

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10092

研究課題名(和文)顎顔面の発生過程における一次繊毛の機能解明：シグナル経路のクロストークの観点から

研究課題名(英文)Elucidating the function of primary cilia during maxillofacial development: In terms of signal pathway crosstalk

研究代表者

川崎 真依子 (Kawasaki, Maiko)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：40584587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、一次繊毛で機能するSHHとWNTシグナル経路を人為的に同時に制御し、シグナル経路間の相互作用を形態学的・分子生物学的手法を用いて解析することにより、顎顔面領域の発生過程における一次繊毛の機能を明らかにした。SHHとWNTを両方制御したマウスは、口蓋裂や歯数異常、歯の形態異常、歯の形成遅延などを認めた。しかしながら、その表現型は、それぞれ単独で制御したマウスのどちらかの表現型に近似していた。本研究により、表現型が極めてシビアな顎顔面領域の形態異常であったことから、SHHとWNTシグナル経路は、顎顔面の形態形成の制御因子として、非常に重要な役割をそれぞれ担っていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一次繊毛のこれまでの役割である、SHHやWNTによるシグナル伝達および細胞小器官の合成と維持に加え、本研究で明らかにされる新たな各シグナル間のクロストーク機構の解明より、一次繊毛のより詳細な機能解明が可能となり、歯学のみならず広範な基礎生物学の進展に寄与する。さらに、本申請研究は一次繊毛の機能解明だけでなく、SHH、WNTシグナル経路の異常を原因とする各種先天異常の原因の解明、治療法の開発に貢献できる。これまで対症療法しかなかった繊毛病治療にシグナル経路サイドからの遺伝子治療や予防薬の開発という新しい視点を提供することができる。患者に侵襲の少ない治療を提案することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, the interaction between SHH and WNT signaling pathways was analyzed using morphological and molecular biological techniques in transgenic mice in which both SHH and WNT signaling pathways functioning within the primary cilia were regulated. This revealed the function of primary cilia during the development of the maxillofacial region. Transgenic mice in which both SHH and WNT were regulated showed cleft palate, abnormal tooth number, abnormal tooth morphology, and delayed tooth formation. However, their phenotypes approximated either phenotype of mice in which each was controlled alone. The phenotypes of the mice created by this study were extremely severe morphological abnormalities in the maxillofacial region, indicating that the SHH and WNT signaling pathways each play a very important role as regulators of morphogenesis of the maxillofacial region.

研究分野：発生生物学

キーワード：SHH WNT 一次繊毛

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

一次繊毛 primary cilia はほとんどの動物細胞表面に位置する細胞小器官であり、細胞内外のシグナルを感受するアンテナ機能を有している。その機能不全はさまざまな疾患を引き起こす。これらは「繊毛病」と総称され、その多くは、顎顔面の形態異常を伴う。これらのことから、一次繊毛が顎顔面の形成に重要な役割を担っていることが強く示唆されている。これまでの研究により、SHH、WNT、PDGFのシグナル伝達が活性化する場所が一次繊毛であることが明らかになっている。BMP、SHH、WNT、FGF、TNF という主要なシグナル経路が時空間的に作用して歯が形成される。そのため、一次繊毛の機能不全は歯の形態異常を引き起こす。申請者のグループは一次繊毛をシグナル感受のアンテナとしている SHH シグナルの関連分子を単独で欠損させると、重度な歯の表現型を示すことを見出した。一方、顔面の発生過程では、WNT シグナル関連分子欠損マウスが重度な表現型を示した。これらの観察結果から、一次繊毛を介して機能する SHH と WNT シグナル経路が歯や顔面などの器官形成に関わっていることが想像される。さらに、一次繊毛の機能の全貌を解明するには、一次繊毛からのアプローチだけではなく、一次繊毛を介して行われる各シグナル活性を同一細胞内で、かつ同時に変動させる実験系が必要ではないかということを示している。申請者は、WNT シグナルまたは SHH シグナルを増強または減弱させる Flox マウスをそれぞれ組み合わせ、Cre-LoxP システムを用いて細胞特異的に変化させる実験を想起した。さらに Floxマウスに加え、各 Cre マウスでも神経堤由来細胞特異的 Cre(Wnt1 Cre)、口蓋突起特異的 Cre(Osr2 Cre)に、Flox マウスを交配し表現型を分析すれば、部位特異的に各シグナル経路間の相互作用や各シグナル経路が一つの器官形成に与える影響を明らかにすることが可能となると考えた。

