

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21036

研究課題名（和文）JAK2/STAT経路を介した新規口蓋裂発症メカニズムの解明と治療薬の探索

研究課題名（英文）Investigation of a novel mechanism of cleft palate pathogenesis via JAK2/STAT pathway and search for a treatment

研究代表者

吉田 尚起（Yoshida, Naoki）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：30965273

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：口蓋裂の発症メカニズムについては今なお不明な点が多い。本研究ではJAK2/STAT経路特異的阻害剤（AG490）を用いて、JAK2/STAT経路の異常で口蓋突起上皮細胞（MEE細胞）の癒合不全が起きるメカニズムの解析とJAK2/STAT経路の異常による口蓋裂に対して新規治療薬となる化合物の探索を目的とした。AG490投与群のMEE細胞から腫瘍抑制遺伝子のp21の発現が抑制されることが明らかになった。また、葉酸の添加によりJAK2/STAT経路の異常による口蓋突起癒合不全が回復することが明らかとなり、JAK2/STAT経路の異常による口蓋裂に対する新規治療法の新たな手掛かりが見つかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口蓋突起の癒合におけるJAK2/STAT経路の役割についての解析はこれまで報告がなく、本研究成果は口蓋突起の上皮の癒合に着目し、口蓋突起の癒合で最も重要な経路のTGF- β シグナルでは説明できない口蓋裂発症メカニズムを解析しようとする点で非常に高い学術的意義がある。また、多因子性の疾患である口蓋裂発症のメカニズムの中でJAK2/STAT経路の異常から発症する口蓋裂の新しい予防治療法の開発につながる点で社会的意義を有している。

研究成果の概要（英文）：The pathogenesis of cleft palate remains unclear. In this study, we used a JAK2/STAT pathway-specific inhibitor (AG490) to analyze the mechanism by which inhibition of the JAK2/STAT pathway causes loss of medial edge epithelium (MEE cells). The study also aimed to find a compound that would be a new drug for cleft palate due to inhibition of the JAK2/STAT pathway. It was found that AG490 treatment suppressed the expression of the tumor suppressor gene p21 in MEE cells. In addition, folic acid rescued cleft palate due to inhibition of the JAK2/STAT pathway. New clues have been found to a new treatment for cleft palate inhibition of the JAK2/STAT pathway.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：口蓋裂 JAK2/STAT経路

1．研究開始当初の背景

口唇口蓋裂は顎顔面形成不全のうち最も頻度の高い先天性疾患の一つであり、裂により様々な機能不全や審美障害を呈することで患者の QOL は著しく低下する。口蓋裂の発症メカニズムについては今なお不明な点が多く、予防法も確立されていない。口蓋は胎生期に左右の口蓋突起が癒合して形成される。癒合前の口蓋突起は上皮で覆われており、癒合後に間葉組織の連続性を得て口蓋を形成するために口蓋突起癒合部の上皮である medial edge epithelial cell（MEE 細胞）が取り除かれる必要がある。口蓋裂は多因子性の疾患であり、その原因となる因子は一部報告されているが、まだ不明なものも多く存在すると考えられている。また、口蓋突起の癒合では最も重要な経路として TGF- β シグナルが知られているが、TGF- β シグナルでは説明できない口蓋突起の癒合不全も多く存在することが知られている。

炎症で代表的な JAK2/STAT シグナル伝達経路はサイトカインや成長因子の刺激を仲介する分子経路として、細胞の成長や分化、細胞死を調節する。JAK2/STAT 経路の異常は自己免疫疾患等の原因となっており、STAT3 の機能欠失が原因で起こる原発性免疫不全症候群の高 IgE 症候群では随伴症状として口蓋裂が報告されている。研究代表者は、JAK2/STAT 経路特異的阻害剤 (AG490) を用いて、野生型マウスから摘出した口蓋組織を培養することで、AG490 投与による JAK2/STAT 経路の異常が口蓋突起上皮における Stat3 のリン酸化を抑制することで MEE 細胞の消失を阻害することを明らかにした。しかしながら、口蓋突起上皮における Stat3 のリン酸化が MEE 細胞の消失に関わるメカニズムは明らかになっていない。また、そのメカニズムを明らかにすることで JAK2/STAT 経路の異常により生じた口蓋突起の癒合不全を回復する方法も探索でき、JAK2/STAT 経路の異常による口蓋裂に対する新規治療法の開発に挑戦できる。

2．研究の目的

本研究は、研究代表者が明らかにした JAK2/STAT 経路の異常で口蓋突起上皮の癒合不全が起きることから、AG490 投与の影響による MEE 細胞の遺伝子発現の変化を網羅的に解析し、そのメカニズムを明らかにすることで AG490 投与により生じる口蓋突起上皮の癒合不全を予防する化合物を探索することを目的とした。

3．研究の方法

実験 JAK2/STAT 経路阻害を行った口蓋組織の MEE 細胞からの RNA 採取と RNA-seq を用いた網羅的解析

胎生 13.5 日齢の野生型マウスから摘出した口蓋組織に AG490 を投与して 48 時間培養後の口蓋組織を回収し、組織切片を作成した。組織切片からレーザーマイクロダイセクションを使用して MEE 細胞を回収し、RNA を採取した。採取した RNA を RNA-seq を用いて網羅的に解析し、JAK2/STAT 経路阻害により MEE 細胞において変動する分子を明らかにした。また、変動した分子の MEE 細胞における RNA の発現量を q-PCR で確認した。

