

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10380

研究課題名(和文) 糖鎖による頭蓋顎顔面形態形成の制御機構の解明 新たな診断法・治療法の基盤構築

研究課題名(英文) the roles of heparan sulfate on neural crest cells function during craniofacial and tooth development

研究代表者

岡 綾香 (Ayaka, Oka)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：20635403

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)：本研究では、ヘパラン硫酸合成酵素のノックアウトマウスを用いて、ヘパラン硫酸の欠失が頭蓋顎顔面や歯の形態形成に与える影響およびその制御機構を解明した。結果、ヘパラン硫酸合成酵素のノックアウトマウスでは、上下顎の著しい低形成および口蓋裂を含む顔面正中の癒合不全ならびに切歯や臼歯歯胚の矮小化と形態異常が認められた。さらに、ヘパラン硫酸欠失による頭蓋顎顔面形態の形態異常はWntシグナリングの制御機構の破綻による細胞死の増加と細胞増殖の低下ならびにフォーカルアドヒージョンの異常による神経堤細胞の遊走能の低下により引き起こされていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ヘパラン硫酸による頭蓋顎顔面や歯の形態形成制御機構の詳細を明らかにしようというはじめての試みであり、本研究成果はGAG糖鎖合成/代謝異常を原因とする先天異常症候群のメカニズムの解明や従来では治療が困難であったそれらの先天異常症候群に対する新しい治療法開発につながると考えられる。さらに、歯をはじめとした新規組織再生法開発に繋がることが強く期待される。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to clarify the roles of heparan sulfate (HS) on neural crest cells function during craniofacial and tooth development by the conditional knockout mice model. We generated conditional knockout mice by deleting the Ext1 (Ext1-CKO mice) which is involved in HS biosynthesis, and examined the craniofacial developmental phenotype in the Ext1-CKO mice. The Ext1-CKO mice showed severer craniofacial abnormalities with midline cranial bone defects including cleft palate, short mandible, and small maxilla, as well as reduced size and malformation of tooth germ. In addition, our results indicated that HS plays an essential role in the craniofacial and tooth morphogenesis by regulating neural crest cells migration. We also demonstrated that Wnt/ β -catenin signaling is significantly impaired in Ext1-CKO mice, by comprehensive RNA-sequencing approach and reporter mice model. The results might contribute to improve clinical diagnosis for craniofacial anomalies.

研究分野：発生

キーワード：ヘパラン硫酸 糖鎖 口蓋裂 不正咬合

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は生命機能の根幹に関わり、生物の多様性を作り出す生体分子で核酸、タンパク質に次ぐ第三の生命の鎖と言われている。ゲノムの直接産物であるタンパク質の解析では説明のつかない未解明の生命現象の一つに形態形成のメカニズムがあり、糖鎖によるシグナル分子ダイナミクスの制御が関わっているのではないかと注目されている。一方、糖の繰り返し構造からなるグリコサミノグリカン糖鎖(GAG 糖鎖)の合成/代謝異常を原因とする先天異常症候群の多くが頭蓋顎顔面、不正咬合や歯の形態形成異常を伴っていることが明らかになってきた。しかし、頭蓋顎顔面、不正咬合や歯の形態形成における GAG 糖鎖の制御機構については不明である。

2. 研究の目的

これまで、我々の研究グループは、GAG 糖鎖の一つであるヘパラン硫酸合成酵素のコンディショナルノックアウト(CKO)マウスが頭蓋顎顔面の形態異常を自然発症することをすでに見出している。そこで、本研究ではヘパラン硫酸合成酵素のCKOマウスを用いてヘパラン硫酸による頭蓋顎顔面形態形成の制御メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験1：ヘパラン硫酸の欠失が顎顔面の形態形成に及ぼす影響の検討

野生型マウス(C57BL/6)ならびにヘパラン硫酸合成酵素(Ext1)の頭蓋顎顔面特異的(Wnt1-Cre)ノックアウトマウス(以下、CKO)胎児を用いた。摘出した胎児は、様々なステージ(E12.5, E14.5, E15.5, E17, P0, P7, P28)で頭蓋顎顔面組織を採取し、 μ CTによる形態学的な解析を行った。さらに各ステージにおける頭蓋顎顔面組織の組織切片を作製し、頭蓋顎顔面と歯の形態形成異常を組織学的に解析した。遺伝子発現分布の解析はin situ hybridization 法にて行った。

