

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31日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592269

研究課題名（和文） パールカンが関与する上皮索基底膜消失から検討した口蓋裂発生メカニズムの研究

研究課題名（英文） Localization of Perlecan and Heparanase in the Epithelial Seam during Palate Formation

研究代表者

菅原 利夫（SUGAHARA TOSHIO）

愛知学院大学・歯学部・客員教授

研究者番号：10116048

研究成果の概要（和文）：硬口蓋形成へのヘパラン硫酸とその分解酵素ヘパラーゼの関与を明らかにする目的で、二次口蓋形成過程における骨芽細胞転写調節因子、ヘパラン硫酸およびヘパラーゼの局在について検討した。その結果、骨基質中に存在するヘパラン硫酸および骨芽細胞が産生したヘパラーゼは上顎骨あるいは口蓋骨の形成に関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We examined the immunolocalization pattern of heparan sulfate (HS) and heparanase (HPSE) in order to clarify their roles in murine palatal bone formation in palatogenesis. Heparanase might contribute to the formation of hard palate by cleaving of heparan sulfate chains of HSPG in bone matrix.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：口蓋裂・発生メカニズム・パールカン・上皮索基底膜・口蓋突起

1. 研究開始当初の背景

口蓋裂の発生メカニズムを研究する上で重要な二次口蓋形成時の形態変化は、1) 舌の側方に沿った口蓋突起の下方への発育・伸長、2) 口蓋突起が舌の上方へ挙上する際の水平への伸長と接触、3) 左右の口蓋突起の癒合、4) 二次口蓋の間葉組織の結合による癒合の完了の発育段階に分けられている。この中で口蓋突起の癒合期には正中部での上皮索および口腔側・鼻腔側の上皮トライアングル部の形成が、また間葉組織の結合による癒合完了期には上皮索の断裂、上皮島の形成がみられ、これらのステージにおけるカスパーゼやTUNEL法を用いた上皮細胞のアポトーシス、細胞接着因子、上皮細胞の間葉系細胞への形質転換 (EMT) といった多彩な細胞、分子レベルでの相互作用と制御機構についての研究が行われている。そして口蓋裂の発生は、口蓋突起の癒合を妨げるアポトーシスに関与する **programmed cell death** の不調によるとする報告が一般的であるが、それに相反する報告も出されており、口蓋裂の発症メカニズムについての明確な解答は出されていない。

私たちの研究グループは口蓋裂の発症のメカニズムを解明するため、下記のような口蓋の正常な発生における基底膜の関与についての研究を行ってきた。

2. 研究の目的

本研究は従来の口蓋裂発生機序の研究とは視点を変えて、正常口蓋形成と化学物質誘発の口蓋裂発生系を比較することにより口蓋形成の4つのステージのそれぞれの口蓋突起の基底膜をはじめ、細胞膜表面、細胞外基

質に局在するプロテオグリカンおよびその分解酵素であるパールカン、そしてプロテオグリカンの発現を介して遊離、活性化され、口蓋突起の挙上・水平転位、発育、癒合、そして口蓋の骨形成、更には二次口蓋間葉細胞の分化、増殖に関すると考えられている増殖因子 **bFGF** とそのレセプター **FGFR-1,2,3,4** の局在を免疫組織化学, **in situ hybridization** 法によって明らかにし、ヘパラーゼを介した基底膜の消失と口蓋形成との関連を解析する。

また、口蓋突起挙上時の持続的筋収縮に関与するアクチンに関すると考えられる基底膜-ジストロフィン-アクチン架橋構造を構成する因子である基底膜パールカン、細胞膜サルコグリカンコンプレックス、細胞内ジストロフィン、基底膜と細胞膜を繋ぐジストログリの細胞・組織内局在、動態を詳細に検討し、各ステージでの口蓋発生および口蓋裂発症メカニズムを解明しようとするものである。

3. 研究の方法

本研究は口蓋裂自然発生系 **Eh/Eh** マウスと口蓋裂非発生系 **C57BL/6By WT** マウスを用いて、1) 口蓋突起の下方への発育・伸長、2) 口蓋突起の挙上と水平への伸長、3) 左右の口蓋突起の癒合、4) 二次口蓋の間葉組織の結合、そして口蓋の骨形成という4つのステージにおける下記の事項を比較検討する。

(1) 口蓋突起の基底膜をはじめ、細胞膜表面、細胞外基質に局在するプロテオグリカンおよびその分解酵素であるヘパラーゼ、パールカン、そしてプロテオグリカンの発現により遊離、活性化されると考えら

れている増殖因子**bFGF**とそのレセプター**FGFR-1,2,3,4**の局在を免疫組織化学, **in situ hybridization**法によって明らかにし、基底膜の消失と口蓋突起癒合との関連を解析する。

