

令和 6 年 9 月 5 日現在

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08291

研究課題名（和文）上皮の癒合破綻によって発症する二分脊椎や口蓋裂などに共通する病因の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the common etiology of spina bifida and cleft palate caused by epithelial fusion defects.

研究代表者

持田 京子（Mochida, Kyoko）

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター（研究所）・病因病態部門・流動研究員

研究者番号：00834417

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）：表皮の形成不全（表皮細胞への分化異常や、細胞動態の異常など）によって発症する顕在性二分脊椎モデルマウスにおいて、同様な上皮癒合不全によって発症すると考えられる口唇口蓋裂を高頻度に発症するのか検討を行った。結果、顕在性二分脊椎発症モデルとして有名なGrhl3遺伝子ホモ欠損胎児では二次口蓋裂のみ発症し、b-catenin遺伝子を表皮でのみ欠損させたコンディショナルノックアウトマウスでは、一部の胎児で口唇裂を発症し、さらに一次口蓋裂も発症することがわかった。これらの研究成果から、神経管閉鎖不全を発症する上皮癒合異常は、その他の器官、特に口蓋形成に関わっていることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経管閉鎖不全と口唇口蓋裂はいずれも頻度の高いヒトの先天性疾患である。特に口唇口蓋裂は外科的な治療に加え、成長に伴う言語治療、歯科治療など長い期間に渡る治療が必要となるため早期発見、治療が急務である。一方、ヒトの場合は一次口蓋を発症するケースが多いのに対し、マウスでは二次口蓋を発症する疾患モデルマウスが多く、一次口蓋裂はほとんど発症しない。つまり、口唇口蓋裂の基礎研究を臨床に繋げるためには、ヒトの発症に近いモデルマウスの作出が必要である。そこで本課題では、上皮癒合の観点から口唇口蓋裂発症モデルマウスを同定することで新規な疾患モデルマウスの作出を試みた。

研究成果の概要（英文）：We investigated whether mouse models of spina bifida manifesta, which is caused by epidermal dysplasia (abnormal differentiation into epidermal cells, abnormal cell morphology, etc.), develop cleft lip and palate, which is also thought to be caused by epithelial fusion defects. The results showed that the Grhl3 deficient fetuses, a well-known model of manifest spina bifida, developed only secondary cleft palate, while the b-catenin conditional knockout mice, in which the beta-catenin gene was deleted only in the epidermis, developed cleft lip in some fetuses and primary cleft palate as well. These findings indicate that the epithelial fusion defects that cause neural tube closure are also involved in the formation of other organs, particularly, the palate.

研究分野：発生生物学

キーワード：上皮癒合 口唇口蓋裂 疾患モデルマウス 神経管閉鎖不全

1. 研究開始当初の背景

1.-(1) 先天性疾患である「二分脊椎」と「口蓋裂」；先天性疾患とは、発生期の形態的、機能的な異常であり、新生児の約 5%に存在するといわれている。その中で神経管閉鎖不全は、生命保持、生活に支障の生じる可能性のある重篤な先天性疾患の一つであり、胎生 23 日頃までに閉鎖する神経管が閉鎖せず発症する。特に、開放性二分脊椎（以後、二分脊椎と称する）は腫瘍表面の皮膚欠損を伴い、脊髄髄膜瘤となる。疾患モデルマウスの解析から、200 遺伝子以上が、二分脊椎に関与していることが知られており、それら発症要因もアポトーシス異常や、神経上皮の過形成、パターンニング異常など多岐にわたる。一般的に、葉酸摂取によって発症リスクを低減出来るとされているが、二分脊椎発症の変異マウス群に葉酸を投与しても症状が軽減しないケースも数多く報告されており、このことは、葉酸による関与とは別の経路が主因であると考えられる (van Straaten and Copp., 2001)。

