

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11963

研究課題名(和文)メカノセンサーによるマウス口蓋形成制御

研究課題名(英文) Expression and localization of mechanosensitive ion channels in mouse palatal fusion

研究代表者

本田 裕子 (Honda, Yuko)

佐賀大学・医学部・教務職員

研究者番号：60295053

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)：口蓋裂は東洋人に多く、500出生に1人程度とされている。口腔と鼻腔との隔てが不十分なため、哺乳、構音、咀嚼などに関わる機能障害を伴い、治療も長期に渡り、その社会的・経済的な負担は大きい。ゆえに、口蓋裂の機構の解明は重要な課題である。私たちは、力学刺激を受容するメカノセンサーチャネルの遺伝子変異を伴うヒト口蓋裂の発生頻度が高いことに着目し、胎生マウスにおけるメカノセンサーチャネルの発現を検討した。口蓋癒合直前に口蓋突起の先端に数種類のメカノセンサーチャネルが発現し、癒合の進行に伴いその発現部位が変動し、癒合完了に伴い消失した。よって、メカノセンサーチャネルは口蓋癒合に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口蓋突起に発現するメカノセンサーチャネルは、口蓋癒合の前後で発現部位および発現強度が変化し、口蓋癒合に関わるという本研究成果は、口蓋裂という頻度の高い発生異常の新たな理解に繋がる可能性を秘めている。また、近年Piezoはチャネルタンパクの三次元立体構造が解かれた。イオンチャネルは、低分子化合物の開発が盛んで創薬の標的であることから、口蓋裂患者への新しい治療に繋がるのが期待できる。さらに、メカノセンサーチャネルが細胞間の接着に関与するという結果は、創傷治癒機構の理解への応用が可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cleft palate is one of the most frequent congenital anomalies, occurring in approximately 1 per 500 live births. The impacts of cleft palate on the individual and society are multifaceted. Recently, Piezo channel gene mutation has been reported to be associated with cleft palate. In this study, we investigated the expression pattern of mechanosensitive ion channels during palatal fusion. The expression of mechanosensitive ion channels were observed extensively at the tip of palatal shelves and diminished after palatal fusion. It is suggested that mechanosensitive ion channels play a part in the process of palatal fusion.

研究分野：組織学

キーワード：メカノセンサー イオンチャネル 口蓋裂

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口蓋裂は500出生に1人程度と言われる頻度の高い先天異常である。口蓋裂は、完全口蓋裂・口唇裂・歯槽裂・軟口蓋裂・二分垂裂など多様な裂形を示す。その中でも二次口蓋と言われる口蓋後方の癒合不全は、哺乳や嚥下、発音などへの影響が大きい。治療は、機能的な障害に加え、顔面の審美性を回復するために複雑で長期に及び、社会的・経済的負担は大きい。ゆえに、口蓋の癒合機構を解明し、将来の治療に資する基礎的理解を深めることが重要である。口蓋形成に関わる分子の理解は進んでいるが、未だ口蓋裂の機構が理解されたとは言えない。

顎顔面の発生は短期間にダイナミックで神秘的な変化を見せながら進む。口蓋形成は、左右の口蓋突起が下方に成長し、その後、水平方向へと屈曲・挙上し、正中へ伸長後、癒合を完了する。多くの研究者の貢献により、口蓋癒合を促進する転写因子や細胞外基質など、多様な分子の関わりについての知見は蓄積されている。その一方で、口蓋の癒合過程において、機械的な力が時間的・空間的に多様に作用していると考えられるが、そうした観点からの解明はなされていない。

力学刺激は細胞増殖や分化、形態形成など、細胞・生体の機能を制御する。2010年 Patapoutian らが細胞膜への直接的な圧入刺激および伸展刺激の大きさに応じてチャネル活性を示す陽イオンチャネル Piezo1 および Piezo2 を報告した(Coste et al., 2010)。さらに、Piezo2 のヒト遺伝子変異保有者は口蓋裂の発生頻度が高いとの報告がなされた(McMillin et al., 2014)。Piezo2 変異保有者では、骨格異常と共に口蓋後方の癒合不全が3割認められるという。そこで、私たちは口蓋の癒合前後におけるダイナミックな形態変化に、力学刺激により直接活性化されることが知られている陽イオンチャネル群としてメカノセンサーチャネル Piezo2 が関わると考えた。

2. 研究の目的

胎生マウス口蓋癒合前後におけるメカノセンサーチャネルの発現と細胞内外の時間的・空間的な構造学的変化を解析することで、口蓋癒合におけるメカノセンサーチャネルの役割を明らかにする。特に口蓋後方の癒合に着目することで、口蓋裂発生のメカニズムの理解に繋げる。Piezo2 の近縁のイオンチャネルである Piezo1、細胞膜伸展により活性化する Transient receptor potential-vanilloid 4 (TRPV4) に着目し、口蓋癒合における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験には C57BL/6 マウスを用いた。実験計画は佐賀大学動物実験委員会にて承認を受けて実施した。

