

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463100

研究課題名(和文) 二次口蓋癒合におけるTGF- $\beta$  superfamily シグナル伝達経路の解明

研究課題名(英文) Identification for TGF-beta signaling pathway in palatogenesis

研究代表者

中嶋 昭 (NAKAJIMA, Akira)

日本大学・歯学部・講師

研究者番号：50297842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：二次口蓋癒合時のTGF- $\beta$  シグナル伝達において、未だ明らかとなっていないTGF- $\beta$  と BMPs との cross talk について解明することを目的とし研究を行った。その結果、Control群では、72時間後の二次口蓋は癒合していたが、inhibitor 添加群において癒合不全を生じていた。また、Inhibitor添加群では、control群と比較し、p-Smad2/3の発現は約90%減少し、一方p-Smad1およびp-Smad5についてもそれぞれ約40%減少していた。以上の結果から、二次口蓋癒合時にはTGF- $\beta$  と BMPs との cross talk が行われている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Functional role of TGF-beta and BMP cross talk during palatogenesis has not been fully understood. The objective was to investigate cross talk between TGF-beta and BMP signaling during palatal development. The palates treated inhibitor of Tbr1 and Tbr11 decreased approximately 90% of both receptor expressions compared to the control. As the phenotype treated with inhibitor Tbr1/11, approximately 90% palates were remained medial edge epithelium (MEE) cells at E13 + 72 h. The phospho-Smad2/3 and phospho-Smad1/5 were significantly decreased comparing with control. The present study suggested that TGF-beta and BMP could be linked to events during palatogenesis through both receptors function. The inhibitor treatments resulted in persistent MEE cell signaling, which has been shown to be linked to a failure to complete palatal fusion events. This event could be strong associate with TGF-beta and BMP cross talk signaling pathway.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：TGF-beta 口蓋裂 二次口蓋 分子生物学 成長・発育

## 1. 研究開始当初の背景

日本人の400人に1人、先進国の統計では500-1000人に1人(Mossey et al., 2009)とされている、唇顎口蓋裂、特に口蓋裂の病因は、胎生期における二次口蓋の癒合および成長不全により発生すると言われてきている。哺乳類の二次口蓋は、顎顔面の成長発育において、特異的な成長を行う。マウスでは胎生12日から舌の左右両側に垂直的に成長し(胎生13.5日)、やがて胎生14日から下顎が前方へ成長するとともに、舌が沈下し、口蓋は舌の上方へ水平位をとる。水平位をとった両側二つの口蓋は互いに近づくように伸びていき(胎生14.5日)、左右の口蓋は上皮癒合を開始する(胎生15.5日)、最終的にマウスでは16日までに口蓋は一塊となり上顎を形成する。口蓋裂の原因として(1)二次口蓋突起が十分に成長しない場合、(2)成長してもなんらかの原因で水平位をとらない場合、(3)水平位をとっても正中口蓋上皮(Medial edge epithelium: MEE)が癒合しない場合、口蓋裂となる。

このMEEについて、代表者らはTGF- $\beta$ およびreceptorが口蓋癒合上皮に強い遺伝子発現を認めたことを明らかにした(図1B)(Nakajima et al., 2007, 2010)。また、TGF- $\beta$  type II 受容体(T $\beta$ R-II)についても、conditional knock out マウスの generation に成功し、その phenotype は口蓋裂を呈していたことを明らかにした(Ito et al., 2003)。TGF- $\beta$  type III receptor (T $\beta$ R-III) と二次口蓋癒合については、small interfering RNA (siRNA) を使用し、T $\beta$ R-III の機能を knock down した際、二次口蓋癒合の遅延を認め、down stream である Smad-2 の phosphorylation を阻害していたことを報告した(Nakajima et al., 2007)。最近の報告では、TGF- $\beta$  super family である骨形成因子の Bone Morphologic Protein (BMPs)、特に

BMP-2 および BMP-4 は、口唇および口蓋の上皮間葉組織に強い発現があるとされている(He et al., 2010; Parada et al., 2012)。しかし、二次口蓋癒合時に、BMPs を含む TGF- $\beta$  superfamily の ligand もしくは receptor を knock down した場合、downstream 遺伝子である Smad-dependent 遺伝子および Smad-independent 遺伝子における phosphorylation への影響、ならびに TGF- $\beta$ s と BMPs との遺伝子間の cross talk が行われているかについては十分に明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