### 2. 研究の目的

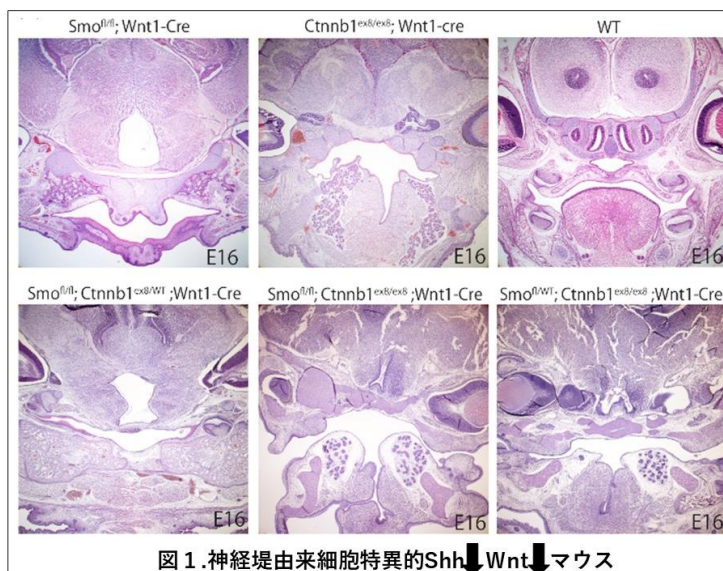
本研究の目的は、WNT と SHH という二つのシグナル経路を人為的に同時に制御し、シグナル経路間の相互作用を網羅的に解析することで、顎顔面領域の発生過程における一次繊毛の機能を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

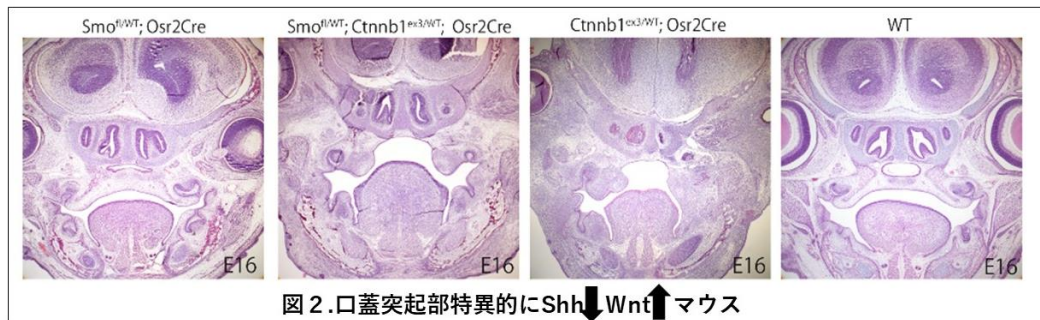
胎生期の顎顔面形成過程で、発現する部位が異なる Wnt1-Cre、Osr2-Cre マウスを、各種 Flox マウスと交配し、形態解析により、SHH と WNT シグナルの同時の発現が顎顔面形成にどのように影響するのか明らかにする。

### 4. 研究成果

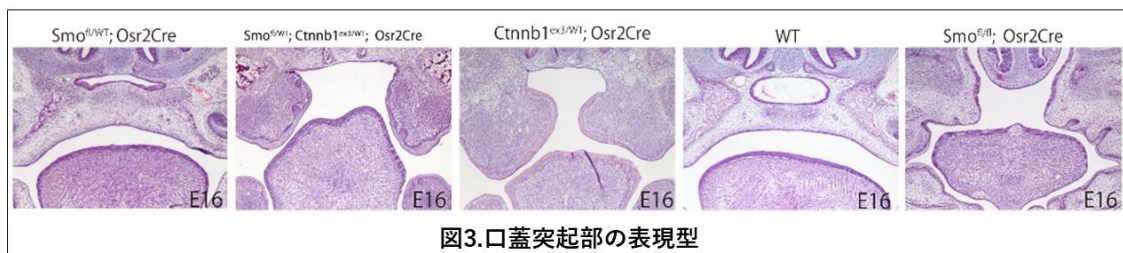
最初に、神経堤由来細胞特異的に SHH シグナルの関連分子を減弱させ、WNT シグナルの関連分子も減弱させたマウス ( $Smo^{f1/f1}; Ctnnb1^{ex8/ex8}; Wnt1Cre$  とする) を作成し解析を行った。神経堤由来細胞特異的に SHH シグナルの関連分子のみ減弱させたマウス ( $Smo^{f1/f1}; Wnt1Cre$  とする) と WNT シグナルの関連分子も減弱させたマウス ( $Ctnnb1^{ex8/ex8}; Wnt1Cre$  とする) は、どちらも口蓋裂と歯の形成



