

令和 6 年 6 月 7 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：22K21060

研究課題名（和文）コト`ロイソ硫酸硫酸化転移酵素Chst11-KOマウスから紐解く口蓋裂発症の新たなメカニズム

研究課題名（英文）Chst11-KO Mice Unravel a New Mechanism for Cleft Palate Development

研究代表者

横山 美佳（Yokoyama, Mika）

大阪大学・大学院歯学研究科・招へい教員

研究者番号：60967701

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）：Chst11ノックアウトマウスの口蓋突起間葉組織においてATP量の低下を認めた。口蓋突起間葉における細胞増殖能の低下にはATPの低下が関与することが示唆された。次に、ミトコンドリア活性薬剤MA-5を用いたところ、胎生18.5日齢のChst11ノックアウトマウスにおいて約94%の確率で口蓋形成がなされ、ミトコンドリア活性薬剤MA-5により口蓋裂発症を予防できることが示唆された。さらに、酸化ストレス下においてChst11ノックアウトマウスの口蓋突起細胞のミトコンドリア膜電位は優位に低下し、Chst11が欠損すると、口蓋突起間葉細胞の酸化ストレスに対する感受性が高まることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口蓋裂は多因子疾患であると考えられているが、発症の分子メカニズムには不明な点も多い。Chst11ノックアウトマウスにおける口蓋裂発症メカニズムを検討する中で、酸化リン酸化によるATP産生の異常が口蓋裂発症と関係がある可能性を見出した。これまでにエネルギー代謝の異常と口蓋裂の発症についてはほとんど検証されていないため、本研究は学術的独自性が高いと言える。口蓋裂の治療は対症療法としての外科的・矯正歯科的治療が中心であり、有効な予防法は未だにない。本研究によりエネルギー代謝の異常と口蓋裂発症の関係が明らかになれば、口蓋裂予防・治療の全く新しいアプローチが可能になると考えられ非常に高い創造性がある。

研究成果の概要（英文）：ATP levels were decreased in the palatine process mesenchyme of Chst11 knockout mice. The results suggest that decreased ATP is involved in the reduced cell proliferative capacity in the palatine process mesenchyme. Next, when the mitochondria-active drug MA-5 was used, palatal formation occurred at about 94% probability in Chst11 knockout mice at 18.5 days of gestation. This suggests that the mitochondria-activating agent MA-5 can prevent the onset of cleft palate. Furthermore, the mitochondrial membrane potential of palatal process cells in Chst11 knockout mice was predominantly decreased under oxidative stress, suggesting that loss of Chst11 increases the sensitivity of palatal process mesenchymal cells to oxidative stress.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：口蓋裂

1. 研究開始当初の背景

口蓋裂はヒトにおける先天性頭蓋顎顔面形態異常のうち最も多く認められる先天性疾患の1つである。その発症には口蓋突起の伸長の異常や口蓋突起の挙上不全、融合不全が関与すると考えられている。また、遺伝的要因と環境的要因の組み合わせによって引き起こされる多因子性疾患であることが知られているが、病因は解明されていないものが多い。プロテオグリカン (以下、PG) は、グリコサミノグリカン (以下、GAG) と呼ばれる多糖類がコアタンパク質に共有結合したものである。PGは細胞外基質の重要な構成成分の一つであり、特に軟骨においてコラーゲン、ヒアルロン酸と共に高分子マトリックスを形成し、緩衝作用や足場として細胞の移動、接着に重要であることが知られている。さらに、高度に硫酸化されたGAGの負電荷による陽イオンや細胞増殖因子、細胞分化因子、サイトカインなどのシグナル分子との相互作用により、形態形成、組織再生、細胞機能調節など多様な機能を有することが知られている。コンドロイチン硫酸 (以下、CS) は、生体内ではCSプロテオグリカンとして細胞外基質と細胞表面に存在し、特に軟骨に多く含まれていることが知られている。

申請者は哺乳動物においてコンドロイチン硫酸鎖を硫酸化する硫酸基転移酵素をコードする遺伝子である *Chst11* に着目し、*Chst11* のノックアウトマウスが口蓋裂を発症することを見出した。その発症機序として、*Chst11* ノックアウトマウスでは口蓋突起の挙上が障害されていることを明らかにした。さらに、RNAシーケンスによる網羅的遺伝子発現解析結果は、*Chst11* ノックアウトマウスにおいて酸化的リン酸化の異常が起きていることを示唆している。酸化的リン酸化はミトコンドリアにおけるATP産生に関与しており、ミトコンドリアの異常による酸化的リン酸化の低下は口蓋突起におけるATP産生量を低下させることが示唆される。興味深いことに、口蓋裂の主要な原因遺伝子の一つである *MSX1* の変異マウスは、エネルギー代謝異常により口蓋裂を引き起こすことが近年報告されている (Park *et al.*, 2021 *CPCJ* PMID:34047208)。これらのことから、エネルギー代謝の異常によるATP産生低下は口蓋裂発症に関与しており、*Chst11* によるコンドロイチン硫酸の適切な硫酸化修飾は口蓋突起の挙上におけるエネルギー代謝に関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