(2) 実験2：ヘパラン硫酸合成酵素の細胞・組織特異的CKOマウスを用いてヘパラン硫酸により制御されるシグナル分子の検索

実験1の解析からCKOマウスにおいて異常が起こっている部位を特定し、同部位から採取したtotal RNAを用いて全エキソームのRNAシーケンス解析を行いWTから採取した対照群のデータと比較した。遺伝子発現解析、シグナルパスウェイ解析によりCKOマウスでの形態異常と最も関連が高いと予想されるシグナル分子を抽出した。また、CKOマウス頭蓋顎顔面組織の器官培養を行い、抽出されたシグナル分子のインヒビターやアクチベーターを投与し、表現型の回復(Rescue)実験を行うことで、ヘパラン硫酸欠損による形態形成異常発症と関連の大きいシグナル分子を特定した。

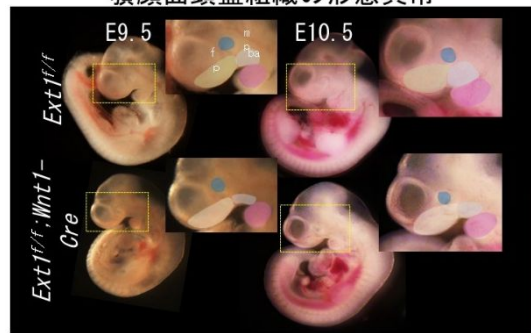
次に、実験1で作成した組織切片はin situ ハイブリダイゼーション法や免疫組織化学的手法を用いて実験2_1で特定したシグナル分子の遺伝子発現パターンを調べることでシグナル分子の産生細胞や発現量を可視化した。さらに、レポーターマウスまたは免疫組織化学的手法にて、シグナル分子活性化を可視化することで、シグナル分子の標的細胞を特定する。得られた結果を比較、分析することで、どの細胞で産生されたシグナル分子がどのように拡散してどの細胞にどの程度作用しているかを調べた。これにより、ヘパラン硫酸とシグナル分子との相互作用を明らかにした。

4. 研究成果

(1) 実験1

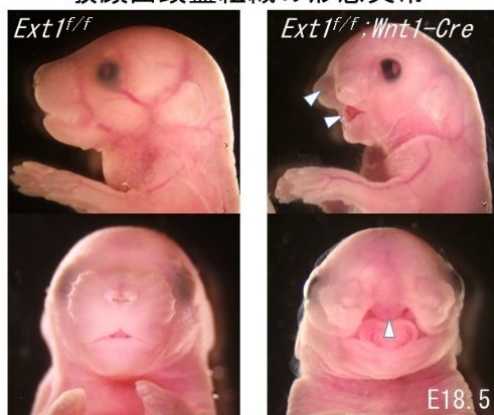
胎生9.5日では、CKOにおいて大きな形態異常は認められないが、胎生10.5日以降になると、CKOでは顔面突起の伸長や癒合が著しく抑制されていることが明らかになった(図1)。CKOは全て出生直後に死亡し、正中裂、口蓋裂を伴う形態異常を示した。骨格標本ならびにμCTでの解析では、顔面正中部は大きく骨が欠損しており、また、上顎骨ならびに下顎骨の著しい短小化が認められた(図2)。組織学的解析で

図1 *Ext1^{f/f};Wnt1-Cre*マウスの顎顔面頭蓋組織の形態異常



顔面形成初期における顔面突起の低形成

図2 *Ext1^{f/f};Wnt1-Cre*マウスの顎顔面頭蓋組織の形態異常



上下顎の著しい低形成や口蓋裂を含む顔面正中の癒合不全または神経堤細胞由来組織における細胞増殖や細胞死に及ぼす影響について検索した。その結果、CKOではE10.5において顔面突起におけるTUNEL陽性細胞数の有意な増加を認めた(図4)。また、CKOでは細胞増殖マーカーであるPHH3陽性細胞数の有意な減少を認めた(図5)。これらのことから、CKOでは神経堤細胞の遊走の異常に加えて、神経堤細胞由来組織における細胞死の増加と細胞増殖の低下により、頭蓋顎顔面や歯の形態形成異常を発症していることが示唆された。

