

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2019～2022

課題番号：19KK0231

研究課題名（和文）口腔・顎・顔面の形態形成におけるリボソーム生合成を介した新たな分子機構の解明

研究課題名（英文）Roles of ribosome biogenesis in oral and craniofacial development

研究代表者

山城 隆（Yamashiro, Takashi）

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：70294428

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,100,000円

研究成果の概要（和文）：リボソームは生体に広く存在する、その生合成に関わる遺伝子変異は、特定の器官や組織、特に神経堤細胞由来の顎顔面領域に影響を及ぼすことが特徴である。本研究では、その病態発症の分子機構を検討した。口蓋形成で癒合前の口蓋突起は、コンドロイチン硫酸(CS)の硫酸化が亢進していた。CSの硫酸基転移酵素であるChst11の機能不全マウスでは、様々なリボソーム生合成に関わる分子の発現が減弱し、ATPの産生が抑制され、口蓋裂が発症した。この口蓋裂はミトコンドリアの機能を回復させることで、発症を予防した。これらの所見から、口蓋の形成において、糖鎖修飾による部位特異的なリボソームの生合成の制御機構が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リボソーム病はリボソームの生合成に関わる遺伝子変異で生じる疾患であり、その病態が神経堤細胞由来の顎顔面領域において症状が現れる点が特徴である。しかし、このような部位特異的な症状の発現がどのような分子・細胞機序で生じるのか不明であった。本研究によって、口蓋突起の形成の際に、コンドロイチン硫酸の硫酸化が部位特異的なリボソームの生合成の亢進に関与していることが示唆され、口蓋形成におけるコンドロイチン硫酸の役割が明らかになった点で学術的な価値は高い。さらに、リボソーム病で見られる口蓋裂の発症に薬理的なミトコンドリアの機能回復が有効であることが示され、臨床的に意義が高い。

研究成果の概要（英文）：Ribosomes are widely present in living organisms, and genetic mutations involved in their biosynthesis are characterized by affecting specific organs and tissues, especially the maxillofacial region derived from neural crest cells. In this study, we investigated the molecular mechanisms underlying the pathogenesis of the disease. The palatine process prior to fusion in the palatine formation showed increased sulfation of chondroitin sulfate (CS), and in mice dysfunctional for Chst11, a CS sulfotransferase, the expression of various ribosome biosynthesis-related molecules was attenuated and ATP production was suppressed, resulting in the development of cleft palate. The onset of cleft palate was prevented by restoring mitochondrial function. These findings reveal a regulatory mechanism of site-specific ribosome biogenesis by glycosylation in the formation of the palate.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：口蓋裂 リボソーム コンドロイチン硫酸 Chst11

1. 研究開始当初の背景

口腔・顎・顔面の形態は非常に複雑である。その形態形成の分子機構を明らかにすることは、口腔・顎・顔面の先天奇形の病態発症の理解や将来の治療法の開発の基盤となるため重要である。近年、分子生物学・発生生物学的研究によって、疾患の原因となる DNA の変異の影響とそれに伴う mRNA 発現への影響の検討は、複雑な形態形成の理解に多大な影響を与えてきた。一方、網羅的なプロテオーム解析によるタンパク質の解析とマイクロアレイによる mRNA の解析の間の相関関係が極めて低いことが明らかにされ、遺伝子発現に加え、リボソームにおけるタンパク質への翻訳効率が重要な役割を果たすことが示唆されるようになってきた (Xue and Barna, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012)。

最近、リボソームが形態形成や疾患の発症に果たす役割が注目されている。ヒトのリボソームは約 80 種類のタンパク質 (リボソームタンパク質: RP) と 4 種類の RNA (リボソーム RNA: rRNA) から構成される複合体である。リボソームは、mRNA の遺伝情報を読み取りタンパク質へと変換しタンパク質を合成するだけの静的な装置と考えられていたが、近年、リボソーム自体が結合タンパク質や化学修飾を介して翻訳の制御にかかわることが明らかにされている (Xue and Barna, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012)。

