

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09841

研究課題名(和文)顎顔面の形態発生を制御する新規シグナル伝達機構

研究課題名(英文)A novel signaling regulates patterning and growth in the face.

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは、これまで顎顔面の形成過程を司る分子シグナル機構を調べてきた。顔面突起の癒合時epithelial-mesenchyme transition(EMT)が行われる。唇顎裂発症においてはEMTが作用していないのではとの仮説を立て、EMTに作用する遺伝子シグナル作用について調べた。Dkk-1を用いてWNTシグナルを阻害するとEMTに作用する遺伝子の発現が減少し、唇顎裂を生じることが明らかとなった。したがってWNTシグナルを阻害するとEMTが阻害された結果顔面突起が癒合せず、口唇裂を発症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

われわれは、これまで顎顔面の形成過程を司る分子シグナル機構を調べてきた。顔面の形成は胎生期、顔面突起が前下方に成長し、上顎突起と前頭鼻突起が癒合し(EMT)上口唇が形成される。唇顎裂発症においてはEMTが作用していないのではとの仮説を立て、今年度はEMTに作用する遺伝子シグナル作用について調べた。Dkk-1を用いてWNTシグナルを阻害するとEMTに作用する遺伝子の発現が減少し、唇顎裂を生じることが明らかとなった。したがって、すなわち口唇裂発症の原因はWNTシグナルをはじめとする顎顔面の形成過程を司る分子シグナル伝達がよく行われていなかったことが考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cleft lip with or without cleft palate (CLP) usually results from a failure of the medial nasal

prominences to fuse with the lateral and maxillary prominences. This failure inhibits facial morphogenesis regulated by several major morphogenetic signaling pathways. We hypothesized that CLP results from the failure of the Wnt signaling pathway. We applied beads soaked with Dickkopf-1 (Dkk-1), Alsterpaullone (AL) or Wnt3a to the right side of the maxillary prominence of the chick embryo. The embryo showed a defect of the maxilla on the treated side, and skeletal staining revealed hypoplasia of the premaxilla and palatine bone as a result of Dkk-1-soaked bead implantation. 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. Wnt signaling might regulate N-cadherin expression via Msx1, resulting in cell aggregation for osteochondrogenesis.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：発生・分化 細胞・遺伝子 シグナル伝達

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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限局して発現し、上皮性の因子であるFgf-8 やTgf- $\beta$  3 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、 $\beta$ -カテニンのリン酸化と分解を抑制する。その結果、 $\beta$ -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伝達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 20 まで発育させたのち、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の上顎突起に埋入した。

