

令和 3 年 5 月 25 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：19K19291

研究課題名（和文）ライブイメージングを用いた口蓋裂マウスモデルの口蓋組織の細胞動態解析

研究課題名（英文）Cell dynamics analysis of palate tissue in a cleft palate mouse model using live imaging technology

研究代表者

青山 剛三（Aoyama, Gozo）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：00838542

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：口唇口蓋裂は顎顔面領域で起こる形態形成不全としては最も頻度の高い現象であり、胎生期における遺伝的要因と環境要因に大きな影響を受けて発病することが知られている。とりわけ口蓋突起上皮の動態異常が口蓋裂の発症と深く関連していることが明らかになっている。本研究では口蓋突起の癒合に関与するStat3-TGF β シグナル経路が口蓋突起癒合面上皮細胞の細胞動態に与える影響を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TGF β シグナル伝達経路は口蓋裂発症において中心的な役割を果たしていることは知られているものの、口蓋上皮の細胞動態に与える影響やその分子メカニズムについては不明な点が多い。本研究で明らかとなった口蓋突起癒合面上皮細胞に対するStat3-TGF β シグナルの細胞動態解析は口蓋裂の新たな治療法・予防法の開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Cleft lip and palate is the most common morphogenetic phenomenon that occurs in the maxillofacial region in humans, and can be caused by significant effects on genetic and environmental factors. In particular, it has been clarified that the dyskinesia of the palatal process epithelium is closely related to the development of cleft palate. In this study, we clarified the effect of the Stat3-TGF β signaling pathway involved in secondary palatal fusion on the dynamics of medial edge epithelium cells.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：口唇口蓋裂 Stat3 TGF β ライブイメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂は多くの機能不全や審美障害を伴い患者の QOL を著しく低下させる。口唇口蓋裂の発症には様々な要因が関与することが知られているが、とりわけ口蓋突起上皮の動態異常が口蓋裂の発症と深く関連していることがわかってきた。今回我々が着目する TGF- β シグナル伝達経路は口蓋裂発症において中心的な役割を果たしていることは知られているものの、口蓋上皮の細胞動態に与える影響やその分子メカニズムについては十分に明らかになっていない。研究代表者らの過去の研究結果から、Stat3 のリン酸化と TGF- β の発現が双方向に制御し、口蓋の癒合に重要な役割を果たすことは知られており (Sarper SE, *et al.* Sci Rep 2018)、Stat3-TGF β シグナル経路が口蓋突起癒合における上皮細胞の細胞動態に与える影響を明らかにし、Stat3-TGF β シグナルを標的として口蓋突起癒合面の細胞動態の異常を改善することができれば、口蓋裂発症のメカニズム解明に寄与するだけでなく、口蓋裂に対する根治的な病因治療の開発に繋がる可能性が高い。

2. 研究の目的

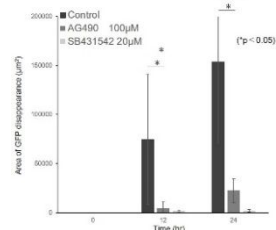
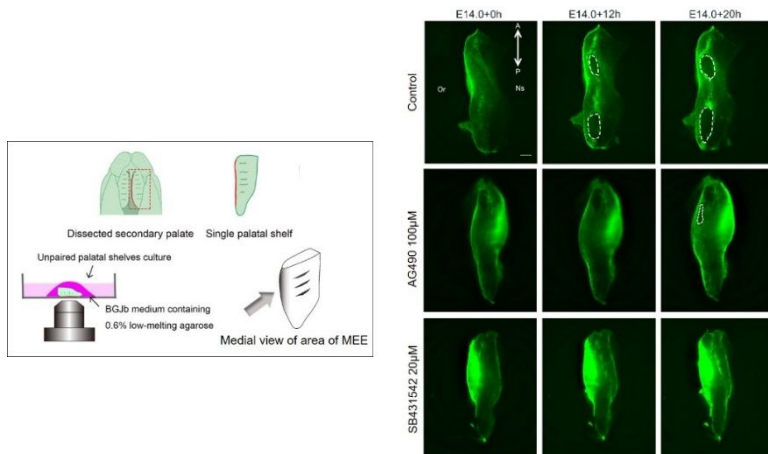
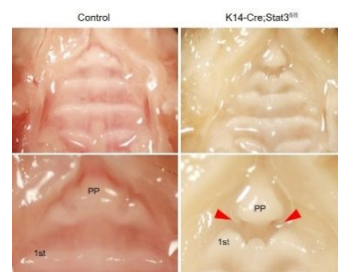
口蓋突起癒合不全における口蓋上皮の細胞動態の異常はいくつかのパターンに集約されることが明らかになってきた。つまり、口蓋上皮癒合面の細胞動態の異常を改善することで、発症原因が多様な口蓋裂に対して非常に効率的・効果的な治療が可能になると推察される。研究代表者らは上皮特異的に GFP を発現するマウスを用いて、口蓋癒合時の上皮の細胞動態を観察するライブイメージング手法を開発し、これまで困難であった口蓋突起癒合時の上皮細胞の細胞動態を観察することを可能にした。本研究では口蓋突起における Stat3 シグナルがどのように関与するのかを詳細に解析し、口蓋裂発症における新たな細胞学的メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

