

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17159

研究課題名（和文）TGF-β/Rasシグナルを分子標的にした口蓋突起癒合不全制御への挑戦

研究課題名（英文）New challenge of control failure of palatal fusion as molecularly target TGF-β/Ras signal.

研究代表者

青山 剛三（AOYAMA, GOZO）

大阪大学・大学院歯学研究科・招へい教員

研究者番号：00838542

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：口蓋突起上皮の動態異常が口蓋裂の発症と大きく関わっていることが知られている。Ras阻害剤投与群において口蓋突起上皮のライブイメージング技術により二次口蓋の上皮除去が阻害されることを見出した。静置培養でも同様にRas阻害剤投与群では口蓋突起癒合が抑制され、E-cadherinおよびp63が口蓋癒合面の内側縁上皮に強発現していた。また、Rasシグナルの下流分子であるRREB1に着目し、Rreb1遺伝子は口蓋癒合面の内側縁上皮に特異的に発現し、Rreb1ノックダウン群では口蓋突起癒合が抑制された。これによりRasシグナルおよびRreb1遺伝子が口蓋突起癒合に重要な因子であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は口蓋突起上皮のライブイメージング技術を応用することで、TGF-β/Rasシグナル経路が口蓋突起癒合における細胞動態にどのような影響を及ぼしているかを解明し、Rasシグナル経路を制御するための標的分子を探索する新しい取り組みである。Rasシグナルの標的分子であるRREB1を用いた実験系を確立したことにより、口蓋突起癒合不全に特異性の高いTGF-β/Rasシグナル分子標的治療法の構築を進めていくことが可能になる。

研究成果の概要（英文）：It is known that various factors involved in the development of cleft lip and palate, in particular, abnormal dynamics of the palatal epithelium are greatly involved in the onset of cleft palate. We found that secondary palatal epithelial removal was inhibited by live imaging techniques of the palatine process epithelium in the Ras inhibitor group. Similarly, in stationary culture, palatal fusion was suppressed in the Ras inhibitor group, and E-cadherin and p63 were strongly expressed in the medial edge epithelium of the palatal fusion surface. In addition, focusing on RREB1, a downstream molecule of Ras signaling, the Rreb1 gene was specifically expressed in the medial edge epithelium of the palatal fusion surface, and palatine process fusion was suppressed in the Rreb1 knockdown group. We found that Ras signaling and Rreb1 genes are important factors for palatal fusion.

研究分野：組織発生学

キーワード：二次口蓋の癒合 口唇口蓋裂 TGF-β Rasシグナル経路

1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂の発症には様々な要因が関与することが知られているが、とりわけ口蓋突起上皮の動態異常が口蓋裂の発症と大きく関わっている。今回我々が着目する TGF- β シグナル伝達経路は口蓋裂発症において中心的な役割を果たしていることは知られているものの、口蓋上皮の細胞動態に与える影響やその分子メカニズムについては十分に明らかになっていない。研究代表者らの過去の研究結果から、口蓋突起上皮のライブイメージング技術により、口蓋突起癒合時の上皮細胞の細胞動態を観察することを可能にしている。また、TGF- β の下流で働く Ras シグナル経路は非古典的な経路として近年、特に注目されている (*Nature* 2020 PMID: 31915377)。我々は、この Ras シグナル経路の阻害により口蓋上皮の癒合不全が生じる新たな知見を得た。このことから、上述のライブイメージング技術を応用し、TGF- β /Ras シグナル経路を標的として口蓋突起癒合面の細胞動態の異常を改善することができれば、口蓋裂発症のメカニズム解明に寄与するだけでなく、口蓋裂に対する根治的な病因治療の開発に繋がる可能性が高い。

