

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32404
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2022
課題番号：20K18463
研究課題名（和文）口蓋突起挙上における細胞動態および力学的要素のライブ観察による解析

研究課題名（英文）Live imaging analysis of cell dynamics and mechanical factors in palatal shelf elevation

研究代表者
長坂 新（NAGASAKA, Arata）
明海大学・歯学部・助教

研究者番号：40822474
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：マウス口蓋が形成される過程をリアルタイムで観察することのできるライブ観察法の構築を行った。口蓋の形成過程の中で特に変形の顕著な口蓋挙上のライブ観察を行い、口蓋突起全体が持ち上がるflip upモデルの変形を捉えることができた。また、口蓋挙上や組織変形に関係する分子の時空間的な発現部位の違いを調べた。口蓋挙上に関わるPax9とOsr2に関して口蓋挙上の前後、そして口蓋の舌側と頬側で発現部位の違いがあることが明らかとなった

研究成果の学術的意義や社会的意義

口蓋挙上に伴う口蓋突起の変形過程は短い時間で生じることが示唆されており、その過程を固定標本で捉えることは限界があった。本研究で構築したライブ観察法は、数分間隔で撮影を行うことで口蓋突起の変形過程を連続的に観察することが可能であり、短時間の変形を捉えるのに適している。この手法を用いることでヒトの先天異常として高頻度で生じる口蓋裂などの病態解明に新しい方法論と視点を提供できると期待できる。

研究成果の概要（英文）：To observe palatal elevation in real time in detail, we aimed to establish a live imaging method using explants of the anterior region of the palatal shelf in mouse embryos before the beginning of elevation. This live imaging method enables the continuous observation of palatal shelf elevation and provides new insights into palatogenesis. In addition, we examined the expression regions of molecules associated with palatal shelf elevation and tissue deformation. Pax9 and Osr2 are critical molecules leading to differences in the elevation pattern in palatogenesis.

研究分野：発生学

キーワード：口蓋発生 ライブ観察 二次口蓋 口蓋挙上

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

二次口蓋形成に対する研究は、ヒト口蓋裂の発症メカニズム解明を目的として進められてきた。口蓋裂はヒトの先天性異常の中でも発症頻度が高く、多様な病態を示すことが知られている。その理由として二次口蓋の形成が顎顔面を構成する諸器官との相互関連の中で進行することに加えて、二次口蓋の形成過程自体が複雑な発育段階を辿ることによると考えられている。二次口蓋は舌をはさむように位置する左右の口蓋突起が舌の沈下に伴って水平方向へ挙上し、やがて正中部で接着・癒合することによってその形が出来上がる。この段階のどこかで異常が生じると口蓋裂が発症する。

主に遺伝子改変マウスを用いた解析によって、特定の遺伝子異常がそれぞれの発育段階で口蓋形成を障害し口蓋裂の発症を導くことが明らかとなりつつある(Li et al., J Dent Res., 2017)。口蓋裂発症に対する生化学的な理解が進む一方で、正常な発生過程において組織を構成する細胞がどのような形態や動態を示すのかは明らかになっていない。発生過程での個々の細胞および細胞集団のダイナミクスが重要であることが知られつつあるが、二次口蓋形成、特にその発育段階のひとつである口蓋突起の挙上に対しては十分な知見が得られていない。

2. 研究の目的

これまでの研究では、口蓋突起挙上という組織の変形が生じる過程の中で、組織のどの部分がどのように変形するのか、またその組織を構成する細胞の増殖や移動、分化といったふるまいがどの場所でどの程度行われているのかといった定量的な解析は少なく、リアルタイムでの変形過程を捉えた解析は行われていなかった。そこで本研究では、口蓋挙上の際に口蓋突起および細胞の形態・動態をリアルタイムで捉え、また細胞の増殖や細胞骨格などの解析によって挙上の原動力を調べることで、正常な二次口蓋発生機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

研究の性質上、生きている状態で口蓋突起に存在するすべての細胞を可視化し観察することが理想である。そこで、挙上の起こる胎生 13.5 日目(E13.5)のマウス二次口蓋をスライスし、培養下でライブ観察を行う手法を構築した。細胞の可視化には核を標識することのできる CYT011 を用いた。また、免疫組織化学的手法を用いて、Pax9 や Osr2 といった間葉細胞のマーカーや E-cadherin といった上皮細胞のマーカーによって細胞種を特定し、Ki67 や F-actin などによって細胞増殖や細胞骨格の位置などを調べた。さらに、これら遺伝子の発現部位や発現タイミングの変化を調べるために、RT-PCR 法を用いた。

