

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21037

研究課題名（和文）硫酸イオン代謝異常が軟骨形成不全症を引き起こすメカニズムの解明とその治療法の探索

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism by which abnormal sulfate ion metabolism causes chondrodysplasia and search for its treatment

研究代表者

吉田 侑加（Yoshida, Yuka）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：50966710

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：Slc26a2-K0の上顎軟骨の形態異常の発生メカニズムとアポトーシス亢進の関連が示唆されたマウス軟骨前駆細胞株にて、Slc26a2ノックダウンを行うと、正常細胞と比較してアポトーシスが亢進することを確認した。Slc26a2ノックダウンマウス軟骨前駆細胞株では対照群と比較して有意にアポトーシスが亢進しており、mTORの活性化に伴い、S6K、4EBP1のリン酸化が亢進していた。さらに、mTOR阻害剤を投与することでアポトーシスが抑制されることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Slc26a2の欠失による硫酸イオン代謝（硫酸イオンの細胞内への取り込みとその利用）の異常が、上顎骨の低形成や上顎歯胚に特異的な形成不全等を引き起こすメカニズムを明らかにすることで、軟骨形成不全症における特徴的な顎顔面形態異常の病因を解明し、新しい分子診断や予防・治療法の基盤構築を目指すことができる。

研究成果の概要（英文）：In a mouse cartilage progenitor cell line that has been suggested to be associated with the developmental mechanism of abnormalities in Slc26a2-K0 maxillary cartilage morphology and enhanced apoptosis, we confirmed that Slc26a2 knockdown resulted in enhanced apoptosis compared to normal cells. In Slc26a2 knockdown mouse cartilage progenitor cell line significantly enhanced apoptosis compared to the control group, and phosphorylation of S6K and 4EBP1 was enhanced with activation of mTOR. Furthermore, we confirmed that treatment with mTOR inhibitors suppressed apoptosis.

研究分野：遺伝学

キーワード：軟骨

### 1. 研究開始当初の背景

軟骨形成不全症の患者は、中顔面の劣成長、相対的な下顎前突といった特徴的な顔面形態を呈し、矯正治療単独では正常咬合を達成できず、上下骨切り術を伴う外科的矯正治療を併用しても良好な咬合関係の確立や審美的な改善が十分得られない難症例が多数存在する。そのため、軟骨形成不全症の病因の解明と有効な矯正歯科治療法の構築の必要がある。

一方、SLC26A2 遺伝子の変異は軟骨形成不全を主徴とする先天性疾患の一つである捻曲性骨異形成症と呼ばれる先天性疾患を引き起こすことが知られている。捻曲性骨異形成症の全身症状としては、軟骨形成不全、低身長、四肢の短縮などが挙げられ、主な顎顔面領域の先天異常としては、上顎骨の低形成、口蓋裂(25-60%)、歯の先天欠如(30%)、歯の短小化などが報告されている。SLC26A2 遺伝子は、硫酸イオンを細胞内へ取り込む硫酸イオントランスポーターをコードする遺伝子として知られている。硫酸イオンは、多糖鎖、ステロイドホルモン、チロシンの硫酸化修飾を介して組織の発生や形態形成に重要な働きをしていることが報告されている。しかし、硫酸イオンが組織特異的に取り込まれる仕組みや、硫酸イオンの欠乏が頭蓋顎顔面の形態形成や軟骨形成のどの過程において、どのように異常を引き起こすのかは十分明らかにはなっていない。上顎骨の形態形成において、硫酸イオン代謝が重要な働きをしていることは疑いがない。しかし、軟骨形成の、特に上顎の発生過程において、硫酸イオン代謝がどのような役割を担っているのかについて報告はない。

### 2. 研究の目的

*Slc26a2* の欠失による硫酸イオン代謝(硫酸イオンの細胞内への取り込みとその利用)の異常が、上顎骨の低形成や上顎歯胚に特異的な形成不全等を引き起こすメカニズムを明らかにすることで、軟骨形成不全症における特徴的な顎顔面形態異常の病因を解明し、新しい分子診断や予防・治療法の基盤構築を目的とする。

### 3. 研究の方法

方法 . *Slc26a2*-KO マウスの作製と形態学的、病理学的解析

*Slc26a2* のホモ変異マウス胎児から経時的(胎生 12.5 日~胎生 18.5 日)に頭蓋顎顔面組織を採取し、 $\mu$ CT や骨格標本による形態学的な解析を行った。上顎骨の組織切片を作製し、HE 染色や免疫化学染色、*in situ* hybridization 等により、病理組織学的に解析した。上顎骨の軟骨組織をレーザーマイクロダイセクションにより採取し、RNA シークエンスによるトランスクリプトーム解析を行うことで、軟骨形成不全の原因となっている分子メカニズムを検索した。上記で抽出した分子経路について、軟骨細胞を用いて、*in vitro*での検証実験を行った

