

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10159

研究課題名（和文）レチノイン酸シグナルと相互作用を持つ顎顔面形成に関わる新規病的因子の解析

研究課題名（英文）Analysis of new etiology during craniofacial development that interact with retinoic acid signaling

研究代表者

大原 春香（Ohara, Haruka）

大阪大学・大学院歯学研究科・招へい教員

研究者番号：40754726

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）：口唇口蓋裂を始めとする顎顔面形成不全は先天性疾患の中でも30%以上の割合で発生し、患者の生活の質（QOL）を著しく低下させる多因子性疾患である。本研究では、Gata3を除去した複数の遺伝子マウスモデルを使用して、Gata3の鼻中隔および一次口蓋の発生における機能を探索した。その結果、頭蓋顔面領域の発生ではGata3が鼻軟骨の分化、細胞増殖および生存において重要な役割を果たし、その遅延が鼻中隔の形態異常を引き起こす可能性があることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複数の遺伝子間の相互作用は顎顔面の形成に不可欠であり、中でもレチノイン酸シグナルは顎顔面の形成において重要な役割を果たす。Gata3は顎顔面形成においてレチノイン酸シグナルの下流で機能することが明らかとなっており、その機能を阻害することで異なるメカニズムを持つ複数の器官および組織の欠陥を引き起こすが分かっているが、一次口蓋および鼻中隔の発生中のGata3の機能はほとんど明らかになっていない。本研究で行ったGata3の時空間的な発現の解析により、先天性の鼻中隔形態異常に関する基礎的な理解が深まり、新しい病因を明らかにする可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Craniofacial malformations are a variegated group of head and facial bone growth anomalies which comprise around 30% of all congenital diseases.

In the present study, we utilized multiple genetic mouse models to eliminate Gata3 from different embryonic tissue to investigate the role of Gata3 in nasal septum and primary palate development. This study indicated that Gata3 plays a critical role in nasal cartilage differentiation, cell proliferation, and survival during embryonic craniofacial development, which retardation could result in nasal septum deformation.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：顎顔面形成不全 レチノイン酸シグナル Gata3 歯科矯正

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂を始めとする顎顔面形成不全は先天性疾患の中でも 30%以上の割合で発生し、患者の生活の質 (QOL) を著しく低下させる多因子性疾患である。その発達の各段階において、顔面突起の成長や癒合に何らかの問題が生じることで、頭蓋顎顔面領域の先天的な奇形が引き起こされ、顎顔面形成不全は軽度で小さな口唇裂のみの症状から広範囲の顔面裂と後鼻孔閉鎖の併発が見られる重度なものまで非常に多様な表現型を示す。その中でも、口唇口蓋裂は比較的良好に研究されており、細胞学的・分子生物学的解明から臨床結果まで多くが明らかになっている。その一方、鼻中隔を含む一次口蓋の発生やその欠損がおよぼす臨床的影響についてはほとんどわかっていない。

我々の研究グループでは、これまでに顎顔面領域の様々な器官の発生や再生の基礎研究を動物モデルを使用して継続的に行っており、胎生期におけるレチノイン酸 (RA) シグナル異常により口唇口蓋裂と後鼻孔閉鎖が併発する事が明らかとなっている。RA シグナルの活性化に必須の Rdh10 遺伝子を胎生時期特異的に除去したマウスは顎顔面発生時、広範囲に渡り RA シグナルが顕著に低下し、正中顔面裂、鼻中隔の変形、後鼻孔閉鎖が併発する事が解明されている (Kurosaka et al. Hum Mol Genet. 2017)。RA シグナル活性や Rdh10 が鼻上顎複合体で広範囲に渡り強く発現する報告からも、RA シグナル異常は、多様性を持つ顎顔面形成不全において中心的役割を担う要因の一つであると考えられた。

その後の研究では、RA シグナルと相乗効果をもつ顎顔面形成不全の原因遺伝子の候補として Gata3 が同定されており、その除去は後鼻孔閉鎖のような RA シグナルの減少と部分的に重なる表現型を示すことが示された (Kurosaka et al., 2021)。興味深いことに、ヒトでの GATA3 のヘテロ接合性変異によって引き起こされる HDR 症候群では、副甲状腺機能低下、心奇形、免疫不全、腎臓奇形、生殖器の奇形などに加えて、一次口蓋の発達の遅れから、顔面裂や後鼻孔閉鎖などのさまざまな頭蓋顔面異常が生じることがわかっている (Shim et al., 2015)。後鼻孔閉鎖は、鼻中隔の外側縁で生じる原始後鼻孔の発達の障害によって引き起こされることから、RA および Gata3 シグナルの喪失が鼻中隔の発生に影響を与えることが強く示唆された。

