

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593106

研究課題名(和文) 上顎の形成過程におけるWntシグナリングの役割

研究課題名(英文) Wnt/beta-catenin pathway controls midfacial morphogenesis in chick embryo.

研究代表者

川上 正良 (Kawakami, Masayoshi)

奈良県立医科大学・医学部・学内講師

研究者番号：20244717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、顎顔面の形態発生においてWntシグナルがどのような働きをしているのか調べた。WntシグナルのantagonistとしてDickkopf-1(Dkk-1)を用い、Chick embryoの上顎突起にDkk-1を浸潤させたbeadsを埋入した。上顎突起が前頭鼻突起と癒合する直前のStage 20HHに投与すると、Lhx8、Msx1、Msx2遺伝子発現が抑制され、上顎に著明な骨欠損を生じた。両突起が癒合した後では(Stage 26HH)、その効果は認められなかった。この結果、Wntシグナルは、顔面突起が癒合する時期に主要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Wnt/beta-catenin signaling pathway has a potential to control craniofacial morphogenesis. The downstream target genes of the Wnt signaling pathway in morphogenesis of the developing upper jaw and lip remain unknown. To investigate the roles of Wnt signaling in facial development, we performed a loss-of-function experiment using local implantation of beads soaked with Dkk-1 (antagonist of Wnt receptor) during lip fusion at the maxillary prominence of chick embryos at stage 22HH. Dkk-1 induced deformities of the premaxilla and jugal bone. Real-time RT-PCR analysis showed the significant downregulation of Lhx8, Msx1 and Msx2 expression in the maxillary mesenchyme at 6 and 24 hours after bead implantation. At HH 26 when the fusion of facial primordial started, Dkk-1 did not reduce those gene expression. These findings suggested that Wnt signaling is responsible for intrinsic upper jaw development before the lip fusion.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：発生・分化 細胞・組織 遺伝子 シグナル伝達 歯学

1. 研究開始当初の背景

唇顎口蓋裂をはじめとする顎顔面の形成異常は、多くの原因因子によるものとされているが、発症のメカニズムは未だ不明なままである。臨床では対症療法に終始せざるをえず、発症メカニズムの解明が求められている。

顎顔面の形態異常の発症は、個体発生のきわめて初期に求めることができる。胚生期、脊索の神経堤細胞が腹側に遊走後、顔面突起を形成し、増殖と癒合を繰り返し、複雑な顔面骨格を形成していく。形態発生は、単一の遺伝子によるものではなく、いくつかの遺伝子や制御因子の相互作用によるものである。これらは一連のシグナル伝達系を形成して、各組織の精密な形態形成を行っていると考えられているが、ほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

Wnt (ウイント) は、分泌性のタンパク質で、個体発生の初期に器官形成をコントロールしている。上唇は上顎突起と前頭鼻突起が癒合することで形成され、癒合が起こる前に *Wnt* 遺伝子群やそのレセプターが、顔面突起に発現することが示されている。しかし、*Wnt* シグナルが、どの標的遺伝子を活性化させ、顔面の形態形成へと導くのか明らかになっていない。

本研究では形態形成の情報伝達となる *Wnt* シグナル経路について、顎顔面の形成時における作用のメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Beads implantaion

Wnt シグナルを阻害するため、antagonist として、*Wnt* レセプターに結合し、 β -catenin の細胞内蓄積を阻害する Dickkopf-1 (*Dkk-1*) を用いた。上顎突起と前頭鼻突起が癒合する時期の Stage 20HH の chick embryo の上顎突起に、*Dkk-1* を浸潤させた Beads を実体顕微鏡下で embryo の上顎突起に埋入した。埋入 6、24、48 時間後に embryo を摘出し、4%パラホルムアルデヒドに浸漬固定した。

