

## 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25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592254

研究課題名（和文） 口蓋発生におけるMFCS4の役割

研究課題名（英文） MFCS4 in palate development

研究代表者

奥原 滋（OKUHARA SHIGERU）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：10451973

研究成果の概要（和文）：

Shh の転写を時空間特異的に調節する遺伝子配列群のうち MFCS4 は、口腔と咽頭の発生時期（胎齢（E）11.00-15.50）に活性を発揮する。MFCS4 を、Shh と共にヘテロ欠させたマウス（Shh<sup>+/-</sup>MFCS4<sup>+/-</sup>マウス）は、完全正中口蓋裂を表現型に持つ。その主たる原因と目される舌は Shh<sup>+/-</sup>MFCS4<sup>+/-</sup>マウスでは、基底膜は不連続に局在し、平坦で波打ち状の構造が認められなかった。舌中隔も連続性が失われ部分欠損していたので、これが舌筋の配列が乱れる原因と考えられた。Shh シグナリングにより基底膜構成成分 Laminin  $\alpha$  1 や舌中隔マスター転写因子 Scleraxis が支配されることを示す過去の報告と一致した。

研究成果の概要（英文）：

MFCS4 is one of cis-regulatory sequence for Shh transcription and its activation was found in oral and pharyngeal region from E11.00-E15.50. Compound deletion heterozygotes for Shh and MFCS4 show cleft palate. In palatal development, elevation of palatal shelves is achieved by corporation of intrinsic elevation force and change in shape and motion of the tongue. Because the palate of the mutant without tongue in organ culture successfully elevated and the exterior and histological preparation of the mutant tongue was hypomorphic, we focused on the relationship between tongue development and Shh signaling. In the tongue of the mutant, arrangement of the myotube was not organized or symmetric. Basal membrane of lingual epithelium that was discontinuous and without wave, and lingual septum that was again discontinuous and hypomorphic, were suggested to cause myotube disarrangement. As Shh signaling was previously reported to regulate the expression of laminin, that is a key component for basal membrane, and Sox9, that is a master transcription factor for tendon development, histological significances found in the tongue of the mutant agree with molecular mechanisms. These findings will be published with molecular evidences.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：病態検査学・口蓋裂

### 1. 研究開始当初の背景

口蓋裂はヒト先天異常中最も高頻度である。その治療は多方面かつほぼ成人までの長期にわたるので、口蓋裂の原因と口蓋発生の機序の解明は社会に有用である。

Sonic hedgehog (以下 Shh) は、胚において正中形成や、四肢・歯・味蕾など多くの器官の発生に必要な分子である。その発現は複数の cis-regulatory sequences に制御されているが、そのひとつで、本研究で着目する MFCS4 はマウス胎齢 (E) 11.0-15.5 日の間、舌・咽頭などで Shh の発現を誘導する。MFCS4 および Shh のヘテロ欠失マウスの交配で得られる複合ヘテロ欠失マウスは、100%口蓋裂を示す。従来の Shh の遺伝子改変マウスでは得られなかった、口腔に局限した表現型が特徴である。

### 2. 研究の目的

そこで、上記複合ヘテロ欠失マウスを用いて、口蓋発生のメカニズムと Shh シグナルの役割を明らかにすることを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

主に口蓋裂モデルマウスの解析方法に従った。すなわち、口蓋発生前における3つの大きなステップである口蓋突起の伸長・挙上・癒合のどの段階が阻害されて口蓋裂になるか、ついで、各段階に貢献する組織とその役割を発揮するために必要な分子がどのように変化しているかを検討した。

### 4. 研究成果

まず Shh と共に Shh シグナリングに参画する Ptc1、Gli1 の発現領域を in situ hybridization により検討したところ、野生型マウス E11.75 では舌上皮全体に Shh が、それに対応する上皮直下から舌内部へ Ptc1 が、上皮直下から舌内部へ Ptc1 よりも深く舌基部まで Gli1 の発現がみられた。複合ヘテロ欠失マウスではいずれも弱く、また浅い範囲でのみ発現がみられた。これは、舌上皮に発する Shh シグナリングが舌基部に及んでいないこと、複合ヘテロ欠失マウスでは Shh の発現のみならず Shh シグナリングも減弱し到達深度が浅くなっていることを示す。