2. 研究の目的

本研究では顎顔面形成不全を発症させる遺伝的要因として、Gata3 遺伝子を用いて検証を行った。Gata3 は様々な組織の発生および維持において複数の役割を果たす転写因子であり (Chou et al., 2010)、その機能を阻害することで、異なるメカニズムを持つ複数の器官および組織の欠陥を引き起こす。頭蓋顔面の発生において、Gata3 機能阻害マウスは下顎の低形成を示し (Lim et al., 2000)、また、Gata3 は上顎および下顎の後方領域で重要な役割を果たし、Gata3 の機能阻害により顎癒合および下顎低形成が生じることが明らかにされている (Abe et al., 2021)。

しかし、Gata3 の前方領域、つまり一次口蓋および鼻中隔の発生中の役割はほとんど明らかになっていない。このため、本研究では、異なる胚性組織から Gata3 を除去した複数の遺伝子マウスモデルを使用して、Gata3 の鼻中隔および一次口蓋の発生における機能を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物の作製

本研究で使用した Ert2Cre;Gata3^{fx/fx} は、すでに報告されている方法 (Zhu et al., 2004, Furusawa et al., 2013) に従い、Ert2Cre;Gata3^{fx/fx} 雄性マウスと Gata3^{fx/fx} 雌性マウスを交配して作製した。Wnt1Cre;Gata3^{fx/fx} は、Wnt1Cre;Gata3^{fx/+} 雄性マウスを Gata3^{fx/fx} 雌性マウスと交配して作製した。Ert2Cre;Gata3^{fx/fx} の Gata3 の機能阻害には、妊娠した胎生 9.5 日の Gata3^{fx/fx} マウスにタモキシフェンを腹腔内投与した。

(2) 解剖学および組織学的観察

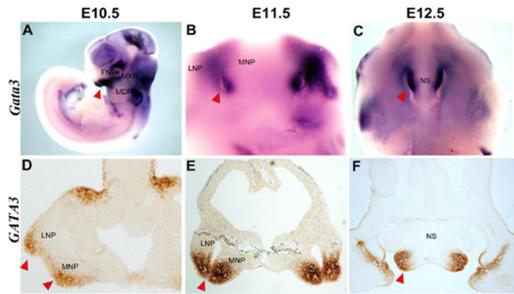
頭蓋顔面の形成時期にみられる解剖学および組織学的な変化を解析するため、様々なステージで作製したマウス胎子を取り出し、Whole mount nuclear fluorescent imaging (Sandell, Kurosaka et al. 2012) を用いて観察を行い、顎顔面の表現型を解析した。また組織切片を作製し、免疫組織染色や in situ hybridization 等の解析を行った。

さらに、胎生のどの時期でまたどの組織で Gata3 が顎顔面発生において重要な役割を果たすかを解明するため、表現型が確認できるマウス胎子においては、表現型を誘発した原因となる Gata3 の機能阻害による細胞増殖や細胞死、細胞分化等の細胞動態の変化を解析した。

4. 研究成果

(1) 発生中の上顎の Gata3 mRNA および GATA3 タンパク質の発現の解析

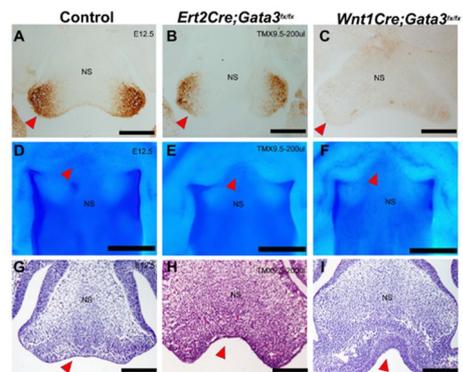
In situ hybridization の結果、胎生 10.5 日のマウスで、Gata3 の発現が目や耳胞などの様々な頭蓋顔面組織で観察され、特に内側および外側鼻突起の近心側や、上顎突起の遠心側で強い発現を示した。胎子の成長が進むにつれて、Gata3 の発現領域は、発生初期の蝸牛周囲の組織に局限され、胎生 11.5 日では上顎突起での発現は弱くなった。胎生 12.5 日では、Gata3 の発現領域はさらに鼻中隔組織に局限された。特に、発生中の鼻中隔の側縁で強いシグナルがみられた。組織特異的に GATA3 タンパク質の局在を明らかにするため、マウスの前頭断の組織切片の免疫組織染色を行った。その結果、胎生 10.5 日で GATA3 タンパク質は内側および外側鼻突起の表面表皮および間葉細胞でみられた。GATA3 陽性細胞は、胎生 11.5 日の内側および外側鼻突起で類似した発現を維持し、胎生 12.5 日では GATA3 の強い免疫応答が発達中の鼻中隔の腹側外側縁で確認できた。これらの GATA3 の免疫組織染色の結果は、ほとんどが Gata3 mRNA の発現領域と重複していた。



