

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10211

研究課題名(和文) 歯胚形成過程における一次繊毛の機能の新規探索

研究課題名(英文) The novel exploration of the role of primary cilia during tooth development

研究代表者

中富 満城 (Nakatomi, Mitsushiro)

産業医科大学・産業保健学部・准教授

研究者番号：10571771

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)：正常なマウス歯胚の形成過程において一次繊毛関連遺伝子である Inversin (Inv) および Nephrocystin 3 (Nphp3) の発現が認められた。両遺伝子の変異マウスを解析した結果、切歯の先端部の鈍円化、切歯の萌出方向の異常、切歯全長の短縮化、臼歯の低咬頭、口蓋裂、顎下腺管の拡張等の表現型が観察された。これらの結果より、歯を含む顎顔面の正常な発生過程において Inv や Nphp3 の機能が必須である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

将来的な歯の再生医療を実現する為には歯の分子設計図としての正常な発生機構の正確な理解が必要不可欠である。本研究の成果によりマウス一次繊毛関連遺伝子である Inv および Nphp3 が切歯や臼歯の正常な形態形成や萌出過程に必須である可能性が示唆された。更に Inv は二次口蓋や顎下腺管の正常な形成に関与する可能性が示唆され、顎顔面領域における一次繊毛関連遺伝子の変異を原因とする先天異常発症機構の解明に貢献する成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Inversin (Inv) and Nephrocystin 3 (Nphp3) encode primary cilium related proteins and were expressed in developing mouse tooth germs. Inv and Nphp3 mutant mice exhibited a variety of craniofacial phenotypes such as abnormal shape of the tip of incisors, abnormal erupting direction of incisors, shortened incisors, abnormally lower cusps of molars, cleft palate, and expansion of the duct of submandibular gland. These results suggest that normal functions of Inv and Nphp3 are required for craniofacial development including teeth.

研究分野：顎顔面発生学

キーワード：一次繊毛 歯胚発生 二次口蓋 顎下腺管

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物のほとんど全ての細胞には一次繊毛という突起があり、基底小体と微小管によって構成される。一次繊毛の存在自体は古くから知られていたが、網膜の視細胞や鼻粘膜の嗅細胞等の特殊な細胞を除いて、一般の細胞における一次繊毛の役割は長らく不明のままであった。近年になって一次繊毛が Wnt シグナリングや Sonic hedgehog (Shh) シグナリングの活性化の場としての機能を有する事が判明し、俄然注目を浴びるようになった。一次繊毛に関連する遺伝子の異常によって全身に様々な疾患が起こる事が知られており、「繊毛病 (ciliopathy)」と総称される。代表的な症状として腎嚢胞、肝臓・胆管異常、内臓逆位、多指症、脳梁低形成、網膜色素変性症が挙げられる。

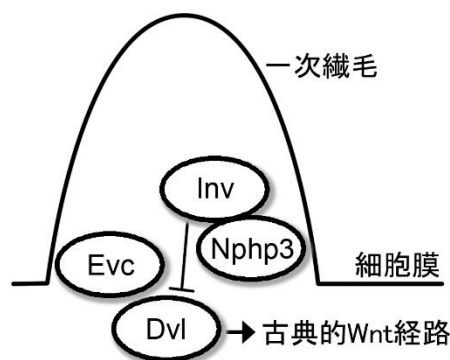


図 1: 一次繊毛の模式図

ヒトの遺伝性疾患の解析と遺伝子変異マウスを用いた研究により、歯胚形成における一次繊毛の関与が示唆されている。例えば繊毛病の一つである Ellis-van Creveld 症候群 (OMIM #225500) は四肢の短縮、心奇形、多指症を特徴とし、歯科所見としては歯の先天欠損、前歯部円錐歯、歯冠形態形成異常が報告されている。原因遺伝子である *Evc* は一次繊毛の基底小体を構成するタンパクをコードする (図 1)。 *Evc* 欠損マウスでは臼歯歯胚の頰側半において Shh シグナルが正常に機能せず、矮小歯を生じる事が明らかとなっている (Nakatomi et al., J Dent Res, 2013)。

一次繊毛は胚発生の初期にノードと呼ばれる領域で回転流を発生させ、胚子の左右軸を決定すると考えられている。また腎臓形成過程において一次繊毛は尿細管上皮の内腔側に突出し、原尿の流れを感知するセンサーの機能を果たす。このように一次繊毛は「 Wnt や Shh 等のシグナリングの活性化の場」としての側面に加えて、「細胞外の環境と相互作用する小器官」としての側面を有している。しかし歯胚形成と一次繊毛の関係については先行研究の数が限られており、未解明な点が多く残されている。ヒトの繊毛病の発症機序を正確に理解する為にも、また将来的な歯の再生医療を目指す上でも、「歯胚形成過程において一次繊毛の果たす機能」について解明する必要がある。

