

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09477

研究課題名(和文) 成長期における頭蓋顎顔面骨に及ぼすレチノイン酸の役割の解析

研究課題名(英文) Role of retinoic acid on cranio-maxillofacial bone during growth period

研究代表者

峯岸 芳樹 (Minegishi, Yoshiki)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・助教

研究者番号：10467566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：レチノイン酸は多数の遺伝子発現の促進や抑制を制御する重要な鍵となっている因子である。その分解酵素であるCyp26b1がレチノイン酸の濃度を調整することで、組織の発生、パターンニング、細胞の増殖・分化などに深く関与している。これまで胚発生におけるレチノイン酸の役割は広く研究されてきた。今回の研究では11型コラーゲン発現部位でCyp26b1が欠失し、レチノイン酸濃度が上昇しているCyp26b1<sup>-/-</sup>chonマウスを用いることにより、成長期の頭蓋顎顔面骨においてレチノイン酸が、その成長に重要な役割を果たしていることを明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レチノイン酸は催奇形因子として知られており、そのような観点から母体の過剰摂取には注意を払わなければならない。また乾癬などの疾患においてビタミンA製剤が使用されるが、副作用として長管骨骨端の早期閉鎖は知られていた。

今回の研究において頭蓋顎顔面骨においてもレチノイン酸過剰状態が成長障害を及ぼすことが明らかとなり、頭部発達の面からも成長期においてはビタミンA製剤の投与には慎重さが求められることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Retinoic acid is a key regulator of the promotion or repression of numerous gene expressions. Cyp26b1, RA degrading enzyme, regulates the concentration of retinoic acid and is deeply involved in tissue development, patterning, and cell proliferation and differentiation. The role of retinoic acid in embryonic development has been widely studied.

In this study, by using Cyp26b1<sup>-/-</sup>chon mice, in which Cyp26b1 is deleted at the type 11 collagen expression site and retinoic acid concentration is increased, we were able to clarify that retinoic acid plays an important role in the growth of craniofacial bones during the growth period.

研究分野：軟骨分化

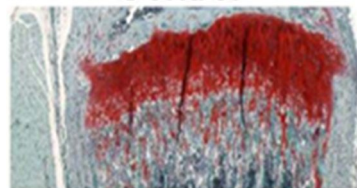
キーワード：頭蓋顎顔面 レチノイン酸

### 1. 研究開始当初の背景

ビタミン A の活性型代謝酵素であるレチノイン酸 (RA) はシグナル伝達分子として重要な役割を有しており、多数の遺伝子発現の促進や抑制を制御する重要な鍵となっている因子である。組織の発生、パターンニング、細胞の増殖・分化などに深く関与している。RA の各臓器への影響を解析するにはマウスへの RA の経口投与による実験やレチノイン酸の分解酵素である Cyp26b1 遺伝子が欠失した KO マウスを用いた実験が行われる。しかしながら RA の経口投与では全身的な影響がでるため他臓器からの内分泌系を介した影響等を除外できない。また RA は催奇形性をもつことが知られており Cyp26b1 KO マウスは RA 過剰により口蓋裂をはじめ短肢症、無脳症、眼瞼癒合不全を生じるため出生後死に至ってしまい、成長期における頭蓋顎顔面骨形成に及ぼす RA の影響の検討は困難であった。

この問題に対して我々は部位特異的な遺伝子ノックアウトの手段として Cre/loxP 組み換え系を利用し、増殖軟骨細胞特異的に Cre リコンビナーゼを産生するマウス (Col11a2-Cre マウス) と Cyp26b1 flox マウスを交配することで増殖軟骨細胞でのみ Cyp26b1 遺伝子を欠失した cKO マウス (Cyp26b1<sup>chon</sup> マウス) を作製し、RA 過剰が四肢長幹骨で成長板の早期閉鎖を引き起こすことを明らかにした (図 1)。この Cyp26b1<sup>chon</sup> マウスは頭蓋顎顔面骨においては口蓋裂を生じなかったが、明らかな成長障害による顔貌の変形を生じていた (図 2)。

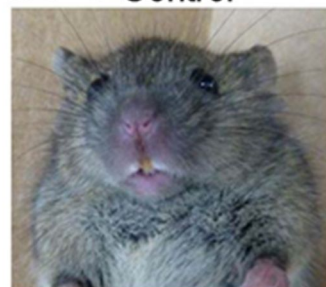
【図 1】 Control



Cyp26b1<sup>Δchon</sup>



【図 2】 Control



Cyp26b1<sup>Δchon</sup>



胎生期においては RA がパターンニングを精密に規定しており、RA 過剰によって口蓋裂が生じると同様に、成長期においても RA が頭蓋顎顔面骨の成長に重要な役割を担っていると考え、本研究では動物モデルを用いてそのメカニズムについての解析を行う。

### 2. 研究の目的

本研究では増殖軟骨である 11 型コラーゲン特異的に Cyp26b1 を欠失した conditional KO (cKO) マウス (Cyp26b1<sup>chon</sup> マウス) を用いて、in vivo での実験として頭蓋顎顔面領域における解析を行う。

#### (1) 頭蓋顎顔面における 11 型コラーゲンの発現部位の解析

内軟骨性骨化がおきる四肢長幹骨において 11 型コラーゲンは関節軟骨および成長板軟骨に発現していることが分かっている。頭蓋顎顔面領域においては頭蓋底の一部を除いて膜性骨化により骨形成しており、骨形成方法は四肢長幹骨と異なっている。Cre リコンビナーゼを発現する 11 型コラーゲンがどの領域で産生されているのかを Col11a2-LacZ マウスを用いて解析する。

