

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 25 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593116

研究課題名(和文) 口蓋発生時の癒合部上皮消失過程における基底膜の動態

研究課題名(英文) The changing of basal membrane during medial edge epithelium disappearing in palatal fusion

研究代表者

岡 暁子 (OKA, KYOKO)

福岡歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：60452778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：口蓋裂発症のメカニズムの一端を解明することを目的として、胎児マウスの口蓋形成について組織学的に解析を行った。口蓋は、左右の口蓋突起が正中部で接触することで形成されるが、この癒合上皮消失プロセスを硬口蓋と軟口蓋の前後で比較した。癒合上皮の消失に必須である、TGF-betaシグナルは、口蓋前後で異なる細胞内シグナル経路を活性化していることがわかった。さらに癒合時の上皮消失(基底膜の変化)に伴って、口蓋間葉に発現してくるTenascin Cは、TGF-betaシグナルに制御されていること、また口蓋前後でその制御に違いがあることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanism of cleft palate, we studied about palatal development of mice embryo using histological analysis. We focused on disappearing process of medial edge epithelium (MEE) during palatal shelves fusion. The intra-cellular signaling of TGF-beta which is critical factor for disappearing of MEE, were different between hard and soft region of palatal shelves. Furthermore, Tenascin C expression in palatal mesenchyme induced after basal membrane changing during MEE disappearing, was regulated by TGF-beta signalind, and specially observed in soft palate region. Our data suggested that the extra cellular matrix expression in palatal mesenchyme was differentially regulated by TGF-beta signaling between anterior and posterior of MEE.

研究分野：発生学

キーワード：口蓋発生 TGF-beta 口蓋上皮

1. 研究開始当初の背景

口蓋裂は、高い頻度で発症する先天的顔面奇形の1つであることから、口蓋発生についての研究は古くから行われ、数多くの報告が存在する。近年、口蓋裂を表現型に持つ遺伝子改変マウスを用いた研究は、口蓋発生の詳細なメカニズムを次々と明らかとなった。さらに詳細な解析を行うために、近年では、口蓋を1次口蓋と2次口蓋の癒合部となる前方部、上顎骨と口蓋骨によって構成される中央部、口蓋筋群で構成される後方部のそれぞれにおいて詳細な解析がなされてきていることにより、口蓋裂児の治療、つまり口蓋の再建方法にも遺伝子工学的アプローチの可能性が高まってきている。

2. 研究の目的

本研究は、口蓋裂治療における口蓋再建といった組織工学的アプローチにつながることを目標とし、マウス口蓋発生の重要な時期である胎生 13.5~15.5 日齢は口蓋成長促進、また癒合を促進させるような因子の探索を口蓋の前後軸で比較することによって、口蓋組織の前方、中央、後方での特徴を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

口蓋形成中の癒合上皮 Medial Edge Epithelium (以下、MEE) の消失過程に着目し、MEE の発現領域決定、基底膜の消失、MEE 細胞間接着の消失に焦点を絞り、この一連の過程が口蓋の前後軸で異なるメカニズムで制御されているとの仮説のもとに、口蓋発生における上皮-間葉相互作用を明らかにすることを目的として解析を行った。

①細胞増殖解析

胎生 13.5, 14.5, 16.5 日齢の ICR マウスに、BrdU (100 μ g/g 体重) を腹腔内に投与し、1時間後に頭部を採取し10%中性ホルマリンにて固定、パラフィン切片を作成した。BrdU 陽性の細胞の同定には、BrdU Detection Kit (Roche Applied Science) を用いた。染色後、単位面積あたりの BrdU 陽性細胞の出現率を計算し比較した。

②Fibrillin-1, Fibrillin-2 の発現

Fibrillin は、LTBP(latent transforming growth factor β -binding proteins)を介して、TGF- β シグナルを抑制的に調節している。

Fibrillin-1 変異が原因であるマルファン症候群では、TGF- β シグナルの亢進が報告されている。このマルファン症候群は、高口蓋という口蓋表現型を持っている。一方で、先天性拘縮性くも指趾症の原因である Fibrillin-2 の発現についても解析した。この二つの蛋白の発現は、脱灰操作により反応が減弱することがわかったため、胎生 13.5~14.5 日齢の ICR マウスより頭部を採取し、無固定・非脱

