

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11019

研究課題名(和文)顎顔面発生過程における低酸素ストレス抵抗性因子の解析

研究課題名(英文)Analysis of anti-hypoxic stress factors during maxillofacial development

研究代表者

中富 満城 (NAKATOMI, Mitsushiro)

九州歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：10571771

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)：本研究では遺伝要因としてMsx1遺伝子変異マウスを用い、環境要因として妊娠母獣に低酸素ストレスを付与し、口唇裂発症過程における遺伝-環境相互作用について解析した。Msx1遺伝子欠損により内側鼻突起においてBmp4発現が低下し、野生型と比較してBmpシグナルの活性化を示すリン酸化Smad1/5の発現が有意に低下した。低酸素マーカーのHypoxyprobe発現解析により、内側鼻突起先端部が特に高い低酸素感受性を示す事が明らかとなった。以上の結果より遺伝要因によって生じる内側鼻突起の形態的变化に環境要因の低酸素ストレスが相加的に作用し、上顎突起との癒合不全を呈して口唇裂を発症する可能性が示唆された。

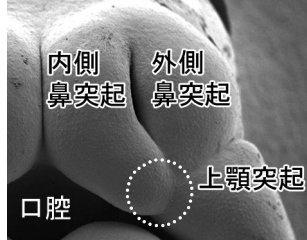
研究成果の概要(英文)：In this study we analyzed gene-environmental interaction during upper lip development using Msx1 null knockout mice as a genetic factor and hypoxic stress as an environmental factor. Bmp signaling was statistically significantly down-regulated in the medial nasal process (MNP) of Msx1-/- . Upon hypoxic stress, immunohistochemistry of a hypoxia marker Hypoxyprobe revealed that the tip of the MNP was among the most hypoxia-sensitive tissues. Our data indicate that loss of Msx1 leads to morphological changes of the MNP and hypoxic stress additively affects the contact between the MNP and the maxillary process, resulting in cleft lip formation.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：口唇口蓋裂

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類の顔面発生過程において、内側鼻突起・外側鼻突起・上顎突起の三者が癒合して上唇領域が形成される(下図)



口唇裂はこれらの突起の伸長不全や癒合不良により生じ、全身の先天異常の中でも特に高頻度で起こる(Shkoukani et al., Front. Pediatr., 2013)。ヒトにおいてはその発症率に人種差があり、日本人を含む北東アジアで最も高い発症率を呈する(約500人に1人)。

(2) 先天異常の発症には遺伝的要因と環境的要因の双方が重要な役割を果たすと考えられており、遺伝-環境多因子閾値説が提唱されている。口唇口蓋裂患者の遺伝子変異解析により、リスク遺伝子として *MSX1*・*PAX9*・*TGF*・*TGF 3*・*FGFR1*・*IRF6*・*PVRL1*・*TBX22* 等が報告されている。環境要因としては母体の低酸素・低栄養・喫煙・飲酒・X線曝露・薬物摂取・精神的ストレス等が挙げられる(Webster et al., Curr. Pharm. Des., 2006)。特に低酸素は喫煙・不整脈・過度な運動・睡眠時無呼吸症候群・喘息・心疾患・肺疾患・高地居住等の様々な要素に随伴して起こり得る為、母体の低酸素ストレスが胎児発生過程に与える影響の解明が求められていた。

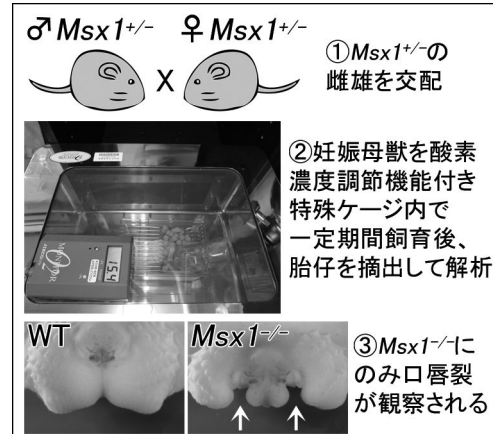
(3) 世界的な研究の進展により歯や二次口蓋の発生過程については多くの知見が蓄積されているものの、口唇形成過程には未だ不明な点が多い。その最大の理由は口唇裂を呈する遺伝子ノックアウトマウス为数非常に限られている事であり、口唇発生を進める上での大きな障害となっていた。また従来の先天異常研究は主に遺伝要因単独あるいは環境要因単独の実験系を用いて行われており、両者を組み合わせた実験系は充分得られていなかった。これらの事から、口唇裂の発症メカニズムについての詳細な解析が求められていた。

2. 研究の目的

(1) *Msx1* 遺伝子はホメオボックス型転写因子をコードし、歯を含めた頭蓋顎顔面領域の発生過程に重要な役割を果たす事が知られている。ヒトの *MSX1* 変異による非症候群性(孤発性)口唇口蓋裂の症例が多数報告されている(van den Boogaard et al., Nat. Genet., 2000 等)。実際にマウス口唇形成期において *Msx1* は顔面原基に強く発現する。しかしながら *Msx1* 遺伝子ノックアウトマウス