リボソーム病 (Ribosomopathy) は、正常にリボソームが生合成されないことが原因と考えられるヒトの疾患で、リボソームタンパク質あるいはリボソーム生合成に関わるトランス作用因子をコードする遺伝子の変異によって、ダイヤモンドブラックファン貧血、トリーチャーコリンズ症候群 (図 3)、X 連鎖角質性角化症、T 細胞急性リンパ芽球性白血病などの疾患が生じることが明らかにされてきた (海外共同研究者業績 3,4)。ショウジョウバエでは Minute 変異によってリボソームの生合成が阻害されると、身体全体が矮小化する。興味深いことに、ヒトでは、リボソーム関連タンパクに変異が生じると、全身に表現型が現れるのではなく、リボソームタンパクやサブユニットの変異に応じて部位特異的・臓器特異的に表現型が現れる。特に神経堤細胞由来の細胞が分布する口腔・顎・顔面領域における形成不全は本疾患の特徴であり、顎顔面の形態形成に特異的に関わるリボソーム関連タンパクの存在と、その分子の遺伝的脆弱性が示唆される。

リボソームの生合成を介した形態形成の分子機構が明かになれば、顎顔面の形態形成の複雑な制御機構を説明する所見として学術的に非常に意義が高い。また、顎顔面の先天性疾患の理解にもつながるため、臨床的にも意義が高い。さらに、リボソームの機能不全で生じる遺伝子改変動物の口蓋裂が、リボソームの生合成を活性化することで回復すれば、将来の胎児治療や予防治療につながる基盤的知見となるため、学術的にも臨床的にも意義が高い。

本研究では、従来の発生生物学・分子生物学的手法に加え、リボソーム関連タンパク群の同定と、各分子がタンパクの翻訳に関わる機能的な役割を検討することが必須である。また、リボソームの機能を検討するうえで、関連タンパクの網羅的な機能解析が重要である。しかしながら、我々は、これらの実験系の経験を有しておらず、その実施には設備、知識、経験を要し、その実施には、支援の必要性があった。

ストワーズ研究所のポール・トレイナー博士はトリーチャーコリンズ症候群などの病態発症における分子機構を世界に先駆けて明らかにしており、リボソームに関わる実験系に習熟している。特に、ノックアウトマウスの組織のリボソームの機能解析を含む、様々な研究手法に習熟し、成果を挙げている。そのため、本研究で、口腔・顎・顔面の形態形成におけるリボソーム生合成が果たす役割を検討するうえで、海外共同研究者であるポール・トレイナー博士から研究支援を得ることが必要であった。

本研究では当初、Runx1 の遺伝子改変動物を用いて、リボソームの役割を検討することにしていたが、Chst11 ノックアウトマウスで見られる口蓋裂において、リボソーム生合成に関わる分子の発現が減弱することを見出し、この遺伝子改変動物を用いてリボソームの役割を検討した。

2. 研究の目的

顎顔面の先天性奇形の病因は非常に複雑である。従来の多くの研究において、病態は mRNA の発現の変動をもとに理解されてきた。しかしながら、mRNA の発現動態と、タンパクの発現は必ずしも相関しないことも理解されるようになり、近年、リボソームにおける mRNA の翻訳における制御にも注目が集まるようになってきている。

ヒトのリボソーム病では、その病態や表現型が部位特異的、臓器特異的に表れる点の特徴である。最近では、リボソームはすべての細胞において均一ではなく、その関連タンパクの一部に部位あるいは組織特異的に不均一性があることが原因で、組織特異的な翻訳の特性が生じることが示唆されている。そのため、従来の mRNA を基盤においた研究成果に、リボソームの生合成による mRNA の翻訳の調整の機構を考慮すれば、複雑な顎顔面形成に関わる分子機構がより明確に理解できるようになると期待される。

本研究の目的は、従来のマウスを用いた遺伝子改変動物マウスの解析や網羅的な遺伝子発現

の変動を検討することで、未だ十分に明らかにされていないリボソーム生合成が口腔・顎・顔面の形態形成に果たす役割を検討することである。最終的には、薬理的な症状の回復まで検討することで、新規の治療法の基盤的な所見を得ることを目標とする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