#### (2) 顎顔面の形態評価

Embryo をStage38 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。

#### (3) 細胞増殖活性とapoptosis

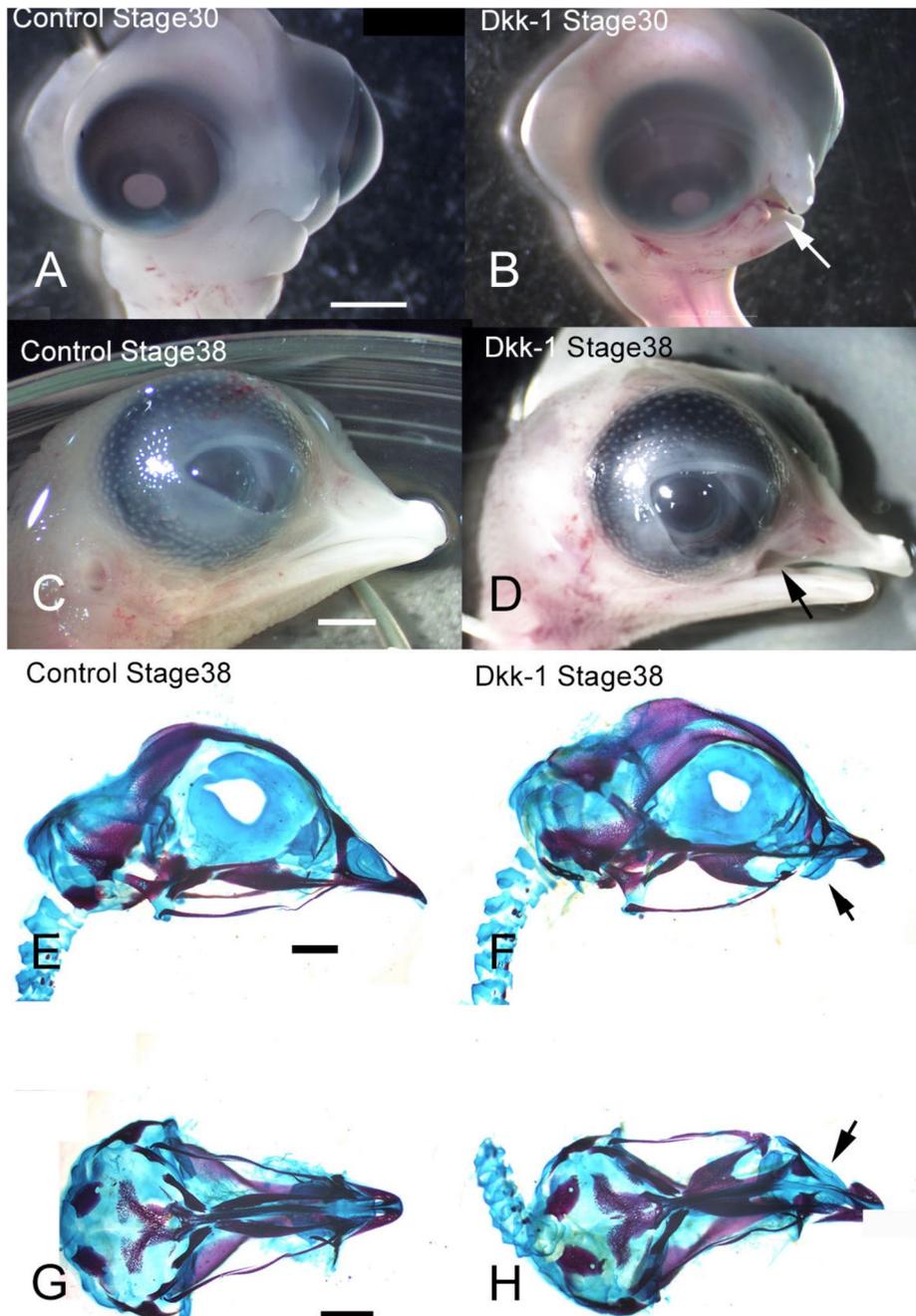
BrdU labeling reagentをBeads 埋入6 時間後のembryoに投与。20 分後にembryo を取り出し、4%パラホルムアルデヒド固定、パラフィン標本を作成する。Diaminobenzidine(DAB)による免疫組織染色を行い、上顎突起組織の切片上1 領域内のBrdU の細胞内取り込みをカウントする。Apoptosis の指標とさ

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

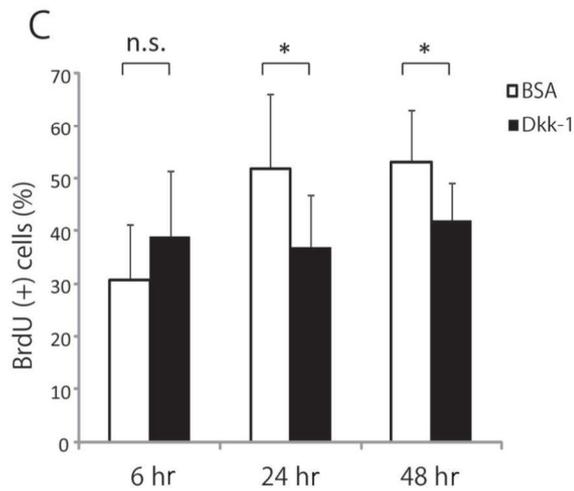
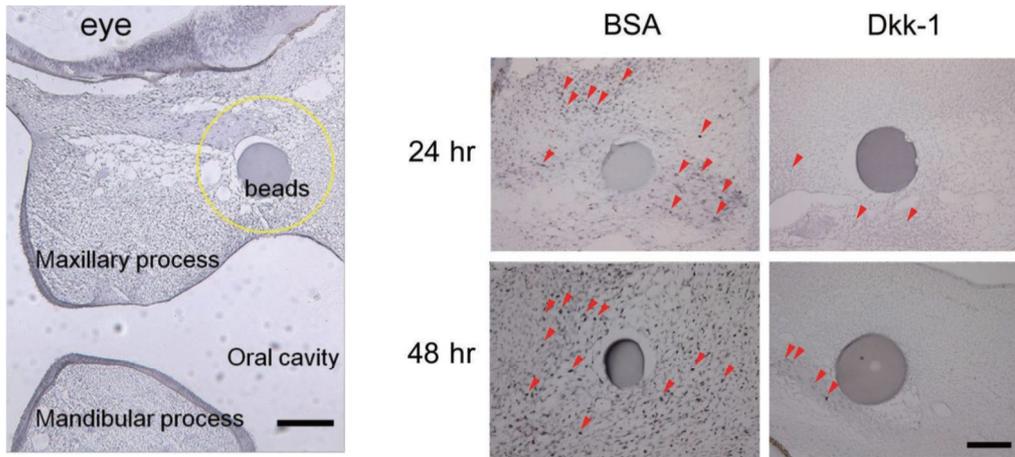
##### (1) Dkk-1 投与による顎顔面形態

