

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25862014

研究課題名(和文) Runxを使った口蓋裂の分子診断と分子治療への基盤研究

研究課題名(英文) Research for molecular diagnosis and treatment of cleft palate with Runx signaling

研究代表者

伊藤 慎将 (Itoh, Shinsuke)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40633706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：最も発生頻度の高い先天奇形である口蓋裂について、遺伝子改変動物を用いた研究から近年、飛躍的にその発症に至る分子機構が明らかになっている。本研究では、Runxファミリー遺伝子を經由する口蓋裂発症機構について新たなシグナル分子を同定する目的で、上皮特異的にCbfbあるいはRunx1を不活化したノックアウトマウスの解析を行った。その結果、いずれのノックアウトマウスも、一次口蓋と二次口蓋の癒合に異常をきたす特徴的な口蓋裂がみられた。Runx1/Cbfbシグナルは正常な口蓋形成に必須な系路であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Cleft palate is one of the most frequent congenital malformation. Recent years, the molecular mechanism has been revealed dramatically from studies which used mutant animals. In this study, we analyzed the functional role of Cbfb and Runx1 in the palate formation, using a conditional knockout mice in which Cbfb or Runx1 gene was inactivated in epithelial cells specifically (K14Cre;Cbfb^{fl/fl}, K14Cre;Runx1^{fl/fl}). We found that both conditional knockout mice exhibited cleft palate which results into abnormal fusion between the primary palate and secondary palate. These results strongly suggest that Runx1/Cbfb signaling is essential for normal palate formation.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：口蓋裂 Runx遺伝子 Runx1 Cbfb ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂は種々の遺伝子異常が関与する発生頻度の高い先天異常である。本疾患は哺乳障害、鼻咽腔閉鎖不全、歯牙の欠損を来とし、発音障害、顎顔面発育異常をまねく。古くから歯科領域との関わりが深い疾患であるが、中でも歯科矯正学はその中心的役割を担う分野である。口蓋裂の原因は多岐に及ぶが、近年遺伝子改変動物を利用した研究の発展から、飛躍的に口蓋裂発症に関わる遺伝子が報告されており、徐々に細かい分子病態の解明に迫りつつある。しかし、それぞれの因子を繋ぐ分子機構は依然として未解明の部分も多い。

核内転写因子である Runx 遺伝子ファミリー(Runx)は、Runx 1~3 とその共役因子である Cbfb からなる。造血、骨形成、発癌など重要な役割を持つことが知られている。そして近年 Runx が口蓋裂発症に関わるあらゆる因子のマスター遺伝子である可能性を示唆する報告もあり、Runx を介したシグナル経路の解明は極めて重要であると言える。

2. 研究の目的

口唇口蓋裂は最も頻度の高い先天奇形の一つであり、歯科矯正学はその治療の主軸となる分野である。本疾患の分子診断および分子治療の基盤を確立することは極めて重要である。口蓋裂の発症原因は環境因子、遺伝因子と多岐に渡る。中でも Runx 遺伝子ファミリーは、単一の遺伝因子としてだけでなく、あらゆる遺伝因子、さらには環境因子の集約点である可能性に着目した。申請者のグループでは、Runx が口腔上皮において上皮間葉相互作用に関与し、器官形成を制御することを見出している。そこで、この Runx 関連遺伝子を介して口蓋裂発症に至る、下流のシグナル経路を新たに同定する。これにより口蓋裂の新たな発症分子メカニズムを解明し、分子診断および分子治療へ繋げていく。

3. 研究の方法

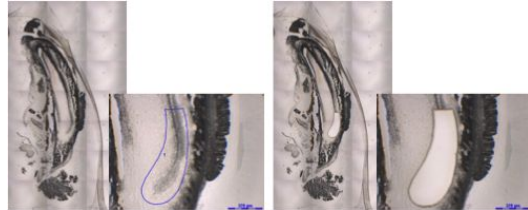
- (1) 既存の上皮特異的 Cbfb ノックアウトマウス (K14Cre;Cbfb^{f/f}) に加えて、上皮特異的 Runx1 ノックアウトマウス (K14Cre;Runx1^{f/f}) を作成した。
- (2) (1)のコロニー作成期間を利用して、口蓋の解析に先立ち、上皮特異的 Cbfb ノックアウトマウスにみられる下顎切歯の形成異常について、サービカルループ部で発現変動がみられるシグナル分子をマイクロダイセクション法およびマイクロアレイ法を用いて探索した。ここで得られる因子は口蓋形成にも関与している可能性が十分に高いと考えられた。
- (3) 上皮特異的 Runx1 ノックアウトマウスの頭蓋部骨格形成についてマイクロ CT を用いて形態学的解析を行った。