(1) in situ hybridization による mRNA 発現解析

口蓋癒合前後である胎生 13.5-15.5 日齢のマウス口蓋組織について連続切片を作製し、Piezo1、Piezo2、TRPV4 の mRNA 発現局在を解析した。

(2) 免疫組織染色による解析

口蓋癒合前後の胎生 13.5-15.5 日齢マウスを 4%パラホルムアルデヒドにて固定後、凍結連続切片を作製し、免疫組織染色を行った。Piezo1、Piezo2、TRPV4 およびこれらメカノセンサーチャネルとの関連が考えられる分子の発現と局在について時間的・空間的発現を観察した。

4. 研究成果

口蓋癒合前後に当たるマウスの胎生 13.5-15.5 日齢で、メカノセンサーチャネルの mRNA は口蓋癒合の直前に口蓋突起先端の上皮細胞に強い発現を示し、癒合完了に伴い消失していた。

次に、特異的抗体を用いた免疫組織染色にて特異的な反応を得る条件検討を進め、よりよい条

件を確立した。胎生 14.5-15.0 日齢で口蓋突起が屈曲・挙上後、水平方向へ伸長するにつれてメカノセンサーチャネルの発現は強くなった。特に両側の口蓋突起が近づくと先端上皮の最表層細胞(Periderm 細胞)に強く発現し、癒合の進行に伴い発現部位が次の癒合直前部位へと移動し、癒合が完了すると消失する特徴的な発現を示した。また、これらメカノセンサーチャネルは細胞内での発現部位に違いが認められた。

さらに、超解像顕微鏡を用いて、細胞の伸展や移動に関わる分子であるアクチン線維との関連性についても解析した。左右の口蓋突起先端の Periderm 細胞同士が接触する直前になると、Periderm 細胞は手を繋ごうとするように細胞突起を対側に向けて伸ばしており、その突起の中には線維状アクチンとメカノセンサーチャネルとの共存が認められた。

これらの結果から、力学刺激の強さに応じて活性化するイオンチャネルであるメカノセンサーチャネルは、口蓋癒合において時期特異的かつ部位特異的に関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 本田裕子, 田原愛理, 大崎康吉, 曹愛琳, 高イキ, 西田寛汰, 内野加穂, 吉本怜子, 城戸瑞穂 |
| 2. 発表標題 口蓋癒合におけるメカノセンサーイオンチャネルの発現 |
| 3. 学会等名 第61歯科基礎医学会学術大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 高イキ, 曹愛琳, 吉本怜子, 合島怜央奈, 大崎康吉, 本田裕子, 内野加穂, 西田寛汰, 田原愛理, 城戸瑞穂 |
| 2. 発表標題 アレルギーモデルマウスの骨代謝調節とメカノセンサーチャネルの機能 |
| 3. 学会等名 第61歯科基礎医学会学術大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 西田寛汰, 高イキ, 曹愛琳, 田原愛理, 本田裕子, 内野加穂, 大崎康吉, 城戸瑞穂 |
| 2. 発表標題 骨発生におけるメカノセンサーチャネルの発現と機能 |
| 3. 学会等名 第61歯科基礎医学会学術大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 田原愛理, 高イキ, 曹愛琳, 大崎康吉, 本田裕子, 内野加穂, 西田寛汰, 城戸瑞穂 |
| 2. 発表標題 マウス大腿骨軟骨におけるTRPV4の発現 |
| 3. 学会等名 第61歯科基礎医学会学術大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 西田寛汰, 高イキ, 曹愛琳, 本田裕子, 西山めぐみ, 田原愛理, 内野加穂, 城戸瑞穂 |
| 2. 発表標題 骨形成における血管新生と機械刺激感受性陽イオンチャネルの発現 |
| 3. 学会等名 日本解剖学会第75回九州支部学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 田原愛理, 高イキ, 曹愛琳, 大崎康吉, 本田裕子, 西山めぐみ, 内野加穂, 西田寛汰, 城戸瑞穂 |
| 2. 発表標題 マウス大腿骨におけるメカノセンサーの炎症による発現調節 |
| 3. 学会等名 日本解剖学会第75回九州支部学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 本田裕子, 曹愛琳, 吉本怜子, 西山めぐみ, 高イキ, 内野加穂, 西田寛汰, 田原愛理, 村田祐造, 城戸瑞穂 |
| 2. 発表標題 マウス口蓋形成におけるメカノセンサーチャンネル発現 |
| 3. 学会等名 日本解剖学会第74回九州支部学術集会 |
| 4. 発表年 2018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 |
|-----------|--|--------------------------------|----|
| 研究 分担者 | 城戸 瑞穂 (Kido Mizuho) (60253457) | 佐賀大学・医学部・教授 (17201) | |