(2) real-time RT-PCR による上顎突起組織の mRNA の定量

Beads 周辺の上顎突起組織の遺伝子発現を real-time RT-PCR により定量化して評価した。Beads 埋入 6 時間後の embryo から上顎突起を摘出し、total RNA を抽出して PCR を行い、上顎突起中の各遺伝子の発現比を算出した。PCR 産物を電気泳動にかけ、cDNA の発現パターンを確認した。

(3) Apoptosis

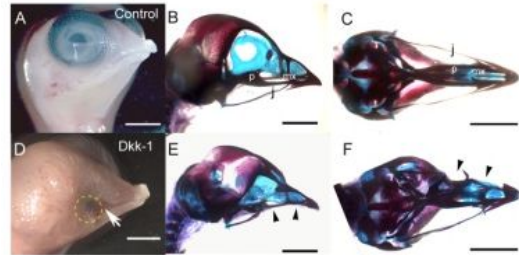
Beads 埋入 6 時間後の頭部のパラフィン標本を作成し、cleaved caspase-3 による免疫組織学的染色を行った。

4. 研究成果

(1) 顔面形態への影響

Dkk-1 beads を埋入したときの、Stage 38HH (孵卵直前) の Chick embryo の顔面形態を示す。

Dkk-1 を投与した embryo では、上顎骨の前方部が欠損し、上顎骨と口蓋骨が形成不全をおこし、眼球が陥没していた (矢印) (図 1 D,E,F)。

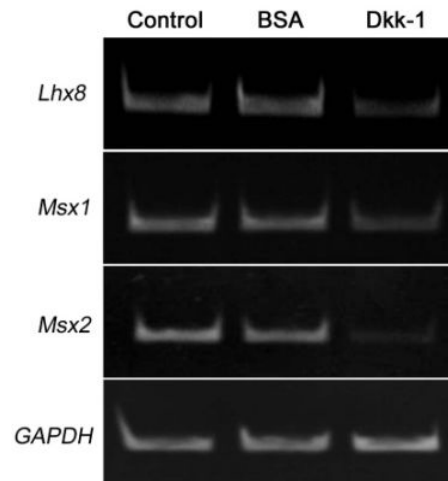


【図 1 Stage 38HH (孵卵直前) の Chick embryo】

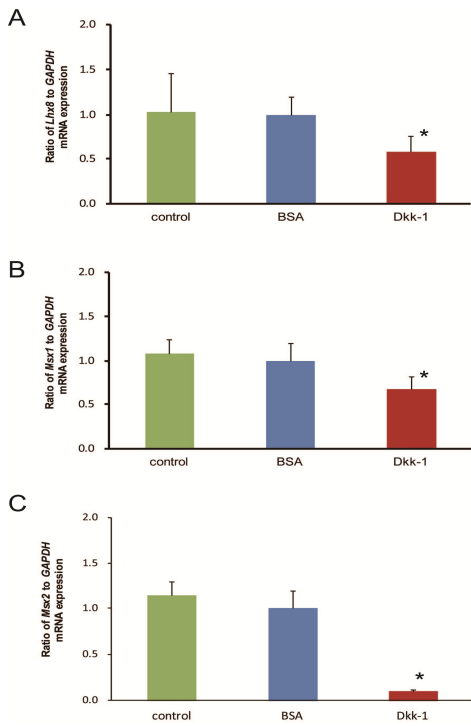
(2) 遺伝子発現のコントロール

Lhx8、*Msx-1*、*Msx-2* は、顎顔面の形成期で、とくに顔面突起の癒合時期に発現することが明らかになっている。Bead 埋入 6 時間後の Stage 22HH の上顎突起から、total RNA を抽出して real-time RT-PCR を行い、*Lhx8*、*Msx-1*、*Msx-2* 発現を測定した (図 2, 3)。

その結果、上顎突起に *Dkk-1* を作用させることで *Lhx8*、*Msx1*、*Msx2* ともに遺伝子発現が有意に減少した。*Wnt* シグナルを阻害することにより、*Lhx8* あるいは *Msx1*、*Msx2* 遺伝子発現が抑制された。

