

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 14日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390547

研究課題名（和文） オートファジーが口蓋と顎・顔面・頭蓋の形成に果たす役割を考える

研究課題名（英文） The possible role of autophagy in craniofacial development

研究代表者

山城 隆 (YAMASHIRO TAKASHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70294428

研究成果の概要(和文):

オートファジーは、大規模なタンパク質分解系であり、飢餓状態における細胞の生存、個体発生、免疫反応、ガンの抑制や抗老化などにおいて重要な役割を果たしている。本研究によって、口蓋形成における口蓋癒合時にオートファジーが関与していることが明らかになった。さらに骨形成時における骨芽細胞においてもオートファジーが関与しており、骨形成時に生じる細胞内で生じる ER ストレスに対して、オートファジーが細胞内の恒常性の維持に関与することを示唆する所見を得た。

研究成果の概要(英文):

Autophagy is a bulk protein degradation system and important for various physiological processes such as cell survival under starvation, development, immune responses, tumor suppression, and antiaging. The present study demonstrated that autophagy is involved in the palatal fusion in palatogenesis. Our study also indicated autophagy is also involved in osteogenesis and suggested that autophagy might regulate the ER stress responses presumably to maintain *cellular homeostasis*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：オートファジー、口蓋の形成、口蓋突起、骨組織、ER ストレス、ATG5、LC3

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) オートファジーは、大規模なタンパク質分解系であり、低酸素刺激や小胞体ストレスなどにより誘導されることも知られている。また、細胞内の不良タンパク質を分解し、リサイクルすることで生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。
- (2) 口唇・口蓋裂は口腔において最も高頻度で出現する先天異常の一つである。口蓋は左右の口蓋突起が癒合して形成される。上皮で覆われた口蓋突起が癒合するためには、癒合予定部位の上皮が取り除かれなければならない。この上皮はアポトーシスやネクローシスとは異なる細胞像を示して細胞死にいたる。しかし、その詳細は明らかではない。
- (3) 骨芽細胞は骨基質産生などのタンパク質代謝が盛んに行われ、細胞内に異常タンパク質が蓄積しやすく細胞機能の低下が生じやすいと考えられている<sup>8)</sup>。神経細胞などでは、恒常的なオートファジー活性は、細胞の機能を保ち、組織を健全な状態に維持している。しかし、骨基質を産生する骨芽細胞においてオートファジーが機能しているのかどうかについては明らかではない。

## 2. 研究の目的

- (1) オートファジーは、飢餓時に強く活発化することが知られているが、近年では飢餓適応以外の、発生や分化、細胞内の浄化作用、免疫応答といった生命現象においても、細胞の機能を維持するために重要な役割を担うことが明らかにされている。一方、非アポトーシス細胞死にも関与しており、オートファジーに関連する遺伝子の働きを抑制すると個体発生の過程で神経細胞等に異常が生じることが報告されている。しかし、オートファジーが、口蓋の形成過程および口蓋裂の発生の要因に関与しているかどうかについて検討した研究は報告されていない。本研究の目的は第三の細胞死といわれるオートファジーが口蓋上皮の癒合に関わる機能的意義を明らかにすることである。特に、オートファジーの特

異的マーカーである LC3 を GFP にて標識して恒常的に発現させる変異マウスと、オートファジー欠損マウスである ATG5 のノックアウトマウスを用いて、オートファジーが口蓋の癒合に果たす役割を検討する。

(2) 一方、骨芽細胞は骨の形成時には基質タンパク質を多く産生することが知られており、不良タンパク質の蓄積や、低酸素状態等の微小環境によって小胞体ストレスが生じている可能性が考えられる。また、オートファジーが口蓋形成に果たす役割については、これまで検討されたことがなかった。本研究の目的はオートファジーが骨芽細胞の基質産生に伴う ER ストレスに関わる機能的意義を明らかにすることである。

(1)と同様、LC3-GFP マウスと、ATG5 のノックアウトマウスを用いて、オートファジーが骨基質産生に果たす役割を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 口蓋の癒合時における発現と機能解析

#### ①口蓋突起の癒合時における発現解析

LC3 のシグナルを確認するため、GFP-LC3 トランスジェニックマウスの胎仔の口蓋組織表面および凍結切片を共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。

#### ②口蓋突起の癒合に果たす機能解析

口蓋上皮におけるオートファジーの機能解析のため、Atg5 ノックアウトの口蓋における表現型を検討した。口蓋を摘出し、光学顕微鏡と走査型電子顕微鏡にて組織像と表面正常を観察した。