2. 研究の目的

口蓋突起癒合不全における口蓋上皮の細胞動態の異常はいくつかのパターンに集約されることが明らかになってきた。つまり、口蓋上皮癒合面の細胞動態の異常を改善することで、発症原因が多様な口蓋裂に対して非常に効率的・効果的な治療が可能になると推察される。研究代表者らは上皮特異的に GFP を発現するマウスを用いて、口蓋癒合時の上皮の細胞動態を観察するライブイメージング手法を開発し、これまで困難であった口蓋突起癒合時の上皮細胞の細胞動態を観察することを可能にした。本研究では Ras シグナルが TGF- β シグナル経路の下流において口蓋上皮癒合面の上皮細胞の細胞動態にどのような影響を及ぼしているのかを詳細に解析し、TGF- β /Ras シグナル経路を分子標的にして口蓋裂発症における新たな細胞学的メカニズムを解明する。

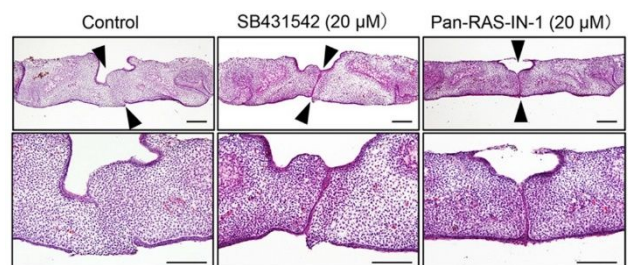
3. 研究の方法

野生型マウス口蓋突起の器官培養において TGF- β 阻害薬添加群および Ras シグナル阻害薬添加群の実験モデルを用い、口蓋突起癒合面の形態学的な解析を行った。同様の実験群で口蓋突起半側除去器官培養 (Gozo A. et al *Front. Physiol.* 2019) を行い経時的な観察を行った。さらに Ras シグナルの下流分子である RREB1 に着目し、*Rreb1* ノックダウン群を用いて口蓋突起癒合面の形態学的な解析を行い、*Rreb1* 遺伝子が口蓋突起癒合に及ぼす影響について評価した。

4. 研究成果

生後 4 週齢の野生型マウスの口蓋では、口蓋突起が癒合し、完全な口蓋の形成が確認できる。胎生 14.5 日齢の口蓋突起を摘出し、静置培養を行った。48 時間後に対象群では口蓋突起どうしの癒合が認められたが、TGF- β 阻害薬 (SB431542) 添加群および Ras シグナル阻害薬 (Pan-Ras-IN) 添加群では癒合が認められなかった。

(図 1)



Inubushi, T. et al. *Dis. Model. Mech.* 2022, 15,

図 1 TGF- β 阻害薬添加群と Ras シグナル阻害薬添加群における口蓋突起癒合時の形態学的解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

また、E-カドヘリンは口蓋癒突起癒合時における MEE の消失過程において、喪失することが知られている上皮特異的なマーカーであり、p63 は口蓋裂が生じる際に重要な転写因子の一つであることが知られている。

E-カドヘリンと p63 の免疫染色により、対照群では 48 時間培養後に E-カドヘリンと p63 の二重陽性細胞が口蓋突起癒合面正中 (MEE) 領域から消失することが示された。一方、TGF 阻害薬添加群および Ras シグナル阻害薬添加群では、口蓋突起が接触しているにもかかわらず、MEE では E-カドヘリンおよび p63 の発現が観察された (図 2)。

次に上皮特異的に GFP を発現するマウスである K14-GFP マウス胎生 14 日齢の口蓋突起を摘出し、口蓋突起半側除去器官培養実験を行った (図 3 右上)。

対象群と比較して GFP 消失領域は TGF 阻害薬添加群および Ras シグナル阻害薬添加群で有意に減少した。(図 3 左)

また、片側の口蓋突起前方部の器官培養において GFP 消失領域は TGF 阻害薬添加群および Ras シグナル阻害薬添加群では MEE 領域での E-カドヘリンの発現が保持されていた。(図 3 右下)。これらの結果から MEE の消失過程に必須である E-カドヘリンの喪失には Ras シグナル伝達が必要であることが示唆された。これらは口蓋裂発症の主因の一つである口蓋癒合不全において TGF- β /Ras シグナル経路が口蓋癒合面上皮細胞に関与することが明らかとなった。