TGF- $\beta$  signaling pathway は、二次口蓋の正中癒合上皮(MEE)の癒合もしくは cranial neural crest 由来の二次口蓋間葉組織の成長に強い関係を示すことが明らかとなってきた(Ito et al., 2003; Nakajima et al., 2007, 2010)。また、BMP-2 および BMP-4 は、口唇および口蓋の上皮間葉組織に強い発現があることが知られている(He et al., 2010; Parada et al., 2012)。しかし、TGF- $\beta$  および BMP signal の downstream である、Smad-dependent 遺伝子(Smad-2/3/4 および Smad1/5/8)経路および MAPK に代表される Smad-independent 遺伝子(TAK/MLK3/MEKK1 および ERK1/2)経路との関連性についての全容は明らかとなっていない。また、さらに downstream である MKK3/6 および MKK4、および p38 および JNK の phosphorylation が、どのように口蓋癒合に影響を及ぼすか、また TGF- $\beta$ s と BMPs との cross talk についても明らかとなっていない。したがって、今回代表者は、TGF- $\beta$  super family の ligand および receptor の siRNA を二次口蓋に transfect し knock down させた際に生じる、口蓋の phenotype および cell proliferation の観察、および downstream である Smad-dependent/-independent の phosphorylation への影響お

よび TGF- $\beta$ s と BMPs との cross talk について解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 口蓋サンプルの作成

ICR (Wild type) マウスの胎生 13 日目口蓋突起のみ摘出し、フィルター上に両口蓋突起を合わせるように grobstein organ culture mesh 上に試料をのせ、TGF- $\beta$  receptor の inhibitor (LY2109761) (10nM, 25 nM, 50 nM) BGjb medium (Gibco) 溶液にて organ culture を行う。なお, organ culture は 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-air atmosphere の環境下で、正常口蓋では culture 72 時間後に癒合が完成されるため 24, 48, 72 時間の time course で culture を行う。

#### (2) *In vitro* 凍結切片の作製および二次口蓋成長発育の観察

胎生13日目のマウス二次口蓋を siRNA 処理し、上記(1)の time course で organ culture を行った後、4% paraformaldehyde 固定液にて固定し、PBSにて洗浄を行う。その後、10% sucrose in PBSで4°C, over night で試料を浸透攪拌、次に30% sucrose in PBSにて同様に、4°C, overnightで試料を浸透攪拌した後、Tissue-Tek OCTにて凍結試料を作製し、-80°Cで保存する。凍結試料は、本学生理学教室所有のクライオスタットにて凍結切片を作製する。切片の厚みは、10 $\mu$ mとし、スライド試料は-20°Cに保存する(Nakajima et al., 2007)。その後、再度固定処理し、HE染色を行い、control群と siRNA treatment群の二次口蓋の phenotype について比較検討を行う。

#### (3) Western blot 法による TGF- $\beta$ s および BMPs target 遺伝子タンパク発現の定量解析

上記、(1)同様の条件で organ culture を行い、transfection 48 時間後の口蓋 sample より MEE を採取し、lysis buffer にて homogenize を行い、SDS-page 法にて、sample の loading を行う (Nakajima et al.,

2007)。その後、semi-dry 法にて membrane に loading sample を transfer し、blocking 処理を行い、一次抗体および二次抗体を反応させた後、western blot detecting kit (Roche) にて、X-ray film に発色させ、siRNA が transfect しているかどうかについて、target 遺伝子タンパク発現量の確認を行う。また、濃度依存性であるかどうかについても検討を加える。

#### (4) MEE細胞の単離および real-time RT-PCR による mRNA 発現の定量解析

上記(1)同様の条件で、transfection 24 時間後の口蓋 sample より MEE 細胞を採取する。次に mRNA extraction kit (Qiagen) を使用し、mRNA の抽出を行う。抽出した mRNA より 1 st strand RT-PCR 法で cDNA 合成を行う。マウス TGF- $\beta$ , BMPs および receptor の塩基配列より 5'および 3' primer を設計合成し、quantitative real time RT-PCR 法により上記遺伝子の増幅を行い、遺伝子発現を検討する。なお mRNA 遺伝子発現量の standard として、すでに報告されているマウス GAPDH の primer を使用し、各 culture 後の TGF- $\beta$ s, BMPs および receptor の反応を定量的に比較検討する。