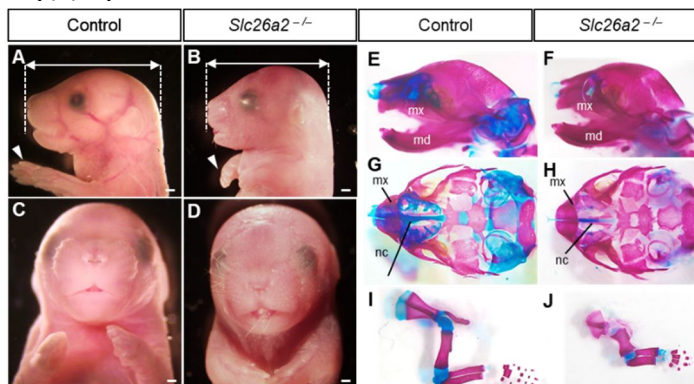
方法 . 軟骨細胞を用いた *in vitro*での検証実験を行い、予防法や治療法の基盤を構築

*Slc26a2*-KO マウスの上顎から抽出した軟骨細胞においてアポトーシスが亢進しているか検証し、方法 のトランスクリプトーム解析で抽出した分子経路阻害剤を治療薬として用いることでアポトーシスが抑制できるか検討し、*in vitro*での表現型の回復作用を検証した。

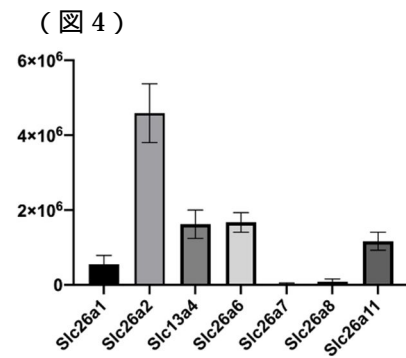
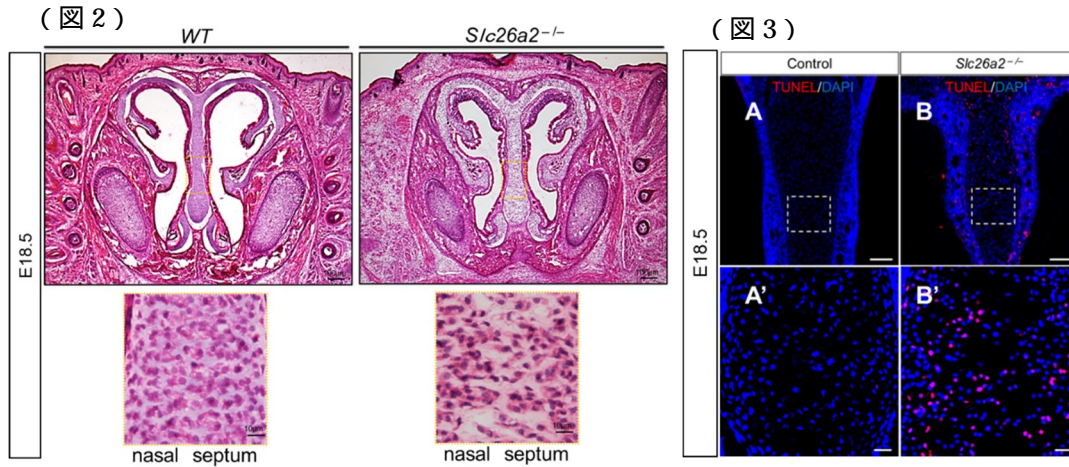
### 4. 研究成果

