

令和元年6月13日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11352

研究課題名(和文) 顔面の形態形成を制御する新規シグナルネットワークの解明

研究課題名(英文) Novel signal network controls craniofacial morphogenesis.

研究代表者

川上 正良 (Kawakami, Masayoshi)

奈良県立医科大学・医学部・学内講師

研究者番号：20244717

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、上顎の形成に及ぼすWntシグナルの影響について検討した。上顎突起と前頭鼻突起が癒合する前の(Stage 22) embryoの上顎突起にWntシグナルを阻害するDkk-1を投与すると、上顎の形成異常を引き起こした。Dkk-1投与6時間後では、上顎突起組織におけるBmp4、Sox9、Tbx22、Barx1の遺伝子発現が減少し、細胞増殖能が低下した。Wntシグナルは、これらの遺伝子発現を活性化させることで顎顔面の形態形成をコントロールすることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎顔面は複雑な発生過程を有し、そのメカニズムは不明な点が多い。唇顎口蓋裂をはじめとする顎顔面の形成異常に対して、発生生物学的手法を用い、発症メカニズムを明らかにしようとする本研究は、歯科矯正学の分野ではあまり手のつけられていなかった研究である。本研究で得られた結果は、Wntシグナル伝達の異常が、ヒトの口唇裂や口蓋裂の原因であり、その発症機構の一端が明らかとなることが予想される。

研究成果の概要(英文)：We examined whether the Wnt signaling pathway is required for maxillofacial development in chick embryo. Affi-Gel Blue beads soaked in Dickkopf-1 (Dkk-1) were inserted on right side of the maxillary prominence of chick embryo at HH stage 22. Total RNA was isolated and real-time RT-PCR was performed. The bead-implanted embryos were injected with 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 2 h before euthanization. BrdU-positive cell numbers in the treated maxillary prominence were significantly lower at both 24 and 48 h after implantation. Down-regulation of the expression of Bmp4, Tbx22, Sox9, and Barx1 was confirmed in the maxillary prominence treated with Dkk-1, which indicated that the deformity of the maxillary bone was controlled by gene targets of the Wnt signaling pathway. Our findings indicate that the Wnt signaling regulates maxillary morphogenesis and growth through Bmp4, Tbx22, Sox9, and Barx1.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：発生・分化 細胞・組織 遺伝子 シグナル伝達 歯学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

唇顎口蓋裂をはじめとする顎顔面の形成異常は多因子性の疾患とされ、多くの原因遺伝子が報告されている。しかし発症のメカニズムは、未だ不明なままである。臨床では対症療法に終始せざるを得ず、発症機序の解明が求められている。

顎顔面の形態異常の発症は、個体発生のきわめて初期に求めることができる。脊索の神経堤細胞が腹側に遊走後、顔面突起を形成し、増殖と癒合を繰り返し、複雑な顔面骨格を形成していく。申請者は、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、これがのちの上顎の形態に影響を及ぼしていることを明らかにした (Kawakami M, 2006)。顎顔面の形成過程は、さまざまな遺伝子シグナルによってコントロールされているが、そのうち LIM homeobox 遺伝子は、ボディプランとなる遺伝情報と考えられており、申請者は *Lhx8* は上顎突起、下顎突起の上皮直下の間葉細胞に局限して発現し、上皮性の因子である Fgf-8 や Tgf- β により発現誘導されていることを明らかにした (Inoue M. et al, 2006)。申請者らはニワトリ胚を用いて上顎突起に発現する Fgf-8b を阻害すると、上顎突起由来の premaxilla や maxilla, jugal bone が欠損し、口唇裂・顎裂を発症することを明らかにした。

Wnt (Wingless/int; ウイント) は分泌性のタンパク質で、個体発生の初期に形態形成、器官形成を制御している。*Wnt* シグナルは受容体から細胞内へ伝達され、 β -カテニンのリン酸化と分解を抑制する。その結果、 β -カテニン/転写因子 TCF 複合体が形成され、細胞核に入って標的遺伝子を活性化し、細胞組織の増殖や分化を引き起こす。

上唇は上顎突起 (Maxillary process) と前頭鼻突起 (frontonasal mass) が癒合することで形成されるが、この癒合が起こる時期に、*Wnt* 遺伝子やその receptor が顔面突起上皮に発現し、活性化されることが明らかとなっている。

2. 研究の目的

本研究期間内では、顎顔面の形成時におけるシグナルメカニズム、特に *Wnt* シグナリングの顔面形態を形成する標的遺伝子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Beads implantaion