#### (5) Down stream 遺伝子発現分布および定量解析

Downstream である Smad-dependent (Smad2/3/4 および Smad1/5/8) および Smad-independent (TAK/MLK3/MEKK1, ERK1/2) 遺伝子、さらに p-38 および JNK の phosphorylation に与える影響について、western blot 法にて、total 遺伝子との relative amount を求め定量解析を行う。Transcription factor については、real time RT-PCR 法にて検討を加える。TGF- $\beta$ s と BMPs の cross talk については、それぞれ knock down した際の ligand すなわち BMPs (特に BMP2/4 および receptor) と TGF- $\beta$ s の発現量、さらに receptor への影響について検討を加える。Target 遺伝子の distribution については、前

述した凍結切片にて免疫染色を行い，MEE との関係性を明らかにするため，MEE の trace が可能な Dil 染色 (Nakajima et al., 2010) との二重染色により観察を行う。

#### (6) 統計処理による総合評価

以上，総合的に評価し，western blot および real time RT-PCR における target 遺伝子と standard 遺伝子との relative amount を算出した後，統計処理ソフトウェア SPSS を使用し，ANOVA 分散分析法を用い，その後 Bonferroni correction もしくは Tukey's HSD にて統計的有意差検定を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 結果

24 時間後の二次口蓋は，control 群では，MEE の癒合が開始されてきたが (Fig. 1 A)，inhibitor treatment 群では，左右の口蓋の癒合は開始されていなかった (Fig. 2 B)。72 時間後の control 群の二次口蓋は完全に癒合していたが (Fig. 1 C)，inhibitor 添加群において MEE の癒合不全を生じていた (Fig. 1 D)。

免疫染色の結果では，24 時間および 72 時間後の control 群では BMP2/4 の発現を認めたが (Fig. 1 A, C arrow)，inhibitor treatment 群では，control 群に比較し発現が弱かった (Fig. 1 B, D)。

BMP2/4 (Fig. 2 A, B)，BMP1 (Fig. 3 A, B)，および BMP2 (Fig. 4 A, B) の protein expression は，inhibitor の濃度依存的に減少し，control 群に比較し 50nM inhibitor treatment 群で有意に低かった。

BMP の down stream である Smad1/5 の phosphorylation は，50nM Inhibitor treatment 群で，control 群と比較し約 50%有意に減少した (Fig. 5 A, B)。

TGF- $\beta$  の downstream である Smad2 (Fig. 6 A, B) および Smad3 (Fig. 7 A, B) の phosphorylation 発現は，control 群に比較し

inhibitor treatment 群で有意に約 65%減少していた。また，p38 の phosphorylation についても約 80%発現が減少していた (Fig. 8 A, B)。

Figure 1 ~ 8

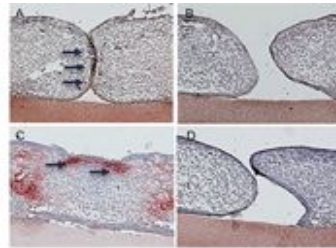


Figure 1: TBR-III inhibitor treatment群およびControl群のBMP2/4発現  
A: Control palate at E13+24 h  
B: Treatment palate at E13+24 h  
C: Control palate at E13+72 h  
D: Treatment palate at E13+72 h

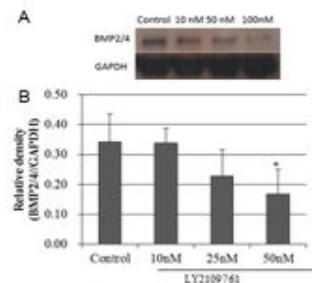


Figure 2: BMP2/4のWestern blotの結果  
A: BMP2およびGAPDHの発現  
B: Relative amount (BMP2/GAPDH)の結果。n=5。\*p < 0.05 (Controlとの比較)。

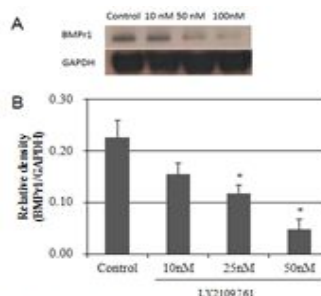


Figure 3: BMP1のWestern blotの結果  
A: BMP1およびGAPDHの発現  
B: Relative amount (p-Smad2/Smad2)の結果。n=5。\*p < 0.05 (Controlとの比較)。