不全を示した。さらに、*Ctnnb1<sup>ex8/ex8</sup>; Wnt1Cre* マウスは、顎下腺が舌脇に位置し、眼は中央寄りに位置し、顔面には突起の癒合不全と多数の異所性の突起を認めた(図1上段)。この2種類のマウスのWノックアウトマウスである、*Smo<sup>f1/f1</sup>; Ctnnb1<sup>ex8/ex8</sup>; Wnt1Cre* マウスは、それぞれ単独の表現型を比較してシビアであった *Ctnnb1<sup>ex8/ex8</sup>; Wnt1Cre* マウスに類似した表現型を示した。さらに、*Smo<sup>f1/f1</sup>; Ctnnb1<sup>ex8/WT</sup>; Wnt1Cre* マウスは、*Smo<sup>f1/f1</sup>; Wnt1Cre* マウスの表現型に似ていて、*Smo<sup>f1/WT</sup>; Ctnnb1<sup>ex8/ex8</sup>; Wnt1Cre* マウスは、*Ctnnb1<sup>ex8/ex8</sup>; Wnt1Cre* マウスに近似した表現型を示した。以上のことから、それぞれ単独のマウスより表現型が悪化することはなく、それぞれの表現型を併せ持つマウスが作成されていることがわかった。Shh と Wnt はどちらも神経堤由来細胞では、顔面形成に非常に重要な役割を果たすが、相互作用は認めないことが示唆された。

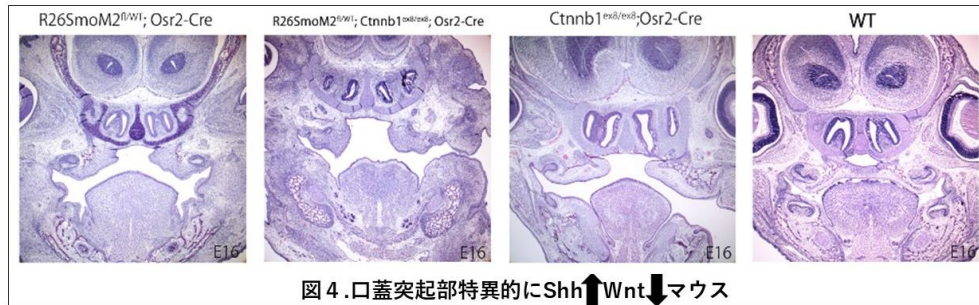


次に、口蓋突起形成細胞特異的に SHH シグナルの関連分子を減弱させ、WNT シグナルの関連分子を増強させたマウス (*Smo<sup>f1/WT</sup>; Ctnnb1<sup>ex3/WT</sup>; Osr2Cre* とする) を作成し解析を行った。口蓋突起形成細胞特異的に SHH シグナルの関連分子を減弱させたマウス (*Smo<sup>f1/WT</sup>; Osr2Cre* とする) は、成体まで生きるため、口蓋形成並びに歯の形成は正常である。一方で、WNT シグナルの関連分子を増強させたマウス (*Ctnnb1<sup>ex3/WT</sup>; Osr2Cre* とする) は、野生型 (WT) と比較して、口蓋裂があり、歯の形態異常や遅延を認めた(図2)。この2種類のマウスのWノックアウトマウスである、*Smo<sup>f1/WT</sup>; Ctnnb1<sup>ex3/WT</sup>; Osr2Cre* マウスは、口蓋裂を認め、歯の形態異常並びに形成遅延を認めた。これらの表現型は、*Ctnnb1<sup>ex3/WT</sup>; Osr2Cre* のマウスの表現型に近似していた。