Cre / loxP システムを介して *Chst11* 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスと間葉特異的 (*Wnt1-Cre*) トランスジェニックマウスを交配し、*Wnt1-Cre* ノックアウトマウスを作製した。

(2) in situ hybridization 法

DIG 標識 RNA プローブは、DIG RNA ラベリングキットを用いて事前に作成した。プローブは、*Chst11* の断片 (Allen Institute for Brain Science) から合成した。ハイブリダイゼーション後、各 mRNA の発現パターンを、抗 DIG-AP Fabfragments (Roche 社) にて検出し可視化した。

(3) 増殖細胞の検出

EdU 10 μ M 200 μ l 腹腔内投与を行った後、口蓋突起組織の凍結切片を作製し、Click-iT[®] EdU assay のプロトコルに従い、EdU 細胞を検出した。

(4) アポトーシスの検出

口蓋突起細胞のアポトーシスを ApopTag Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit (Sigma-Aldrich, USA) で検出した。

(5) 口蓋突起間葉組織の摘出

胎生 14.5 日齢 (E14.5) の胎仔を摘出後、口蓋突起間葉組織を摘出した。

(6) 遺伝子発現解析

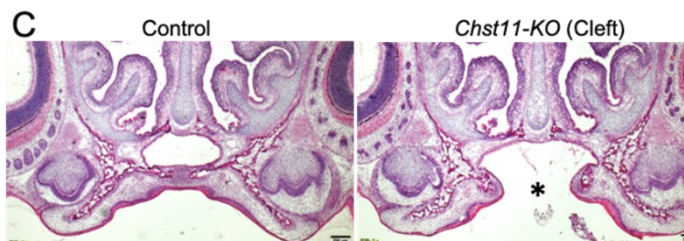
E14.5 胎仔の口蓋突起間葉組織から RNeasy[®] Plus Mini Kit を用いて RNA の抽出後、CAGE (Cap analysis of Gene Expression) 法にて 5' 末端のシーケンスを行い、各遺伝子発現量を定量解析した (株式会社ダナフォーム、神奈川)。各群での遺伝子発現パターンを GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) ソフトウェア (Broad Institute, USA) にてエンリッチメント解析することで、*Chst11* ノックアウトマウスにて特異的なパスウェイを抽出した。さらに、各群で発現量に差があった遺伝子は STRING 解析 (Elixir, UK) にて遺伝子間相互作用を可視化した。

(7) ATP の測定

E14.5 の胎仔の口蓋突起間葉組織を摘出した後、ATP Assay Kit-Luminescence (同仁化学) のプロトコルに従い、ルミノメーター GloMax[®] (Promega, USA) を用いて、ATP 量を測定した。

(8) MA-5 による口蓋の表現型のレスキュー

MA-5 はミトコンドリアの内部構造を維持する重要なタンパク質であるミトフィリンに結合し、さらに ATP 合成酵素と複合体を形成することで、ATP の産生効率を高めるという新しいメカニズムを持つ化合物である。*Chst11* で生じた口蓋裂が、MA-5 でレスキューできるか検討する。



4. 研究成果

(1) *Chst11* ノックアウトマウスの形態学的解析

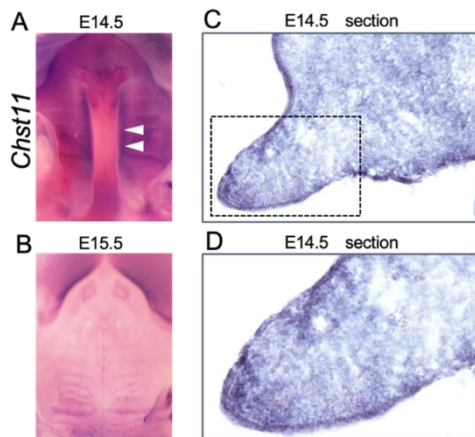
Wnt1-cre コンディショナルノックアウトマウスは全て生後直後に死亡し、口蓋裂の表現型を約 37.5% の割合で示した。このことから、口蓋裂の発症は、間葉組織における *Chst11* の欠失に関与していることが示唆された。