灰にて O.C.T コンパウンド(Tissue-Tek®)を用いて包埋、凍結連続切片を作成した。一次抗体には Rabbit Polyclonal anti Fibrillin-1 (Abcam)を用い、二次抗体には Alexa Fluor® 488 goat anti rabbit IgG (Molecular probe)を用いて免疫組織化学染色を施行した。

③TGF- β シグナルについての組織学的解析

TGF- β シグナルは、口蓋発生時の間葉においては口蓋間葉細胞の細胞増殖を、MEE においては、アポトーシスを促進し MEE 消失過程に関与していることが明らかとなっている。しかしながら口蓋前後軸での TGF- β シグナル活性については詳細な解析がなされていない。そこで、胎生 13.5, 14.5, 16.5 日齢の ICR マウスを用いて、パラフィン連続切片を作成した。一次抗体には Rabbit polyclonal anti smad-2 (Abcam), Rabbit Monoclonal anti smad-3 (Abcam), Rabbit Monoclonal anti phospho-p38 (Cell signaling)を用い、二次抗体には Alexa Fluor® 488 goat anti rabbit IgG (Molecular probe)を用いて免疫組織化学染色を施行した。

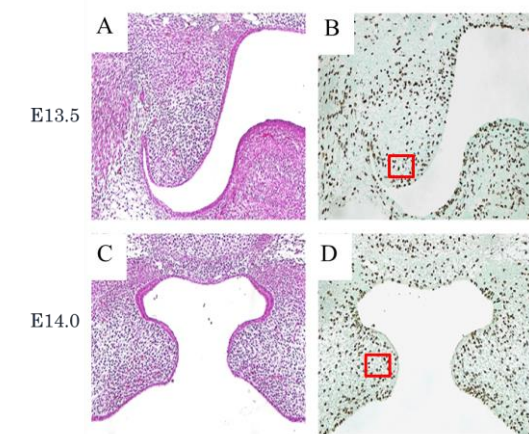
④TGF- β の下流で調節される細胞外基質蛋白についての解析

以前の研究において着目していた Tenascin C の口蓋発生における発現を口蓋前後軸で比較した。

さらに、上皮特異的に TGF- β II型レセプターをノックアウトした *K14-cre;Tgfr2^{fl/fl}* マウスと *Wnt1-cre;Tgfr2^{fl/fl}* マウスを用いてそれぞれにおける Tenascin C の発現を比較した。

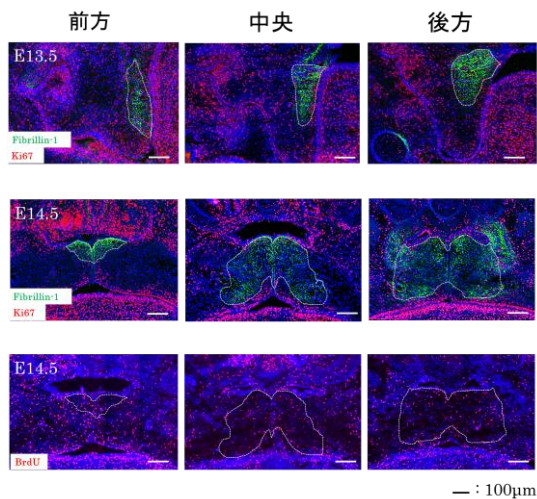
4. 研究成果

①細胞増殖解析



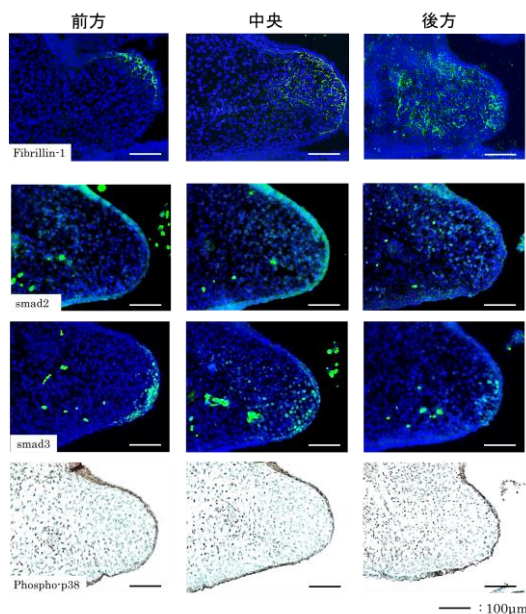
口蓋形成時の細胞増殖は、癒合直前の E13.5~E14.0 日齢の口蓋間葉で最も活性が高かった。また、前後軸においては、増殖は口蓋後方で明らかに高い傾向を示していた。