### (2) 骨組織における発現と機能解析

#### ①*in vivo* の骨芽細胞における発現解析

胎生 19.0 日齢の GFP-LC3 型マウスの頭蓋骨における GFP-LC3 シグナルの集積を共焦点顕微鏡にて観察した

#### ②*in vitro* の骨芽細胞における発現解析

胎生 19.0 日齢の GFP-LC3 型マウスおよび wild 型マウス頭蓋骨から単離した骨芽細胞の 3

週間の長期培養に伴うオートファジーマーカーの発現および変動を確認した

### ③骨芽細胞の経時的変化に伴うER ストレスマーカーの変動

胎生 19.0 日齢の wild 型マウス頭蓋骨から単離した骨芽細胞の 3 週間の長期培養に伴う ER ストレスマーカーの変動をリアルタイム RT-PCR 法を用いて観察した。

### ④骨芽細胞の低酸素刺激に伴うオートファジーおよび ER ストレスマーカーの変動

胎生 19.0 日齢の wild 型マウス頭蓋骨から単離した骨芽細胞の 3 週間の長期培養後の低酸素刺激に伴うオートファジーマーカーおよび ER ストレスマーカーの変動をリアルタイム RT-PCR 法を用いて観察した。

### ⑤骨組織における機能解析

骨組織におけるオートファジーの機能解析のため、Atg5 ノックアウトの骨組織における表現型を検討した。Atg5 ノックアウトの頭蓋骨を摘出し、光学顕微鏡にて組織像を観察した。

## 4. 研究成果

記述すること。

### (1) 口蓋の癒合時における発現と機能解析

#### ①口蓋突起の癒合時における発現解析

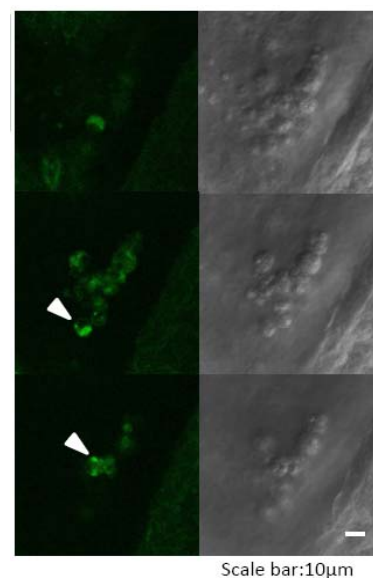
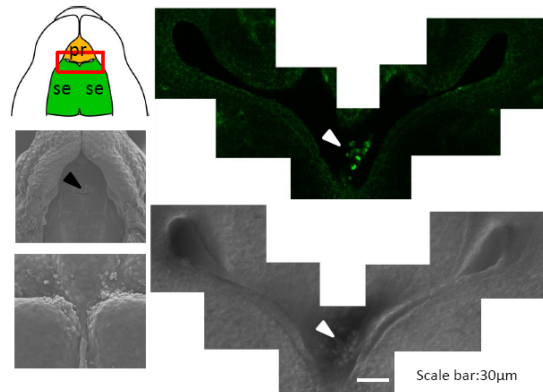
口蓋上皮の癒合部においてオートファジーの存在について、LC3-GFPマウスを用いて検討したところ、癒合上皮においてオートファジーを観察した。

E14.5 の口蓋の切片では、癒合直前、および癒合中の口蓋突起の上皮に、ドット状の LC3 のシグナルが観察された(図 2-1 B,C)。しかし、癒合に関与しない口蓋突起の上皮には、LC3 のシグナルは観察されなかった。

E18.0 の口蓋の口腔側表面では、口蓋の癒合が終了しており、口蓋表面に、LC3 のシグナルは観察されなかった。

E15.5 の口蓋の口腔側表面では、一次口蓋と左右の口蓋突起の癒合が開始していた。癒合

する直前の一次口蓋と左右の口蓋突起間の表面に確認された敷石状の形態を示す上皮細胞内に、ドット状ならびにリング状の LC3 のシグナルが観察された(図 2-1 F,H)。一次口蓋と口蓋突起の平坦な形態の上皮に、LC3 のシグナルは観察されなかった。