は、切歯や臼歯歯胚の矮小化と形態異常を認めた(図3)。さらに、神経堤細胞やそれに由来する組織においてヘパラン硫酸プロテオグリカンであるSyndecan1やGlypican1の発現が認められた。これらの所見から、神経堤細胞の遊走をヘパラン硫酸が制御していることが示された。

そこで、ヘパラン硫酸の欠失が、神経堤細胞ま

図3 *Ext1^{f/f};Wnt1-Cre*マウスの歯の形態異常

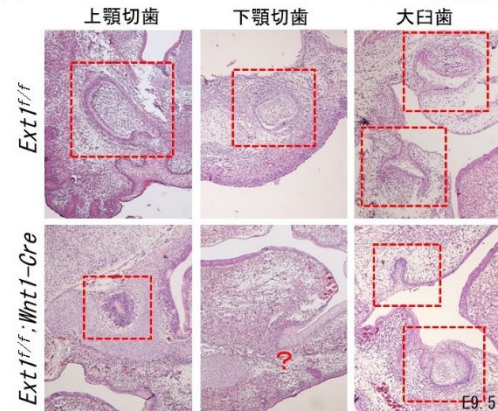


図4 ヘパラン硫酸の欠失が顔面突起の細胞死に与える影響

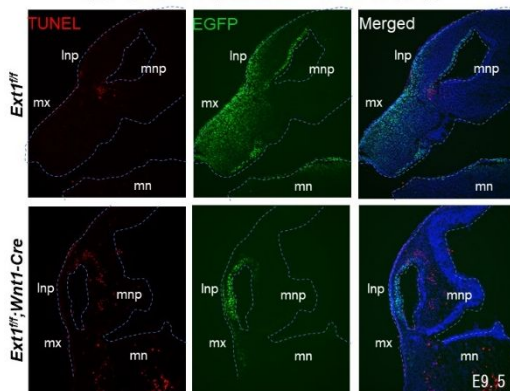
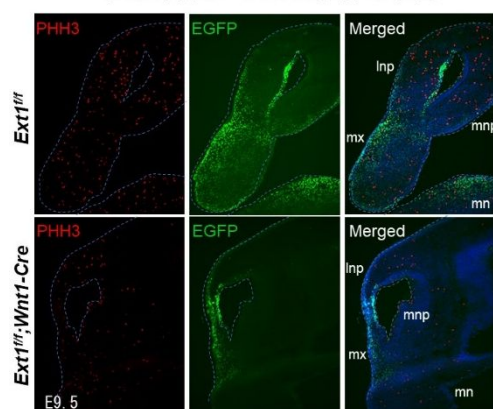