②Fibrillin-1, Fibrillin-2 の発現



Fibrillin-1 は、胎生 13.5 日齢より口蓋間葉の正中側に、胎生 14.5 日齢では、鼻腔側に発現を認めた。胎生 14.5 日齢の口蓋間葉後方部では、広い範囲での発現を認めた。胎生 16.5 日齢では、口蓋中央部間葉の殆どに発現がみられた。Fibrillin-2 は、胎生 13.5 日齢では、口蓋間葉にほとんど発現を認めなかった。胎生 14.5 日齢では舌に発現を強く認めた。口蓋間葉においては、胎生 14.5 日齢の後方部のみ発現を認めた。

③TGF-βシグナルについての組織学的解析



上図に、胎生 14.0 日齢の Fibrillin-1, Smad2, Smad3 Phospho-p38 の発現を示す。口蓋前方部では、鼻腔側に Fibrillin-1 が観察されるが、この部位では smad3, Phospho-p38 の発現がやや低下していた。口蓋中央部および後方部では、Fibrillin-1 は、鼻腔側および先端に発現を認めるが、Smad3 は鼻腔側のみで低下を示すものの他の部位では関連を認めなかった。

④TGF-βの下流で調節される細胞外基質蛋白についての解析

口蓋発生時における Tenascin C の発現は、軟口蓋領域で口蓋間葉に広く発現が見られ、硬口蓋部分よりも高い発現が認められた。この発現は、上皮特異的に TGF-βII 型レセプターをノックアウトした *K14-cre;Tgfr2^{fl/fl}* マウスでは、その発現は殆ど抑制されていた。しかしながら、神経堤細胞でのコンディショナルノックアウトマウス *Wnt1-cre;Tgfr2^{fl/fl}* マウスではその発現に著明な変化を認めなかった (未発表)。

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 8 件)

1. Lai WF1, Oka K, Jung HS. Advanced functional polymers for regenerative and therapeutic dentistry (Review) Oral Dis. 2014 in press.
2. Hatakeyama Y, Hatakeyama J, Oka K, Tsuruga E, Inai T, Anan H, Sawa Y. Immunohistochemical Study of Amelogenin and Lysosome-Associate Membrane Proteins (LAMPs) in Cartilage. International Journal of Morphology 32(2):618-626. 2014.
3. Kawagoe M, Tsuruga E, Oka K, Sawa Y, Ishikawa H. Matrix metalloproteinase-2 degrades fibrillin-1 and fibrillin-2 of oxytalan fibers in the human eye and periodontal ligaments in vitro. Acta Histochem Cytochem. Oct 30;46(5):153-9. 2013
4. Hatakeyama Y, Hatakeyama J, Oka K, Tsuruga E, Inai T, Sawa Y. Immunohistochemical Study of Lysosome-Associated Membrane Proteins During Periodontal Ligament Development. Journal of Hard Tissue Biology; 22(2). 2013
5. Mima J*, Koshino A*, Oka K*, Uchida H, Hieda Y, Nohara K, Kogo M, Chai Y, Sakai T (*contributed equally). Regulation of the epithelial adhesion molecule CEACAM1 is important for palate formation. PLoS One. Apr 17;8(4). 2013 18.
6. Oka K, Morokuma M, Imanaka-Yoshida K, Sawa Y, Isokawa K, Honda MJ. Cellular turnover in epithelial rests of Malassez in the periodontal ligament of the mouse molar. Eur. J Oral. Sci. 120(6). 484-494. 2012
7. Tsuruga E, Oka K, Hatakeyama Y, Isokawa K, Sawa Y. Latent transforming growth factor-b binding protein 2

negatively regulates coalescence of oxytalan fibers induced by stretching stress. *Connect Tissue Res.* 50 (3):521-527. 2012

