

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390510

研究課題名（和文） 口蓋裂発症の過程におけるソニックヘッジホッグシグナルの関与

研究課題名（英文） Involvement of sonic hedgehog signaling in secondary palate formation

研究代表者

井関 祥子（ISEKI SACHIKO）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：80251544

研究成果の概要（和文）：

発生過程のさまざまな場面で機能し、体の正中構造を決定するソニックヘッジホッグ(Shh) 遺伝子の組織特異的エンハンサーMFCS4 の機能について検討した。MFCS4 は咽頭領域上皮における Shh の発現を誘導して発生中の舌筋の配列制御に深く関与することが明らかとなった。これより、二次口蓋形成過程の口蓋突起挙上に必要な、時期特異的口腔内空間の供給のための舌運動機能発現に関わることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

MFCS4 is one of tissue specific enhancers of mouse sonic hedgehog (Shh) gene and responsible for inducing Shh expression in oropharyngeal epithelium. The expression is involved in arrangement of myotubes in the tongue, which allows the tongue to function in descending itself at the stage of secondary palatal elevation that requires space in the oral cavity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：病態検査学、ソニックヘッジホッグ、口蓋、エンハンサー

## 1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂は日本を含めたアジア圏で高頻度に起きる先天異常で、その原因は環境要因、遺伝的要因が複雑にからみ、症候群性の先天異常の一表現型として現れる頻度が高い。一方、孤発性の口蓋裂も遺伝的要因の関与が強く示唆されているものの、これまでに

MSX1 (1, 2) および IRF6 (3) の2 遺伝子が同定されたにすぎない。ソニックヘッジホッグ (SHH) シグナルは、初期発生においては正中決定に機能し、その後の発生過程においては肢芽形成や頭蓋顔面の発生に関与している。さらに SHH シグナル分子における変異は母斑基底細胞癌の原因であり、口腔領域でもエナ

メル上皮腫や口腔扁平上皮癌との関連が指摘されるなど、その機能が多岐にわたるシグナルである。Shh 関連分子はマウス頭蓋顎顔面の発生過程において時間・空間特異的な発現を示し、頭蓋顎顔面の形成への強い関与が示唆されている(4)。しかし、遺伝子機能解析のための強力なツールである遺伝子ターゲットング、いわゆる Shh のノックアウトマウスでは頭部の形成がほぼ起こらず(5)、哺乳類頭蓋顎顔面の形態形成における Shh の役割について詳細な解析を行うことは不可能であった。近年 Shh の発現を直接制御するプロモーターに加え、組織特異的なエンハンサーが複数発見された(6)。この中の MFCS4 配列は哺乳類から魚類まで保存されている配列で、その活性は胎齡 10.75~15 日に、舌背・咽頭・軟口蓋などの上皮に出現し、同時期同部位での Shh の発現と一致している。マウスでこの配列を欠失させると(MFCS4<sup>-/-</sup>と表記)外観上頭蓋顎顔面の形成は起きるが、軟口蓋が前後に短くなり、また喉頭や舌骨および甲状軟骨が低形成になるなど口腔咽頭領域の形成に異常が認められたことから咽頭領域特異的な Shh の発現を制御している(7)。Shh は、正常発生過程において口腔咽頭領域の上皮で発現するが、MFCS4<sup>-/-</sup>個体ではその発現レベルが低下していた。これより、MFCS4 配列が口腔咽頭領域の Shh 発現制御に主要な役割を果たし、またこの配列の欠失が当該領域における Shh の発現レベルの低下を誘導し、形態形成異常を引き起すと考えられた。ヒトにおいては SHH シグナルの喪失が holoprosencephaly の原因であり、holoprosencephaly 患者では高頻度に口唇口蓋裂を伴う。また口唇口蓋裂患者の CT スキャン解析により、舌骨の低石灰化、舌骨や喉頭の位置異常が認められ、口蓋裂発症との関連も示唆されている(8)。これらの報告と MFCS4<sup>-/-</sup>マウスの表現型から、Shh シグナルが口蓋を含めた咽頭領域の発生において役割を果たすこと、また、Shh の発現量と表現型が関連する、すなわち Shh シグナルの減弱と口蓋および咽頭領域発生異常の表現型の重篤度に関連があることが示唆される。そして、マウスのみならずヒトにおける MFCS4 配列の機能不全が口蓋裂や鼻咽腔閉鎖不全の原因