4. 研究成果

(1) マウス口蓋突起は anterior-posterior 軸に沿って前方部(A部)、中間部(M部)、後方部(P部)の3つに区別することができ、口蓋挙上のパターンが異なることが示唆されている。A部では flip up モデルと呼ばれる口蓋突起全体が持ち上がる様子が見られ、M部とP部では flow モデルと呼ばれる口蓋突起舌側面が膨らみ口蓋突起が水平方向へと伸長する。本研究では、A部の挙上に対してライブ観察を行い、連続的に組織が変形する様子を観察することができた(図1)。口蓋突起のA部のみを切り出して標識し、コラーゲンゲルに包埋した後にステージ上にインキュベーターを備えた共焦点顕微鏡を用いて、培養下でライブ観察を行なった(図1a)。360分間の観察を行うことができ、flip up モデルの口蓋挙上の様子を捉えることができた(図1b)。ここから、口蓋突起のみでも口蓋挙上が生じることが示唆された。

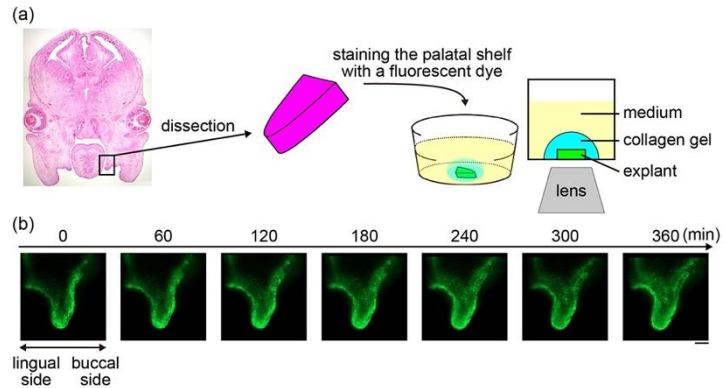


図1 口蓋突起前方部のライブ観察像

(2) ライブ観察によって得られた結果から口蓋突起の角度の変化を計測した。ライブ観察像を計測した群(in vitro 群)と対応する時期のマウス胎仔を固定し HE 染色を行なった画像から計測した群(in vivo 群)とで比較した(図2a)。口蓋突起全体の角度変化を計測したところ、口蓋突起は360分間の観察中、常に舌側方向へ変形を続けていた。その変形度合いは in vitro 群よりも in vivo 群の方が大きかった(図2b)。

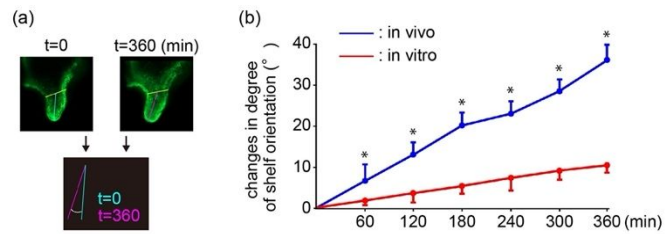


図2 口蓋突起の角度変化

次に、口蓋突起基部(変形の基点となる部分)の角度の変化を、舌側と頬側それぞれで計測した(図3a)。舌側では in vitro 群、in vivo 群ともに鋭角方向へ変形し、頬側では in vitro 群、in vivo 群ともに鈍角方向へ変形した(図3b)。また、変形度合いは in vitro 群よりも in vivo 群の方が大きかった。これらの結果から、口蓋挙上は口蓋突起自身の「内力」に加え、周囲の口腔組織や器官に起因する「外力」が関与する可能性が示唆された。

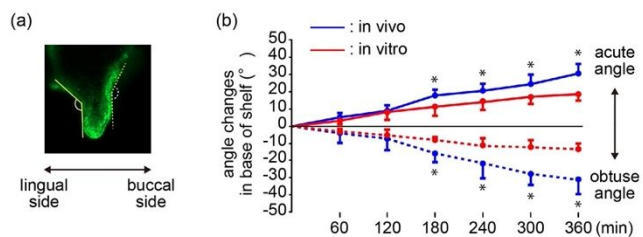


図3 口蓋突起基部の角度変化

(1)および(2)の研究成果は Development, Growth & Differentiation 誌に掲載された。
 掲載雑誌: Nagasaka A et al., Live imaging observation of elevation of the anterior palatal shelf in mouse embryos. *Dev Growth Differ.* **65**, 224-229 (2023).