Wnt シグナルを阻害するために *Wnt* レセプター Lrp5/6 への antagonist として、Dickkopf-1 (Dkk-1) を用いる。ニワトリ胚を Stage 20HH まで incubate したのち、卵殻に小窓を開け embryo を明示する。Dkk-1 (1mg/ml) を Beads (Affi-Gel-Blue beads (Bio-Rad)) に浸潤させておき、実体顕微鏡下で、embryo の上顎突起に埋入する。

(2) 顎顔面の形態評価

Embryo を Stage 38 まで発育させ、頭部を摘出する。100%エタノールで固定後 Alizarin red と Alcian Blue で染色し、水酸化カリウムで軟組織を clear 化し、実体顕微鏡で観察した。

(3) real-time RT-PCR による Beads 周囲組織の mRNA の定量

Beads 埋入 6 時間後の embryo から上顎突起を摘出し、セパゾールで安定化させた後、total RNA を抽出する。抽出した RNA をもとに template cDNA を作成、GAPDH を指標として real-Time RT-PCR を行った。

4. 細胞増殖活性と apoptosis

BrdU labeling reagent (Zymed, South San Francisco, CA) を Beads 埋入 6 時間後の embryo に投与。20 分後に embryo を取り出し、4%パラホルムアルデヒド固定、パラフィン標本を作成

する。Diaminobenzidine(DAB)による免疫組織染色を行い、上顎突起組織の切片上 1 領域内の BrdU の細胞内取り込みをカウントする。Apoptosis の指標とされる cleaved caspase-3 抗体 (1:500, rabbit polyclonal, Cell Signaling Technology)を用いて、免疫染色し、apoptosis の様相を観察比較する (Kawakami M, et al., 20014)。

4 . 研究成果

(1) Dkk-1 投与による顎顔面形態

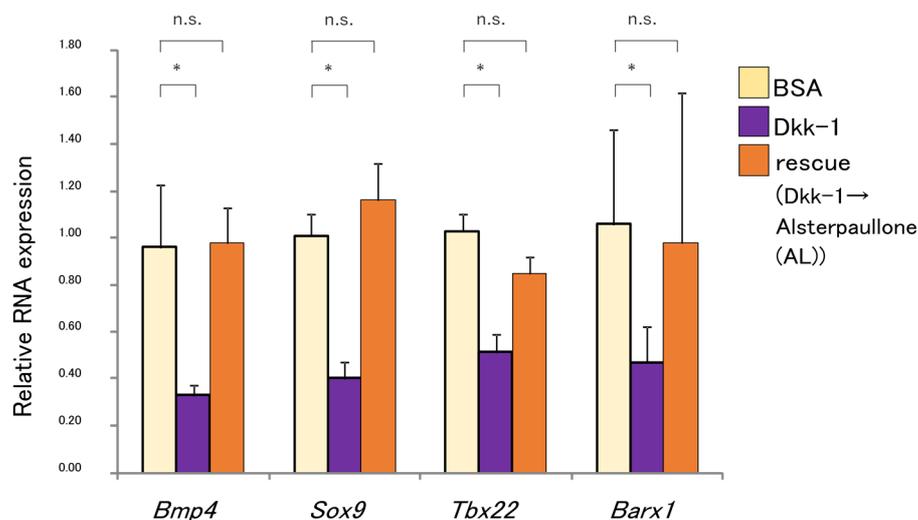
Dkk-1 を上顎突起に投与した embryo では投与 3 日目に上顎の一部欠損を認めた。さらに 8 日目では唇裂が認められた。Alizarin red と Alcian Blue 染色の骨格標本では上顎骨の欠損と形成不全が認められた。

(2) 顎顔面の形態形成に關与する遺伝子

Dkk-1 投与 6 時間後の上顎突起を real-time RT-PCR 分析すると上顎突起組織における *Bmp4*, *Sox9*, *Tbx22*, *Barx1* の発現量が有意な減少が認められた (図 1)。

Alsterpaullone (AL)は Wnt シグナル経路で GSK-3 を阻害して Wnt/ β -catenin シグナルを活性化する。そこで、Dkk-1 ピーズを埋入 3 時間後に AL を浸潤させたピーズを埋入することで rescue を行った。すると、Dkk-1 によって減少した *Bmp4*, *Sox9*, *Tbx22*, *Barx1* 遺伝子発現が回復し、BSA 投与群と有意差が認められなくなりました。

したがってこれらの遺伝子 (*Bmp4*, *Sox9*, *Tbx22*, *Barx1*) は、Wnt シグナルの下流にあり、Wnt シグナルによってコントロールされていることを確認した。



*:p < 0.05, n= 9

図 1

(3) 細胞増殖活性

Dkk-1 投与後の上顎突起の細胞増殖活性を BrdU を用いて調べた。Dkk-1 投与では、ピーズ周辺に BrdU 反応細胞は少なく、24 時間、48 時間後で BrdU 反応細胞がわずかに認められる程度で BSA と比較して、24 時間後と 48 時間後で有意に減少した (図 2)。したがって Dkk-1 を投与すると、上顎突起の細胞増殖が低下することが明らかとなった。