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



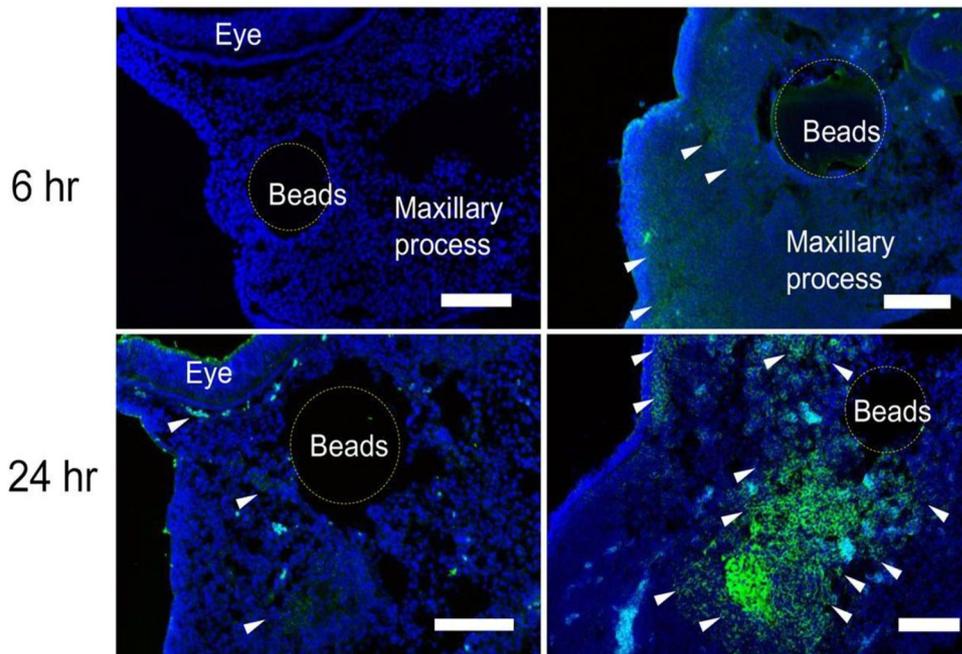
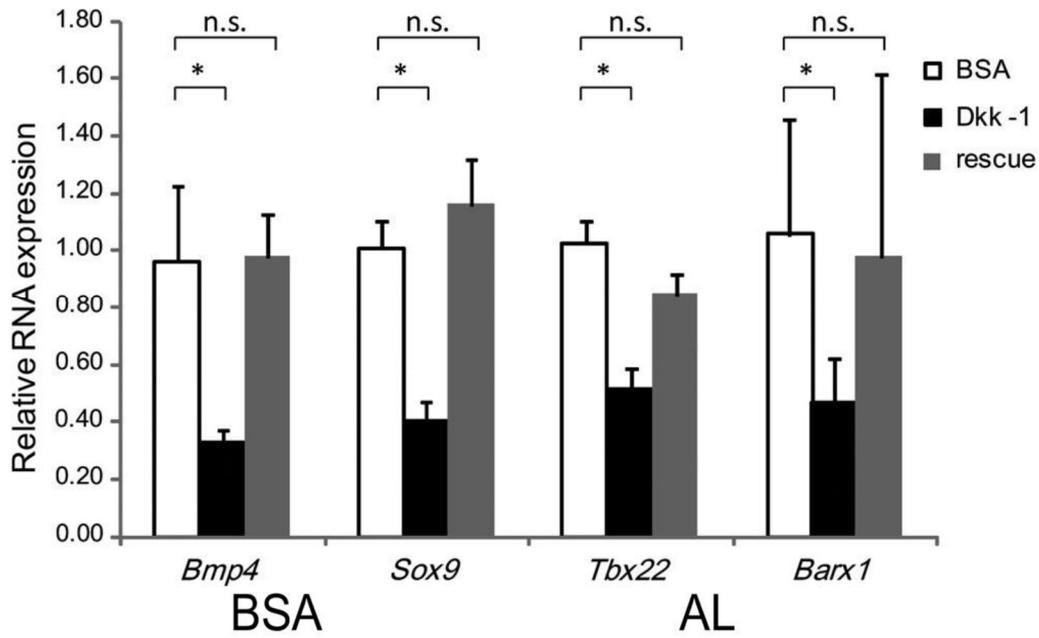
##### (2) 細胞増殖活性