エネルギー代謝の異常によるATP産生低下は口蓋裂発症に関与しており、*Chst11* によるコンドロイチン硫酸の適切な硫酸化修飾は口蓋突起の挙上におけるエネルギー代謝に関与している可能性が考えられる。口蓋形成において、コンドロイチン硫酸はミトコンドリアにおける酸化的リン酸化によるATP産生に必要であることを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験①口蓋突起が癒合する前の胎生14.5日において、口蓋突起が癒合する前の胎生14.0日において、*Chst11* ノックアウトマウスならびに野生型マウスの口蓋突起を実体顕微鏡下で切り出し、ATP Assay Kit-Luminescence (同仁化学) を用いてATP産生量を定量評価した。

実験②ミトコンドリア活性薬剤MA-5を用いて、*Chst11* ノックアウトマウスにおける口蓋裂発症が予防できるかを検討した。

実験③ *Chst11* ノックアウトマウスならびに野生型マウス口蓋突起間葉組織より細胞を採取した後、過酸化水素水を用いて酸化ストレスを誘導し、JC-1 Assay (同仁化学) を用いて *Chst11* ノックアウトならびに野生型の細胞におけるミトコンドリアの活性を比較した。

4. 研究成果

最初に、*Chst11*ノックアウトマウスの口蓋突起間葉組織においてATP量の低下を認めた（図1）。口蓋突起間葉における細胞増殖能の低下にはATPの低下が関与していることが示唆された。次に、ミトコンドリア活性薬剤MA-5を用いたところ、胎生18.5日齢の*Chst11*ノックアウトマウスにおいて約94%の確率で口蓋形成がなされていた。このことから、ミトコンドリア活性薬剤MA-5により口蓋裂発症を予防できることが示唆された（図2）。さらに、酸化ストレス下において*Chst11*ノックアウトマウスの口蓋突起細胞のミトコンドリア膜電位は優位に低下した（図3）。*Chst11*が欠損すると、口蓋突起間葉細胞の酸化ストレスに対する感受性が高まることが示唆された。

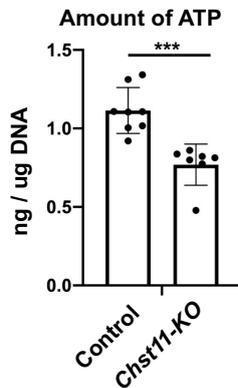


図1 口蓋突起組織における解析
胎生14.5日齢の口蓋突起組織におけるATP量
Control群n=8, *Chst11*-KO群n=7, ***:P<0.001

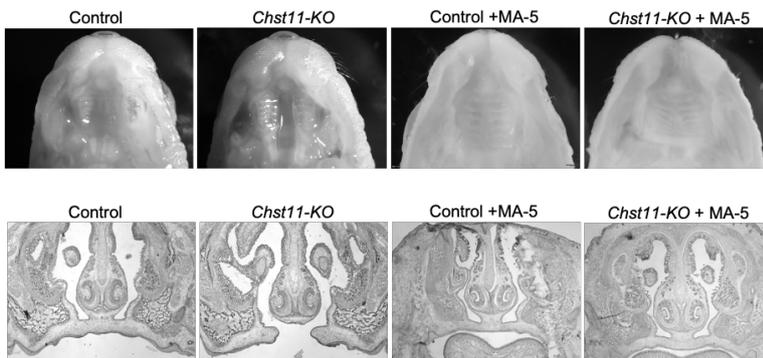


図2 胎生18.5日齢の*Chst11*ノックアウトマウスならびに野生型マウス（MA-5投与と未投与）口蓋の実体顕微鏡像と組織切片像

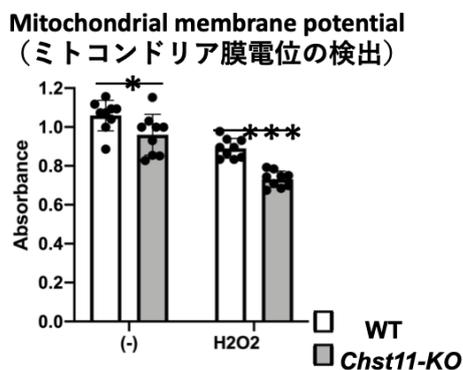


図3 *Chst11*ノックアウトマウスの口蓋突起細胞に対する酸化ストレスの影響
JC-1 assayによるミトコンドリア膜電位の検出
Control群n=8, *Chst11*-KO群n=9, *:P<0.05 ***:P<0.001

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 横山美佳 |
| 2. 発表標題 コンドロイチン硫酸転移酵素Chst11の口蓋形成における役割 |
| 3. 学会等名 第81回 日本矯正歯科学会大会 |
| 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|