であると示唆される。

- 1) Jezewski PA. et al. J Med Genet. 2003 Jun; 40(6): 399-407.
- 2) Suzuki Y. et al. Genet Med. 2004 May-Jun; 6(3): 117-25.
- 3) Zuccherro et al. N Engl J Med. 2004 Aug 19; 351(8): 769-80
- 4) Hu D. et al. Development. 1999 Nov; 126(21): 4873-84.
- 5) Chiang C. et al. Nature. 1996 Oct 3; 383(6599): 407-13
- 6) Sagai T. et al. Development. 2005 Feb; 132(4): 797-803.
- 7) Sagai T. et al. Development. 2009 May; 136(10): 1665-74
- 8) Rajion ZA. et al. Cleft Palate Craniofac J. 2006 Sep; 43(5): 532-8.

## 2. 研究の目的

発生過程における口腔咽頭領域での Shh の発現量低下が口蓋裂の原因となる可能性は、MFCS4<sup>-/-</sup>の表現型からも強く示唆される。そこで、Shh 発現量低下と表現型の関連についてマウス変異体を用いて検討する。定量的 in situ hybridization を確立して野生型、MFCS4<sup>-/-</sup>、MFCS4<sup>+/-</sup>; Shh<sup>+/-</sup> 個体における Shh シグナルの強度を Shh シグナル関連分子の発現レベルとして数値化する。そしてその強度と咽頭領域の発生、特に口蓋(軟口蓋の短小化、口蓋裂)、舌骨領域の形成異常の度合い、組織分化度などとの比較検討を行う。

次に、孤発性口蓋裂を含めたヒト口蓋裂に口蓋発生に関連している遺伝子について MFCS4<sup>-/-</sup>および MFCS4<sup>+/-</sup>; Shh<sup>+/-</sup> マウス口腔咽頭領域における発現の変化について検討し、Shh とこれら分子の相互作用を明らかにする。

さらにヒト MFCS4 配列における遺伝子多型を明らかにし、その多型性が口蓋裂発症の原因となる可能性について検討する。多型が認められる部位に対してその部位と相互作用する分子の予測を行う。

## 3. 研究の方法

定量的 in situ hybridization

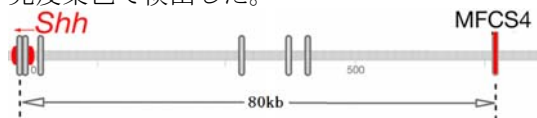
マウス Shh 配列に特異的な配列を合成し標識して Shh mRNA に対するプローブとした。

配列はオープンリーディングフレーム内で40basesのcDNAに対する相補的な標識DNAプローブを複数設計し、hybridization後にチラミドシステムを用いてシグナルを増幅した。

マウス変異体 MFCS4<sup>+/-</sup>; Shh<sup>+/-</sup>

二次口蓋の発生は以下の過程を経る。上顎突起下面から口蓋突起が発生し、口腔内で舌の両側を下方へと伸長する段階、次いで口蓋突起が舌の上へと向きと位置を変える拳上の段階、そしてさらに互いに近づく向きに伸長し癒合へ至る段階である。口蓋裂はこれらの段階のいずれかに不全があった結果である。MFCS4<sup>+/-</sup>; Shh<sup>+/-</sup>でどの段階に不全があるか組織学的観察で検討する。