興味深いことに、Wノックアウトマウスである、*Smo<sup>f1/WT</sup>; Ctnnb1<sup>ex3/WT</sup>; Osr2Cre* マウスは、口蓋部に上皮の陥入を認めた(図3)。この陥入は、*Smo<sup>f1/WT</sup>; Osr2Cre* マウスでも *Ctnnb1<sup>ex3/WT</sup>; Osr2Cre* マウスでも見られなかった表現型である。このような表現型は、*Smo<sup>f1/f1</sup>; Osr2Cre* の口蓋部にも認めた。*Smo<sup>f1/WT</sup>; Osr2Cre* マウスではなかった表現型が、*Smo<sup>f1/WT</sup>; Ctnnb1<sup>ex3/WT</sup>; Osr2Cre* マウスでは認められ、その表現型は *Smo<sup>f1/f1</sup>; Osr2Cre* にもあるという事は、口蓋部の上皮の形成には、間葉の SHH と WNT シグナルの関連分子が相互作用している事を示唆している。

最後に、口蓋突起形成細胞特異的に SHH シグナルの関連分子を増強させ、WNT シグナルの関連分子を減弱させたマウス (*R26SmoM2<sup>f1/WT</sup>; Ctnnb1<sup>ex8/ex8</sup>; Osr2Cre*) を作成し解析を行った(図4)。口蓋突起形成細胞特異的に SHH シグナルの関連分子を増強させたマウス (*R26SmoM2<sup>f1/WT</sup>; Osr2Cre*) は、顔面の突起の癒合不全が起こり、口蓋裂と歯の形成異常を示し、WNT シグナルの関連分子を減弱させたマウス (*Ctnnb1<sup>ex8/ex8</sup>; Osr2Cre*) は、歯の形成遅延及び口蓋裂を示した。Wノックア



ウトマウスは、口蓋裂と歯の形成遅延を示したが、それぞれ単独のマウスより表現型がシビアになることはなかった。

これらの結果より、歯の形成や、口蓋形成などの顎顔面領域の形態形成において、SHH も WNT も非常に重要な役割を担っているが、顕著な相互作用は認めないことが示唆された。口蓋部の上皮の陥入に関しては、今後も研究を継続していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takehisa Kudo, Maiko Kawasaki, Katsushige Kawasaki, Fumiya Meguro, Jun Nihara, Izumi Honda, Madoka Kitamura, Akira Fujita, Kazuaki Osawa, Kaya Ichikawa, Takahiro Nagai, Yoko Ishida, Paul T Sharpe, Takeyasu Maeda, Isao Saito, Atsushi Ohazama	4. 巻 1
2. 論文標題 lft88 regulates enamel formation via involving Shh signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/odi.14162	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 -

1. 著者名 Jun Nihara, Maiko Kawasaki, Katsushige Kawasaki, Akane Yamada, Fumiya Meguro, Takehisa Kudo, Supaluk Trakanant, Takahiro Nagai, Isao Saito, Takeyasu Maeda, Atsushi Ohazama	4. 巻 41
2. 論文標題 Expression of R-spondins/Lgrs in development of movable craniofacial organs.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gene Expr Patterns	6. 最初と最後の頁 119195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gep.2021.119195.	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 -

1. 著者名 Trakanant Supaluk, Nihara Jun, Nagai Takahiro, Kawasaki Maiko, Kawasaki Katsushige, Ishida Yoko, Meguro Fumiya, Kudo Takehisa, Yamada Akane, Maeda Takeyasu, Saito Isao, Ohazama Atsushi	4. 巻 238
2. 論文標題 MicroRNAs regulate distal region of mandibular development through Hh signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Anatomy	6. 最初と最後の頁 711 ~ 719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/joa.13328	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Akane, Kawasaki Maiko, Miake Yasuo, Yamada Yurie, Blackburn James, Kawasaki Katsushige, Trakanant Supaluk, Nagai Takahiro, Nihara Jun, Kudo Takehisa, Meguro Fumiya, Schmidt Ullrich Ruth, Liu Bigang, Hu Yinling, Page Angustias, Ram?rez ?ngeI, Sharpe Paul T., Maeda Takeyasu, Takagi Ritsuo, Ohazama Atsushi	4. 巻 26
2. 論文標題 Overactivation of the NF B pathway impairs molar enamel formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 1513 ~ 1522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/odi.13384	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔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	前田 健康  (Maeda Takeyasu)  (40183941)	新潟大学・医歯学系・教授   (13101)	
研究分担者	大峽 淳  (Ohazama Atsushi)  (40266169)	新潟大学・医歯学系・教授   (13101)	
研究分担者	川崎 勝盛  (Kawasaki Katsushige)  (40529640)	新潟大学・医歯学系・助教   (13101)	

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
---------	---------