(*Msx1*^{-/-})は通常の飼育条件下では口唇裂を呈さない為、口唇形成過程における *Msx1* の役割については未解明であった。

(2) 予備実験として *Msx1*^{+/-}マウスの雌雄を交配後に妊娠母獣を10%酸素濃度下で一定期間飼育した所、野生型(WT)および *Msx1*^{+/-}の胎子は表現型を示さない一方、*Msx1*^{-/-}の胎子は有意に高確率に口唇裂を発症した(下図)。



これは遺伝要因と環境要因が組み合わさった時に初めて口唇裂を発症する事を意味しており、遺伝-環境多因子閾値説を実証する優れた研究モデルであると考えられる。しかしその成因については全く不明であるので、「顎顔面発生過程における低酸素ストレス抵抗性に *Msx1* 遺伝子が重要な役割を担う」という仮説を立案し、本研究においてその解析を試みた。

(3) また予備実験により低酸素ストレスを加えた歯胚の歯髄内に著しい血管拡張および鬱血が生じている例が多数認められた。顔面原基と歯胚の発生は共に上皮-間葉相互作用により進行し、*Msx1* をはじめ多くの遺伝子が共通に用いられる。歯胚発生過程の解析で得られる知見は顔面発生の研究を進める上で大いに有用であると考えられた事から、歯胚でも同様に組織学的・分子生物学的解析を行う事とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究では *Msx1* 遺伝子変異マウスを用いて実験を行った。妊娠母獣への低酸素負荷の方法として酸素濃度調節機能付き特殊ケージによる10%酸素濃度下での飼育と、不整脈を惹起して低酸素状態を誘発する事が知られている抗てんかん治療薬のフェニトインの腹腔内投与の2種類を用いた。いずれの方法でも口唇形成時期である胎齢10日目および11日目に妊娠母獣に対して低酸素負荷を与え、胎齢後期に胎子を摘出して野生型と *Msx1*^{-/-}胎子の間での口唇裂の発症率の差を検証した。

(2) 低酸素に陥った細胞を標識できる Hypoxyprobe を胎仔抽出 1 時間前に妊娠母獣に腹腔内投与し、低酸素高感受性組織を検出した。

(3) *Msx1* は Bmp シグナルを制御する事が知られているので、Bmp4 発現の *in situ* hybridization による検出および Bmp シグナルの活性化を示すリン酸化 Smad1/5 の免疫染色を行い、野生型と *Msx1*^{-/-} の胎仔顔面原基における Bmp シグナルの動態について解析した。

(4) 救済実験として胎齢 10 日目と 11 日目にフェニトインを投与した妊娠母獣を 60% 高酸素濃度下で飼育し、胎齢後期に胎仔を抽出して口唇裂の有無について検証した。

(5) 血管構築に重要な役割を果たす事が知られている *Hey1* および *Hey2* 遺伝子の顔面原基および歯胚における発現パターンについて、*in situ* hybridization 法により検出した。

(6) 妊娠母獣に低酸素負荷を与え、胎仔の歯胚形成に与える影響について形態学的に解析すると共に、低酸素マーカーの *Hif1a* および *VEGFa* の発現動態について免疫組織学的解析と Real-time PCR 解析を行った。

4. 研究成果

(1) 妊娠母獣に 85mg/kg の濃度でフェニトインを投与した場合、野生型胎仔の口唇裂発症率は 2.0%、*Msx1*^{-/-} 胎仔の口唇裂発症率は 91.7% で、変異型において有意に高確率に口唇裂を発症した。妊娠母獣を 10% 酸素濃度下で飼育した場合、野生型胎仔の口唇裂発症率は 0%、*Msx1*^{-/-} 胎仔の口唇裂発症率は 71.4% で、変異型において有意に高確率に口唇裂を発症した。双方の実験系において類似した結果が得られた事から、フェニトイン投与による催奇形性は低酸素状態を惹起した事が主因であると考えられる。また 10% 酸素濃度下での飼育による胎仔への影響は母体を介した間接的なものであるが、フェニトインは胎盤を通過して直接胎仔の心臓に作用する事が知られているので、フェニトイン投与の方が高い口唇裂発症率を示したと考察される。

(2) 低酸素に陥った細胞を標識できる Hypoxyprobe を用いて免疫組織学的に検出した結果、フェニトインの作用を受けた胎仔の内側鼻突起および外側鼻突起の先端部の間葉において著しい陽性反応を示した。この領域は *Msx1* の発現部位とほぼ一致する事から、*Msx1* が通常は顔面原基において低酸素ストレス抵抗性作用を担っていると考えられる。

(3) 口蓋や歯胚を用いた先行研究により、間葉組織において *Msx1* が *Bmp4* の発現を正に制御する事が知られている。本研究において

Msx1^{-/-} 胎仔の顔面原基における Bmp シグナルの発現動態を解析した所、内側鼻突起の *Msx1* 発現領域において *Bmp4* の mRNA 発現が低下し、リン酸化 Smad1/5 の発現も同様に低下していた。ImmunoRatio ソフトウェアを用いてリン酸化 Smad1/5 の発現を定量解析すると、対照群では陽性細胞率が 77.0% だったのに対し、*Msx1*^{-/-} 胎仔では陽性細胞率が 36.7% で、有意に低下していた。走査型電子顕微鏡解析により、野生型と比較して *Msx1*^{-/-} では内側鼻突起の劣成長が認められた。

