

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19290

研究課題名(和文)正中顔面裂および一次口蓋の劣形成を誘発するレチノイン酸シグナルの機能解明

研究課題名(英文)Elucidation of the function of retinoic acid signaling contributed to midfacial defects

研究代表者

大原 春香(Ohara, Haruka)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：40754726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胎生時期特異的にRdh10の機能を阻害したマウスでは、発生中の前頭鼻突起でのRAシグナルの実質的な低下をもたらし、正中顔面裂や切歯の形成異常といった顎顔面領域の異常が生じることを示した。また正中顔面裂の発症は発生中の前頭鼻突起内の頭部神経堤細胞でのアポトーシスの増加やAlx1およびAlx3転写の実質的な減少と関連すること、Shhシグナルの制御を誤ると正中顔面の形成異常に關与するRAシグナルの低下を引き起こす原因となることが示された。以上より、正中顔面の発生には胎生初期特異的で部位特異的なRdh10とRAシグナルが重要な機能を果たし、分子および細胞レベルでの調整が必要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異常な顔面突起の成長や癒合、骨形成の異常は、顎顔面形成不全の原因となり、口唇口蓋裂は顎顔面領域において高頻度で生じる先天性疾患である。Rdh10遺伝子が制御する顎顔面領域のRAシグナルが顔面正中部の癒合における分子基盤であることが示唆されることに着目し、本研究ではRdh10遺伝子を機能阻害したマウスの形態や組織学的表現型を詳細に解析し、正中顔面裂および切歯の形成異常の発症に關連するRAシグナルの機能解明を行った。本研究によりRAシグナル異常により誘発される顎顔面形成異常に關する基礎的な理解が深まり、予防法や治療法の確立に貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We showed that Rdh10 loss-of-function leads to a substantial reduction in RA signaling in the developing frontonasal process during early embryogenesis, which results in a variety of craniofacial anomalies, including midfacial cleft and agenesis of upper incisors. Elevated apoptosis in post-migratory cranial neural crest cells and a substantial reduction of Alx1 and Alx3 transcription in the developing frontonasal process are associated with midfacial cleft in Rdh10-deficient mice. Importantly, expanded Shh signaling in the ventral forebrain, as well as partial abrogation of midfacial defects in Rdh10 mutants via inhibition of Hh signaling, indicates that misregulation of Shh signaling underlies the pathogenesis of reduced RA signaling associated midfacial defects. These data illustrate the spatiotemporal function of Rdh10 and RA signaling during early embryogenesis and their importance in orchestrating molecular and cellular events essential for normal midfacial development.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：正中顔面裂 レチノイン酸シグナル Rdh10 歯科矯正

1. 研究開始当初の背景

顎顔面の発生には様々な顔面突起の適切な成長および癒合が必要不可欠である。また、その過程において顎顔面を形成する骨も同時に分化発生し生命維持に不可欠な多くの顎顔面の臓器を保護し、咀嚼や発音等多くの生命機能を発揮するのに重要な役割を果たす。異常な顔面突起の成長や癒合、骨形成の異常は顎顔面形成不全の原因となり、その中でも口唇口蓋裂は日本での発生率が1/500と非常に高く、高頻度で発生する疾患である。口唇口蓋裂患者は哺乳・発音・咀嚼等の機能障害や審美障害を呈し、著しいQuality of Life (QOL) の低下をきたす。これらの疾患は国内外問わず、多くの研究者が様々な分子メカニズムと同疾患の関連性についての研究を行っており、矯正歯科分野との関連も非常に強い。

実際に矯正歯科の臨床現場では、両側性の口唇口蓋裂患者において上顎骨の正中前方に位置する切歯骨部に特異的に著しい劣成長がみられたり、または上顎臼歯の形成は正常であるのに対し、切歯の部位特異的な形成異常を認める患者に度々遭遇する。

本研究では我々が着目するレチノイン酸(以下 RA) シグナルは上記疾患との関連が示唆されているものの、双方の疾患発症のメカニズムを包括的に理解するには至っていない。ヒトの場合、RA の過剰摂取によって、小耳症・小顎症・口蓋裂といった頭蓋顔面構造の異常や、心疾患、胸腺の異常、網膜や視神経の異常といった中枢神経系の構造異常などの胎児の催奇形性を惹起することがこれまでも報告されており、RA シグナルが頭部の神経堤細胞の活動に有害な影響を与える可能性が考えられている(Lammer et al. 1985)。

RA は生体内にてビタミン A(レチノール)を基に複数の酵素により生成される事が知られており、その酵素の中の一つである Rdh10 は RA 生成の初期過程に必要な不可欠な分子である。同遺伝子が正常な顔面発生に重要な役割を果たす事は既に解明されており(Sandell et al. 2007)、また興味深いことに Rdh10 の機能阻害を行ったマウスは過去に報告された他の RA シグナルの機能阻害とは異なる表現型を示している。よって、その表現型を詳細に解析することによって、RA シグナルが正中顔面裂および一次口蓋の劣形成にどのような影響を与えるかを明らかにする。

