

令和 3 年 4 月 27 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09849

研究課題名(和文) 口蓋発生における細胞外環境因子としてのECMによるシグナル制御

研究課題名(英文) Roles of extra-cellular matrix proteins as environmental factors in signaling regulation of palatal development

研究代表者

岡 暁子 (OKA, KYOKO)

福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授

研究者番号：60452778

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)：本研究で注目したTenascin Cは、胎児マウスの組織を用いた免疫組織染色により口蓋後方部の間葉組織に強く発現し、軟口蓋形成に重要な細胞外マトリックス蛋白であることがわかった。さらに、様々な成長因子と呼ばれる分泌タンパクに関連する遺伝子改変マウスを用いてTenascin Cの発現を確認したところ、口蓋の上皮組織に発現するTGF- β レセプターやSonic Hedgehogの遺伝子改変マウスで著しく発現抑制が起きていることを明らかにした。つまり、軟口蓋形成に重要なTenascin Cの発現を促進する重要な因子としてのTGF- β とSonic Hedgehogの役割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

口蓋は胎児期に左右から成長する口蓋突起が正中で癒合することで形成されるが、このプロセスが障害されると口蓋裂という顔面奇形を生じる。治療は主に外科的な閉鎖だが、軟口蓋領域は組織量が十分でない理想的な閉鎖は難しい。そこで、閉鎖術の前に十分な組織量を得るための再生医療学的手法の開発が望まれている。本研究は、軟口蓋形成を誘導するための担体を構成する細胞外基質蛋白候補としてTenascin Cを示すことができ、さらにTenascin Cの分泌を促進する因子として、TGF- β やSonic Hedgehogといった分泌蛋白の役割を示すことができたことは、今後の口蓋裂治療においても意義のあるものといえる。

研究成果の概要(英文)：The extracellular matrix protein Tenascin C, which we focused on in this project, was particularly important for the soft palate development. We confirmed their expression in the posterior part of palatal shelves by immunohistochemical staining using mice embryos. We found that this Tenascin C expression was dramatically inhibited in TGF- β receptors and Sonic Hedgehog mutant mice, which are expressed in palatal epithelium. In conclusion, we clarified the roles of TGF- β and Sonic Hedgehog as factors that promote the expression of Tenascin C, which is important for soft palate formation.

研究分野：顔面発生学 小児歯科学

キーワード：TGF- β シグナル 軟口蓋形成 Tenascin C Sonic Hedgehog 線維芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞 細胞間に存在する細胞外マトリックスは、組織・器官の骨格的役割を果たし、細胞接着の足場となる。その機能は、組織を新しく形成する発生期において、あるいは組織を修復する創傷治癒過程において特に発揮される。口蓋形成時、左右の口蓋突起は、成長方向を垂直から水平へドラスチックに変化させる。この口蓋突起の形態変化は、細胞外マトリックス発現の変化によってもたらされる。また、この口蓋突起の形態変化のタイミングや形は、口蓋の前後 (Anterior-Posterior) で異なることから、口蓋突起に発現している細胞外マトリックスは、口蓋の前後軸でそれぞれに特徴を持っていると想像できる。

にもかかわらず、軟口蓋の発生はこれまでに着目されてきた研究が少なく、口蓋筋群の発生のベースとなる口蓋突起後方の口蓋間葉組織の細胞外マトリックス発現の特徴については、不明な点が多かった。

2. 研究の目的

軟口蓋発生に重要な細胞外マトリックスを同定し、その発現パターンを明らかにすることに加え、口蓋間葉細胞から細胞外マトリックスの分泌を促進する因子を明らかとすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

口蓋前後での Tenascin C、Tenascin X、Tenascin W の遺伝子発現の比較解析

胎生 13.5, 14.5, 15.5 日齢のマウスの口蓋突起を採取し前方と後方に分け、mRNA を単離し、その後 Real-time PCR にてそれぞれの発現量を定量し比較検討した。

Tenascin C の組織学的発現パターン解析

胎生 13.5-15.5 日齢のマウスの頭部を採取後、冠状断で組織切片を作成し、1 次抗体として Rat anti-TNC monoclonal antibody (R&D Systems)、2 次抗体として Biotin-conjugated goat anti-rat IgG H&L (Abcam) を用い、Tenascin C 蛋白の発現パターンを解析した。