2. 研究の目的

腎疾患を主要な症状とする繊毛病としては多発性嚢胞腎やネフロン癆があり、また多くの繊毛病において腎嚢胞を併発する。ネフロン癆は発症時期により幼児・若年性・思春期の 3 型に分類される。原因遺伝子としてそれぞれ *Inversin* (*Inv*)、 *Nephrocystin 1* (*Nphp1*)、 *Nphp3* が同定されており、いずれも一次繊毛に関連するタンパクをコードする。 *Inv* は Wnt シグナルを構成する Dishevelled (*Dvl*) タンパクの分解を制御し、古典的・非古典的 Wnt シグナル経路の切り替えに関与する (図 1 : Simons et al., Nat Genet, 2005)。 *Nphp3* は *Inv* と相互作用し、古典的 Wnt 経路を抑制する事が報告されている (Bergmann et al., Am J Hum Genet, 2008)。しかしながら *Inv* と *Nphp3* が歯胚を含む顎顔面形態形成過程に果たす機能については未解明である為、本研究で新規に解析を行う。

3. 研究の方法

Inv 遺伝子欠損マウス (*Inv*^{-/-} マウス) は出生直後に死亡する為、胎生期の解析しか行う事ができない。この欠点を克服する為、生後数週間生存可能となる *Inv*^{C/C} 変異マウスが開発された。 *Nphp3*^{-/-} マウスは内臓逆位と腎嚢胞を呈し、胎齢 13 日頃に致死となる。 *Nphp3*^{G2A/G2A} 変異マウスは生後も数週間生存可能であるが、 *Nphp3* タンパクの一次繊毛への局在が阻害され、腎嚢胞を呈する (Nakajima et al., Kidney Int, 2018)。また自然発症型の *Nphp3*^{pcy/pcy} マウスはハイボモルフ (機能低下) 型変異体で、同様に腎嚢胞を呈する (Orman et al., J Am Soc Nephrol, 2001)。本研究においてはこれらの 4 種類の遺伝子変異マウスを用いて歯胚を含む顎顔面形態形成過程における *Inv* および *Nphp3* の機能を組織学的に解析する (図 2)。

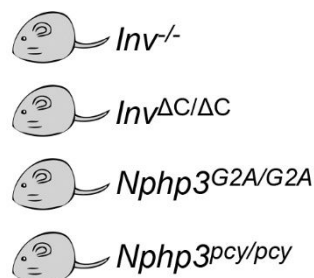
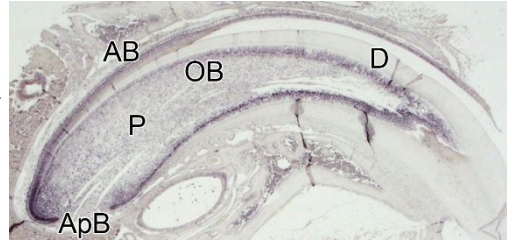


図 2: 本研究で用いる 4 種類の変異マウス

4. 研究成果

(1) 正常発生過程における *Inv* の発現パターン

胎齢 12, 14, 16, 17, 18 日および生後 1, 3, 5 日の野生型 (WT) マウスの下顎第一臼歯の前頭断切片を用い、*Inv* タンパクの局在について免疫組織化学染色法にて解析を行った。その結果、歯胚の発達段階に応じて星状網、内エナメル上皮、象牙芽細胞、エナメル芽細胞等の多様な組織に発現が認められた。



(2) 正常発生過程における *Nphp3* の発現パターン

野生型マウスの生後 3 日目の下顎第一臼歯の前頭断切片および生後 8 週齢の上顎切歯矢状断切片を用いて *Nphp3* の mRNA の発現について *in situ* hybridization 法を用いて解析を行った。その結果、内エナメル上皮、エナメル芽細胞、未分化間葉細胞、象牙芽細胞等に発現が認められた (図 3)。

図 3: 8 週齢野生型マウス上顎切歯矢状断における *Nphp3* 発現パターン (濃染部)。

(3) 遺伝子変異マウスの表現型解析

Inv^{-/-} (図 4) では下顎臼歯歯胚と歯槽骨の過度な近接が認められた。3 例中 2 例は二次口蓋裂を発症した。残る 1 例は二次口蓋は癒合していたものの、一次口蓋と二次口蓋の癒合部に開存が認められ、同部で鼻腔と口腔が交通していた。また顎下腺管の拡張が観察された。

Inv^{ΔC/ΔC} (図 5) では上顎・下顎とも切歯の先端が鈍円化していた。対照群の野生型マウスでは上顎切歯の舌側部に段差が認められたが、変異型では認められなかった。

Nphp3^{G2/G2A} (図 6) では切歯の全長が短縮していた。切歯後方の形成端 (apical bud) は対照群の野生型マウスでは第三臼歯よりも後方に位置していたが、変異マウスでは第三臼歯の直下に位置していた。