8. Oka K, Honda MJ, Tsuruga E, Hatakeyama Y, Isokawa K, Sawa Y. Roles of collagen and periostin expression by cranial neural crest cells during soft palate development. *J Histochem Cytochem.* 2 60(1): 57-68. 2012

[学会発表] (計 12 件)

1. Kyoko Oka, Michiko Kira, Eichi Tsuruga, Yoshihiko Sawa, Masao Ozaki. 「Roles of Collagen and Periostin Expression during Soft Palate Development」第 53 回 韓国小児歯科学会総会 2013 年 04 月 28 日～2013 年 04 月 29 日 韓国 ソウル COEX
2. 岡 暁子 吉良 迪子, 敦賀 英知, 沢 禎彦, 尾崎 正雄 「軟口蓋発生における Periostin の役割」第 36 回 日本口蓋裂学会総会・学術集会 2013 年 05 月 24 日～2013 年 05 月 25 日 京都 国立京都国際会館
3. 比嘉 ありさ, 岡 暁子, 吉良 迪子, 敦賀 英知, 沢 禎彦, 尾崎 正雄 「口蓋発生における Fibrillin1 および Fibrillin2 の発現」第 39 回福岡歯科大学学会総会 2013 年 11 月 18 日～2013 年 11 月 18 日 福岡歯科大学
4. 比嘉 ありさ, 岡 暁子, 吉良 迪子, 敦賀 英知, 沢 禎彦, 尾崎 正雄 「口蓋発生における Fibrillin1 および Fibrillin2 の発現」第 51 回 日本小児歯科学会学術大会 2013 年 05 月 23 日～2013 年 05 月 24 日岐阜市長良川国際会議場
5. Kyoko Oka, Arisa Higa, Michiko Kira, Eichi Tsuruga, Yoshihiko Sawa, Masao Ozaki. 「Fibrillin-1 and Fibrillin-2 expression in craniofacial development」24th Congress of the international association of pediatric dentistry 2013 年 06 月 13 日～2013 年 06 月 15 日 韓国 ソウル COEX
6. Kyoko Oka, Michiko Kira, Satoshi Itaya, Yoshihiko Sawa, Masao Ozaki. 「The role of Fibrillins during tooth and periodontal ligament development」2013 年 05 月 25 日～2013 年 06 月 02 日 La Londe les Maures French Riviera, フランス
7. 比嘉 ありさ, 岡 暁子, 吉良 迪子, 敦賀 英知, 沢 禎彦, 尾崎 正雄 「口蓋発生時の Fibrillin-1 の発現は細胞増殖を調節している」第 38 回日本口蓋裂学会 2014 年 05 月 29 日～2014 年 05 月 30 日 札幌市 札幌コンベンションセンター
8. 板家智, 吉良迪子, 比嘉ありさ, 敦賀英知, 沢禎彦, 岡暁子, 尾崎正雄 「歯根膜線維形成に対する歯原性上皮細胞の関与」第

52 回日本小児歯科学会 2014 年 5 月 16 日～2014 年 05 月 17 日 東京都

9. 戸田雅子, 田村翔悟, 大野純, 岡暁子, 尾崎正雄 「DNA/プロタミン複合体の骨形成促進効果」第 52 回日本小児歯科学会 2014 年 5 月 16 日～2014 年 05 月 17 日 東京都
10. 岡暁子 「軟口蓋発生メカニズムの解明」第 52 回日本小児歯科学会(招待講演) 2014 年 5 月 16 日～2014 年 05 月 17 日 東京都
11. Shougo Tamura, Kyoko Oka, Masako Toda, Tadao Fukushima, Masao Ozaki. 「New Approach for the tooth replantation using DNA/Protamine complex」第 55 回韓国小児歯科学会 2014 年 04 月 18 日～2014 年 04 月 20 日 韓国 ソウル COEX
12. 岡暁子, 板家智, 吉良迪子, 藤原尚樹, 原田英光 「歯根膜発生制御における HERS の新規役割」第 56 回歯科基礎医学会総会サテライトシンポジウム 2014 年 09 月 25 日～2014 年 09 月 27 日 福岡市 国際会議場

[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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 暁子 (KYOKO OKA)

福岡歯科大学・成育小児歯科学分野・准教授

研究者番号：60452778

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：