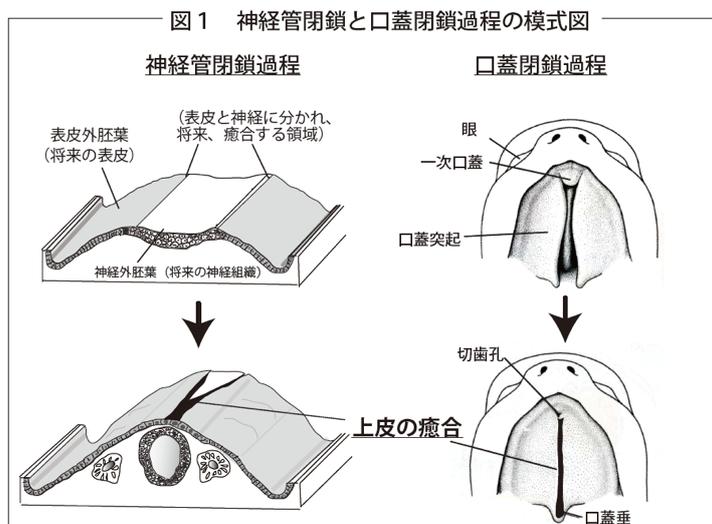
一方、口蓋裂は、外表先天性疾患の中で最も高頻度で発症する多因子遺伝疾患である。ヒトでは、胎児の口蓋は妊娠初期 (5 週目～10 週目位) に形成されるが、その時期に何らかの原因で左右の突起構造の癒合が妨げられることで発症する。口蓋裂を発症すると音声に鼻に抜けてしまうため発語を習得しづらい事実もあって、手術を含めた総合的な診療が必要となる。

また口蓋裂には、一次口蓋と二次口蓋間の口蓋裂 (primary cleft palate ; 一次口蓋裂) と、二次口蓋間の口蓋裂 (secondary cleft palate ; 二次口蓋裂) に大別できるが、これまでの遺伝子改変マウスでは secondary cleft palate を示すものがほとんどであり、primary cleft palate に関する報告はほとんどない。これらのことが、口蓋裂研究が遅れている理由とも言われている。つまり、口唇口蓋裂研究にはヒトの口唇口蓋裂に類似した口蓋裂や口唇裂が認められるマウスが望ましいが、現状、適した疾患モデルマウスはほぼ無い。

1.-(2) 二分脊椎と口蓋裂の共通点である「上皮癒合不全」；我々は二分脊椎と口唇口蓋裂の発症には、共通した形成異常を想定している。二分脊椎は、発生期の神経管閉鎖過程での異常により発症する。神経管閉鎖とは、初期胎生期では一層の外胚葉性のシートが次第に中軸に向かって迫り上がり、その後将来の神経と表皮層に分かれて、それぞれが中心で癒合する (図 1 左)。これら過程に破綻が見られると、神経管閉鎖不全を発症する。一方、口蓋形成に関しては、原始口腔内の上顎突起から生じる左右一対の口蓋突起同士が正中中部で癒合し、二次口蓋が形成され、二次口蓋はさらに鼻中隔、および内側尾突起同士の癒合により生じた一次口蓋とも癒合して、鼻腔と口腔は互いに隔てられる (図 1 右)。つまり、神経管閉鎖過程と口蓋形成過程は、時期も組織も全く違うにも関わらず、上皮の癒合現象の異常が引き金となっている点で共通しており、上皮性癒合が正常に行われない結果、発症に至るのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

そこで本研究課題では、すでに我々が作製している顕在性二分脊椎を発症する遺伝子改変マウ

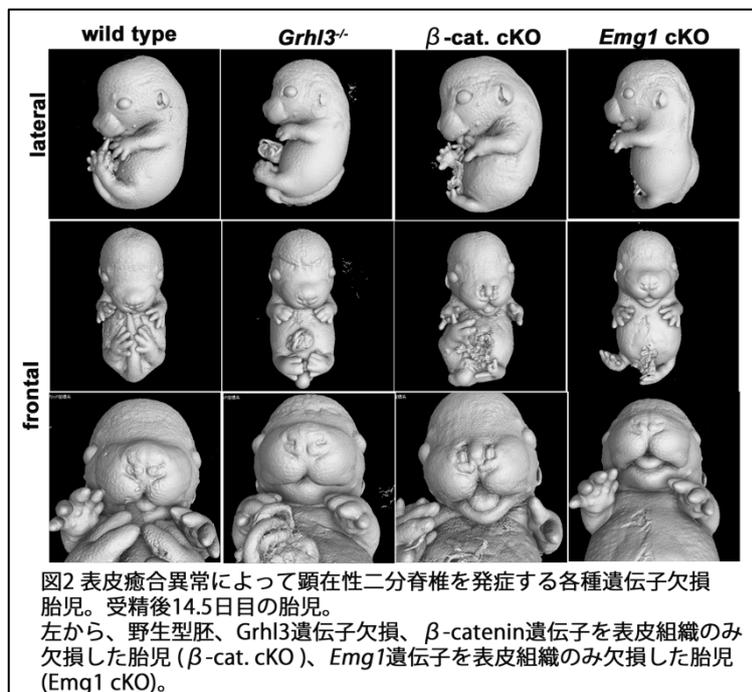


スに対して口蓋裂発症の有無を検証し、最終的に全く違う組織の形態形成でありながら、共通する発症機序を抽出することで上皮癒合現象をより詳細に理解することを目的とした。

