存が明らかであり, 癒合の遅延を認めた。B: Nasal epithelial から oral epithelial まで MEE 細胞の残存状態を 50% を境界にグラフ化した結果を示す。前方部では, 約 50% の二次口蓋に 50% 以上の MEE 細胞の残存を認めた。後方部においても, 約 40% の口蓋に 50% 以上の MEE 細胞の残存を認めた(n=48)。

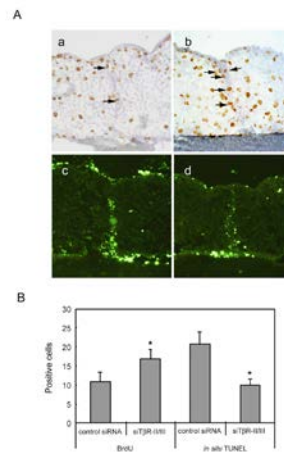


Figure 4. Nakajima et al.

図 4 : Cell proliferation および programming cell death 細胞の比較(n=5, \*p<0.05)

E13+24h における, コントロール群 BrdU の結果 (A a) および treatment 群の結果 (A b) を示す。コントロール群に比較し, treatment 群で有意に cell proliferation の細胞が多い傾向を認めた (B)。同様に, E13+72h における in situ TUNEL の結果では, コントロール群 (c) に比較し, treatment 群の二次口蓋 MEE 細胞の方が陽性細胞は少ない傾向を認めた (B)。したがって, treatment 群の MEE 細胞は E13+24h において, proliferation をする細胞がコントロール群より多く MEE 細胞は残存することが示唆された。

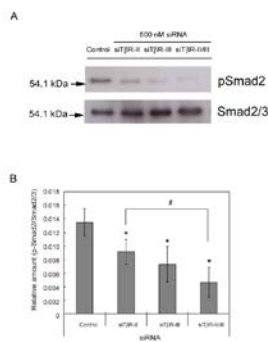


Figure 5. Nakajima et al.

図 5 : TβR-II/III を knock down した際の下流遺伝子 p-Smad2 の発現 (n=5, \*#p<0.05)

A: siTβR-II, siTβR-III および siTβR-II/III を transfect した際のマウス口蓋の Total Smad2/3 および p-Smad2 のタンパク発現を示す。発現量は, receptor を double knock down した際の方が single knock down した場合よりリン酸化が阻害されていた。B: Relative amount (p-Smad2/total Smad2/3) を計算した結果, control siRNA に比較し, 各 single receptor knock down した場合および double knock down した際にも有意に amount が減少していた。さらに, siTβR-II に比較し, siTβR-II/III の方が有意に発現が抑制された。

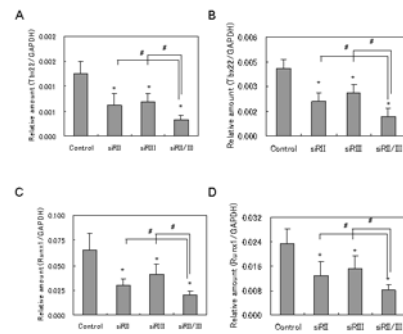


Figure 6. Nakajima et al.

A: Tbx22 (NIH3T3), B: Tbx22 (Palate), C: Runx1 (NIH3T3), D: Runx1 (Palate)

図 6 : TβR-II/III を knock down した際の NIH3T3 細胞および二次口蓋における Transcription factor (Tbx22 および Runx1) の発現 (n=5, \*#p<0.05)

A: NIH3T3 細胞における Tbx22 の発現

B: マウス口蓋における Tbx22 の発現

C: NIH3T3 細胞における Runx1 の発現

D: マウス口蓋における Runx1 の発現

A-D: Control RNA に比較し, siRNA 群では有意に小さい値を示し, double knock down した場合には, 各 receptor の single knock down した場合に比較し, 有意に小さい値を示した。したがって, TβR-II, TβR-III および TβR-II/III の knock down を行うことにより, 下流の転写因子についても発現を抑制することが明らかとなった。

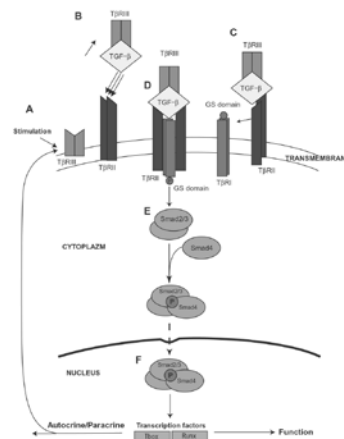


Figure 7. Nakajima et al.