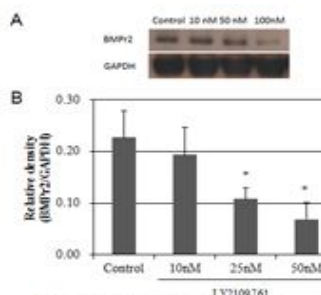


Figure 4: BMP2のWestern blotの結果  
A: BMP2およびGAPDHのタンパク発現  
B: Relative amount (p-Smad2/Smad2)の結果。n=5。\*p < 0.05 (Controlとの比較)。

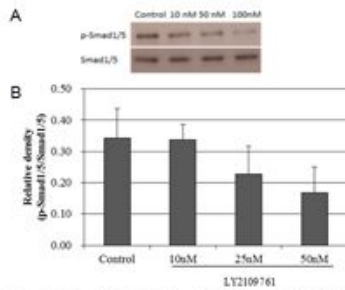


Figure 5: Smad1/5およびp-Smad1/5のWestern blotの結果  
A: p-Smad1/5およびSmad1/5のタンパク質発現  
B: Relative amount (p-Smad1/5/Smad1/5)の結果, n=5, \*p < 0.05 (Controlとの比較).

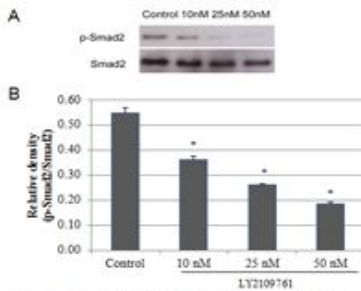


Figure 6: Smad2およびp-Smad2のWestern blotの結果  
A: p-Smad2およびSmad2のタンパク質発現  
B: Relative amount (p-Smad2/Smad2)の結果, n=5, \*p < 0.05 (Controlとの比較).

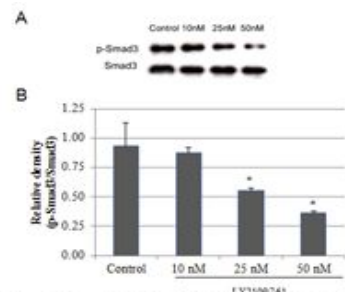


Figure 7: Smad3およびp-Smad3のWestern blotの結果  
A: p-Smad3およびSmad3のタンパク質発現  
B: Relative amount (p-Smad3/Smad3)の結果, n=5, \*p < 0.05 (Controlとの比較).

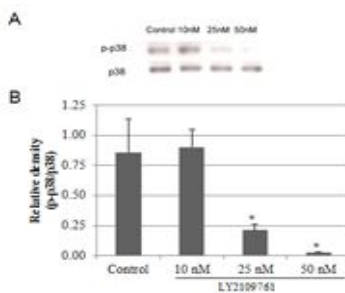


Figure 8: p-p38およびp38のWestern blotの結果  
A: p-p38およびp38のタンパク質発現  
B: Relative amount (p-p38/p38)の結果, n=5, \*p < 0.05 (Controlとの比較).

## (2) 考察

本研究結果より, TGF- $\beta$  の signaling pathway は BMP の発現およびその downstream にも影響を及ぼしている可能性が示唆され, お互いに cross talk しながら二次口蓋癒合に強く関連していることが考えられた。

## (3) 結論

二次口蓋癒合時に TGF- $\beta$  のシグナル伝達を抑制すると癒合不全が生じ, BMP2/4, BMP receptor およびその downstream である Smad1/5 の phosphorylation が顕著に抑制されていたことから, 二次口蓋癒合時には, TGF- $\beta$ s と BMPs との cross talk が行われている可能性が示唆された。

## 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3件)

1) Sano R, Nakajima A, Kawato T, Maeno M, Shimizu N. Effect of Compressive Force on TGF- $\beta$ 1/2 Signaling Pathway in MC3T3-E1 Cells, Journal of Hard Tissue Biology, 2017; 26(2): 177-186.