3. 研究の方法

3.-(1) 口蓋裂の検証方法；

我々の研究室では表皮組織（将来の皮膚）に形成異常が見られ、最終的に顕在性二分脊椎を発症する遺伝子改変マウスを数種類維持している（*Grhl3* 遺伝子ホモ欠損マウス、*β-catenin* コンディショナル欠損マウス、*Emg1* コンディショナル欠損マウス）。これら顕在性二分脊椎発症モデルマウス胎児に対して、口蓋裂の発症の有無を検討を行った。具体的には、これらマウス外見を、適切な染色液にて染色を行うことで形態をクリアに撮影する状態にし、小動物用マイクロCT（アイビット社；



FX-300tR) を用いて撮影を行った。その後、骨染色や切片を作製し病理学的解析を行った。

3.-(2) 骨染色；受精後 18.5 日目のマウス胎児の一部組織を取り、PCR 反応にて遺伝子型解析を行う。目的の遺伝子型を持つマウス胎児の内臓、表皮をできるだけ取り除いてから、固定液（ホルマリン：酢酸：70%エタノール = 1：1：8）で30分から1時間程度、室温にて固定する。その後、蒸留水にて3回洗浄したのち、軟骨染色（最終濃度 0.06% Alcian Blue in 95% エタノール：無水酢酸 = 4:1）にて1晩染色を行った。その後、エタノールシリーズ（95%, 75%, 40%, 15%）に通したのち、蒸留水にて洗浄を行った。次に、肉片を綺麗に除くために、トリプシン溶液（1% トリプシン in 30%四ホウ酸ナトリウム飽和溶液にて蛋白除去を行った。その後、硬骨染色（0.02%アリザリンレッド in 0.5%水酸化カリウム溶液）にて染色を行った。染色を確認し、保存液（0.5% KOH：グリセリン=1:1）にて保存した。

3.-(3) 各種遺伝子変異マウスの作製；

3.-(3)-① *β-catenin* コンディショナル欠損マウスの作製；既に報告のあった *b-catenin flox*-ノックインアレルのマウスを The Jackson Laboratory 社から導入した (Brault et al., 2001)。Cre タンパク質を発現するマウスに関しては、*Grhl3* 遺伝子内に Cre cDNA をノックインしたマウス (Camerer et al., 2010) を用いることで、表皮のみで遺伝子欠損となるマウス (*b-cat. cKO* マウス) を作製した。

3.-(3)-② *Emg1* コンディショナル欠損マウスの作製；*flox* アレルの遺伝子座を持つ遺伝子改変マウスは CRISPR/Cas9 システムを用いて当研究室で作製を行った（未発表データ）。作製した *Emg1-flox* ノックインアレルを持つマウスに、*Grhl3* 座位に Cre cDNA をノックインかつ *Emg1* ヘテロ変異を持つダブル変異マウスを交配させることで、表皮組織で完全に *Emg1* 遺伝子発現を消失したマウス (*Emg1 cKO*) を作製した。

また、我々のこれまでの研究成果から、 β -catenin 因子は神経管閉鎖時の未分化性外胚葉細胞から表皮細胞への分化過程に作用することが明らかにされている (Kimura-Yoshida et al., 2015, 2018)。また *Emg1* 因子は canonical Wnt 経路と *Grhl3* 因子が協調的に核内で表皮分化時に作用する際に、細胞内の局在制御に働くことを明らかにしている (未発表データ)。

4. 研究成果

各遺伝子型の 14.5 日目の胎児を回収し、外見上の情報を得るためにマイクロ CT にて撮影を行った (図 2)。ちなみにいずれの遺伝子改変マウス (*Grhl3* 遺伝子ホモ欠損マウス、 β -catenin cKO, *Emg1* cKO マウス) も 100% の発症率で顕在性二分脊椎を発症する (図 2)。まず、 β -catenin cKO