(3)細胞の核を標識しライブ観察を行うことで、組織内に存在する個々の細胞の動態を捉えることができた。舌側の基部付近に存在する細胞は一方向(約40度)へ、頬側の基部付近に存在する細胞は放射状に移動する様子が観察された(図4)。ここから、舌側がより鋭角に、頬側がより鈍角にという組織変形の違いは、細胞動態の違いに起因することが示唆された。

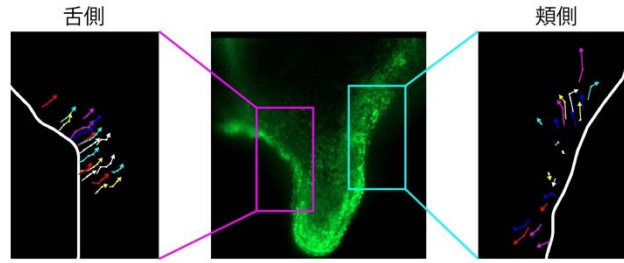


図4 細胞の移動軌跡

(4)口蓋突起の舌側・頬側では組織変形の様子に違いが見られたことから、組織変形や口蓋挙上に関連する遺伝子の時空間的な発現部位の違いを調べた(図5, 6)。口蓋挙上前であるE13.5および挙上後であるE14.5のマウス胎仔を用いて、口蓋突起のA部、M部、P部のそれぞれに対して舌側(L部)と頬側(B部)に区別した。対象とした遺伝子は組織変形に関連するF-actin、E-cadherin、Ki67および口蓋挙上に関連するPax9、Osr2、Tgfb3である。

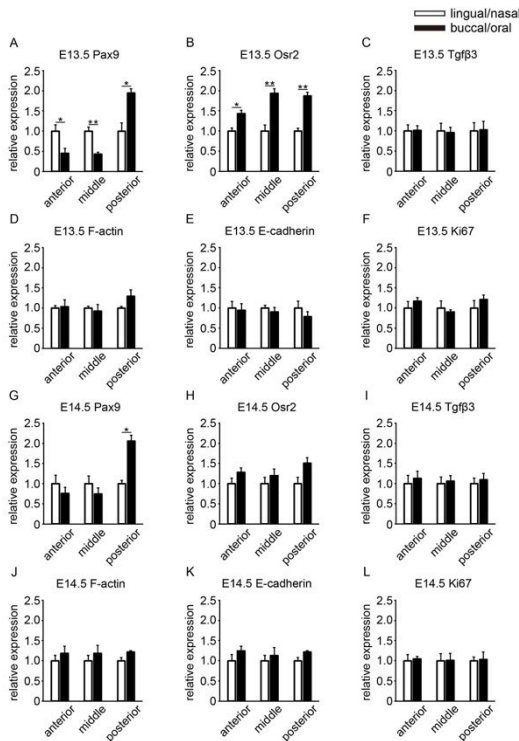


図5 各遺伝子の部位的違い

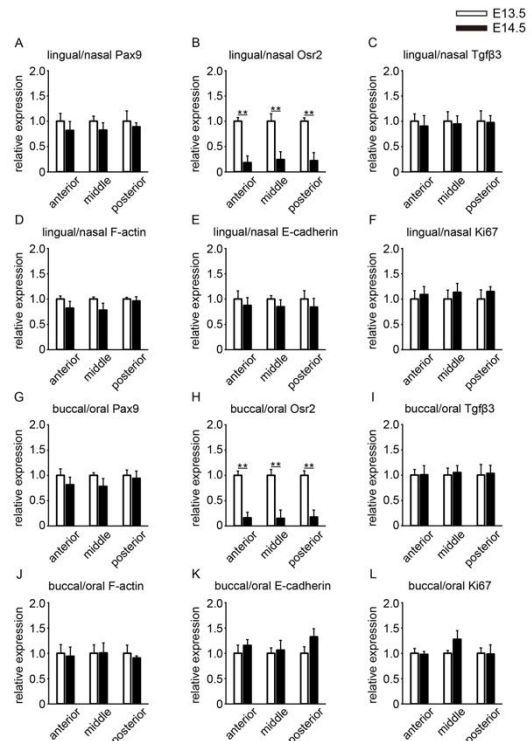


図6 各遺伝子の発生時期的違い

その結果、F-actin、E-cadherin、Ki67、Tgfb3の発現部位には顕著な差がないことが分かった。しかし、口蓋挙上に関連するPax9はE13.5でAL部、ML部、PB部に、E14.5でPB部の間葉細胞に発現が見られ、Osr2はE13.5でAB部、MB部、LB部の間葉細胞に発現が見られた。これら遺伝子の発現部位やタイミングの違いが口蓋挙上に影響することが示唆された。