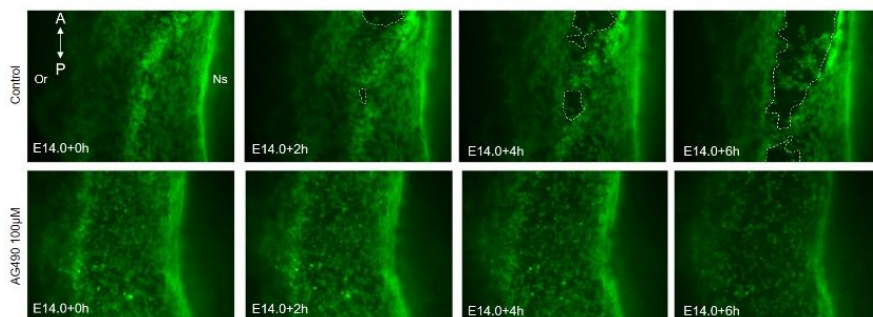
上皮特異的 Stat3 ノックアウトマウス (K14-cre; Stat3^{fl/fl}) を作製し、形態学的な解析を行った。また、Stat3 阻害薬および TGF β 阻害薬添加時における口蓋突起半側除去器官培養 (Gozo A. *et al.* Front. Physiol. 2019) を行い経時的な観察を行った。さらにライブイメージングデータを解析することで、口蓋突起癒合不全において口蓋突起癒合面における上皮細胞の動態を評価した。

4. 研究成果

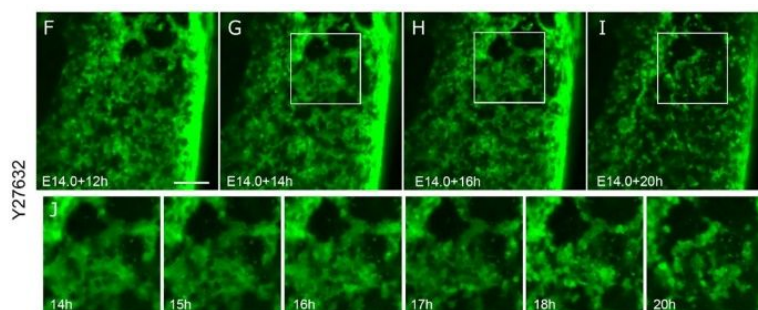
生後 4 週齢の野生型マウスの口蓋では、一次口蓋と二次口蓋が癒合し、完全な口蓋の形成が確認できる。一方、上皮特異的 Stat3 ノックアウトマウスの口蓋では一次口蓋に相当する前方部特異的に癒合不全が生じた (右図)。これは過去に研究代表者らが報告した Runx1 の遺伝子改変動物における口蓋裂の表現型と同様であった。しかしながら、一次口蓋に限局した癒合不全を認めるのみで、口蓋棚は正常に癒合し、二次口蓋の癒合不全は認められなかった。そこで、*in vitro* において口蓋の癒合を阻害する既知の Stat3 阻害薬 (AG490) を用い、上皮特異的に GFP を発現するマウスである K14-GFP マウス胎生 14 日齢の口蓋突起を摘出し、口蓋突起半側除去器官培養実験を行った (左下図)。対象群と比較して GFP 消失領域は有意に減少した。また、TGF β 阻害薬 (SB431542) を用いた実験群でも同様の所見を認めた (右下図)。この事は口蓋裂発症の主因の一つである口蓋癒合不全において、Stat3-TGF β シグナルが口蓋突起癒合面上皮細胞に関与することが明らかとなった。



次に胎生 14 日齢の K14-GFP マウス口蓋突起を培養開始時から 20 時間ライブイメージング観察を行い、Stat3 阻害薬添加実験群の口蓋突起癒合面における上皮細胞の動態を確認した。対象群では、観察開始 2 時間後から GFP 消失領域が出現し、細胞遊走により経時的に前後方向に拡大していることが認められたが、実験群では細胞の遊走による GFP の消失は認められなかった（下図）。



口蓋突起上皮細胞の癒合部への遊走が阻害される Rho kinase シグナル阻害剤（Y27632）を使用し、ライブイメージング観察を行った。GFP の消失が認められず、Stat3 阻害薬添加時と同様の所見であった（下図）。細胞遊走が口蓋突起癒合面上皮細胞の除去に寄与する割合が高いことが示唆された。



これらの事から口蓋癒合時の Stat3-TGF β シグナルが口蓋突起癒合面上皮細胞の細胞遊走に密接に関連していることが示唆された。また非常に興味深い事に上皮特異的 Stat3 ノックアウトマウスでは前方部特異的に癒合不全を生じたことから、Stat3 の機能阻害を補完する因子が存在する可能性がある事を強く示唆している。

今後はこれらの発見を元に Stat3-TGF β シグナルと口蓋裂と関連のある事が知られている様々な分子経路や環境要因との相互関係を解明していく予定である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Aoyama Gozo, Kurosaka Hiroshi, Oka Ayaka, Nakatsugawa Kohei, Yamamoto Sayuri, Sarper Safiye Esra, Usami Yu, Toyosawa Satoru, Inubushi Toshihiro, Isogai Yukako, Yamashiro Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Observation of Dynamic Cellular Migration of the Medial Edge Epithelium of the Palatal Shelf in vitro	5. 発行年 2019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.2019.00698	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

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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 青山 剛三、黒坂 寛、岡 綾香、中津川 昂平、山本 沙優里、宇佐美 悠、豊澤 悟 犬伏 俊博、磯貝 由佳子、山城 隆
2. 発表標題 マウス二次口蓋における口蓋突起癒合時のmedial edge epithelial cellの動態
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

〔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
---------	---------