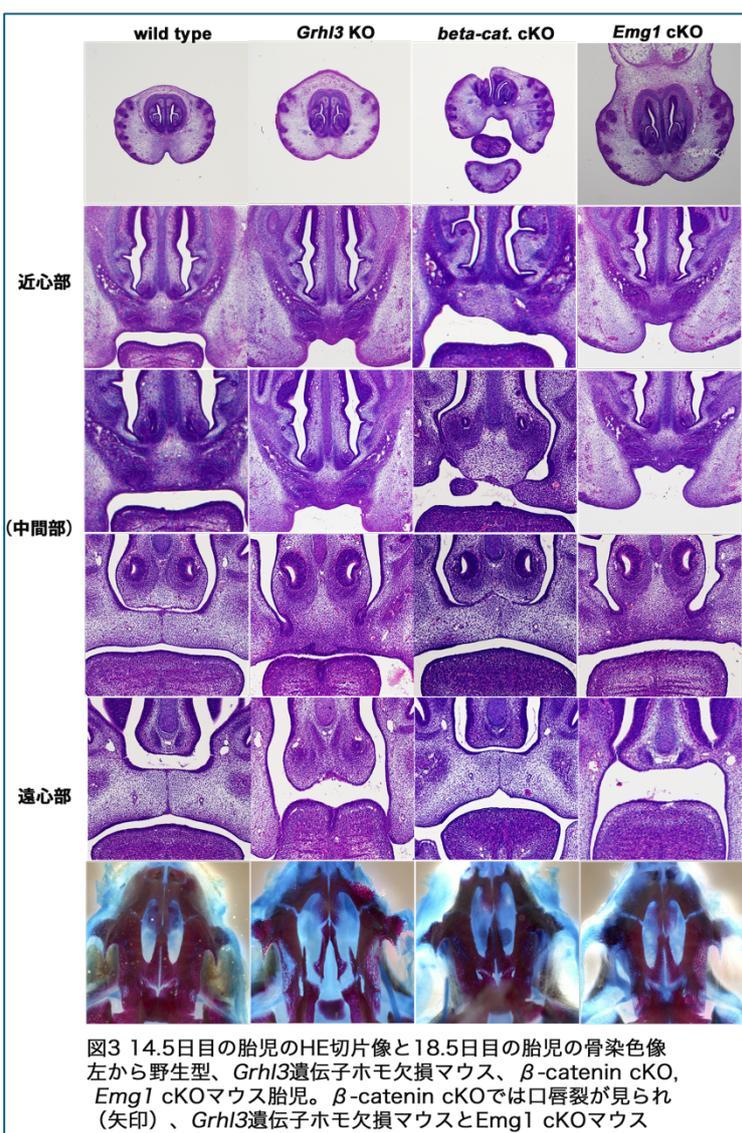


図3 14.5日目の胎児のHE切片像と18.5日目の胎児の骨染色像
左から野生型、*Grhl3*遺伝子ホモ欠損マウス、 β -catenin cKO、*Emg1* cKOマウス胎児。 β -catenin cKOでは口唇裂が見られ (矢印)、*Grhl3*遺伝子ホモ欠損マウスと*Emg1* cKOマウス

マウス胎児では口唇裂が見られることが外見上の観察でわかった (図 2, 3)。また、 β -catenin cKO マウス胎児では、低頻度ではあるが、鼻腔の上部の表皮が裂けているような像も見られた (図 3)。

次に受精後 14.5 日目の胎児に対して、口蓋形成の初期異常が見られるのか詳細に検証するため組織切片を作製し検討を行った。つまり、口蓋裂を発症するのかどうか、また発症するのであればどの領域 (primary cleft palate または secondary cleft palate) で異常が見られるのか検討を行った。まず、 β -catenin cKO マウス胎児では一次口蓋付近の形態である鼻中隔が著しく左右非対称であった (図 3; β -catenin cKO)。また、両側の上顎突起から突出した口蓋突起が中央で癒合し二次口蓋が形成されるが、 β -catenin cKO 胎児では二次口蓋は正常に形成されていることがわかった。