結果 硫酸代謝異常がどのように頭蓋顎顔面の形態形成異常を引き起こすかを明らかにするため、CRISPR/CAS9 遺伝子編集法により、*Slc26a2* 遺伝子のノックアウトマウス(以下 *Slc26a2*-KO とする)を作製した。*Slc26a2*-KO は E18.5 で母体から取り出すと、すべて、生後間もなく呼吸運動を示すことなく死亡した。*Slc26a2*-KO は対照群と比較し、四肢の短小化、上顎骨の前後方向の低形成を認めた(図 1)。透明骨格標本から、*Slc26a2*-KO は対照群と比較し、鼻中隔軟骨、肋軟骨のアルシアンブルーの染色性の低下が認められた(図 1)。これらの結果から、*Slc26a2* 遺伝子ノックアウトにより、軟骨形成や内軟骨内骨化において表現型が現れることが明らかとなった。組織切片の HE 染色の結果から、*Slc26a2*-KO において、鼻中隔軟骨が厚く、鼻中隔軟骨の細胞排列の乱れが認められた。さらに、軟骨細胞密度の減少、軟骨細胞の染色性の低下を認めた(図 2)。また、TUNEL 染色より、*Slc26a2*-KO の鼻中隔軟骨細胞は、対照群と比較して、アポトーシスが有意に亢進していることが明らかになった(図 3)。 *Slc26a2*-KO における

(図 1)



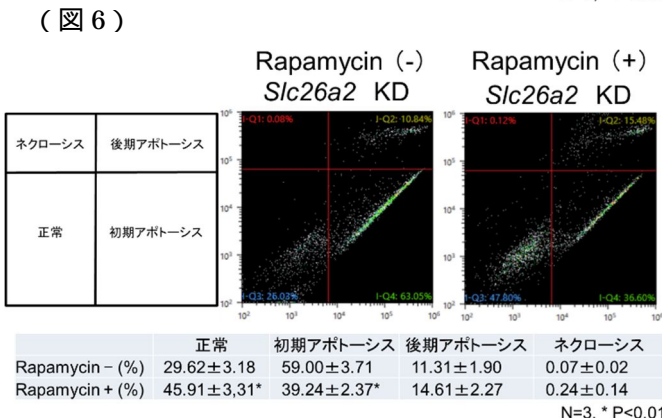
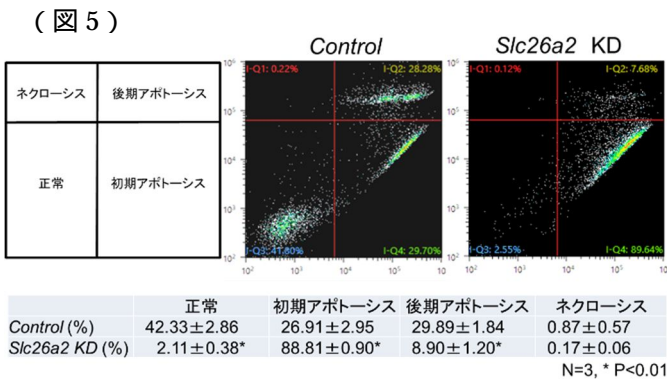
上顎軟骨の形態異常の発生メカニズムとアポトーシス亢進の関連が示唆された。



結果 アポトーシスには大きく分けて p53 依存性アポトーシス、p53 非依存性アポトーシスがある。そこで、*Slc26a2*-K0 の E6.5 から毎日、同時刻に p53 阻害剤の腹腔内注射を行い、E18.5 にて母体から取り出し、解析したところ、表現型の回復は認められなかった。このことから、*Slc26a2*-K0 において亢進しているアポトーシスは、p53 非依存性であることが示唆された。mTOR は、4EBP1 や S6K といったタンパク質合成や細胞増殖に関わる分子をリン酸化し、p53 非依存性アポトーシスを引き起こすことが知られている。マウス由来の軟骨前駆細胞株を用いて Q-PCR を行い、*Slc* トランスポーターの発現を解析したところ、*Slc26a2* の発現が高いことを確認した(図4)。その上で、マウス軟骨

前駆細胞株にレンチウイルスをトランスフェクションし、*Slc26a2* ノックダウンを行うと、正常細胞と比較してアポトーシスが亢進することを確認した(図5)。Western blot にて解析したところ、*Slc26a2* ノックダウンマウス軟骨前駆細胞株(ATDC5)では対照群と比較して有意にアポトーシスが亢進しており、mTOR の活性化に伴い、S6K、4EBP1 のリン酸化が亢進していた。*Slc26a2* ノックダウンマウス軟骨前駆細胞株(ATDC5)に mTOR 阻害剤を投与することでアポトーシスが抑制されることを確認した(図6)。

今後、治療薬の中で最も有効性が高い阻害剤を *in vivo* で応用するため、*Slc26a2*-K0 マウスに治療薬を投与することで表現型の回復を図り、予防・治療法としての有効性を検討していく。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田侑加、犬伏俊博、横山美佳、岡綾香、山城隆
2. 発表標題 頭蓋顎顔面の形態形成における硫酸イオン代謝の役割
3. 学会等名 日本矯正歯科学会
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
---------	---------