次に、Ras シグナルの下流分子である RREB1 に着目し、*Rreb1* 遺伝子は口蓋癒合面の内側縁上皮に特異的に発現し、口蓋癒合面上皮における発現を調べた。胎生 14.0 日齢のマウス口蓋癒合面では MEE 領域で発現し、胎生 14.5 日齢のマウス口蓋癒合面では接触部の MEE 領域で *Rreb1* の発現を顕著に認められた (図 4)。これらの結果から、*Rreb1* が口蓋形成において口蓋癒合の間葉ではなく MEE を含む上皮特異的に発現している可能性が示

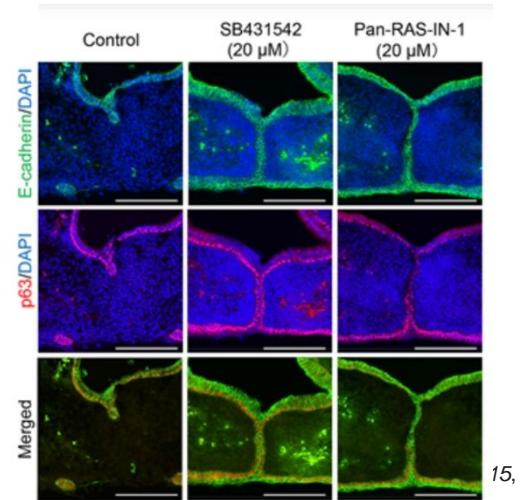
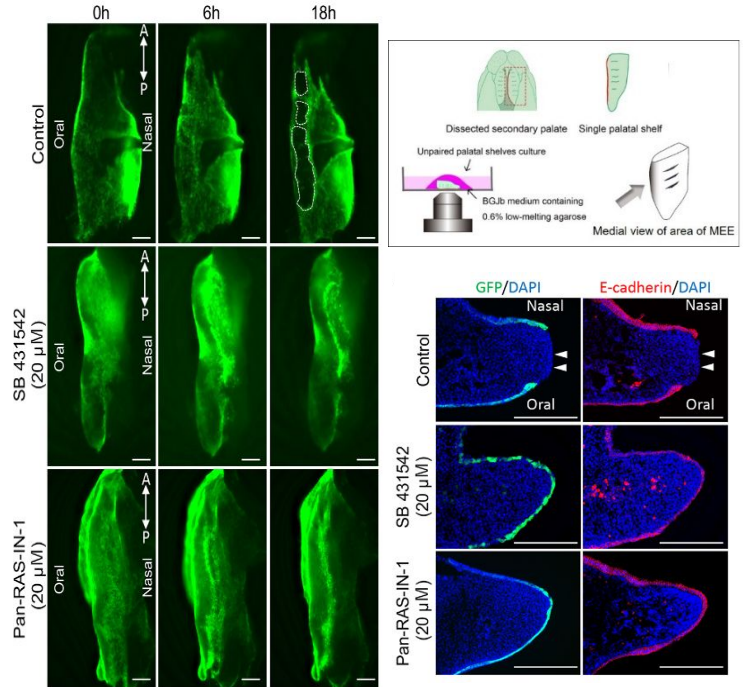
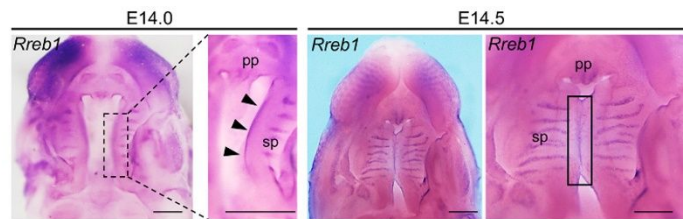