- (4) 上皮特異的 Runx1 ノックアウトマウスの臼歯エナメル質の小柱構造の違いについて高分解能観察を行った。

- (5) Cbfb、Runx1 ノックアウトマウス両者の口蓋形成について形態的解析および組織学的解析を行った。

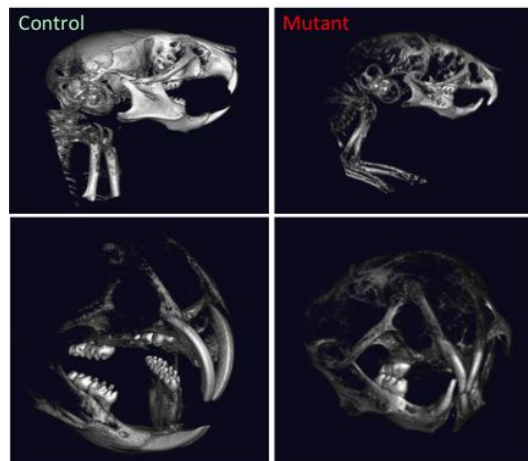
4. 研究成果

- (1) 上皮特異的 Cbfb ノックアウトマウスの下顎切歯サービカルループにおける遺伝子発現変動の網羅的解析



出生直後の Cbfb ノックアウトマウスと同腹の野生型マウスの下顎切歯からそれぞれ凍結切片を作成し、マイクロダイセクション法を用いて、サービカルループ部を回収した(上図)。RNA を精製後マイクロアレイ解析を行い、両群で発現変動のある因子を抽出した。結果、TGF および Wnt 系路に関与する因子、エナメル質および象牙質形成に関わる因子等、有意に発現の差を認める因子を同定できた。口蓋形成における上皮間葉相互作用にも TGF および Wnt 系路が関与している可能性は高いと考えられた。

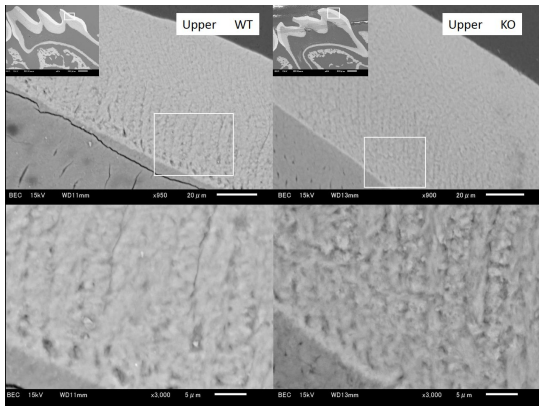
- (2) 上皮特異的 Runx1 ノックアウトマウスの頭蓋部骨格の形態学的解析



生後 4 週齢の上皮特異的 Runx1 ノックアウトマウス (K14Cre;Runx1^{f/f}) 頭蓋のマイクロ CT を撮影した。野生型と比較して、上下顎前歯の著明な形成不全を認めた。頭蓋冠の骨化度も変異マウスでは明らかに低下していた。

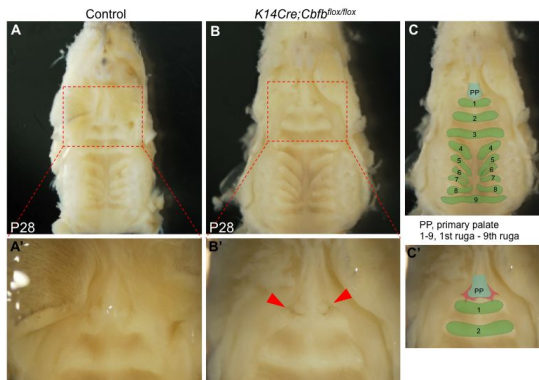
口蓋の骨も同様に、変異マウスの骨化度が低かった。

(3) 上皮特異的 Runx1 ノックアウトマウスの
臼歯エナメル質の小柱結晶構造の相違



上顎臼歯のエナメル小柱構造を反射電子高分解能で観察したところ、変異マウスの小柱結晶構造は野生型よりも不均一であり、コントラストの弱い部分が多くみられた。このことは変異マウスのエナメル質には有機物の残存が多いことが予測された。

