

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791581
 研究課題名 (和文) 口蓋裂発症分子メカニズムを解明し、組織工学的治療法開発を目指す研究

研究課題名 (英文) Research that clarify the mechanism of cleft palate disease, and aim to development of tissue engineering treatment for palatal tissue.

研究代表者

岡 暁子 (KYOKO OKA)
 福岡歯科大学・歯学部・助教
 研究者番号：60452778

研究成果の概要 (和文)：口蓋組織における神経堤細胞の局在を *Wnt1-cre;R26R* マウスを用い解析した結果、神経堤細胞は、硬口蓋間葉細胞を始め、軟口蓋では、蝶形骨翼状突起周囲で *Scleraxis* を発現し口蓋帆張筋と連続する腱組織、さらに *Type I collagen* を強く発現する口蓋腱膜を形成していた。TGF- β シグナルは、神経堤細胞の細胞増殖と *Type I collagen* 発現に促進的に働いていることを確認し、口蓋形成に重要なシグナルであることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The results of analysis for localization of cranial neural crest cells (CNC) in palatal tissue by using *Wnt1-cre;R26R* mice, not only hard palate also soft palate was composed by CNC. During development of soft palate, palatine aponeurosis is organized by CNC cells expressing *Col I* mRNA. TGF- β signaling controls the proliferation of palatal mesenchymal cells and induces Col I protein deposition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：神経堤細胞・口蓋裂・TGF- β シグナル

1. 研究開始当初の背景

口蓋発生時において、二次口蓋の水平的成長は口蓋形成には必須であり、この成長が阻害されると、両口蓋棚は互いに接することが

できず、結果として口蓋裂を発症する。二次口蓋を形成するのは、主に間葉組織では神経堤由来細胞と中胚葉由来細胞である。前者は主に口蓋骨を(硬口蓋)、後者は口蓋帆張筋、

帆挙筋などの摂食・嚥下及び発育機能に重要な骨格筋（軟口蓋）を含む組織で構成されている。さらに二次口蓋は、間葉組織の神経堤由来細胞、中胚葉由来細胞に加えて、それらを取り囲む外胚葉由来の上皮細胞と大きく 3 種類の細胞群からなる。口蓋発生の分子生物学的研究においては、口蓋裂を発症する遺伝子改変マウスの解析を中心とし、口蓋発生に必要な不可欠な遺伝子の同定がさかんに行われている。しかしながら、一つの口蓋を骨組織である硬口蓋と、骨格筋組織を含む軟口蓋とをわけて解析している研究は殆どない。現在、口蓋裂治療は、単純に裂部の閉鎖という物理的な修復を中心としたアプローチで行われている。しかし、咬合、咀嚼、発音などを視野にいれた口蓋組織の機能的な修復を目的とするならば、口蓋形成を組織別に詳細に解析することが重要であり、それぞれの動態を把握することは、組織再生を視野にいれた組織工学的アプローチを目指していくためには必須であると考えられる。

形質転換成長因子（以下 TGF- β ）は、全身のあらゆる器官に幅広く存在する。本分子は、細胞遊走、増殖、分化、細胞外器質産生など様々な過程で重要な役割を演じている。さらに、口蓋の発生においても大変重要な機能を有する。我々研究グループは、Cre-LoxP 遺伝子組み換え系を用いることによって、先に示した口蓋を構成する 3 つの細胞群におけるコンディショナルノックアウトマウスを作成した。これらマウスを用いた解析により、骨芽細胞、軟骨細胞、口腔上皮細胞、線維芽細胞における TGF- β の機能を明らかにしたことは、これらの細胞で組織される口蓋の解析にも参考になると考えられる (Ito et al. Dev. 2003, Xu et al. Dev Biol. 2006, Hosokawa et al. Dev Biol. 2007)。

2. 研究の目的

本研究は、口蓋発生に関与する因子について TGF- β シグナルに着目し解析を行い、特に神経堤細胞から発信される TGF- β シグナルの下流シグナルネットワークを骨細胞・骨格筋細胞に分けて解析することによって、硬口蓋と軟口蓋それぞれにおける成長因子を同定することを目的としている。具体的には、以下の 3 つの柱を具体的な目的として進めていく。

(1) 口蓋を形成において主要な 3 種の組織由来の細胞分布について、組織学的に解析する。

(2) TGF- β シグナルの下流に存在する遺伝子を同定する。そして各組織由来の細胞の役割と細胞間のシグナルクロストークを解明し、口蓋発生機序を分子生物学的に解明する。

(3) 同定した TGF- β シグナル下流の遺伝子について、機能的解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 口蓋を形成において主要な 3 種の組織由来の細胞分布について、組織学的に解析する。