TGF- β II 型受容体のコンディショナルマウス、SHH コンパウンドヘテロマウスにおける Tenascin C の発現解析

口蓋間葉組織または口蓋上皮組織でコンディショナルに TGF- β シグナルをノックアウトするために作成された *Wnt1-cre;Tgfb2^{fl/fl}*、*K14-cre;Tgfb2^{fl/fl}* マウス、軟口蓋領域で時間空間的に Sonic Hedgehog シグナルを抑制した *Shh^{+/-}; MFCS4^{+/-}* マウスを用いて、口蓋発生時の Tenascin C 蛋白の発現パターンを解析した。

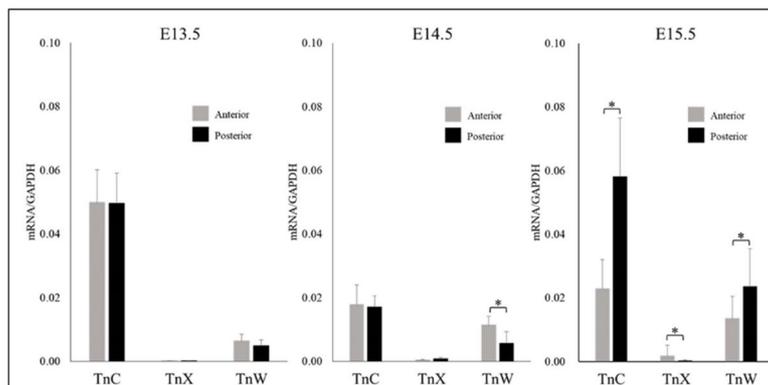
口蓋間葉細胞(MEPM 細胞)、頭蓋神経堤細胞株における TGF- β および Sonic Hedgehog 刺激による TNC の発現変化

胎生 13.5-14.0 日齢マウス口蓋間葉組織から、Primary 口蓋間葉細胞 (MEPM 細胞) を採取し培養を行い、培養液に TGF- β 3; 50ng/ml, Sonic Hedgehog; 100ng/ml を添加し 24、48 時間作用させ、Real-time PCR、ELISA 法を用いて、Tenascin C の発現変化を解析した。さらに、マウス頭蓋神経堤細胞株を用いて同様の解析を行った。マウス頭蓋神経堤細胞株については、骨芽細胞分化マーカー、線維芽細胞分化マーカーの発現比較を施行した。

4. 研究成果

口蓋前後での Tenascin C、Tenascin X、Tenascin W の遺伝子発現の比較解析

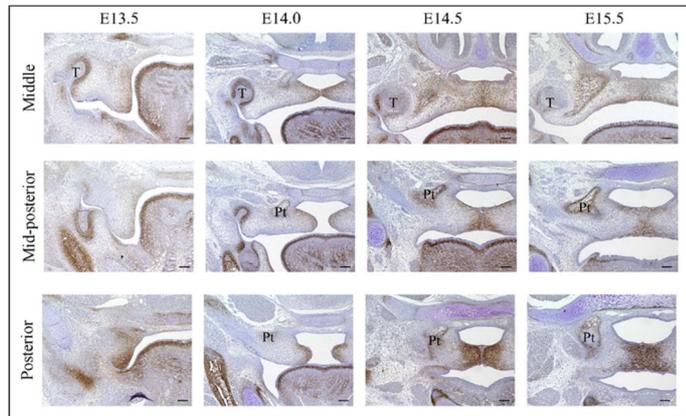
棒グラフ (右図) は、縦軸は各遺伝子の発現量で、グレーが前方、黒が後方を表している。Tenascin C は、Tenascin family の中で常に最も高く発現していることが分かった。興味深いことは、胎生 15.5 日齢では口蓋の前方に比べ後方、つまり軟口蓋で明らかに高か