2. 研究の目的

本研究では、Rdh10 遺伝子を機能阻害したマウスの形態および組織学的表現型を詳細に解析し、正中顔面裂および切歯の形成異常の発症に関連する RA シグナルの機能解明を行うことを目的とした。

RA はビタミン A(レチノール)の2段階の代謝により体内で生成され、Rdh10 はその最初のステップにおいて重要な役割を果たす。胎児発生における RA 代謝酵素の解析に関する研究のなかでも、Rdh10 の機能を解析した研究は少ない。我々の研究室では、すでに Rdh10 の機能を阻害した動物モデル(マウス)の作製に成功しており、胎生初期のマウスで、Rdh10 の機能を阻害すると口唇裂や後鼻孔閉鎖症が併発することを見出している。また Rdh10 機能阻害マウスでは内側鼻突起で認められる神経堤細胞が減少することも確認できており、マウスにおいても一次口蓋の劣形成や切歯の部位特異的な形成異常が生じることをすでに見出している。

このことから、本研究では、Rdh10 機能阻害マウスを用いて、胎生時期および組織特異的に細胞レベルで生じる顔面の解剖学的形態および組織学的な変化についてさらに詳細な解析を進めることにより、正中顔面裂の発生や一次口蓋の劣形成に関連する疾患発症のメカニズムを解明することを明らかにする。また、胎生時期にみられる顎顔面発生異常の遺伝子発現解析を網羅的に行い、顎顔面の発生での RA シグナルに影響を受ける遺伝子カスケードを同定することを第二の目的とした。

3. 研究の方法

胎生初期および神経堤細胞特異的に Rdh10 遺伝子の機能を阻害するマウスを用いて実験を行った。

(1)胎生初期にタモキシフェンを投与して作製された Rdh10 ノックアウトマウスを用いて、顔面正中部の癒合時期または切歯歯胚の形成時期にみられる解剖学的および組織学的な変化を解析した。様々なステージで作製したマウス胎児を取り出し、Whole mount nuclear fluorescent imaging(Sandell, Kurosaka et al.2012)を用いて観察を行い、顎顔面の表現型を解析した。また組織切片を作製して免疫染色や in situ hybridization 等の解析を行った。胎生のどの時期でまたどの組織で RA シグナルが顎顔面発生において重要な役割を果たすかを解明するため、表現型が確認できるマウス胎児においては、表現型を誘発した原因となる RA シグナル阻害による細胞増殖や細胞死、細胞分化等の細胞動態の変化を解析した。

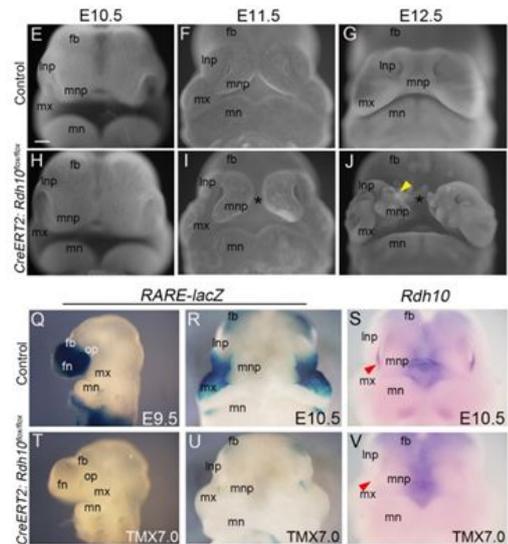
(2)表現型が確認できたノックアウトマウスを用いて、網羅的な遺伝子発現解析を行い、RA シグナル経路の変化によって影響を受けるシグナル経路を同定し、トランスクリプトーム解析を行った。シグナル経路の解析を行って得られて網羅的なデータから RA シグナル経路の変化の影響を受ける遺伝子カスケードをより特異的に同定した。

4. 研究成果

(1) 顔面正中部の形態を形成するために必要な時期特異的・部位特異的な条件を明らかにするため、発生中の顎顔面領域の *Rdh10* の発現パターンの解析を行った。胎生 7.0 日で *Rdh10* の機能を阻害したマウスでは、胎生 10.5~12.5 日のマウスで顔面正中部の癒合不全がより顕著に観察された。

また、胎生 7.0 日に *Rdh10* の機能を阻害すると、胎生 9.5 日および 10.5 日のノックアウトマウスの前頭鼻突起で RA シグナル活性の実質的な低下が認められた。同時に、前頭鼻突起における *Rdh10* の発現の低下を認めた。