神経堤細胞の局在を視覚化するため、遺伝子改変マウス、*Wnt1-cre* マウスと、*R26R* マウスを交配し、*Wnt1-cre; R26R* マウスを作成し、X-gal 染色を施行する。

(2) TGF- β シグナルの下流に存在する遺伝子を同定し、各組織由来の細胞の役割と細胞間のシグナルクロストークを解明し、口蓋発生機序を分子生物学的に解明する。

これまで行った、TGF- β II 型のレセプターのコンディショナルノックアウトマウスを用いた解析や、その他、TGF- β シグナルのリガンド、受容体の遺伝子改変マウスを用いた報告から、TGF- β シグナルの下流のシグナルについていくつか候補を絞り、それら遺伝子

の発現を、in situ hybridization、免疫組織化学染色を用いて調べる。

(3) 同定した TGF- β シグナル下流の遺伝子について、機能的解析を行う

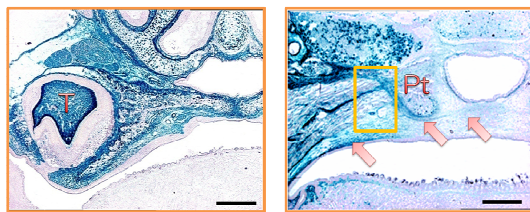
(2)の解析で得られた、TGF- β シグナル下流の遺伝子候補について、TGF- β 刺激に対する反応を口蓋の器官培養を用いて調べ、口蓋の成長における作用を確認する。

4. 研究成果

(1) 胎生 18.5 日齢における神経堤細胞の局在

Wnt1-cre; R26R マウスを作出し、X-gal 染色を施行した。胎生 18.5 日齢における神経堤細胞の局在を、図 1 に示す。

図 1. 硬口蓋と軟口蓋における神経堤細胞の局在



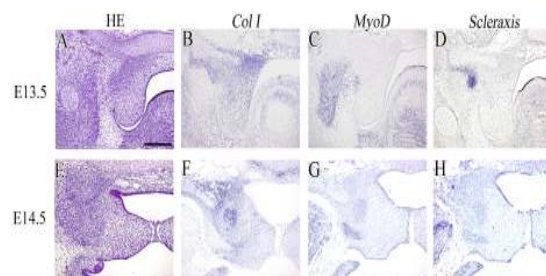
硬口蓋においては、口蓋骨、その周囲の結合組織は、神経堤細胞によって構成されていた(図 1 左)。軟口蓋においては、神経堤細胞は、間葉細胞が帯状に凝集して形成される口蓋腱膜を構成し、さらに骨格筋周囲の結合組織、口蓋帆張筋と口蓋腱膜とを接合する腱も構成していた(図 1 右 矢印)。この解析により、軟口蓋発生においては、口蓋筋群の停止部位となる口蓋腱膜が最初に形成されることがわかり、軟口蓋においても神経堤細胞の挙動が重要であることが明らかとなった。

(2) -1. TGF- β シグナルの下流に存在する遺伝子を同定

(1)の解析によって、軟口蓋においてもその発生時には中胚葉由来の細胞ではなく、神

経堤細胞が口蓋間葉組織での主役を担っており、口蓋腱膜の形成が正常に行われることがその後の軟口蓋の組織形成に重要であることが分かった。そこで、口蓋腱膜形成に着目し解析を進めた。口蓋腱膜発生における細胞の特性を調べるため、結合組織形成に重要である細胞外基質である、*Type 1 collagen*、骨格筋細胞のマーカーである *MyoD*、腱細胞のマーカーである *Scleraxis* の発現を in situ hybridization を用いて調べた(図 2)。

図 2. 各細胞マーカーの発現



胎生 13.5 日齢時、軟口蓋領域の口蓋棚は、舌の両側に垂直に位置している。間葉組織には、*Type 1 collagen* が全体的に発現しているものの、*MyoD* と *Scleraxis* の発現は認められなかった。胎生 14.5 日齢時には、左右の口蓋棚は、舌の上へ挙上され水平位となり癒合する。この時期での *Type 1 collagen* の発現は、その後の口蓋腱膜形成予定領域で促進されていることが観察された。腱細胞のマーカーである *Scleraxis* は、蝶形骨翼状突起周囲でその発現が認められたが、口蓋腱膜領域には認められなかった。