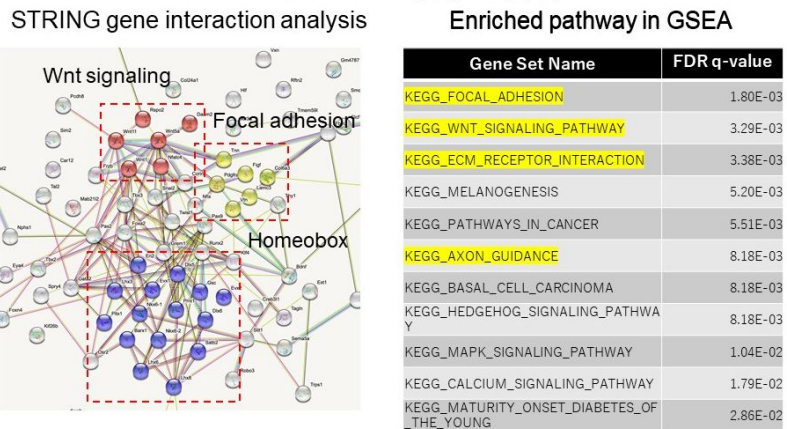
図5 ヘパラン硫酸の欠失が顔面突起の細胞増殖に与える影響の検討



(2) 実験2

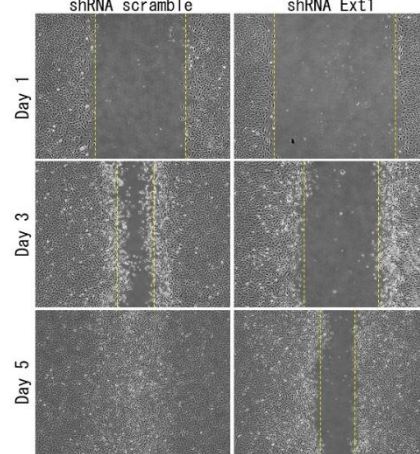
胎生 10 日目の胎児の顔面突起部位を切り出し、RNA を抽出し、RNAseq 解析によりヘパラン硫酸の欠失により影響を受けるパスウェイの網羅的探索を行ったところ、CKO において、顔面突起の細胞増殖と細胞死と関与する Wnt シグナリングが重要であるとわかった(図6)。そのため、ヘパラン硫酸の欠失に伴う Wnt シグナリングの低下により頭蓋顎顔面形態の形態異常が引き起こされることを検証するために、Wnt レポーターマウスを用いてシグナル部位を特定したところ、Wnt シグナルの低下を確認した。さらに、顔面突起の癒合において重要な遺伝子である MSX1, FGF8, Axin2 の発現の局在を解析したところ、MSX1 および Axin2 の発現は Ext1-CKO の顔面突起部位において低下していることがわかった。一方、上皮組織に特異的に発現する遺伝子である FGF8 については、著明な変化は認めなかった。次に、Wnt/ β -catenin シグナリングのシグナル伝達において、中心的な働きをしている分子である β -catenin をコードする Ctnnb1 遺伝子の欠失マウスとの genetic interaction 実験を行うことで、Ext1 遺伝子異常と Wnt/ β -catenin シグナリングの直接的な関与について検証したところ、Ext1 ヘテロと Ctnnb1 ヘテロの交配では著明な表現型は認めなかった。

図6 ヘパラン硫酸の欠失により影響を受けるパスウェイの網羅的探索



伴う Wnt シグナリングの低下により頭蓋顎顔面形態の形態異常が引き起こされることを検証するために、Wnt レポーターマウスを用いてシグナル部位を特定したところ、Wnt シグナルの低下を確認した。さらに、顔面突起の癒合において重要な遺伝子である MSX1, FGF8, Axin2 の発現の局在を解析したところ、MSX1 および Axin2 の発現は Ext1-CKO の顔面突起部位において低下していることがわかった。一方、上皮組織に特異的に発現する遺伝子である FGF8 については、著明な変化は認めなかった。次に、Wnt/ β -catenin シグナリングのシグナル伝達において、中心的な働きをしている分子である β -catenin をコードする Ctnnb1 遺伝子の欠失マウスとの genetic interaction 実験を行うことで、Ext1 遺伝子異常と Wnt/ β -catenin シグナリングの直接的な関与について検証したところ、Ext1 ヘテロと Ctnnb1 ヘテロの交配では著明な表現型は認めなかった。

図7 Ext1のノックダウンが09-1細胞の遊走能に及ぼす影響の検討



RNAseq 解析の結果は、ヘパラン硫酸の欠失が細胞の接着・遊走と関連する Focal adhesion の異常を引き起こしていることも示唆したため、ヘパラン硫酸の欠失が神経堤細胞の遊走能に与える影響の検討を行った。神経堤細胞株である 09-1 細胞を使い、in vitro で検証したところ、スクラッチ領域の閉鎖が野生型に比べ Ext1-CKO のほうが遅いことが判明した。このことから、Ext1-CKO では 09-1 細胞遊走能が低下しているが明らかになった(図7)。