次に口蓋発生前を Hematoxylin-Eosin 染色切片で観察したところ、野生型では口蓋突起の癒合が始まる時期になっても複合ヘテロ欠失マウスでは口蓋突起の挙上が起こらずにいた (図1)。口蓋突起の挙上は、口蓋突起自身の挙上能力と、挙上の道筋に介在する舌の変形や下方移動の2つの協調によって成立する。口蓋突起を上顎体と共に、しかし舌

は伴わずに器官培養すると、野生型マウス同様複合ヘテロ欠失マウスでも口蓋突起は挙上し、癒合も達成した (図2)。舌は外観も、前述切片の観察においても、形態異常が明らかであった。これらは、口蓋突起の挙上失敗は、舌が変形・移動などの運動を正しく行えないことが原因であると示唆する。また、舌の変形には内舌筋が、舌の下方移動にはオトガイ舌筋が主に働くので、これらの発生または走向が異常であると示唆された。

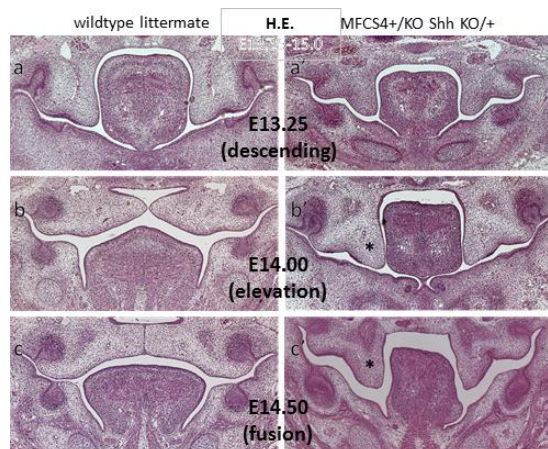
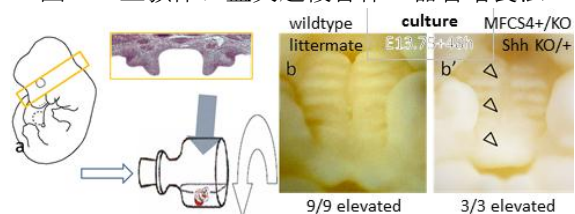


図1. 野生型と複合ヘテロ欠失マウスにおける口蓋発生の各段階 (前頭断切片、H.E.)

口蓋突起は舌の両側を下方に伸長し、次に舌の上へ内転しながら挙上し、最後に左右の口蓋突起が癒合する。右側複合ヘテロ欠失マウスでは口蓋突起 (\*) は舌の両側にとどまっている。

図2. 上顎体口蓋突起複合体の器官培養法



と培養後の口蓋の外観

上顎体口蓋突起複合体の培養は、酸素を加圧供給した回転バイアル内に培養液を入れて行う。左はその模式図。右は培養後の野生型および複合ヘテロ欠失マウスでの口蓋。両者とも口蓋突起は挙上を経て癒合に至っている。

そこで、舌をさらに詳細に観察すると、基底膜の主成分である Laminin に対する免疫組

組織化学染色で検出した舌上皮基底膜は、野生型では波状で連続した膜として観察されるところ、複合ヘテロ欠失マウスでは波状構造がなく平坦で、連続性を失っていた(図3)。

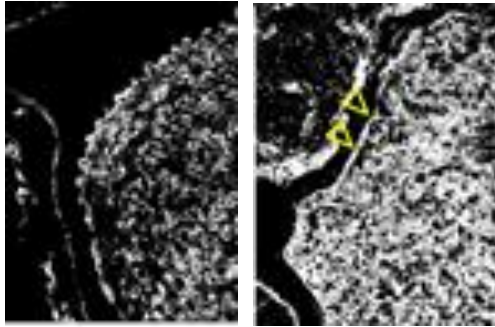


図3. Laminin の免疫組織化学染色による舌上皮基底膜(前頭断切片、左:野生型、右:複合ヘテロ欠失マウス;胎齢13.75日)野生型の舌上皮基底膜には連続した波状構造が認められるが、複合ヘテロ欠失マウスでは平坦で連続性を欠く。