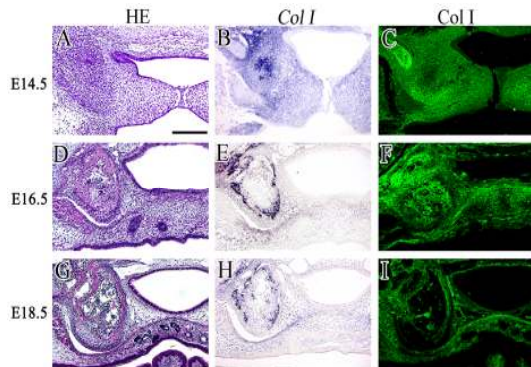
(2) -2. *Type 1 collagen* の発現の経時的変化

各細胞分化マーカーの解析から、口蓋腱膜は、*Type 1 collagen* を発現する細胞によって形成されていることが明らかとなった。そこで、胎生のさらに後期における *Type 1*

collagen の発現について、蛋白質レベルでの発現もあわせて解析した (図 3)。

図 3. Type I collagen の発現

Type I collagen は、胎生 14.5 日齢の口蓋間葉組織全体で発現がみとめられたが、m



RNA の発現パターンと同様に、胎生 14.5 日齢以降では、口蓋腱膜でさらに強い発現を認めた。(2) -1、2 の結果を考え併せると、神経堤細胞は、自ら *Type I collagen* を発現し、細胞外基質を産生し、細胞を凝集させながら口蓋腱膜を形成していることが示唆された。

(3) TGF- β シグナルの機能的解析

軟口蓋における口蓋間葉細胞に対する、TGF- β シグナルの機能を解析するため、口蓋の器官培養システムを確立した。胎生 14.5 日齢の胎児マウスから実体顕微鏡下で口蓋組織を摘出し、24 時間培養した。TGF- β 蛋白の影響を確認するため、ゲルビーズに TGF- β 蛋白を吸収させ、口蓋間葉へ挿入し周囲に惹起される反応を観察した。コントロールとして、BSA を吸収させたビーズを用いた。細胞増殖活性を調べるため、組織採取後の 24 時間培養後に、培養液に BrdU を添加し、120 分培養後固定液にて組織を固定し、切片を作成した (図 4)。

図 4. 器官培養における TGF- β 蛋白の機能解析

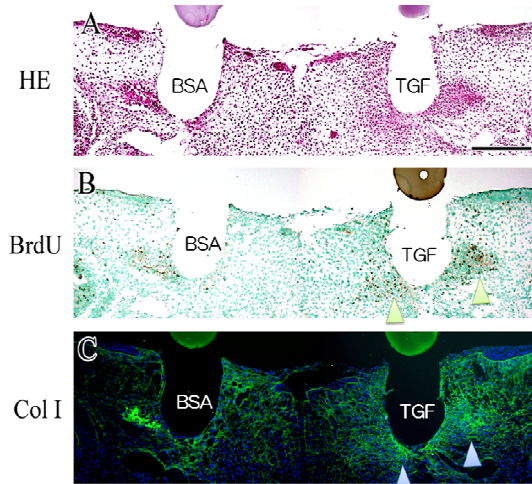


図 4 上段には、24 時間器官培養後の組織切片 HE 染色像を示す。BSA、TGF ビーズ周囲には、細胞密度の高い領域が観察される。これは、口蓋骨の原基であると考えられる。中段に、BrdU 染色を示す。上段で観察されたビーズ周囲の細胞密度の高い領域において、TGF- β ビーズ周囲では、BrdU 陽性の細胞が多数観察される。しかしながらコントロールである BSA ビーズ周囲では、BrdU 陽性細胞の数は、TGF- β ビーズと比較して少ない。さらに下段に Type I collagen の免疫組織化学染色を示す。TGF- β ビーズ周囲では、Type I collagen の発現が観察され、BSA ビーズ周囲と比較して明らかに増強された染色像が観察された。つまり、TGF- β は、口蓋の間葉細胞の細胞増殖を促進し、さらに細胞外基質である Type I collagen の発現を促すことで細胞の凝集を調節していることが明らかとなった。この TGF- β シグナルの作用は、軟口蓋組織における口蓋腱膜形成に重要であることが示唆された。

これまでの研究成果によって、軟口蓋の組織学的変化に加え、遺伝子レベルでのメカニズムの一部が明らかとなり、口蓋裂発症の原因因子の探索として新しい展開を示せた

と考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

(1) Oka K, Oka S, Cai Y.

The role of TGF- β signaling in cranial neural crest cells during mandibular and tooth development. *J Oral Biosci.* 51(3): 143-150, 2009. Review. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

(1) 岡 暁子

口蓋発生における TGF- β シグナルの役割
第 46 回 日本小児歯科学会大会
平成 20 年 6 月 12 日 さいたま市大宮区

(2) 岡 暁子

マウス軟口蓋・口蓋腱膜形成における
TGF- β シグナルの役割
第 115 回 日本解剖学会総会
平成 22 年 3 月 30 日 岩手県盛岡市 県民
会館

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 暁子 (OKA KYOKO)

福岡歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60452778

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：