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、埋入した beads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。



(3) real-time RT-PCRによるmRNAの定量

DKK1 Beads 埋入 6 時間後の embryo から上顎突起を摘出し、realtime RT-PCR を行って上顎突起中の各遺伝子の発現を調べた。その結果、DKK1 で Wnt シグナルを阻害すると Bmp4, Sox9, Tbx22, Barx1 遺伝子の発現が減少した。Alsterpaullone を用いて rescue するとこれらの遺伝子発現が回復したことから Bmp4, Sox9, Tbx22, Barx1 は Wnt シグナルの標的遺伝子であることが確かめられた。また Alsterpaullone を投与すると投与した局所で軟骨形成に必要な細胞凝集に作用する N-cadherin の発現上昇がみられた。



以上の結果、顎顔面の形成は Wnt シグナルが制御しており、Wnt シグナルを阻害すると顔面形成が阻害されることから、顎顔面の形成異常の原因は Wnt シグナルの障害によることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shimomura T, Kawakami M, Tatsumi K, Tanaka T, Morita-Takemura S, Kirita, T, Wanaka, A	4. 巻 52
2. 論文標題 The role of the Wnt signaling pathway in upper jaw development of chick embryo.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 19-26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1267/ahc.18038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimomura T, Kawakami M, Tatsumi K, Tanaka T, Morita-Takemura S, Kirita T, Wanaka A	4. 巻 52
2. 論文標題 The role of the Wnt signaling pathway in upper jaw development of chick embryo.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Histochemica et Cytochemica	6. 最初と最後の頁 19-26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1267/ahc.18038	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 -

1. 著者名 Kawakami M, Shimomura T, Kirita T	4. 巻 6
2. 論文標題 Orthodontic management of patient with Marfan syndrome - case report and review of the literature.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Dentistry and Oral Science	6. 最初と最後の頁 676-680
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kawakami M, Shimomura T, Tatsumi K, Tanaka T, Morita-Takemura S, Wanaka A, Kirita T
2. 発表標題 Wnt Signaling Pathway Controls Epithelial-Mechythmal Transition in Upper Jaw development of Chick Embryo
3. 学会等名 The 9th International Orthodontic Congress（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shimomura T, Kawakami M, Tatsumi K, Tanaka T, Morita-Takemura S, Wanaka A, Kirita T.
2. 発表標題 Wnt signaling Pathway Targete Developmental Control Genes During craniofacial Morphogenesis.
3. 学会等名 97th IADR General session & Exhibition, Vancouver BC, Canada (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下村忠弘, 川上正良, 辰巳晃子, 和中明生, 桐田忠昭
2. 発表標題 顎顔面の形態発生時の上皮間葉移行に与えるWntシグナルの関与
3. 学会等名 第78回 日本矯正歯科学会学術大会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下村忠弘, 川上正良, 辰巳晃子, 和中明生, 桐田忠昭
2. 発表標題 Wnt/b-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
3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimomura T, Kawakami M, Tatsumi K, Tanaka T, Morita-Takemura S, Wanaka A, Kirita T.
2. 発表標題 Wnt Signaling Pathway Targets Developmental Control Genes During Craniofacial Morphogenesis.
3. 学会等名 97th IADR General Session & Exhibition, Vancouver BC, CANADA (国際学会)
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	和中 明生  (Wanaka Akio)  (90210989)	奈良県立医科大学・医学部・教授   (24601)	
研究分担者	下村 忠弘  (Shimomura Tadahiro)  (90645607)	奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員   (24601)	

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		
カナダ	Life Sciences institute	The University of British Columbia	
韓国	College of Dentistry, Yonsei University	Oral Science Research Centre	