実験 JAK2/STAT 経路の阻害による MEE 細胞の消失阻害を正常化する化合物の探索

RNA-seq により明らかになる JAK2/STAT 経路阻害時の MEE 細胞で起こる分子メカニズムから、JAK2/STAT 経路阻害による MEE 細胞の消失阻害を正常化できる化合物を選定し、それらを両側の口蓋突起内側縁上皮同士を接触させた状態（口蓋突起上皮接触モデル）の器官培養において添加し、MEE 細胞の組織学的解析を行うことで、JAK2/STAT 経路阻害で生じる口蓋突起上皮の癒合不全を予防する薬剤を同定した。

4. 研究成果

実験 . 胎生 13.5 日齢で摘出した口蓋組織に AG490 を投与して 48 時間培養後の口蓋組織からレーザーマイクロダイセクションを使用して MEE 細胞を回収し、RNA を採取して解析を行った（図 1）。その結果、MEE 細胞において AG490 投与群では対照群と比較して腫瘍抑制遺伝子であり、細胞増殖を阻害するサイクリン依存性キナーゼ阻害因子である *p21* の発現が抑制されることが明らかになった（図 2）。

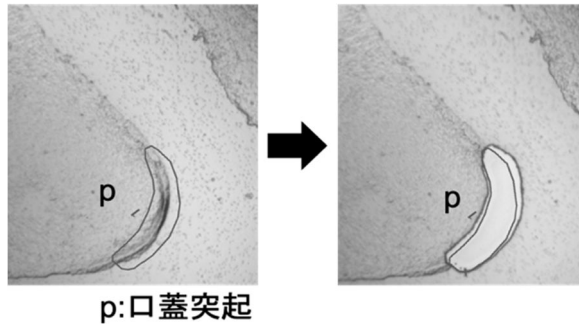


図 1：レーザーマイクロダイセクションによる MEE 細胞の採

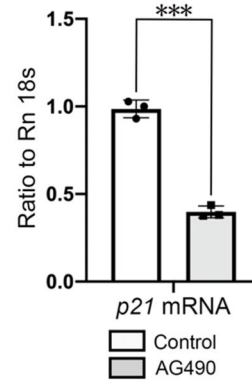


図 2：AG490 投与による *p21* の発現量の変化

実験 . MEE 細胞の RNA 解析により明らかになった JAK2/STAT 経路阻害時の MEE 細胞で起こる分子メカニズムから、*p21* の発現を正常化できる化合物として葉酸を選定し、口蓋突起上皮接触モデルの器官培養において葉酸（FA）を添加して、MEE 細胞の組織学的解析を行った。その結果、AG490 投与群では MEE 細胞の消失阻害が起きたのに対し、AG490 + 葉酸投与群では MEE 細胞が消失した（図 3）。また、葉酸の添加により Stat3 のリン酸化が活性化され、*p21* の発現も有意に上昇した。

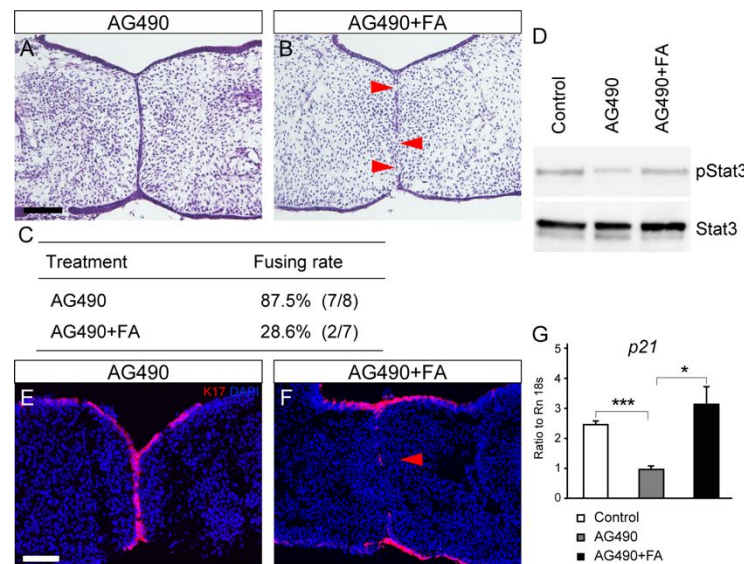


図 3：葉酸による AG490 投与群の口蓋突起癒合不全の回復

本結果により、MEE 細胞における JAK2/STAT 経路の役割を解明することができ、JAK2/STAT 経路の異常による口蓋裂に対する新規治療法の新たな手掛かりが見つかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshida Naoki, Inubushi Toshihiro, Hirose Takumi, Aoyama Gozo, Kurosaka Hiroshi, Yamashiro Takashi	4. 巻 16
2. 論文標題 The roles of JAK2/STAT3 signaling in fusion of the secondary palate	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Disease Models & Mechanisms	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） 10.1242/dmm.050085	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yoshida Naoki, Inubushi Toshihiro, Hirose Takumi, Aoyama Gozo, Kurosaka Hiroshi, Yamashiro Takashi
2. 発表標題 口蓋突起上皮の癒合におけるJAK2/STAT経路の役割について
3. 学会等名 日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2022年～2023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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------