#### (2) RA 過剰が頭蓋顎顔面骨成長に及ぼす影響の解析

Cyp26b1<sup>chon</sup> マウスの頭蓋顎顔面領域において Xp および  $\mu$ CT を用いて形態的に計測し、野生型と比較して低成長となった部位との比較検討を行い、どのような気質的变化が原因で頭蓋顎顔面骨の成長障害が起きているのかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス頭蓋骨における 11 型コラーゲン発現部位の解析

頭蓋骨領域における 11 型コラーゲン発現部位を明らかにするため、11 型コラーゲン発現部位に LacZ レポーターを発現する Col11a2-LacZ マウスに対して Xgal 染色を行ない解析した。

#### (2) Cyp26b1<sup>chon</sup> マウスの表現型解析

野生型と Cyp26b1<sup>chon</sup> マウスに対して生後 3 週齢における頭蓋顎顔面骨側面 Xp および生後 6 か月における頭蓋顎顔面骨  $\mu$ CT 撮影を行い解析した。

#### 4. 研究成果

(1) Col11a2-LacZ マウスに対して Xgal 染色を行ったところ、膜性骨化を起こす頭蓋顎顔面骨では全体的に青色に染色されており、11 型コラーゲンは頭蓋顎顔面骨において万遍なく発現していることが判明した(図3)。これにより、本研究に使用する Cyp26b1<sup>chon</sup> マウスでは頭蓋顎顔面骨の広範囲にわたり Cyp26b1 欠失に伴う組織高 RA 状態となっていることが明らかとなった。

【図3】

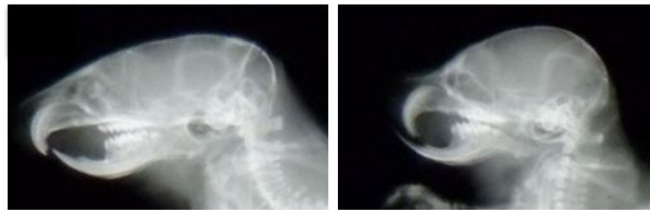


(2) 野生型と Cyp26b1<sup>chon</sup> マウスに対して Xp および  $\mu$ CT を用いて頭蓋顎顔面骨の形態を比較検討した。

生後 3 週齢における頭蓋顎顔面骨側面 Xp では Cyp26b1<sup>chon</sup> マウスは野生型と比較して頭蓋が前後方向に短縮しており、それに伴い丸みを帯びていた(図4)。下顎の成長に大きな低成長はなく、頭蓋から上顎にかけての低成長が顔貌変形の原因となっていた。

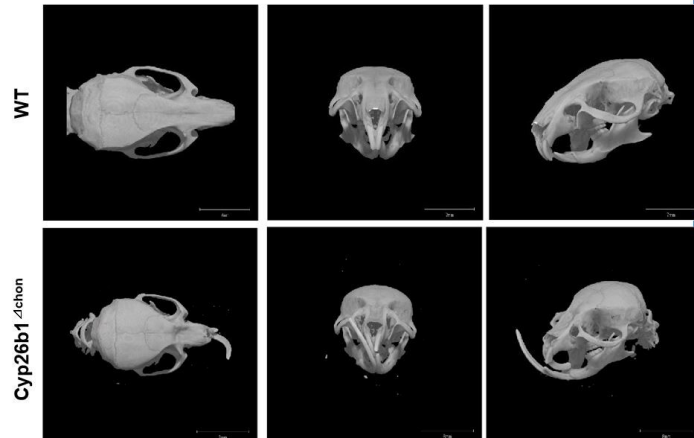
【図4】 Cyp26b1<sup>Δchon</sup>

WT



生後 6 か月における頭蓋顎顔面骨  $\mu$ CT では、縦径および横径には大きな相違は認めないものの、やはり前後径は著明に Cyp26b1<sup>chon</sup> マウスで短縮を認めた(図5)。上顎骨の短縮とくらべて、下顎骨の成長障害はかなり軽度であった。その結果上下牙の咬み合わせが悪く、反対咬合となり、牙が擦り減らないため、下牙の伸長を認めた。

【図5】



マウスの成長期における増殖軟骨細胞の RA 過剰は頭蓋顔面顎領域全域の成長影響を及ぼすが、特に中顔面領域において成長を抑制する影響が大きいことがわかった。

#### <引用文献>

1) Y. Minegishi et al. Cyp26b1 within the growth plate regulates bone growth in juvenile mice. Biochemical and Biophysical Research Communications. 454, 12-18, 2014

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 峯岸芳樹 浦邊亮太郎 宮前誠 中井國博
2. 発表標題 成長期において頭蓋顎顔面骨発達にレチノイン酸が及ぼす役割
3. 学会等名 第28回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019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	中井 國博  (Nakai Kunihiro)  (80362705)	福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・准教授   (13401)	
研究分担者	富田 興一  (Tomita Koichi)  (90423178)	大阪大学・医学系研究科・准教授   (14401)	
研究分担者	金澤 成行  (Kanazawa Shigeyuki)  (50506243)	北里大学・医学部・特別研修生   (32607)	

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
---------	---------