ったことである。つまり、Tenascin C は軟口蓋形成を特徴づける細胞外マトリックス蛋白であることが示唆された。

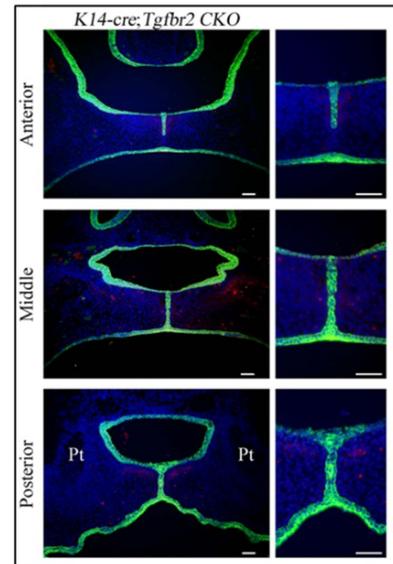
Tenascin C の組織学的発現パターン解析

硬口蓋領域である中央（右図、上段）では、歯原性間葉組織や骨形成領域に Tenascin C の発現が見られた。しかし、さらに後方の領域（右図、中段）では発現が減少し、正中部の口蓋突起の上皮組織直下の間葉組織に発現するのみであった。最も後方の軟口蓋形成領域（右図、下段）では、Tenascin C は口蓋突起間葉に広く発現し、特に胎生 14.5 日齢と 15.5 日齢では口蓋突起間葉全体に強く染色がみられた。つまり、Real time PCR を用いた定量的解析に加え、組織学的な解析においても Tenascin C は、軟口蓋形成に重要な蛋白であることを示すことができた。



TGF- β II 型受容体のコンディショナルマウス、SHH コンパウンドヘテロマウスにおける Tenascin C の発現解析

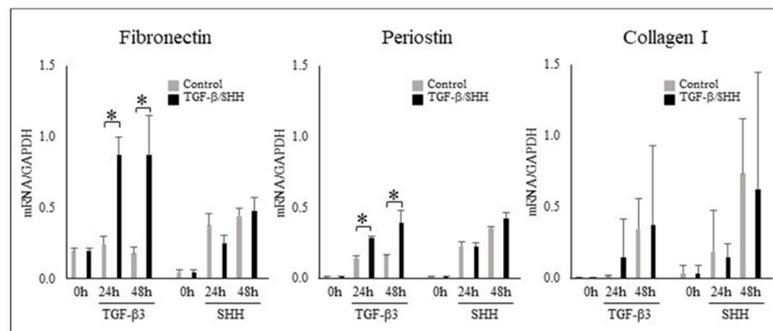
口蓋間葉特異的に TGF- β レセプター をノックアウトマウス *Wnt1-cre;Tgfb2^{fl/fl}* は口蓋裂を示すが、我々の予測と反して Tenascin C の発現は抑制されていなかった。しかし、口蓋上皮特異的に TGF- β レセプター をノックアウトした *K14-cre;Tgfb2^{fl/fl}* マウスでは、胎生 15.5 日齢においても口蓋形成中の口蓋間葉に Tenascin C の発現が確認できなかった（右図：赤）。また、このマウスは口蓋突起が正中で接触したあとも上皮の消失が起こらず（右図・緑）軟口蓋領域の粘膜下口蓋裂を起こしており、Tenascin C 発現抑制が何らかの影響を与えている可能性が示唆された。



胎生 13.5 日齢と 15.5 日齢の *Shh^{+/-};MFCS4^{+/-}* マウスは、口蓋裂は示さないが、軟口蓋の前後径が短いという特徴を持っている。この *Shh^{+/-};MFCS4^{+/-}* マウスにおいても、口蓋後方部における Tenascin C 発現は強く抑制されていた。つまり、口蓋発生時、口蓋後方での口蓋間葉組織に特徴的に発現する Tenascin C は、口蓋上皮の TGF- β シグナルや Sonic Hedgehog シグナルの調整を受け、軟口蓋領域の癒合や軟口蓋の前後的成長に関与している可能性が考えられた。

口蓋間葉細胞(MEPM 細胞)、頭蓋神経堤細胞株における TGF- β および Sonic Hedgehog 刺激による TNC の発現変化

上記に示した結果から、TGF- β や Sonic Hedgehog が Tenascin C の発現を介して、口蓋間葉細胞にどのような影響を与えているのかについて、細胞培養による解析が必要と考えた。まず、マウスの口蓋間葉組織から採取したプライマリー細胞である MEPM 細胞では、TGF- β 3 刺激でも、Sonic Hedgehog 刺激においても Tenascin C の発現が促進されるのに対し、頭蓋神経堤細胞株を用いた解析では、TGF- β 3 では MEPM 細胞と同様 Tenascin C の発現促進がみられたのに対し、Sonic Hedgehog 刺激では発現の促進が観察されなかった。そこで、Tenascin C の発現だけでなく、線維芽細胞分化マーカーとして Fibronectin, Periostin, Collagen I、骨芽細胞マーカーとして Runx2,