(4)の研究成果はInternational Journal of Molecular Sciences誌に掲載された。
掲載雑誌: Nagasaka A et al., Spatiotemporal gene expression regions along the anterior-posterior axis in mouse embryos before and after palatal elevation. *Int J Mol Sci.* **23**, 5160 (2022).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagasaka Arata, Sakiyama Koji, Bando Yasuhiko, Yamamoto Masahito, Abe Shinichi, Amano Osamu	4. 巻 23
2. 論文標題 Spatiotemporal Gene Expression Regions along the Anterior?Posterior Axis in Mouse Embryos before and after Palatal Elevation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5160 ~ 5160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23095160	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 Nagasaka Arata, Sakiyama Koji, Bando Yasuhiko, Onozawa Go, Amano Osamu	4. 巻 65
2. 論文標題 Live imaging observation of elevation of the anterior palatal shelf in mouse embryos	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 224 ~ 229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12851	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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 長坂新
2. 発表標題 二次口蓋形成過程における細胞形態および動態の解析
3. 学会等名 第47回明解歯科医学学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Arata Nagasaka, Koji Sakiyama, Yasuhiko Bando, Go Onozawa, Osamu Amano
2. 発表標題 Observation of palatal shelf elevation developing mouse embryos using live imaging method
3. 学会等名 The 20th Congress of the International Federation of Associations of Anatomists (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長坂 新, 崎山 浩司, 坂東 康彦, 小野澤 豪, 天野 修
2. 発表標題 Spatiotemporal gene expression regions in mouse embryos before and after palatal elevation
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 長坂 新, 坂東 康彦, 小野澤 豪, 天野 修
2. 発表標題 口蓋突起挙上に対するライブ観察法を用いた解析
3. 学会等名 第110回解剖学会関東支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長坂 新, 坂東 康彦, 小野澤 豪, 天野 修
2. 発表標題 ライブ観察法を用いたマウス胎仔の口蓋突起挙上過程の観察
3. 学会等名 第58回日本口腔組織培養学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長坂 新, 坂東 康彦, 小野澤 豪, 天野 修
2. 発表標題 ライブ観察法を用いた発生期マウスの口蓋突起挙上の観察
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

1. 発表者名 長坂新
2. 発表標題 二次口蓋形成過程における細胞形態および動態の解析
3. 学会等名 第44回明解歯科医学学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長坂新、崎山浩司、坂東康彦、小野澤豪、天野修
2. 発表標題 ライブ観察による口蓋突起挙上時の組織変形の解析
3. 学会等名 第109回解剖学会関東支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Arata Nagasaka, Koji Sakiyama, Yasuhiko Bando, Go Onozawa, Osamu Amano
2. 発表標題 Observation of palatal shelf elevation using by live imaging method
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長坂新
2. 発表標題 大脳原基内の凹凸構造での力学的比較および口蓋の組織変形と細胞動態
3. 学会等名 植物構造オプト分科会「機械的刺激と形態形成」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長坂新、崎山浩司、坂東康彦、小野澤豪、天野修
2. 発表標題 ライブ観察法による口蓋突起掌上時の組織変形および細胞動態の観察
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 長坂新、崎山浩司、坂東康彦、小笠原悠大、小野澤豪、天野修
2. 発表標題 Establishment of live imaging method of palatal shelves during secondary palate development in mice.
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長坂新、崎山浩司、坂東康彦、小笠原悠大、小野澤豪、天野修
2. 発表標題 胎生期マウスの外側口蓋突起におけるライブ観察法の確立
3. 学会等名 第108回解剖学会関東支部学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nagasaka A, Sakiyama K, Bando Y, Ogasawara Y, Onozawa G, Amano O
2. 発表標題 Establishment of live imaging method in the developing mouse palatal shelves.
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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