(2) *Chst11* 遺伝子の口蓋における発現パターンの解析

in situ hybridization 法にて *Chst11* 遺伝子は、口蓋形成時期である E14.5 の 2 次口蓋突起に高発現を認めた。E15.5 においては 2 次口蓋突起に発現は認めなかった。

(3) *Chst11* ノックアウトマウスの組織学的解析

E14.5 において口蓋突起の組織切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色を行った。その結果、Control 群の約 18.2%、ノックアウトマウス群の約 80% で口蓋突起の挙上を認めなかった。その後、



E18.5 のノックアウトマウス群の約 30% に口蓋裂を生じた。ノックアウトマウス群では、口蓋突起の挙上の遅延が生じ、その一部に口蓋裂を生じることが示唆された。

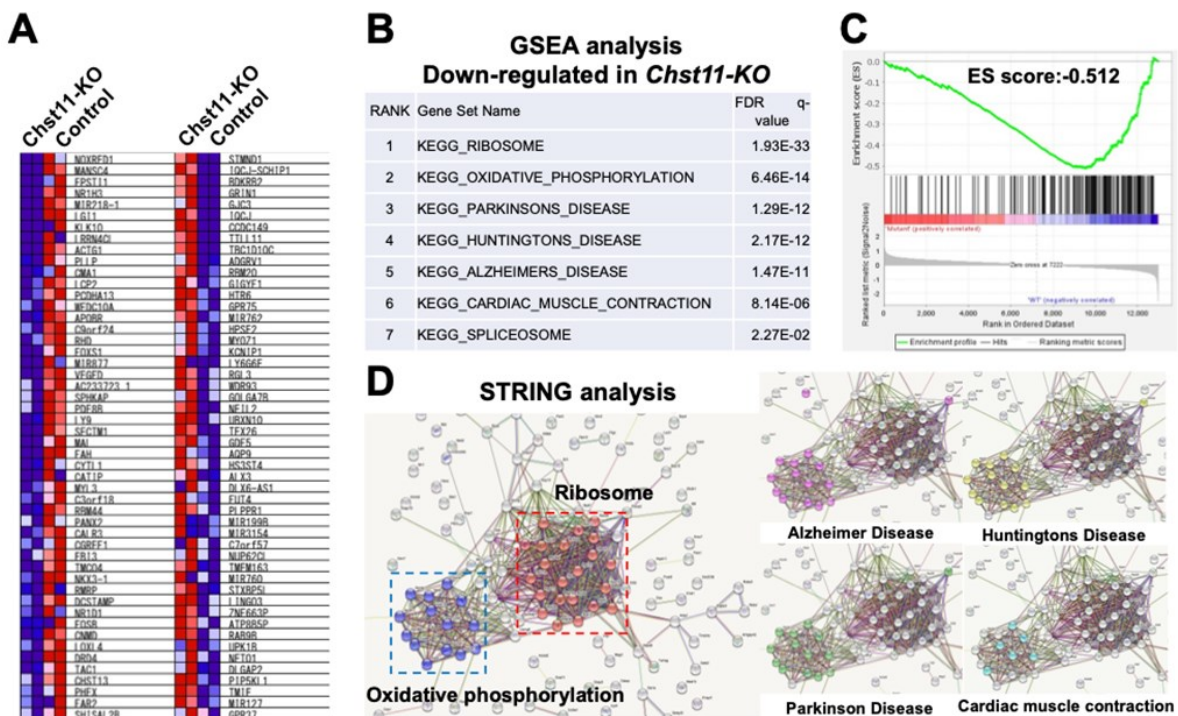
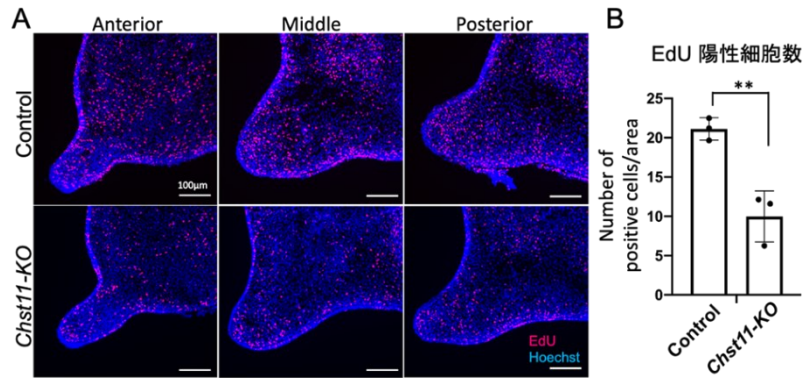
(4) 増殖能の検討