Nphp3^{pcy/pcy} (図 7) では切歯の萌出方向の異常や臼歯の低咬頭が認められた。

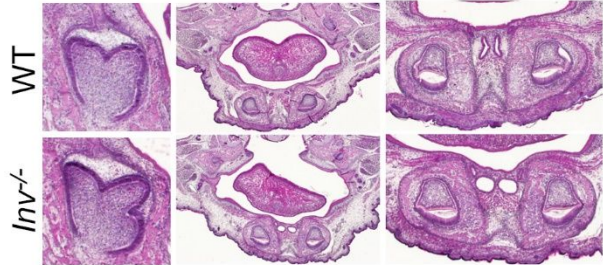


図 4: 胎齢 18 日目の野生型 (上段) および *Inv*^{-/-} (下段) マウス胎仔前頭断切片。左: 下顎第一臼歯, 中央: 二次口蓋, 右: 顎下腺管

(4) 考察

一次繊毛関連遺伝子である *Evc* の欠損マウスにおいても同様に切歯の先端の鈍円化や全長の短縮が報告されている事から、一次繊毛の正常な機能は切歯先端部の形態形成や切歯の近遠心軸方向の適切な成長に必須であると考えられる。また腎嚢胞と共通の機構により顎下腺管の拡張が引き起こされた可能性がある。

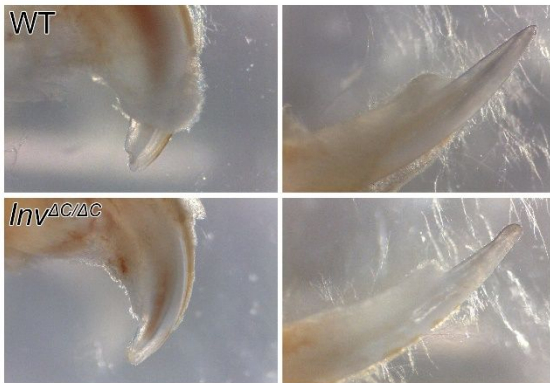


図 5: 生後 2 週齢の野生型 (上段) および *Inv*^{ΔC/ΔC} (下段) マウス。左: 上顎切歯 右: 下顎切歯

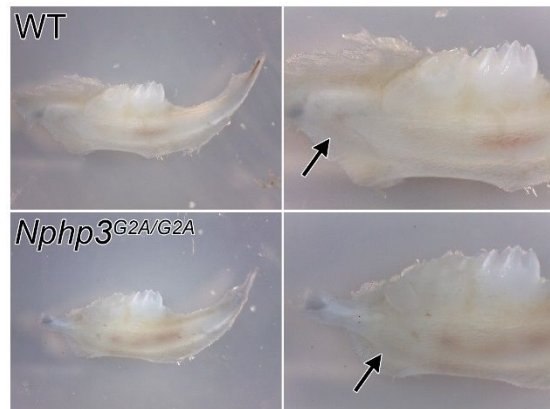
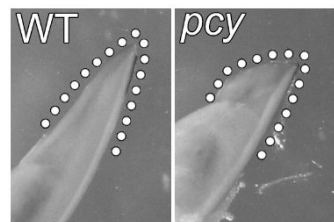


図 6: 生後 2 週齢の野生型 (上段) および *Nphp3*^{G2A/G2A} (下段) マウス下顎。

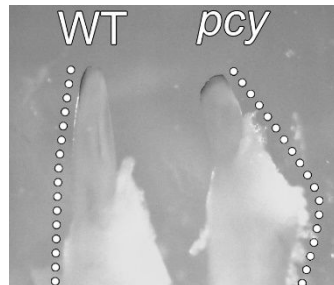


図 7: 生後 8 週齢の野生型および *Nphp3*^{pcy/pcy} マウス下顎左側切歯。上段は正中面から、下段は咬合面から撮影。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中富満城, 中島由郎
2. 発表標題 マウス顎顔面形態形成過程における一次繊毛関連遺伝子の機能
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中富満城, 中島由郎
2. 発表標題 マウス顎顔面形態形成過程における一次繊毛関連遺伝子の機能
3. 学会等名 第62回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中富満城, 松山佳永, 片岡真司, 豊野孝, 瀬田祐司
2. 発表標題 マウス顎顔面形態形成過程における一次繊毛関連遺伝子の機能
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中富満城, 中島由郎
2. 発表標題 マウス顎顔面形態形成過程における <i>Inversin</i> および <i>Nphp3</i> 遺伝子の機能
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023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
研究分担者	中島 由郎 (Nakajima Yoshiro) (30455430)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	
研究分担者	瀬田 祐司 (Seta Yuji) (90291616)	九州歯科大学・歯学部・教授 (27102)	
研究分担者	豊野 孝 (Toyono Takashi) (10311929)	九州歯科大学・歯学部・准教授 (27102)	
研究分担者	片岡 真司 (Kataoka Shinji) (80364149)	九州歯科大学・歯学部・助教 (27102)	

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