MFCS4は前述のとおり、Shhのエンハンサーのひとつで、MFCS4はShhの発現を誘導すると判断されている。MFCS4<sup>+/-</sup>; Shh<sup>+/-</sup>個体では100%口蓋裂を発症し、哺乳不能により出生後1日までにすべてが死亡した。Shhのみのヘテロ欠失個体には表現型がない。従ってMFCS4活性部位である舌後方・咽頭・軟口蓋における胎齢10.75-15.0日のShhの発現が口蓋発生に必要であると切り分けることができる。そこで、MFCS4の活性と口蓋発生の時期が重なる胎齢11.75, 12.75, 13.75日のマウスを観察した。MFCS4の活性は胎齢11.5日に舌背、切歯歯胚、下垂体窩、耳管、口蓋突起、喉頭蓋、披裂軟骨に見られ、これが胎齢13.5日では舌背、軟口蓋、喉頭蓋、披裂軟骨で持続している。この直後に口蓋突起は水平拳上する。この一連の二次口蓋発生過程におけるShhとその受容体であるPtcの発現を、そして口蓋突起の拳上に貢献する舌の発生についてMyf5とMyoD1の発現を、さらに二次口蓋発生に関与するとされている遺伝子の発現をin situ hybridizationによって検討する。舌筋の機能的な成熟はDesminの免疫染色で検出した。



ヒトMFCS4配列は第7染色体の122,352,021 - 122,353,046に位置し、全長1428bpである。これはヒトSHHの

155,285,497 - 155,294,527から80kbほど離れている。出生時に口蓋裂であった提供者と口蓋裂のなかった提供者100人から血液など体細胞を検体として得てゲノムDNAを抽出した。ヒトMFCS4をPCRにより増幅し、遺伝子配列を学内シーケンスサービスに依頼して読み取った。5'側と3'側から読み取ることによって読み取り誤差と機器の特性の介入を減らし、ヘテロな配列多型の検出精度を上昇させた。研究開始前、既知の一塩基多型はMFCS4の中に4つであった(www.ncbi.nlm.nih.gov)。なお、本研究は東京医科歯科大学倫理委員会の承認を得ている。

#### 4. 研究成果

##### 定量的 in situ hybridization

Shhは発生過程の口腔・咽頭領域では口蓋趣壁、歯胚、味蕾原器のいずれも上皮に発現がある。定量ISHの確立を目的として、Shhプローブを複数合成してISHを行った。シグナルが歯胚のenamel knotに発現するプローブが得られたことから(図1、矢印)、in situ hybridization (ISH)は確立されたと考えられ、野生型とミュータントでの口腔咽頭領域でのShh発現の強度の比較を行う予定となっている。また、代表的なShhの標的遺伝子の発現量についても比較する目的で、Gli1遺伝子のISHを行ったところ、いずれのプローブもS/N値が低かった。今後別の標的遺伝子であるPatchedのプローブを作成してISHを行い、S/N値およびShhのシグナルの強さについて検討する予定である。

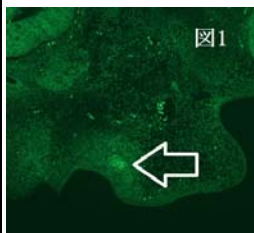
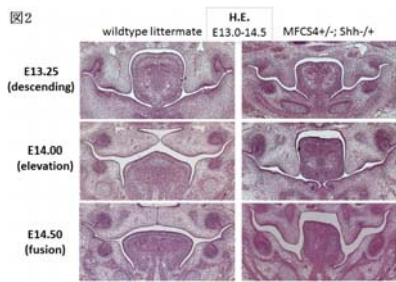


図1

マウス変異体 MFCS4<sup>+/-</sup>; Shh<sup>+/-</sup>

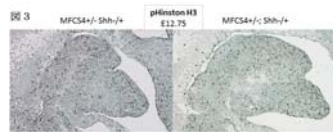
MFCS4<sup>+/-</sup>; Shh<sup>+/-</sup>個体で起こる口蓋裂は、口蓋突起の拳上に失敗することで起こることが、組織学的な観察で判明した(図2)。口蓋突起の拳上に失敗する内的な原因は、口蓋突起の伸長の不足や拳上する自発的な力の不足で、前者は細胞増殖の不足、後者は細胞外基質の分泌不足に起因するとされている。外的な原因は、口蓋突起拳上のための空間の不足であり、内舌筋による舌自身の動き、