E16.0 の口蓋の口腔側表面では、一次口蓋と左右の口蓋突起の癒合部の表面に確認された敷石状の形態を示す上皮細胞内に、ドット状ならびにリング状の LC3 のシグナルが観察された(図 2-1 K,L)。癒合が終了した一次口蓋と口蓋突起の表面の上皮に、LC3 のシグナルは観察されなかった。

E16.5 の口蓋の切片では、癒合直前、癒合中の一次口蓋と口蓋突起の上皮に、ドット状ならびにリング状の LC3 のシグナルが観察された。ま

た鼻腔側の表面に確認された敷石状の形態を示す上皮細胞内に、ドット状ならびにリング状の LC3 のシグナルが観察された(図 2-2 B,C)。

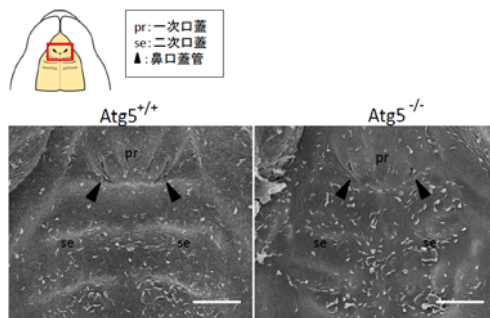
E18.0 の口蓋の口腔側表面では、一次口蓋と口蓋突起間の癒合部の表面に残存する敷石状の形態を示す上皮細胞に、ドット状ならびにリング状の LC3 のシグナルが観察された(図 2-2 E,F)。それ以外の癒合が終了している一次口蓋と口蓋突起の癒合部の上皮に、LC3 のシグナルは観察されなかった。

## ②口蓋突起の癒合に果たす機能解析

E18.0 マウス胎仔において、走査型電子顕微鏡による Atg5 KO マウスと野生型マウスの口蓋の観察では、形態学的な差異を認めなかった(図 4 B,C)。

口蓋の切片の観察では、コントロール群、実験群ともに一次口蓋と口蓋突起の癒合相当部(図 4 G,H)、口蓋突起同士の癒合相当部(図 4 I,J)に間葉の連続を認めた。

これらの結果から、癒合上皮においてオートファジーが観察されるものの、オートファジーの機能を阻害しても口蓋裂は生じなかった。つまり、オートファジーは単独で阻害しても口蓋裂は生じないことが明らかとなった。

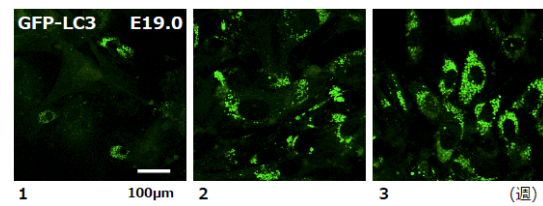


## (2) 骨組織における発現と機能解析

### ① *in vivo* の骨芽細胞における発現解析

胎生 19.0 日齢の GFP-LC3 型マウスの頭蓋骨における GFP-LC3 シグナルの集積を共焦点顕微鏡にて観察した。その結果、骨芽細胞層において、ドット状の GFP-LC3 シグナルの集積を認

めた。

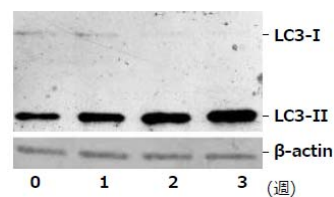


### ② *in vitro* の骨芽細胞における発現解析

胎生 19.0 日齢の GFP-LC3 型マウスおよび wild 型マウス頭蓋骨から単離した骨芽細胞の 3 週間の長期培養に伴うオートファジーマーカーの発現および変動を確認した。

培養 1 週目では骨芽細胞分化初期、2 週目では分化中期、3 週目では分化後期であることがそれぞれの分化マーカーから分かった。さらに、オートファジーマーカーである *Map1c3b* mRNA の発現を観察したところ、分化後期に向かうにつれ *Map1c3b* mRNA の発現が上昇していた。

次に蛍光顕微鏡にて骨芽細胞分化に伴う GFP-LC3 シグナルの集積を観察したところ、培養が進むにつれて GFP-LC3 シグナルが集積していることを認めた。骨芽細胞の分化に伴う LC3 タンパク質の挙動を観察するために、ウェスタンブロット法を行ったところ、培養が進むにつれて LC3-I が減少し、それに応じて LC3-II が増加する傾向が認められた。