以上より、胎生初期に *Rdh10* の機能を阻害することで、発生中の前頭鼻突起における RA シグナルの実質的な低下をもたらすということが示された。その結果、発生中のマウスの前頭鼻突起で *Rdh10* と RA シグナルが減少すると、正中顔面裂が誘発されること示された。



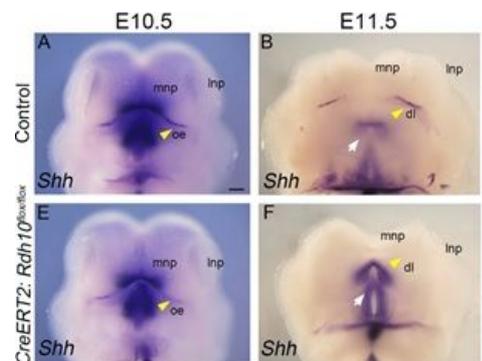
(2) 前頭鼻突起に存在する頭部神経堤細胞の発生の乱れにより正中顔面裂といった顎顔面形態の異常が生じるため、*Rdh10* 機能阻害マウスの頭部神経堤細胞に関して解析を行ったところ、RA シグナルの低下が頭部神経堤細胞の形成や遊走に影響することはなかったが、RA シグナルの低下によって前頭鼻突起内のアポトーシスの増加が認められ、遊走した後の頭部神経堤細胞が生存するためには、RA シグナルが必要であった。これにより、前頭鼻突起でのアポトーシスが增加すると正中顔面裂の発生を誘発するという細胞レベルでの病因となる可能性が示された。

さらに、*Alx1* と *Alx3* は前頭鼻突起でのアポトーシスの増加や正中顔面裂の発生との関与がこれまでに報告されており (Beverdam et al. 2001)、過去に我々が遺伝子解析を行ったデータ (Kurosaka et al. 2017) をさらに詳細に解析したところ、*Rdh10* 機能阻害マウスにおいて、*Alx1* と *Alx3* の発現の減少が認められた。

以上より、*Rdh10* を介して機能する RA シグナルは、*Alx* ファミリー遺伝子の発現を維持し、遊走後の頭部神経堤細胞が生存するのに必要であることが示された。

(3) 我々は、これまでに、顎顔面発生中の過剰な RA が *Shh* シグナルを下方制御することを明らかにした (Wang et al. 2019)。そこで本研究では、*Rdh10* 機能阻害マウスの *Shh* シグナルの変化について解析を行ったところ、*Rdh10* 機能阻害マウスの前脳の腹側で *Shh* の発現が増加し、顔面正中では *Shh* シグナルの異所性の発現が認められた。これに対し、口腔上皮では *Shh* の発現の低下が認められた。

以上の結果から、RA シグナルの低下に伴って前脳腹側の *Shh* の発現が増加し、正中顔面裂を誘発する可能性、また口腔上皮の *Shh* の発現の減少が上顎切歯の形成不全に関連している可能性が示唆された。つまり、RA シグナルの減少に伴う *Shh* の発現の乱れによって、顔面正中部の形成異常を誘発することが示された。



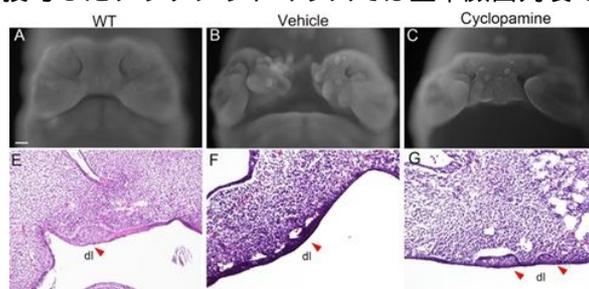
(4) 上顎切歯の発生と RA シグナルとの関連を検証するため、*Rdh10* 機能阻害マウスの歯の発生初期段階で認められる歯堤と dental placodo の境界を定める *SOX2* と *P21* の発現を解析した。*Rdh10* 機能阻害マウスでは、切歯が発生する初期段階の歯堤で発現する *SOX2* が減少し、歯堤の陥入が認められず、*P21* の減少が認められた。

上顎切歯の発生が始まるときの *Rdh10* と RA シグナルの役割を調べるため、間葉組織と口腔上皮のマーカーについてもさらに解析を行ったところ、*Pax9* (切歯発生の初期段階の間葉組織のマーカー) は減少し、*Pitx2* (切歯発生の初期段階の歯堤のマーカー) は下行制御されていた。dental placado のマーカーでもある *Shh* の発現は上顎切歯の dental placado で崩壊し、興味深いことに、上顎切歯の dental placado での *Bmp4* の発現が乱れが認められた一方で、間葉組織での *Bmp4* の発現は減少していた。これらの結果から、上顎切歯の初期の発生は、RA シグナルの低下によって、抑止されることが示された。