外舌筋や咀嚼筋による舌や下顎の運動が不十分・欠失で口蓋突起が拳上

する空間が不足する。実際、口蓋突起の拳上時期は胎児が羊水嚥下や首振り運動を開始する時期と一致している。

内的な原因について、まず伸長中から拳上直前までの間の口蓋突起中の細胞増殖をリン酸化Histone3に対する免疫組織

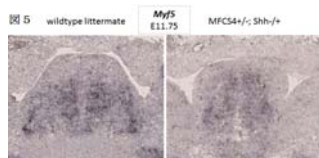


化学染色により検討したが、MFCS4<sup>+/-</sup>; Shh<sup>-/+</sup>個体で野生型と比較して有意な低下を認めなかった(図3)。細胞外基質のうち口蓋突起拳上には主に Collagen type I と hyaluronic acid が貢献するので、これらについても免疫組織化学染色により検討したが有意な差を認めなかった。さらに、MFCS4<sup>+/-</sup>; Shh<sup>-/+</sup>個体の口蓋突起を含む上顎体を胎児から切り出して器官培養に供したところ、口蓋突起は拳上し癒合に至った

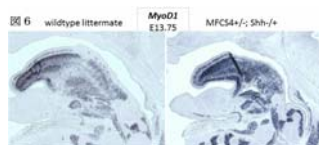


(図4)。このことから、内的な原因があったとしても極めて少ないことが示された。

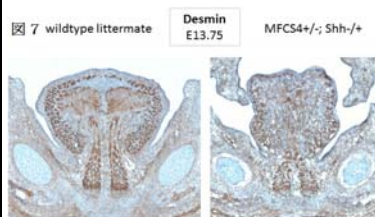
外的な原因は舌内・舌外・下顎の位置と形を変える神経筋複合体の異常であるので、それらの筋形成と機能発現について評価した。内外舌筋群や開口筋群は骨



格筋とほぼ同様の発生様式を示すことから、まず骨格筋の発生に必須な転写因子である Myf5 と MyoD1 の発現を ISH により検討したところ、MFCS4<sup>+/-</sup>; Shh<sup>-/+</sup>個体においても筋芽細胞に発現を認めた(図5,6)。



筋の機能発現は、筋の収縮に必要な構造である Z 帯の構成成分 desmin に対する免疫組織化学染色により評価した。筋の存在すべき部位では desmin の発現も認められ、MFCS4<sup>+/-</sup>; Shh<sup>-/+</sup>個体でも筋芽細胞は筋細胞へと分化すると判断された(図7)。ところが、その筋芽細胞や分化を遂げた筋細胞の分布・配列状態は、MFCS4<sup>+/-</sup>; Shh<sup>-/+</sup>個体において大きく乱れており、筋の機能を正しく発揮できないと想定された(図7)。Shh は発生過程の正中形成に中心的な役割があるが、図7に見えるようなオトガイ舌筋の2腹の癒合は Shh の低下による正中形成不全と考えられる。また、筋細胞の分布・配列状態は筋芽細胞以外の間葉細胞との空間占有のバランスで成り立つであろうことから、MFCS4<sup>+/-</sup>; Shh<sup>-/+</sup>個体における舌背での Shh の発現低下が舌内の間葉細胞の存在を不十分にしていることが原因であると示唆された。また、過去の報告からは Myf5 が Shh の直接支配の下にあるとされているが、この影響は少ないことも同時に判明した。



立つであろうことから、MFCS4<sup>+/-</sup>; Shh<sup>-/+</sup>個体における舌背での Shh の発現低下が舌内の間葉細胞の存在を不十分にしていることが原因であると示唆された。また、過去の報告からは Myf5 が Shh の直接支配の下にあるとされているが、この影響は少ないことも同時に判明した。

#### ヒト MFCS4 配列における遺伝子多型

19 箇所の一塩基多型を新規に発見した。新規多型のうち2箇所は口蓋裂を持って生まれた提供者からしか発見されなかったため、その2か所は MFCS4 の機能において特に重要な部分に含まれているであろうと推定される。一塩基多型の詳細は未発表データのため掲載を見送る。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)  
すべて査読有

- Hjiantoniou E., Anayasa M., Nicolaou P., Bantounas I., Saito M., Iseki S., Uney J.B., Phylactou L.A. (2008) Twist induces reversal of myotube formation.