Edu 標識細胞数を Control 群と Chst11 ノックアウトマウス群で比較した。その結果、間葉細胞においても Edu 標識細胞が有意に低下していた。

(5) アポトーシスの検討

TUNEL 染色を用いて TUNEL 陽性細胞数を検出した。その結果、Control 群と Chst11 ノックアウトマウス群で有意な差は認められなかった。これらのことから、Chst11 ノックアウトマウスの口蓋形成不全には口蓋突起間葉細胞のアポトーシスではなく細胞増殖能が関与していることが示唆された。

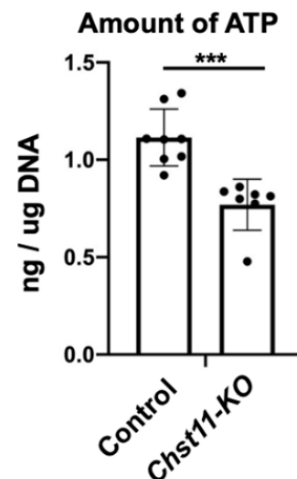
(6) Chst11 ノックアウトマウスの口蓋突起間葉組織の遺伝子発現の解析



Chst11 遺伝子が口蓋突起の細胞増殖能や挙上を制御するメカニズムについて検討した。E14.5 の口蓋突起間葉組織から RNA を抽出し、CAGE 法にて遺伝子発現の定量解析を行った。Chst11 ノックアウトマウス群において、RPS14, RPS19, RPS21 を始め様々なリボソーム生合成に関わる分子の発現が抑制されていることを見出した。このように発現減少が見られた遺伝子群を GSEA ソフトウェアにてエンリッチメント解析をしたところ、リボソーム、酸化的リン酸化、パーキンソン病、ハンチントン病、アルツハイマー病、心筋の収縮の 6 つのパスウェイが存在した。これらの 6 つのパスウェイは非常に高いエンリッチメントスコアを示していた。酸化的リン酸化はミトコンドリアにおける ATP 産生に関与しており、その低下はミトコンドリアの機能異常を示唆していた。

(7) Chst11 ノックアウトマウスの口蓋突起組織における ATP の測定

酸化的リン酸化はミトコンドリアにおける ATP 産生に関与しており、酸化的リン酸化の低下により ATP 産生量が低下することが示唆される。ATP 量を測定した結果、Chst11 ノックアウトマウスの口蓋突起間葉組織において ATP 量の低下を認めた (図 8)。口蓋突起間葉における細胞増殖能の低下には ATP の低下が関与していることが示唆された。



(8) MA-5 による口蓋裂発症のレスキュー

MA-5 を投与することで、Chst11 のヌル変異によって生じる口蓋裂の発症が有意に減少した。

これらの所見から、口蓋の形成における口蓋突起の形成において、コンドロイチン硫酸の糖鎖修飾によってリボソームの生合成が制御されていることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	青山 剛三 (Aoyama Gouzou) (00838542)	大阪大学・大学院歯学研究科・招へい教員 (14401)	
研究分担者	黒坂 寛 (Kurosaka Hiroshi) (20509369)	大阪大学・大学院歯学研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	村田 有香 (Murata Yuka) (90755068)	大阪大学・大学院歯学研究科・助教 (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		
米国	ストワーズ研究所		