(査読有)

2) Asada K, Motoyoshi M, Tamura T, Nakajima A, Mayahara K, Shimizu N. Satisfaction with orthognathic surgery of skeletal III patient. Am J Orthod Dent Orthop, 2015; 148(5): 827-37. (査読有)

3) Nakajima A, Ito Y, Tanaka E, Sano R, Karasawa Y, Maeno M, Iwata K, Shimizu N, Shuler CF. Functional role of TGF- $\beta$  receptors during palatal fusion in vitro, Arch Oral Biol. 2014; 59(11): 1192-1204. (査読有)

[学会発表](計10件)

1) 中嶋 昭, 鈴木淑美, 佐野麗美, 前野正夫, 清水典佳. 二次口蓋癒合時における TGF- $\beta$ s および BMPs 間の cross talk の解明, 第75回日本矯正歯科学会大会, 2016年11月7日~11月9日, アスティとくしま, むらさきホール(徳島県徳島市).

- 2) 佐野麗美, 中嶋 昭, 川戸隆行, 前野正夫, 清水典佳. MC3T3-E1 細胞にメカニカルストレスを与えた際の TGF- $\beta$  シグナル伝達の解明, 第 75 回日本矯正歯科学会大会, 2016 年 11 月 7 日~11 月 9 日, アスティとくしま, むらさきホール (徳島県徳島市).
- 3) 尾崎愛美, 高山忠裕, 山本崇申, 小澤康正, 井口慎也, 鈴木大悟, 長尾麻由, 中嶋 昭, 田邊奈津子, 鈴木直人, 前野正夫, 佐藤秀一. Osteogenic protein-1 添加コラーゲン膜がラット下顎角骨欠損の骨再生に及ぼす影響, 第 25 回硬組織再生生物学会, 2016 年 8 月 20 日, 日本大学歯学部 (東京都千代田区).
- 4) 佐野麗美, 中嶋 昭, 川戸貴行, 前野正夫, 清水典佳. MC3T3-E1 細胞への圧迫力の負荷が TGF- $\beta$  シグナル伝達に及ぼす影響の解明, 第 25 回硬組織再生生物学会, 2016 年 8 月 20 日, 日本大学歯学部 (東京都千代田区).
- 5) 尾崎愛美, 高山忠裕, 山本崇申, 小澤康正, 井口慎也, 鈴木大悟, 長尾麻由, 中嶋 昭, 田邊奈津子, 鈴木直人, 前野正夫, 佐藤秀一. ラット下顎角骨欠損に対する Osteogenic protein-1 添加コラーゲン膜の影響, 第 68 回 日本大学歯学会総会・学術大会, 2016 年 5 月 15 日, 日本大学歯学部 (東京都千代田区).
- 6) Sano R, Nakajima A, Kawato T, Maeno M, Shimizu N. Effect of compressive force on TGF- $\beta$  signaling pathway in MC3T3-E1 cells, March 16-19, 2016, 45th Annual Meeting & Exhibition of the AADR, 40th Annual Meeting of the CADR, Los Angeles, (USA).
- 7) 中嶋 昭, 鈴木淑美, 佐野麗美, 前野正夫, 清水典佳, 二次口蓋癒合時における smad-dependent および independent signaling pathway の解明, 第 74 回日

本矯正歯科学会大会, 2015 年 11 月 18 日~20 日, 福岡国際会議場, マリンメッセ, (福岡県博多市).

- 8) 佐野麗美, 中嶋 昭, 川戸貴行, 前野正夫, 清水典佳, 骨芽細胞に compressive force を与えた際の TGF- $\beta$  シグナル伝達の解明, 第 65 回日本大学歯学会, 2015 年 5 月 19 日, 日本大学歯学部 (東京都千代田区)
- 9) Akira Nakajima, Remi Sano, Yoshimi Suzuki, Yoshihiro Ito, Eiji Tanaka, Masao Maeno, Koichi Iwata, Noriyoshi Shimizu, Charles F. Shuler, Functional role of TGF- $\beta$  receptors during palatal fusion in vitro, 93th International Association for Dental Research Annual meeting, March 10-16th, 2015, Boston, (USA).
- 10) 中嶋 昭, 佐野麗美, 田中栄二, 前野正夫, Charles F Shuler, 清水典佳, 二次口蓋癒合時における 3 種の異なる TGF- $\beta$  受容体の下流シグナルへの影響, 第 73 回日本矯正歯科学会大会, 2014 年 10 月 20 日~22 日, 幕張メッセ (千葉県幕張市).

〔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〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中嶋 昭 (NAKAJIMA, Akira)

日本大学・歯学部・専任講師

研究者番号: 56297842