(4) 妊娠母獣にフェニトインを投与後、高酸素濃度下で飼育して救済実験を行った。通常の酸素濃度下での *Msx1*^{-/-} 胎仔における口唇裂発症率は 71.4% である。高酸素濃度下で飼育した場合、*Msx1*^{-/-} 胎仔における口唇裂発症率は同腹の胎仔が 7 匹以上では 80.0% で有意差は無く、同腹の胎仔が 6 匹以下では 16.7% で有意に低い発症率となった。同腹の胎仔が多い場合は十分な酸素供給が受けられず、高酸素濃度下での飼育でも表現型が救済されない結果になったと考察される。

(5) 顔面原基における *Hey1* および *Hey2* 遺伝子の発現パターンについて解析した結果、*Hey1* の発現は認められなかったが、*Hey2* は外側鼻突起の外側の間葉組織において特異的な発現が認められた。歯胚における *Hey1* および *Hey2* 遺伝子の発現パターンについて解析した結果、*Hey1* は分化初期のエナメル芽細胞および歯髓の象牙芽細胞下層において発現が認められ、*Hey2* は未分化な内エナメル上皮に局限して発現が認められた。

(6) 低酸素負荷を受けた切歯歯胚の歯髓に著しい血管拡張と鬱血が認められたが、臼歯歯胚には認められなかった事から、低酸素感受性に歯種特異性があると考えられる。切歯歯胚の象牙芽細胞において *Hif1a* と *VEGFa* の発現上昇が認められ、歯髓から抽出した total RNA を用いた Real-time PCR 解析でも同様の結果を得られた事から、低酸素負荷を受けた歯髓では象牙芽細胞が *Hif1a* や *VEGFa* を発現し、血管構築を誘導して低酸素からの回復を図る可能性が示唆された。

以上より、*Msx1*^{-/-} の顔面原基では Bmp シグナルの低下により形態変化が生じ、更に胎仔に低酸素負荷が掛かる事によって *Msx1* が通常発現している領域の細胞が低酸素高感受性となり、その相加効果により内側鼻突起と上顎突起の癒合不全が生じ、口唇裂を呈したと考えられる。また高酸素濃度下での飼育によりフェニトインの催奇形性作用による表現型の発現を一定程度緩和できた事から、将来的なヒトにおける有効な口唇裂発症予防法の開発に資する結果が得られたと考えられる。

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1件)

Kibe K, Nakatomi M, Kataoka S, Toyono T and Seta Y. Hey1 and Hey2 are differently expressed during mouse tooth development. Gene Expression Patterns, 27:99-105, 2018. (査読有)
DOI: 10.1016/j.gep.2017.11.004

[学会発表](計7件)

木部琴乃, 中富満城, 片岡真司, 豊野孝, 瀬田祐司: マウスの歯胚における Hey1 および Hey2 遺伝子の発現パターン解析. 第57回歯科基礎医学会学術大会, 新潟, 平成27年9月11-13日.

木部琴乃, 中富満城, 片岡真司, 豊野孝, 瀬田祐司: マウスの歯胚における Hey1 および Hey2 遺伝子発現の定量的解析. 第76回九州歯科学会総会, 北九州, 平成28年5月28日 - 29日.

木部琴乃, 中富満城, 片岡真司, 豊野孝, 瀬田祐司: マウスの歯胚における Hey1 および Hey2 遺伝子発現の定量的解析. 第58回歯科基礎医学会学術大会, 札幌, 平成28年8月24日 - 26日.

木部琴乃, 中富満城, 片岡真司, 豊野孝, 瀬田祐司: 歯胚形成過程における低酸素負荷の影響. 第77回九州歯科学会総会・学術大会, 北九州, 平成29年5月20-21日.

中富満城: 遺伝的要因と環境要因の複合作用による口唇裂研究モデルの新規構築. 第57回日本先天異常学会学術集会, 東京, 平成29年8月26-28日.

中富満城, 片岡真司, 豊野孝, 瀬田祐司: 口唇裂発症モデルマウスにおける遺伝-環境相互作用の解析. 第59回歯科基礎医学会学術大会, 松本, 平成29年9月16-18日.

木部琴乃, 中富満城, 片岡真司, 豊野孝, 瀬田祐司: マウスの歯胚形成過程における低酸素負荷の影響. 第59回歯科基礎医学会学術大会, 松本, 平成29年9月16-18日.

6. 研究組織

(1)研究代表者

中富 満城 (NAKATOMI, Mitsushiro)
九州歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 10571771

(2)研究分担者

瀬田 祐司 (SETA, Yuji)
九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号: 90291616

豊野 孝 (TOYONO, Takashi)
九州歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 10311929

古株 彰一郎 (KOKABU, Shoichiro)
九州歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 30448899

片岡 真司 (KATAOKA, Shinji)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 80364149