(2) Gata3 機能阻害が惹起する鼻中隔の変形

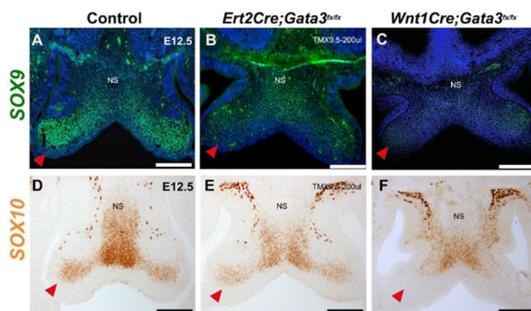
顎顔面発生中の Gata3 の役割を評価するために、異なる組織で Gata3 の機能を阻害する複数のマウスモデルを作製した。Ert2Cre マウス (Zhu et al., 2004) を用いて、胎子の時期特異的に Gata3 の機能阻害を行った。神経堤細胞での部位特異的な機能阻害は、Wnt1Cre マウス (Jiang et al., 2000) を用いた。両方のミュータントマウスで GATA3 の免疫組織染色を行い、Gata3 の阻害効率を評価した。

胎生 12.5 日のコントロールマウスでは、発生途中の鼻中隔の腹側外側の上皮および間葉細胞の両方で GATA3 の強い発現が観察されたのに対し、胎生 9.5 日の段階で雌がタモキシフェンを注射された Ert2Cre:Gata3^{flx/flx} では、GATA3 のシグナルの大幅な減少がみられた。興味深いことに、Wnt1Cre:Gata3^{flx/flx} 胎子では、発生中の鼻中隔でさらなる GATA3 の減少が検出された。DAPI 染色を行い、発生中の鼻中隔を形態学的に観察したところ、胎生 12.5 日で、Ert2Cre:Gata3^{flx/flx} および Wnt1Cre:Gata3^{flx/flx} の発生中の鼻中隔の中心部に、コントロールマウスと比較してより深くぼみが観察された。これらの結果は、Gata3 が正常な鼻中隔の発達に重要な役割を果たし、その機能の喪失が鼻中隔の中心部の発達遅延を引き起こす可能性があることを示している。



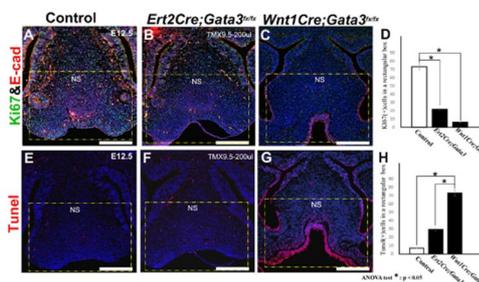
(3) Gata3 ミュータントマウスの鼻中隔軟骨の発生の遅延

鼻中隔の発生は、胎生 1.0 日頃から始まり、頭部神経堤由来の軟骨発達と同期している。このため、Gata3 の減少が鼻中隔軟骨の発達にも影響を与える可能性があるという仮説を立てた。この仮説を検証するために、頭部神経堤や軟骨の発達に関連する分子である SOX9 や SOX10 などの免疫組織染色を行った結果、コントロールマウスでは胎生 12.5 日で、鼻中隔の腹側外側部の間葉細胞で SOX9 と SOX10 の強いシグナルを示した。一方、Ert2Cre:Gata3^{flx/flx} および Wnt1Cre:Gata3^{flx/flx} では、発生中の鼻中隔での SOX9 と SOX10 の発現が減少していることが示された。これらの結果から、Gata3 が鼻中隔での SOX9 と SOX10 の発現を調節し、神経堤細胞と軟骨細胞の発生に Gata3 が重要であることが示された。