### ③ 骨芽細胞の経時的変化に伴う ER ストレスマーカーの変動

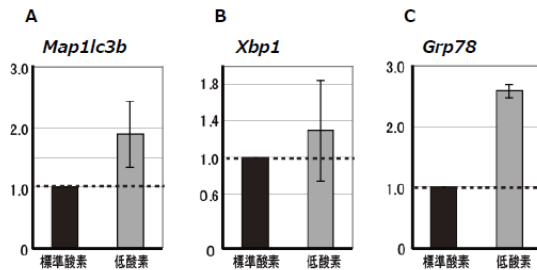
3 週間の長期培養に伴う ER ストレスマーカーの変動をリアルタイム RT-PCR 法を用いて観察した。

*Xbp1*, *Grp78* 等の ER ストレスマーカーの発現は経時的に増加し、2 週目にピークに達した。

### ④ 骨芽細胞の低酸素刺激に伴うオートファジー

および ER ストレスマーカーの変動

低酸素刺激に伴い、オートファジーマーカーである *Map1c3b* mRNA 発現は上昇していた。さらに、ER ストレスマーカーである *Xbp1*, *Grp78* 等の発現も *Map1c3b* mRNA 発現と同様に上昇していた。



#### ⑤骨組織における機能解析

E18.0 マウス胎仔において、Atg5 KO マウスと野生型マウスの頭蓋骨を組織学的に比較したところ、Atg5 KO マウスの骨梁の減少が観察された。組織切片上で骨梁の面積を定量したところ、有意な差が検出された。

これらの結果から、非常に高いストレス環境化にあると考えられる骨基質産生時の骨芽細胞の恒常性維持に、AP や ER ストレス応答が関与していることが示唆された。また、オートファジーは骨芽細胞の恒常性の維持に関与していることが示唆された。

#### 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 4 件)

①Hayano S, Kurosaka H, Yanagita T, Kalus I, Milz F, Ishihara Y, Islam MN, Kawanabe N, Saito M, Kamioka H, Adachi T, Dierks T, Yamashiro T. Roles of heparan sulfate sulfation in dentinogenesis. J Biol Chem. 査読有、2012 Apr 6; 287 (15) :12217-29.

②Kawanabe N, Murata S, Fukushima H, Ishihara Y, Yanagita T, Yanagita E, Ono M, Kurosaka H, Kamioka H, Itoh T, Kuboki T, Yamashiro T. Stage-specific embryonic antigen-4 identifies

human dental pulp stem cells. Exp Cell Res. 査読有、2012 Mar 10; 318 (5) :453-63.

③Kurosaka H, Islam MN, Kuremoto K, Hayano S, Nakamura M, Kawanabe N, Yanagita T, Rice DP, Harada H, Taniuchi I, Yamashiro T. Core binding factor beta functions in the maintenance of stem cells and orchestrates continuous proliferation and differentiation in mouse incisors. Stem Cells. 査読有 2011 Nov; 29 (11) :1792-803.

④Shintaku Y, Murakami T, Yanagita T, Kawanabe N, Fukunaga T, Matsuzaki K, Uematsu S, Yoshida Y, Kamioka H, Takano-Yamamoto T, Takada K, Yamashiro T. Sox9 expression during fracture repair. Cells Tissues Organs. 査読有 2011; 194 (1) :38-48.

[学会発表] (計 1 件)

①中村政裕, 柳田剛志, 山城隆、骨芽細胞の石灰化が進むにつれ、オートファジーと ER ストレスマーカーは上昇する。第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2012 年 9 月 15-16 日、岐阜

[その他]

①2011 年先端歯学にて成果の報告。  
中村政裕, 山城隆、骨形成におけるオートファジーの役割。平成 23 年度 先端歯学スクール 2011、2011 年 9 月 1-2 日、三浦

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

山城 隆(YAMASHIRO TAKASHI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号:70294428

##### (2)研究分担者

藪内 利憲(YABUUCHI TOSHINORI)  
岡山大学・岡山大学病院・医員  
研究者番号:00452582

川邊 紀章(KAWABE NORIAKI)  
岡山大学・岡山大学病院・講師  
研究者番号:00397879  
(H23 のみ)

中川 一路(NAKAGAWA ICHIRO)  
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・  
教授  
研究者番号:70294113  
(H21～H22)

黒坂 寛(KUROSAKA HIROSHI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助  
教  
研究者番号:00397879  
(H21～H22)

(3)連携研究者

水島 昇(MIZUSHIMA NOBORU)  
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・  
教授  
研究者番号:21677002