一方、*Emg1* cKO マウスや *Grhl3* KO マウス胎児では、二次口蓋形

成時の口蓋突起が正中への進展が見られず、二次口蓋の形成不全であることがわかった (図 3)。

以上の結果から、表皮の形成不全 (分化異常や、表皮の細胞動態の異常による) から発症する顕在性二分脊椎発症モデルマウスでは、高頻度で口蓋裂も発症することがわかった。中でも、*Emg1* cKO マウスや *Grhl3* KO マウス胎児では二次口蓋裂のみを発症するのに対し、 β -catenin cKO では一部口唇裂を伴った一次口蓋裂を発症している可能性が示唆された。今後、顕在性二分

脊椎と口蓋裂の発症にどのような共通な発症機序が存在しているのか、マーカー解析やさらに詳細な病理学的解析を行うことで明らかにする予定である。

引用文献

Brault V., Moore, R., Kutsch, S., Ishibashi, M., Rowitch D. H., McMahon A. P., Sommer L., Boussadia O., Kemler R.

Inactivation of the b-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development* **128**, 1253-1264 (2001).

Camere E., Barker A., Duong D. N., Ganesan R., Kataoka H., Cornelissen I., Darragh M. R., Hussain A., Zheng Y-W., Srinivasan Y., Brown C., Xu S-M., Regard J. B., Lin C-Y., Craik C. S., Kirchhofer D., Coughlin S. R.

Local protease signaling contributes to neural tube closure in the mouse embryo. *Dev. Cell* **18** 25-38 (2010)

Kimura-Yoshida, C., Mochida, K., Ellwanger, K., Niehrs, C., and Matsuo I.

Fate specification of neural plate border by canonical Wnt signaling and *Grl3* is crucial for neural tube closure. *EBioMedicine* **2**, 513-527 (2015).

Kimura-Yoshida, C., Mochida, K., Nakaya, M. A., Mizutani, T and Matsuo I.

Cytoplasmic localization of GRHL3 upon epidermal differentiation triggers cell shape change for epithelial morphogenesis. *Nat. Commun.* **9**, 4059 (2018)

Van Straaten, V. W., and Copp, A. J.

Curly tail: a 50-year history of the mouse spina bifida model. *Anat. Embryol.* **203**(4) 225-237 (2001)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kimura-Yoshida C, Mochida K, Kanno SI, Matsuo I.	4. 巻 378
2. 論文標題 USP39 is essential for mammalian epithelial morphogenesis through upregulation of planar cell polarity components	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03254-7	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 Tsume-Kajioka M, Kimura-Yoshida C, Mochida K, Ueda Y, Matsuo I.	4. 巻 64
2. 論文標題 BET proteins are essential for the specification and maintenance of the epiblast lineage in mouse preimplantation embryos.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Biology.	6. 最初と最後の頁 1-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12915-022-01251-0	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 Ueda, Y., Kimura-Yoshida, C., Mochida, K., Tsume, K., Kameo, Y., Adachi, T., Lefebvre, O., Hiramatsu, R., Matsuo, I.	4. 巻 19
2. 論文標題 Intrauterine Pressures Adjusted by Reichert's Membrane Are Crucial for Early Mouse Morphogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Report.	6. 最初と最後の頁 107637
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.107637.	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村-吉田千春、持田京子、菅野新一郎、松尾勲
2. 発表標題 哺乳動物の上皮形成過程において、脱ユビキチン化酵素USP39因子は平面内極性(PCP経路)構成因子を活性化することで機能する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（幕張メッセ）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoko Ueda, Chiharu Kimura-Yoshida, Kyoko Mochida, Mami Tsume, Yoshitaka Kameo, Taiji Adachi, Lefebvre Olivier, Ryuji Hiramatsu, Isao Matsuo
2. 発表標題 Principles in the symmetry breaking in animal and plant development Embryo shape change from sphere to egg-cylinder mediated by intrauterine pressures is crucial for mouse primary axis formation.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 MBSJ2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 爪麻美、木村(吉田)千春、上田陽子、持田京子、松尾勲
2. 発表標題 BRD4はJAK/STAT標的遺伝子の転写活性化を介してマウス着床前胚におけるエピプラストの特異化に必要である
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 MBSJ2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kimura-Yoshida C., Mochida K., Nakaya M., Mizutani T., Matsuo I.
2. 発表標題 GRHL3タンパクの細胞質における局在が上皮細胞の分化過程から形態形成過程へと進行させる
3. 学会等名 第52回日本発生物学会大会 (大阪)
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	吉田 千春 (Yoshida Chiharu) (60360666)	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター (研究所)・病因病態部門・主任研究員 (84408)	

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