Differentiation 76, 182-192

2. Vivatbuttsiri P., Ichinose S., Hytonen M., Sainio K., Eto K., Iseki S. (2008) Impaired meningeal development in association with apical expansion of calvarial bone osteogenesis in the *Foxc1* mutant. *J. Anat.* 212, 603-611
3. Yoshida T., Vivatbuttsiri P., Morriss-Kay G., Saga Y., Iseki S. (2008) Cell lineage in mammalian craniofacial mesenchyme. *Mech. Dev.* 125, 797-808.
4. McBratney-Owen B., Iseki S., Bamforth S.D. Olsen B.R., Morriss-Kay G.M. (2008) Development and tissue origins of the mammalian cranial base. *Dev. Biol.* 322, 121-132.
5. 村嶋真由子、三島木節、阿部成宏、岡田尚子、香月佑子、飯島 伸、佐藤 豊、吉増秀實、壬生美智子、天笠光雄 (2010) 唇顎口蓋裂患者の長期観察結果についての検討 日本口蓋裂学会雑誌 32, 173-185.
6. Harada M., Murakami H., Okawa A., Okimoto N., Hiraoka S., Nakahara T., Akasaka R., Shiraishi Y., Futatsugi N., Mizutani-Koseki Y., Kuroiwa A., Shirouzu M., Yokoyama S., Taiji M., Iseki S., Ornitz D.M., Koseki H. (2009) FGF9 monomer/dimer equilibrium regulates extracellular matrix affinity and tissue diffusion. *Nat. Genet.* 41 (3) 289-298.
7. Sagai T., Amano T., Tamura M., Mizushina Y., Sumiyama K., Shiroishi T. A cluster of three long-range enhancers directs regional Shh expression in the epithelial linings. *Development.* 2009 May; 136(10): 1665-74.
8. Shikanai M., Asahina K., Iseki S., Teramoto K., Nishida T., Shimizu-Saito K., Ota M., Eto K., Teraoka H. (2009) A novel method of mouse ex utero transplantation of hepatic progenitor cells into the fetal liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381 (2) 276-282.
9. Mikura A., Okuhara S., Saito M., Ota M., Ueda K., Iseki S. (2009) Association of *Tenascin-W* expression with mineralization in mouse calvarial development. *Congenit. Anom. (Kyoto)* 49 (2), 77-84.
10. Kimura A., Inose H., Yano F., Fujita K.,

- Ikeda T., Sato S., Iwasaki M., Jinno T., Ae K., Fukumoto S., Takeuchi Y., Itoh H., Imamura T., Kawaguchi H., Chung UI., Martin JF., Iseki S., Shinomiya K., Takeda S. (2010) Runx1 and Runx2 cooperate during sternal morphogenesis. *Development* 137(7): 1159-67.
11. Iseki S. (2011) Disintegration of the medial epithelial seam: Is cell death important in palatogenesis? *Dev. Growth Diff.* 53, (2): 125-276.

[学会発表] (計 37 件)

1. Iseki S., Ichinose S., Vivatbuttsiri P. Impaired meningeal development is associated with defects in skull bone development. 第 48 回日本先天異常学会学術集会 平成 20 年 6 月 28-30 日 東京
2. 奥原滋、齋藤正寛、太田正人、井関祥子 tenascin-N の骨芽細胞分化への関与 第 50 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会 平成 20 年 9 月 23-25 日 東京
3. 塗 隆志、上田晃一、井関祥子、太田正人、大場創介、奥原滋、三倉文子 Saethre-Chotzen 症候群モデルマウスにおける頭蓋骨の成長 第 17 回日本形成外科学会基礎学術集会 平成 20 年 10 月 2-3 日 東京
4. Iseki S., Ichinose S., Vivatbuttsiri P. Impaired meningeal development is associated with defects in skull bone development in the *Foxc1* mutant mouse. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 平成 20 年 12 月 9-12 日 神戸
5. Sato Y., Yoshimasu H., Amagasa T. Application of maxillary distraction for patients with cleft maxillary hypoplasia. The 8th Asian Congress of Oral & Maxillofacial Surgery. 平成 20 年 11 月 4-7 日 Thailand
6. 鈴木 尋之、須田直人、井関祥子、森山啓司: FGFR2IIIc-S252W 及び Soluble form of FGFR2IIIc-S252W トランスジェニックマウスを用いた頭蓋骨骨芽細胞の分化制御の検討 第 27 回日本骨代謝学会 平成 21 年 7 月 23-25 日 大阪
7. Okuhara S., Sagai T., Shiroishi T., Iseki S. Involvement of cis-regulatory element of sonic hedgehog in palatal



development. 16th International Society of Developmental Biologists Congress 6-9 September 2009 Edinburgh, England