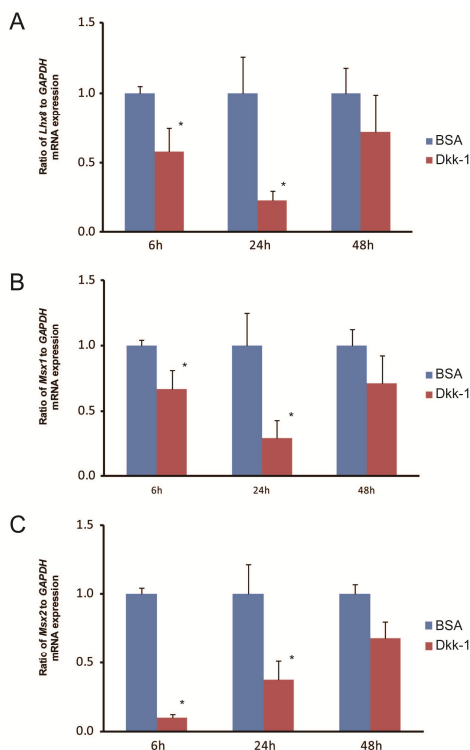


【図 2 RT-PCR】



【図3 real time RT-PCRによる遺伝子発現 . A: *Lhx8*, B:*Msx1* , C:*Msx2*、* : $p < 0.05$ 有意差あり】

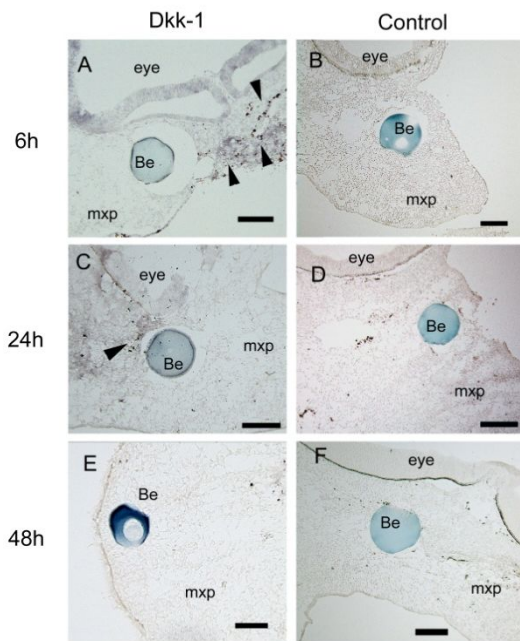
次に、*Wnt* シグナル阻害後の経過について調べた。Beads 埋入 6 時間後、24 時間後、*Lhx8*, *Msx1*, *Msx2* は、有意に減少が認められたが、48 時間後では有意差が認められなかった(図 4)。



【図4 real time RT-PCRによる遺伝子発現 . A: *Lhx8*, B:*Msx1* , C:*Msx2*、* : $p < 0.05$ 有意差あり】

(3) Apoptosis

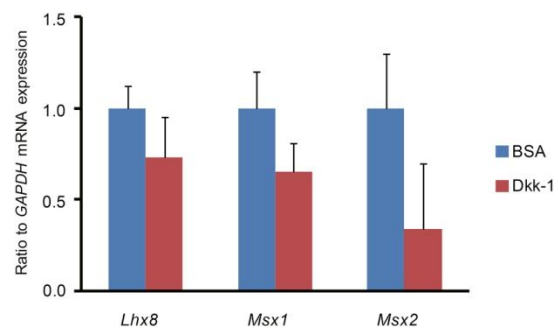
Dkk-1 による細胞への影響について、cleaved caspase-3 による免疫組織学的染色を行って検討した。*Dkk-1* 投与後 6、24 時間後 beads (Be) 周辺に cleaved caspase-3 の反応が見られ (矢印) *Dkk-1* による apoptosis が示された。Beads 挿入のみでは、反応がなく apoptosis は認められなかった。したがって、Beads 挿入による器質的障害は無く、*Dkk-1* による一過性の apoptosis が起こっていると考えられた (図 5)。