以上、本研究結果により、ヘパラン硫酸欠失による頭蓋顎顔面形態の形態異常は、Wnt シグナリングの制御機構の破綻による細胞死の増加と細胞増殖の低下ならびに Focal adhesion の異常による神経堤細胞の遊走能の低下により引き起こされていることが明らかになった。本研究は、ヘパラン硫酸による頭蓋顎顔面や歯の形態形成制御機構の詳細を明らかにしようというはじめての試みであり、本研究成果は GAG 糖鎖合成/代謝異常を原因とする先天異常症候群のメカニズムの解明につながるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Uemura Yume, Oka Ayaka, Kurosaka Hiroshi, Yamashiro Takashi	4. 巻 58
2. 論文標題 Comprehensive Orthodontic Treatment of a Patient With Prader-Willi Syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Cleft Palate-Craniofacial Journal	6. 最初と最後の頁 1459 ~ 1467
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1055665620977375	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 Uemura Yume, Haque Tahsinul, Sato Fumihiko, Tsutsumi Yumi, Ohara Haruka, Oka Ayaka, Furuta Takahiro, Bae Yong Chul, Yamashiro Takashi, Tachibana Yoshihisa, Yoshida Atsushi	4. 巻 225
2. 論文標題 Proprioceptive thalamus receiving forelimb and neck muscle spindle inputs via the external cuneate nucleus in the rat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Structure and Function	6. 最初と最後の頁 2177 ~ 2192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00429-020-02118-2	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 Yamamoto Sayuri, Kurosaka Hiroshi, Miura Jiro, Aoyama Gozo, Sarper Safiye Esra, Oka Ayaka, Inubushi Toshihiro, Nakatsugawa Kohei, Usami Yu, Toyosawa Satoru, Yamashiro Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Observation of the Epithelial Cell Behavior in the Nasal Septum During Primary Palate Closure in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2020.538835	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 Oka Ayaka, Kurosaka Hiroshi, Nakatsugawa Kohei, Yamashiro Takashi	4. 巻 79
2. 論文標題 Surgical and orthodontic approach for a patient with a severely constricted maxillary arch caused by bilateral cleft lip and palate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Orthodontic Waves	6. 最初と最後の頁 127 ~ 134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/13440241.2020.1751456	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 Ayaka Oka, Hiroshi Kurosaka, Kohei Nakatsugawa, Takashi Yamashiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Surgical and orthodontic approach for a patient with a severely constricted maxillary arch caused by bilateral cleft lip and palate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Orthodontic Waves	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/13440241.2020.1751456	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 Oka Ayaka, Tanikawa Chihiro, Isogai Yukako, Mihara Kiyomi, Yamashiro Takashi	4. 巻 59
2. 論文標題 Evaluation of Facial Appearance?Related Quality of Life in Young Japanese Patients With Cleft Lip and/or Palate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Cleft Palate-Craniofacial Journal	6. 最初と最後の頁 S57 ~ S64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/10556656211023243	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 Tanikawa Chihiro, Lee Chonho, Lim Jaeyoen, Oka Ayaka, Yamashiro Takashi	4. 巻 24
2. 論文標題 Clinical applicability of automated cephalometric landmark identification: Part I?Patient related identification errors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Orthodontics & Craniofacial Research	6. 最初と最後の頁 43 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ocr.12501	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 Tanikawa Chihiro, Oka Ayaka, Lim Jaeyoen, Lee Chonho, Yamashiro Takashi	4. 巻 24
2. 論文標題 Clinical applicability of automated cephalometric landmark identification: Part II ? Number of images needed to re learn various quality of images	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Orthodontics & Craniofacial Research	6. 最初と最後の頁 53 ~ 58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ocr.12511	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 中西 祐一郎, 犬伏 俊博, 山城 隆
2. 発表標題 頭蓋顎顔面の形態形成におけるヘパラン硫酸の機能の探索
3. 学会等名 日本口蓋裂学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中西 祐一郎, 犬伏 俊博, 松本 嘉寛, 山口 祐, 山城 隆
2. 発表標題 頭蓋顎顔面の形態形成におけるヘパラン硫酸の役割
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakanishi Y, Inubushi T, Matsumoto Y, Yamaguchi Y, Yamashiro T
2. 発表標題 Elucidation of the regulatory mechanisms of heparan sulfate on the craniofacial and tooth morphogenesis
3. 学会等名 The 4th meeting of the international Association for Dental Research Asia_Pacific Region (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	犬伏 俊博 (Inubushi toshihiro) (30550941)	大阪大学・歯学研究科・講師 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	黒坂 寛 (kurosaka hiroschi) (20509369)	大阪大学・歯学部附属病院・講師 (14401)	
研究分担者	山城 隆 (yamashiro takashi) (70294428)	大阪大学・歯学研究科・教授 (14401)	

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