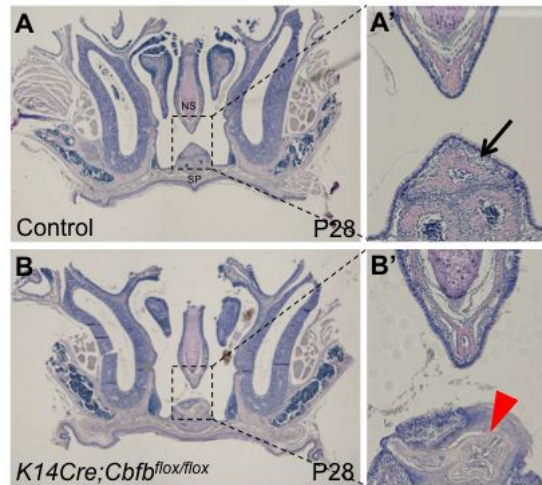
(4) 上皮特異的 Cbfb ノックアウトマウスおよび上皮特異的 Runx1 ノックアウトマウスに生じた口蓋裂についての解析



4週齢の野生型マウスの口蓋では、正常な二次口蓋が形成されており、一次口蓋と二次口蓋が癒合し、完全な口蓋の形成が確認できる。一方で4週齢の上皮特異的 Cbfb ノックアウトマウス (K14Cre;Cbfb^{f1/f1}) の口蓋では、口蓋棚は正常に癒合して二次口蓋が形成されているが、一次口蓋と二次口蓋の間に癒合不全が生じていた (上図矢頭)。上皮特異的 Runx1 ノックアウトマウスも同様に一次口蓋と二次口蓋の間に癒合不全を認めた。

(5) 一次口蓋と二次口蓋の間に生じた口蓋裂の組織学的解析

野生型マウスでは、正常に形成された二次口蓋の骨形成領域 (下図矢印) に、ノックアウトマウスでは、ケラチンの集合した構造がみられた (下図矢頭)。このことから上皮間葉転換の異常が生じている可能性が示唆された。



以上をまとめると、本研究で解析した上皮特異的に Cbfb を不活化したノックアウトマウス、および Runx1 を不活化したノックアウトマウスは、両者ともに切歯の形成不全を生じていた。切歯の伸張が阻害されるだけでなく、エナメル質の物性の低下もみられた。また、口蓋形成においては、両者ともに一次口蓋と二次口蓋の境界にのみ限局した口蓋裂がみられ、Runx 遺伝子ファミリーが歯牙の形成のみならず、口蓋形成においても重要なシグナル分子であることが示された。そして、その下流に繋がる新たなシグナル分子については現在も解析を進めているところである。

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4件)

Ishimoto K, Hayano S, Yanagita T, Kurosaka H, Kawanabe N, Ito S, Ono M, Kuboki T, Kamioka H, Yamashiro T., Topical application of lithium chloride on the pulp induces dentin regeneration. PLoS One. 2015 Mar 26;10(3):e0121938.

doi:10.1371/journal.pone.0121938.

Islam MN, Ito S, Yanagita T, Sumiyoshi K, Hayano S, Kuremoto K, Kurosaka H, Honjo T, Kawanabe N, Kamioka H, Sakai T, Ishimaru N, Taniuchi I, Yamashiro T. Runx/Cbfb signaling regulates postnatal development of granular convoluted tubule in the mouse submandibular gland. Dev Dyn. 2015 Mar;244(3):488-96.doi:10.1002/dvdy.24231.

Ito S, Hattori T, Tomita N, Aoyama E, Yutani Y, Yamashiro T, Takigawa M. CCN family member 2/connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) has

anti-aging effects that protect articular cartilage from age-related degenerative changes. PLoS One. 2013 Aug 12;8(8):e71156. doi: 10.1371/journal.pone.0071156.
Tomita N, Hattori T, Itoh S, Aoyama E, Yao M, Yamashiro T, Takigawa M. Cartilage-specific over-expression of CCN family member 2/connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) stimulates insulin-like growth factor expression and bone growth. PLoS One. 2013;8(3):e59226. doi:10.1371/journal.pone.0059226.

〔学会発表〕(計2件)

伊藤慎将、三原聖美、黒坂寛、柳田剛志、河野加奈、上岡寛、山城隆：口蓋裂発生における Runx/Cbfb シグナリングの関与、第 73 回日本矯正歯科学会大会、2014 年 10 月 20-22 日、千葉。優秀演題賞受賞
伊藤慎将、柳田剛志、山城隆：Runx/Cbfb シグナリングはアンドロゲン代謝を介した唾液腺の雌雄二形性発現を制御する、第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2013 年 9 月 20-22 日、岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 慎将 (ITOH, Shinsuke)

大阪大学大学院歯学研究科・顎顔面口腔矯正学教室・助教

研究者番号：40633706