図 7: 結果により考察された TGF-β の signaling pathway の schema

A: 刺激により, TβR-III が活性化。B: TβR-III が Ligand に結合。C: TβR-III-Ligand complex

が T $\beta$ R-II の結合を誘導・誘発。D: T $\beta$ R-I に結合し GS domain がリン酸化。E: GS domain がリン酸化することにより Smad2/3 が活性化。F: Smad2/3 がリン酸化し核内に入り、転写因子に signal 伝達

#### 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 3 件)

- ① Nakajima A, Tsuboi Y, Suzuki I, Honda K, Shinoda M, Kondo M, Matsuura S, Shibuta K, Yasuda M, Shimizu N, Iwata K, Journal of Dental Research, 査読 有, 2011, In Press.
- ② Nakajima A, Tanaka E, Ito Y, Maeno M, Iwata K, Shimizu N, Shuler CF., The expression of TGF- $\beta$ 3 for epithelial-mesenchyme transdifferentiated MEE in palatogenesis. Journal of Molecular Histology., 査読 有, 41, 2010, 343-345.
- ③ Zhang F, Koyama Y, Sanuki R, Mitsui N, Suzuki N, Kimura A, Nakajima A, Shimizu N, Maeno M., IL-17A stimulates the expression of inflammatory cytokines via celecoxib-blocked prostaglandin in MC3T3-E1 cells, Arch Oral Biol, 査読 有, 55, 2010, 679-688.

[学会発表] (計 8 件)

- ① Nakajima A, Ito Y, Tanaka E, Iwata K, Maeno M, Shimizu N, Shuler CF. The functional role of T $\beta$ R-II and III receptors during palatal fusion, 89<sup>th</sup> International Association for Dental Research Annual Meeting, March 15-21, 2011, San Diego convention center, San Diego, CA, USA (Poster).
- ② Nakajima A, Ito Y, Mitsui N, Maeno K, Iwata K, Shuler CF, Shimizu N. TGF-beta type II and III receptors signaling for fate of MEE in palatogenesis, 7th International Orthodontic Congress, February 6-9, 2010, Sydney convention & Exhibit centre, Sydney, Australia (Poster).
- ③ 中嶋 昭, 三井教裕, 前野正夫, Charles F Shuler, 清水典佳, 二次口蓋融合におけ

る TGF- $\beta$  type II/III receptor signaling pathway の解明, 第 69 回日本矯正歯科学会大会, 2010 年 9 月 27-29 日, パシフィコ横浜, 横浜 (学術展示)

- ④ 中嶋 昭, 浅野正岳, 三井教祐, Shuler CF, 清水典佳, TGF- $\beta$  type II および III receptor における signaling pathway の解明, 第 68 回日本矯正歯科学会大会, 2009 年 11 月 16-18 日, 福岡国際会議場・福岡マリンメッセ, 福岡 (学術展示)
  - ⑤ 中嶋 昭, Current orthodontics, 2009 年 1 月 30-31 日, 徳島大学歯学部, 徳島 (徳島大学招待講演)
  - ⑥ 中嶋 昭, 浅野正岳, 三井教祐, Shuler CF, 清水典佳, TGF- $\beta$  type III receptor における signaling pathway の解明, 第 67 回日本矯正歯科学会大会抄録, 2008 年 9 月 16 日~18 日, 幕張メッセ, 千葉 (学術展示)
  - ⑦ Nakajima A, Ito Y, Mitsui N, Iwata K, Maeno M, Shimizu N, Shuler CF, TGF-beta type III receptor signaling for fate MEE in palatogenesis, 86th International Association for Dental Research, July 2 - 5, 2008, Toronto convention centre, Toronto, Canada. (Poster presentation)
  - ⑧ 中嶋 昭, 清水典佳, Shuler CF, 二次口蓋融合時における口蓋上皮細胞の形質変化について, 第 32 回日本口蓋裂学会大会, 2008 年 5 月 27-30 日, 広島県民文化センター, 広島 (学術展示)
- #### 6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
中嶋 昭 (NAKAJIMA AKIRA)  
研究者番号: 50297842  
日本大学・歯学部・助教
  - (2) 研究分担者  
なし
  - (3) 連携研究者  
なし