(4) Gata3 の減少により発生中の鼻中隔の細胞増殖と細胞死の様態が変化する

正確な細胞増殖と細胞死の数と位置は、器官の形態を形成するのに重要である。このため、細胞増殖マーカーである Ki67 を認識する抗体を用いて、発生中の鼻中隔の免疫組織染色を行ったところ、胎生 12.5 日の *Ert2Cre:Gata3^{fx/fx}* および *Wnt1Cre:Gata3^{fx/fx}* で、Ki67 陽性細胞の有意な減少が観察された。これらの結果から、鼻中隔の発生には GATA3 が細胞増殖に不可欠であり、その抑制が鼻中隔の形成異常を引き起こす可能性があることが示された。



細胞増殖と同じ領域で TUNEL 法を用いてアポトーシス細胞を検出したところ、胎生 12.5 日で、*Ert2Cre:Gata3^{fx/fx}* および *Wnt1Cre:Gata3^{fx/fx}* の鼻中隔でのアポトーシスの有意な増加が観察された。これらの結果から、*Gata3* が鼻中隔の細胞増殖と生存を活性化する重要な役割を果たしており、*Gata3* の減少が細胞分裂の減少と細胞死の増加を引き起こし、鼻中隔の形態異常を引き起こす可能性があることが示唆される。

<引用文献>

Abe, M., Cox, T. C., Firulli, A. B., Kanai, S. M., Dahlka, J., Lim, K. C., Engel, J. D., & Clouthier, D. E. (2021). GATA3 is essential for separating patterning domains during facial morphogenesis. *Development (Cambridge)*, 148(17).

Chou, J., Provot, S., & Werb, Z. (2010). GATA3 in development and cancer differentiation: Cells GATA have it! In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 222, Issue 1, pp. 42-49).

Furusawa, J., Moro, K., Motomura, Y., Okamoto, K., Zhu, J., Takayanagi, H., Kubo, M., & Koyasu, S. (2013). Critical Role of p38 and GATA3 in Natural Helper Cell Function. *The Journal of Immunology*, 191(4), 1818-1826.

Jiang, X., Rowitch, D. H., Soriano, P., McMahon, A. P., & Sucov, H. M. (2000). Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development*, 127(8), 1607-1616.

Kurosaka, H., Mushiake, J., Saha, M., Wu, Y., Wang, Q., Kikuchi, M., Nakaya, A., Yamamoto, S., Inubushi, T., Koga, S., Sandell, L. L., Trainor, P. A., & Yamashiro, T. (2021). Synergistic role of retinoic acid signaling and *Gata3* during primitive choanae formation. *Human Molecular Genetics*, 30(24), 2383-2392.

Kurosaka, H., Wang, Q., Sandell, L., Yamashiro, T., & Trainor, P. A. (2017). *Rdh10* loss-of-function and perturbed retinoid signaling underlies the etiology of choanal atresia. *Human Molecular Genetics*, 26(7), 1268-1279.

Lim, K.-C., Lakshmanan, G., Crawford, S. E., Gu, Y., Grosveld, F., & Engel, J. D. (2000). *Gata3* loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system.

Sandell, L. L., Kurosaka, H., Trainor, P. A. (2012). Whole mount nuclear fluorescent imaging: Convenient documentation of embryo morphology. *Genesis*, Nov;50(11), 844-50.

Shim, Y. S., Choi, W., Hwang, I. T., & Yang, S. (2015). Hypoparathyroidism, sensorineural deafness, and renal dysgenesis syndrome with a GATA3 mutation. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, 20(1), 59.

Zhu, J., Min, B., Hu-Li, J., Watson, C. J., Grinberg, A., Wang, Q., Killeen, N., Urban, J. F., Guo, L., & Paul, W. E. (2004). Conditional deletion of *Gata3* shows its essential function in TH1-TH2 responses.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Wu Y., Kurosaka H., Wang Q., Inubushi T., Nakatsugawa K., Kikuchi M., Ohara H., Tsujimoto T., Natsuyama S., Shida Y., Sandell L.L., Trainor P.A., Yamashiro T.	4. 巻 101
2. 論文標題 Retinoic Acid Deficiency Underlies the Etiology of Midfacial Defects	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 686 ~ 694
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/00220345211062049	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 -

〔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	山城 隆 (Yamashiro Takashi) (70294428)	大阪大学・大学院歯学研究科・教授 (14401)	
研究分担者	黒坂 寛 (Kurosaka Hiroshi) (20509369)	大阪大学・大学院歯学研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	犬伏 俊博 (Inubushi Toshihiro) (30550941)	大阪大学・歯学部附属病院・講師 (14401)	

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