Osterix, ALP の発現を調べたところ、TGF- β 刺激は、頭蓋神経堤細胞において線維芽細胞マーカーの発現を促進し(上図、棒グラフ)、骨芽細胞マーカーの発現を抑制したのに対し、Sonic Hedgehog 刺激ではどちらにも変化がみられなかった。

以上の研究成果によって、口蓋発生初期の未分化な口蓋間葉細胞である頭蓋神経堤由来細胞は、TGF- β シグナルの作用により線維芽細胞への分化が促進され、さらに口蓋発生がすすみ口蓋形成後期になると口蓋上皮に発現する Sonic Hedgehog との相乗効果で口蓋間葉線維芽細胞が強力に Tenascin C の発現を誘導し軟口蓋を形成するメカニズムが存在していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shirabe Ohki, Kyoko Oka, Kayoko Ogata, Shigeru Okuhara, Mihoko Rikitake, Masako Toda-Nakamura, Shougo Tamura, Masao Ozaki, Sachiko Iseki, Takayoshi Sakai	4. 巻 0
2. 論文標題 Transforming growth factor-beta and sonic hedgehog signaling in palatal epithelium regulate tenascin-C expression in palatal mesenchyme during soft palate development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2020.00532	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 Gang L., Oka K.*, Ohki S., Rikitake M., Itaya S., Tamura S., Toda-Nakamura M., Ogata K., Kira-Tatsuoka M., Ozaki M.	4. 巻 34
2. 論文標題 CO2 laser therapy accelerates the healing of ulcers in the oral mucosa by inducing the expressions of heat shock protein-70 and tenascin C.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Histology and Histopathology.	6. 最初と最後の頁 175-189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14670/HH-18-037	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 Nakamura Masako Toda, Oka Kyoko, Harada Hana, Ogata Kayoko, Matsuo Satoru, Rikitake Mihoko, Ohki Shirabe, Kumagai Tetsuya, Kato Yoko, Baba Atsuko, Ozaki Masao	4. 巻 30
2. 論文標題 Ectopic junctional epithelium adhered to the buccal crown surface of an upper central incisor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Dental Journal	6. 最初と最後の頁 51～55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pdj.2019.11.002	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 Rikitake Mihoko, Fujikane Ryosuke, Obayashi Yuko, Oka Kyoko, Ozaki Masao, Hidaka Masumi	4. 巻 25
2. 論文標題 MLH1 mediated recruitment of FAN1 to chromatin for the induction of apoptosis triggered by O6 methylguanine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 175～186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12748	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 Matsuo Satoru, Toda-Nakamura Masako, Oka Kyoko, Kajiya Hiroshi, Ogata Kayoko, Ishii Hanako, Ozaki Masao, Ohno Jun	4. 巻 29
2. 論文標題 Cyclophosphamide Promotes Arrested Development of the Dental Root in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 63 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2485/jhtb.29.63	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Shirabe Ohki, Kyoko Oka, Kayoko Ogata, Masako Nakamura, Shigeru Okuhara, Masao Ozaki, Toshihiko Shiroishi, Sachiko Iseki and Takayoshi Sakai
2. 発表標題 TGF- and Shh in the palatal epithelium induce Tenascin C expression in the palatal mesenchyme
3. 学会等名 第60回 歯科基礎医学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayoshi Sakai, Shirabe Ohki, Kayoko Ogata, Yang Chai and Kyoko Oka*
2. 発表標題 Epithelial TGF- signaling regulates characterized extracellular matrix expression in soft palate development
3. 学会等名 American Association Cleft Palate-Craniofacial Association 76th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kyoko Oka, Kayoko Ogata, Hidemitsu Harada
2. 発表標題 Enamel hypoplasia: Consideration of ameloblast function during the maturation stage in clinical and basic research
3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会学術大会 アップデートシンポジウム
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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