【図5 cleaved caspase-3 による免疫組織学的染色】

(4) *Wnt* シグナルの作用時期

Wnt シグナルの作用する時期を明らかにするため、(1) とは異なり、上顎突起と前頭鼻突起が癒合した後 (Stage 26HH) に *Dkk-1* を作用させた。しかし、上顎突起の *Lhx8*, *Msx1*, *Msx2* の遺伝子の発現量に対照群 (BSA) と有意差が認められなかった。この結果、上顎突起と前頭鼻突起が癒合後では、*Wnt* シグナルの反応性が低下していることが示された。



【図6 上顎突起と前頭鼻突起が癒合した後 (Stage 26HH) における上顎突起の *Lhx8*, *Msx1*, *Msx2* 遺伝子発現】

(5) 考察

上顎突起と前頭鼻突起が癒合する Stage 22HH の Chick embryo の上顎突起に Dkk-1 を投与すると、上顎の形成不全を引き起こした。また、*Lhx8*, *Msx1*, *Msx2* とともに遺伝子の発現が有意に抑制されることが明らかとなった。しかし、この効果は、上顎突起と前頭鼻突起が癒合した後では認められず、Wnt シグナルの活性は発生の段階によって特異性があることが考えられた。

顎顔面の形成過程において Wnt/ β -catenin signaling は、顔面突起の癒合時期に活性化し、その後は作用が減弱することが考えられた。

(5) 結論

Wnt/ β -catenin signaling は顎顔面の形成過程に深く関与し、顔面突起が癒合する時期に作用することが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kawakami M, Okuda H, Tatsumi K, Kirita T, Wanaka A. Inhibition of Wnt/ β -catenin pathway by Dkk1 affects midfacial morphogenesis in chick embryo. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 117(6): 664-669, 2014.
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.11.015.

Shimomura T, Kawakami M, Okuda H, Tatsumi K, Morita S, Nochioka K, Kirita T, Wanaka A. Retinoic acid regulates *Lhx8* expression via FGF-8b to the upper jaw development of chick embryo. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 119(3): 260-266, 2015.
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.08.010.

Kawakami M, Yamamoto K, Shimomura T, Kirita T. Surgical Orthodontic Treatment for Open Bite in Noonan Syndrome Patient. A Case Report. *The Cleft Palate Craniofacial Journal*. In press.
<http://www.cpcjournal.org/>

〔学会発表〕(計 2 件)

川上正良, 奥田洋明, 和中明生, 桐田忠昭, 上顎突起の発育時期による Wnt シグナリングの役割 . 第 72 回日本矯正歯科学会大会、2013 年 10 月 7 -9 日、キッセイ文化ホール、松本市総合体育館 (長野県松本市) .

下村忠弘, 川上正良, 奥田洋明, 和中明生, 桐田忠昭, レチノイン酸と FGF シグナリングによる上顎の発生制御 . 第 73 回日本矯正歯科学会大会、2014 年 10 月 20-22 日、幕張メッセ (千葉県千葉市) .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

川上正良 : 顔のかたちを造る分子メカニズムの解明、奈良県立医科大学シーズ集、p 61、平成 26 年 10 月 .

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

川上 正良(KAWAKAMI, masayoshi)
奈良県立医科大学医学部・学内講師
研究者番号 : 20244717

(2) 研究分担者

和中 明生(WANAKA, akio)
奈良県立医科大学医学部・教授
研究者番号 : 90210989

(3) 研究協力者

下村 忠弘(SHIMOMURA, tadahiro)
奈良県立医科大学・専修生

Joy M. Richman

Department of Oral Health Sciences, Life Sciences Institute, University of British Columbia, Canada, professor