(5) RA シグナルの低下に伴って *Shh* シグナルが上昇し、正中顔面裂を誘発するのではないかと仮説のもと、*Shh* シグナルを抑制することで、裂の発生を抑止できるのではないかと考えた。

Hh シグナル伝達経路を構成する要素のひとつである SMOOTHENED の阻害剤であるシクロパミンを胎生 11 日の妊娠中マウスに投与したところ、シクロパミンを投与したマウスでは、Shh シグナルが低下し、上顎切歯の形成異常が確認できた。タモキシフェンを用いて Rdh10 の機能を阻害したマウスと比較すると、シクロパミンを投与したノックアウトマウスでは正中顔面列裂の発生率が低下し、またその症状の重症度も低くなった。また、Rdh10 機能阻害マウスでは切歯の欠如が認められたが、シクロパミンの投与群では歯堤の陥入が認められず断片化した上顎切歯が存在した。

これらの結果から、Rdh10 機能阻害マウスで生じる過剰な Hh シグナル伝達を抑制することにより、Rdh10 機能阻害マウスの顔面中央部の表現型を部分的に回復させることが示された。



(1) ~ (5) の研究成果より、正常な顔面正中部の発生には、胎生初期特異的および前頭鼻突起での部位特異的な Rdh10 遺伝子と RA シグナルが重要な機能を果たし、また、分子および細胞レベルでの調整が必要不可欠であることが明らかとなった。本研究を発展させていくことで、上記疾患に対するさらなる基礎的な理解が深まり、RA シグナル異常により誘発される顎顔面形成異常の予防法や治療法の確立に貢献することが期待できる。

< 引用文献 >

Beverdam A, Brouwer A, Reijnen M, Korving J, Meijlink F. 2001. Severe nasal clefting and abnormal embryonic apoptosis in *alx3/alx4* double mutant mice. *Development*. 128(20):3975-3986.

Kurosaka H, Wang Q, Sandell L, Yamashiro T, Trainor PA. 2017. Rdh10 loss-of-function and perturbed retinoid signaling underlies the etiology of choanal atresia. *Hum Mol Genet*. 26(7):1268-1279.

Lammer EJ, Chen DT, Hoar MR, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, Curry CJ, Fernhoff PM, Grix Jr AW, Lott IT, Richard JM, Sun SC. 1985. Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med*. 313(14):837-41.

Sandell LL, Lynn ML, Inman KE, McDowell W, Trainor PA. 2012. Rdh10 oxidation of vitamin a is a critical control step in synthesis of retinoic acid during mouse embryogenesis. *PLoS One*. 7(2):e30698.

Sandell LL, Sanderson BW, Moiseyev G, Johnson T, Mushegian A, Young K, Rey JP, Ma JX, Staehling-Hampton K, Trainor PA. 2007. Rdh10 is essential for synthesis of embryonic retinoic acid and is required for limb, craniofacial, and organ development. *Genes Dev*. 21(9):1113-1124.

Wang Q, Kurosaka H, Kikuchi M, Nakaya A, Trainor PA, Yamashiro T. 2019. Perturbed development of cranial neural crest cells in association with reduced sonic hedgehog signaling underlies the pathogenesis of retinoic-acid-induced cleft palate. *Dis Model Mech*. 12(10).

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yanran Wu, Hiroshi Kurosaka, Qi Wang, Toshihiro Inubushi, Kohei Nakatsugawa, Masataka Kikuchi, Haruka Ohara, Takayuki Tsujimoto, Shota Natsuyama, Yuki Shida, Lisa L. Sandell, Paul Trainor and Takashi Yamashiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Retinoic acid deficiency underlies the etiology of midfacial defects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	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） 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 該当する

〔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 大原春香、岡綾香、田中晋、古郷幹彦、山城隆
2. 発表標題 中顔面の著しい陥凹感を認める口唇口蓋裂患者に上顎骨前方部骨延長術および上下顎骨骨切り術を併用した一症例
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上村 夢、佐藤 文彦、古田 貴寛、大原 春香、堤 友美、池之上悦子、吉田 篤
2. 発表標題 頸部と上肢の筋紡錘に生ずる固有感覚を伝達する外側楔状束核から視床への投射
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 Fumihiko Sato, Yumi Tsutsumi, Haruka Ohara, Yume Uemura, Takahiro Furuta, Atsushi Yoshida
2. 発表標題 Efferent projections of granular insular cortex receiving proprioception from jaw-closing muscle spindles
3. 学会等名 IBRO 2019（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
研究協力者	山城 隆 (Yamashiro Takashi) (70294428)	大阪大学・歯学研究科・教授 (14401)	
研究協力者	黒坂 寛 (Kurosaka Hiroshi) (20509369)	大阪大学・歯学部附属病院・講師 (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
---------	---------