また、舌中隔の形成を司る転写因子 scleraxis に対する in situ hybridization により観察される舌中隔は、複合ヘテロ欠失マウスでは小さく不連続であった(図4)。舌基底膜はその直下にある固有層の形成を司り、舌中隔との間に内舌筋が走向して舌の変形を可能にする。舌中隔はその他に、オトガイ舌筋の停止でもあり、舌を下方に引く作用の作用点である。これらが発達不全であることは、内舌筋やオトガイ舌筋の作用が不十分なし正しくない方向で行われる可能性を示している。

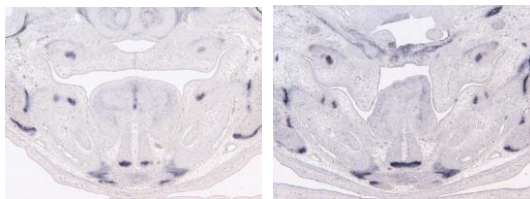


図4. Scleraxis の in situ hybridization による舌中隔(前頭断切片;左:野生型、右:複合ヘテロ欠失マウス)野生型の舌中隔は、舌正中に縦長の領域として明確にみられるが、これは複合ヘテロ欠失マウスでは失われている。オトガイ舌筋の基底部分でも左右の癒合がみられる。

過去の文献によれば、Laminin の構成要素の1つ Laminin  $\alpha 1$  は Shh シグナリングの支配を受けている。Scleraxis は Sox9 を介してやはり Shh シグナリングの支配下にある。これらの過去の報告は、前述の我々の観察所見と大変よく一致している。

以上から、Shh と MFCS4 の複合ヘテロ欠失マウスでは、舌上皮における Shh の発現低下が、舌内での Shh シグナリングの低下を起し、舌上皮基底膜における Laminin  $\alpha 1$  と舌中隔における Scleraxis の発現を不十分にするようなシグナル分子機構の変化がある。これが、舌上皮固有層や舌中隔の発達が不十分になる原因で、舌上皮固有層や舌中隔に起始・停止する内舌筋やオトガイ舌筋の作用を不十分にしたり方向を誤らせたりする。すなわち、口蓋突起挙上時に舌の変形や運動が正しく伴わないので、口蓋裂になると考えられた。また、舌の存在は口蓋突起挙上を妨げるが、舌は変形・下方運動することで逆に口蓋突起挙上を助ける重要な役割があることが明らかになった。

#### 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2件)

1. Effects of embryonic hypoxia on lip formation. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2012 Apr;94(4):215-22. Nagaoka R, Okuhara S, Sato Y, Amagasa T, Iseki S. doi: 10.1002/bdra.23000 査読有

2. Pocket epithelium in the pathological setting for HMGB1 release. J Dent Res. 2011 Feb;90(2):235-40. Ebe N, Hara-Yokoyama M, Iwasaki K, Iseki S, Okuhara S, Podyma-Inoue KA, Terasawa K, Watanabe A, Akizuki T, Watanabe H, Yanagishita M, Izumi Y. doi: 10.1177/0022034510385688. 査読有

[学会発表](計2件)

1. Tongue and palate development in Shh-/+MFCS4+/- . Shigeru OKUHARA, Ryosuke NAGAOKA, Takanori AMANO, Tomoko SAGAI, Toshihiko SHIROISHI, Sachiko ISEKI  
Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, 2012年5月28日神戸

2. Tongue development in Shh-/+MFCS4+/- . Shigeru OKUHARA, Ryosuke NAGAOKA, Takanori AMANO, Tomoko SAGAI, Toshihiko SHIROISHI, Sachiko ISEKI  
Gordon Research Conference Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration 2012年3月18日 Ventura, CA, USA

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

奥原 滋 (OKUHARA SHIGERU)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・非常勤講師  
研究者番号：10451973

### (2) 研究分担者

佐藤 豊 (SATO YUTAKA)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・助教  
研究者番号：90361716

井関 祥子 (ISEKI SACHIKO)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・教授  
研究者番号：80251544

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：