(2) 口蓋突起の水平転移の時期にだけ癒合部にその発現が認められ、他の間葉組織には認められない**Hoxc**遺伝子の口蓋突起の挙上・水平伸長への関連の解析。

(3) 更に口蓋突起の完全な癒合に重要な因子として働くは口蓋骨の形成に関する検討。

以上の実験により各ステージでの口蓋発生および口蓋裂発症メカニズムを細胞分子レベルでのシグナル伝達の相互作用と制御の両面から明らかにする。

4. 研究成果

(1) 上皮索基底膜において他の基底膜構成成分に先んじてパールカンおよびコラーゲンIVの消失が観察されること。

(2) 口蓋突起上皮細胞が分泌したヘパラーゼはパールカンのヘパラン硫酸鎖に結合されている増殖因子を遊離、活性化することにより間葉細胞の分泌・増殖を惹起する可能性があること。

(3) 口蓋突起上皮細胞が分泌した**MMP**はコラーゲンを細分化することで上皮索基底膜を分解・断裂消失させることを解明し、口蓋癒合時の基底膜の動態が極めて重要であることを明らかになった。

(4) 口蓋突起上皮細胞が分泌したヘパラーゼは、上皮索基底膜パールカンのヘパラン硫酸鎖に結合されている増殖因子**bFGF**を遊離活性化する

(5) 遊離活性化された**bFGF**は**FGFR-1**

を介して間葉系細胞の分化・増殖を惹起し、口蓋形成に関与することが示唆された。

(6) 口蓋形成過程において、**Hoxc5**局在は**PCNA**の局在性と類似していたことから、**Hoxc5**は口蓋突起の増殖と分化に関与することが示唆された。

(7) 水平位をとる**E14.5**口蓋突起において、**Hoxc5**陽性を示す間葉系細胞が**Eh/Eh**マウスではびまん性に観察された一方で、**WT**マウスでは口蓋突起基部に局限していた。

(8) これらのことから、**Hoxc5**は口蓋突起間葉系細胞の配置、口蓋突起の水平方向への伸長に関与する可能性が示唆された。

(9) 口蓋突起癒合期に観察される上皮索、上皮島、上皮トライアングルの消失に**Hoxc5**が関与する可能性が示唆された。

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 2件)

① Imura H, Yamada T, Mishima K, Fujiwara K, Kawaki H, Hirata A, Sogawa N, Ueno T, Sugahara T, Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin suggests abnormal palate development after palatal fusion, Congenit Anom (Kyoto), 50(2):77-84, 2010. (査読あり)

② Hirata, A., Tsuji, T., Imura, H., Yamada, T., Ueno, T., Mishima, K., Natsume, N., Sugahara, T., Koga, Y., Takano, K. and Nakamura, H., Localization of the HOXC homeobox gene family during palate formation in mice, Selected papers from the XX Congress of the European

Association of Cranio-Maxillo-Facial Surgery (Bruges [Belgium], September 14-17, 2010): 415-420, 2010 (査読あり)

[学会発表] (計 4件)

① Toshio SUGAHARA, Katsuhiko MINAMI, Katsuaki MISHIMA, Yoshihide MORI, Tomohiro YAMADA, Hideto IMURA, Azumi HIRATA, Nagato NATSUME, Total TMJ replacement for obstructive sleep apnea syndrome associated with TMJ destruction due to rheumatoid arthritis, XXI Congress of the European Association of Cranio-Maxillo-Facial Surgery (Dubrovnik) Croatia, September 11-15, 2012.

② Azumi Hirata, Hideto Imura, Takaaki Ueno, Katsuhiko Minami, Nagato Natsume, Toshio Sugahara, HEPARANASE LOCALIZATION DURING PALATOGENESIS IN MICE, XXI Congress of the European Association of Cranio-Maxillo-Facial Surgery (Dubrovnik) Croatia, September 11-15, 2012. (査読あり)

③ 平田あずみ、井村英人、南克浩、夏目長門、菅原 利夫, Homeobox family HOX 遺伝子は口蓋形成に関与する, 第 56 回 日本口腔外科学会総会, 2011 年 10 月 21 日, 大阪国際会議場

④ Tosho Sugahara, Localization of Heparan Sulfate and Heparanase during Palatal Bone Formation in Palatogenesis in Mice, EUROPEAN ASSOCIATION FOR C, 14 to 17 September, CRANIO-MAXILLO-FACIAL SURGERY 2010 Congress Bruges

[図書] (計 1件)

① 口腔外科専門医マニュアル: 口腔外科専門医として習得すべき手術 P6-12, 救急救命医療 P44-4、手術手技、(1) 消炎手術, (2) 顎口腔領域の硬組織、軟組織に生じる良性腫瘍と嚢胞 P72-105, 菅原利夫, 医歯薬出版, 2011. (査読なし)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 利夫 (SUGAHARA TOSHIO)
愛知学院大学・歯学部・客員教授
研究者番号: 10116048

(2) 研究分担者

平田 あずみ (HIRATA AZUMI)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号: 40263587

南 克浩 (MINAMI KATSUHIRO)
愛知学院大学・歯学部・講師
研究者番号: 70346162

藤原 久美子 (FUJIWARA KUMIKO)
愛知学院大学・歯学部・講師
研究者番号: 60404737

井村 英人 (IMURA HIDETO)
愛知学院大学・歯学部・非常勤講師
研究者番号: 10513187

(3) 連携研究者