図 2 TGF 阻害薬添加群と Ras シグナル阻害薬添加群における口蓋癒合時の組織学的解析



Inubushi, T. et al. *Dis. Model. Mech.* 2022, 15, 15
 図 3 口蓋癒合面半側除去器官培養時の組織学的解析



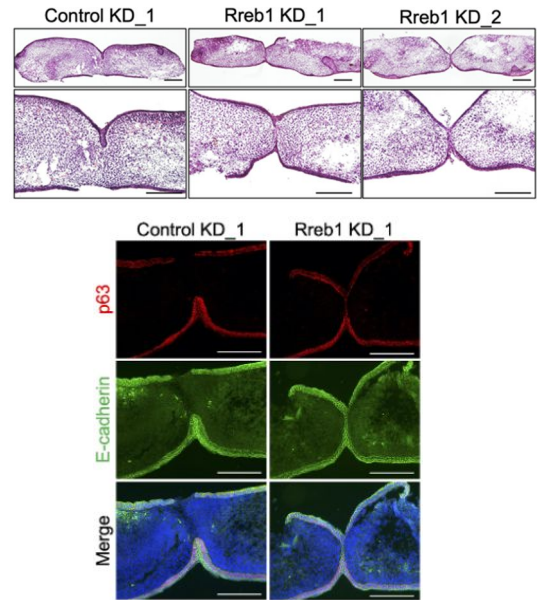
Inubushi, T. et al. *Dis. Model. Mech.* 2022, 15, 15
 図 4 口蓋癒合面上皮における *Rreb1* の発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

唆された。

次に、*Rreb1* ノックダウン群を用いた口蓋突起の静置培養では 48 時間後に口蓋突起どうしの癒合は認められなかった(図 5 上)。E-カドヘリンと p63 の免疫染色ではともに MEE 領域において発現が認められた(図 5 下)。これにより Ras シグナルおよび *Rreb1* 遺伝子が口蓋突起癒合に重要な因子であることを見出した。また、この研究内容を共同執筆者として *Disease Models & Mechanisms* 誌に投稿した。

今後は Ras シグナルの標的分子である RREB1 を用いた上述の実験系を確立したことにより、口蓋突起癒合不全に特異性の高い TGF- β /Ras シグナル分子標的治療法の構築を進めていく。



Inubushi, T. et al. *Dis. Model. Mech.* **2022**, 15,

図 5 口蓋突起癒合における *Rreb1* ノックダウンの影響

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Inubushi Toshihiro, Fujiwara Ayaka, Hirose Takumi, Aoyama Gozo, Uchihashi Toshihiro, Yoshida Naoki, Shiraishi Yuki, Usami Yu, Kurosaka Hiroshi, Toyosawa Satoru, Tanaka Susumu, Watabe Tetsuro, Kogo Mikihiro, Yamashiro Takashi	4. 巻 15
2. 論文標題 Ras signaling and RREB1 are required for the dissociation of medial edge epithelial cells in murine palatogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Disease Models & Mechanisms	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dmm.049093	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 該当する

1. 著者名 青山 剛三、黒坂 寛、三原 聖美、上松 節子、相川 友直、古郷 幹彦、山城 隆	4. 巻 47
2. 論文標題 RED systemによる上顎骨仮骨延長術および下顎枝矢状分割術を施行後長期観察した左側口唇口蓋裂の1例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本口蓋裂学会雑誌	6. 最初と最後の頁 220 ~ 230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11224/cleftpalate.47.220	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田 尚起, 犬伏 俊博, 廣瀬 匠, 黒坂 寛, 青山 剛三, 山城 隆
2. 発表標題 口蓋突起上皮の癒合におけるJAK2/STAT経路の役割について
3. 学会等名 第81回日本矯正歯科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣瀬 匠、犬伏 俊博、吉田 尚起、黒坂 寛、青山 剛三、山城 隆
2. 発表標題 口蓋突起癒合におけるデキサメタゾン(DEX)投与の影響について
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会学術大会 & 第5回国際会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原 采香, 犬伏 俊大, 内橋 俊大, 青山 剛三, 廣瀬 匠, 吉田 尚紀, 渡部 徹郎, 山城 隆, 古郷 幹彦, 田中 晋
2. 発表標題 マウス口蓋突起癒合におけるRasシグナルおよびRreb1遺伝子の役割
3. 学会等名 日本口腔科学会
4. 発表年 2022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
---------	---------