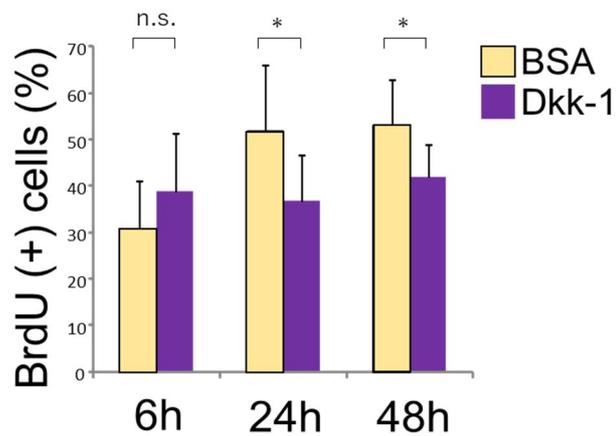


図 2

5 . ビーズ埋入後の上顎突起組織でのアポトーシス

Dkk-1 投与 6 時間後、24 時間後では、ビーズ周辺の細胞にカスパーゼ-3 の反応を認め、Dkk-1 によるアポトーシスと考えられた。48 時間後ではアポトーシスは認められなかった(図 3)。また、control の BSA を投与したのものにはアポトーシスは認められず、ビーズを埋入する器械的障害によってアポトーシスが起これないと考えられた。

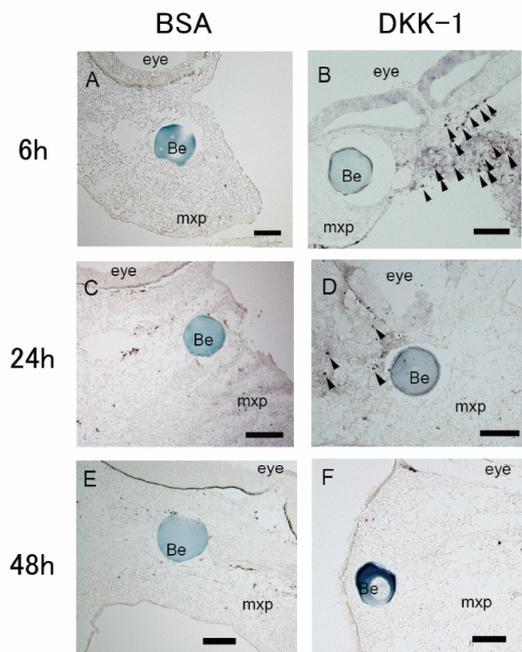


図 3

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- . Shimomura T, Kawakami M, Okuda H, Tatsumi K, Morita S, Nochioka K, Kirita T, Wanaka A. Retinoic acid regulates Lhx8 expression via FGF-8b to the upper jaw development of chick embryo. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 119(3): 260-266, 2015.
- . Shimomura T, Kawakami M, Tatsumi K, Tanaka T, Morita-Takemura S, Kirita T, Wanaka A. The role of the Wnt signaling pathway in upper jaw development of chick embryo. *Acta Histochemica et Cytochemica*. 52(1): 16-26, 2019.

〔学会発表〕(計 4 件)

- ・ 下村忠弘、川上正良、辰巳晃子、和中明生、桐田忠昭．上顎の形態発生は Wnt/ β -catenin シグナルによってコントロールされている．第 74 回日本矯正歯科学会大会 2015 年 11 月 18-20 日、福岡．
- ・ 下村忠弘、川上正良、辰巳晃子、和中明生、桐田忠昭．上顎の形態発生における Wnt/ β -catenin signaling の役割．第 75 回日本矯正歯科学会大会 2016 年 11 月 7-9 日、徳島
- ・ 下村忠弘、川上正良、辰巳晃子、和中明生、桐田忠昭．Wnt/ β -catenin signaling が顎顔面の形態発生に關与する．第 76 回日本矯正歯科学会大会 / 2017 年 10 月 18-20 日、札幌
- ・ 下村忠弘、川上正良、辰巳晃子、和中明生、桐田忠昭．Wnt/ β -catenin シグナルがコントロールする顎顔面の形態形成パターン 第 77 回日本矯正歯科学会大会 2018 年 10 月 30-11 月 1 日、横浜

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：和中明生

ローマ字氏名：Wanaka Akio

所属研究機関名：奈良県立医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁): 90210989

(2)研究協力者

研究協力者氏名：下村忠弘

ローマ字氏名：Shimomura Tadahiro

研究協力者氏名：J.M. Richman

ローマ字氏名：J.M. Richman

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。