8. Iseki S., Nakahara T., Ota M. FGF18-induced osteoblast differentiation in developing mouse fetal calvaria. The 26th NAITO Conference on Osteobiology 4-7, November 2009, Awaji Hyogo, Japan

9. Iseki S., Vivatbuttsiri P., Okuhara S. Involvement of Foxc1 in blood vessel formation of craniofacial region. 第32回日本分子生物学会年会 平成21年12月9-12日 東京

10. 五十嵐英、三島木節、香月佑子、長岡亮介、村嶋真由子、佐藤 豊、吉増秀實、天笠光雄 片側性唇顎口蓋裂患者における口蓋形成術後の口蓋骨形成と上顎歯槽弓形態の検討 第33回日本口蓋裂学会総会・学術集会 平成21年5月28-29日 東京

11. Nagayama S., Nakahara T., Ota MS., Iseki S. FGF18 enhances osteogenesis of mouse fetal skull bone. Gordon Research Conference "Fibroblast Growth Factors in Development & Disease" 平成21年3月14-19日 Ventura, California, USA

12. Nikolaos M., Mustafa A., Antonis, A., Iseki S., Uney J., Phylactou L. Twist reverses muscle cell differentiation. Molecular and Cellular basis of Regeneration and Repair, EMBO Conference Series 平成21年9月26-30日 Sesimbra, Portugal

13. 長岡亮介、奥原滋、天笠光雄、井関祥子 胎児期低酸素状態が顔面形成に与える影響 第50回日本先天異常学会学術集会 平成22年7月8-10日 淡路市

14. 鈴木尋之、須田直人、志賀百年、谷本幸穂、中村正孝、井関祥子、森山啓司: Apert症候群型の変異FGFR2とその可溶性変異体を過剰発現するトランスジェニックマウスの解析 第69回日本矯正歯科学会 平成22年9月27-29日 横浜

15. 永山友子、中原貴、太田正人、春日井昇平、井関祥子: FGFシグナルの胎児マウス頭蓋冠骨芽細胞分化に与える影響 第30回日本炎症・再生医学会 平成22年8月5-6日 東京

16. Nagaoka R., Okuhara S., Amagasa T., Iseki S. Effects of embryonic hypoxia on

maxillofacial development. The 16th International Society of Differentiation Conference 平成22年11月15-18日 Nara

17. Okuhara S., Sagai T., Nagaoka R., Amano T., Shiroishi T., Iseki S. Cleft palate in compound heterozygote of sonic hedgehog and MFCS4 The 16th International Society of Differentiation Conference 平成22年11月15-18日 Nara

18. Suzuki H., Suda N., Shiga M., Tanimoto Y., Nakamura M., Iseki S., Moriyama K. Osteoblastic differentiation of transgenic mice overexpressing Apert syndrome-type mutant FGFR2 and its soluble form. The 10th Tooth Morphogenesis and Differentiation 平成22年9月1-4日 Berlin

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井関 祥子 (ISEKI SACHIKO)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号: 80251544

### (2) 研究分担者

天笠 光雄 (AMAGASA TERUO)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号: 00014332

須田 直人 (SUDA NAOTO)  
明海大学・歯学部・教授  
研究者番号: 90302885

佐藤 豊 (SATO YUTAKA)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教  
研究者番号: 90361716

太田 正人 (OTA MASATO)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教  
研究者番号: 70313228

### (3) 連携研究者

城石 俊彦 (SHIROISHI TOSHIHIKO)  
国立遺伝学研究所・教授  
研究者番号: 90171058