



Title	口蓋突起癒合における Rreb1 遺伝子の役割についての検討
Author(s)	藤原, 采香
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/101534
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (藤原采香)	
論文題名	口蓋突起癒合における <i>Rreb1</i> 遺伝子の役割についての検討

【緒言】

口唇裂・口蓋裂はわが国では約550人に1人の割合で出生する体表に現れる先天奇形の中では最も頻度の高い疾患である。口蓋裂は複数の遺伝子と環境要因との相互作用で病態が発現する多因子疾患と言われているが、その病因は完全には解明されていない。ヒトの口蓋発生を模倣するために、類似した発生過程をたどるマウスの二次口蓋が多数の研究で使用されている。胎生11.5日頃に口蓋突起が伸長し始め、15日で口蓋突起先端が接触し、内側縁上皮(MEE細胞)が消失することで、口蓋突起の癒合が完了する。口蓋突起癒合の異常は口蓋裂の原因となる。

TGF- β シグナルはマウスとヒトの両方で口蓋裂の発生に寄与することがすでに知られており、特に TGF- β 3 が口蓋突起の癒合に必須であることが報告されているが、他のシグナル伝達経路とのクロストークや制御機構について詳細はいまだ明らかとされていない。RAS は増殖、分化、アポトーシスの制御を含む数多くの基本的な細胞機能において極めて重要な役割を果たしており、TGF- β シグナルと協調してがん細胞の EMT に関与することがすでに報告されている。

Ras-responsive element-binding protein 1 (RREB1) は、Ras シグナル下流で働く転写因子であり、TGF- β シグナルと Ras シグナルを統合することにより、発生における上皮間葉転換 (EMT) に極めて重要な役割を果たしていることが近年報告された。また、ヒトでは口蓋癒合不全に RREB1 変異が関与しているという直接的な遺伝学的証拠はないが、いくつかの先天性疾患において RREB1 と口蓋裂との関連が指摘されている。しかしながら、口蓋形成過程において MEE 細胞消失における RREB1 の役割はいまだ明らかにされていない。

本研究では、口蓋の発生過程での口蓋突起癒合における Ras シグナルおよび *Rreb1* 遺伝子の役割を検討し、口蓋裂発症機序への関与を解明することを目的とし、実験を行った。

【方法】

1. 実験動物

妊娠した野生型 C57BL/6J マウスおよび cytokeratin-14 プロモーターの制御下で GFP を発現する遺伝子導入マウス [K14 (KRT14)-GFP] を使用した。胎仔を摘出し、上顎を解剖し各実験に用いた。

2. 解剖および器官培養

E14.5の野生型 C57BL/6J マウス胚から切除した両側の口蓋突起を MEE 領域を接触させた状態で37°C、5% CO2 下で培養した。コントロール群は BGJb 培地を使用し、実験群は器官培養の6時間前に BGJb 培地に Ras 阻害剤 (Pan-Ras-IN-1) または TGF- β 阻害剤 (SB431542) を添加しサンプルを前処理した。

3. タイムラプス画像撮影

E14.5の K14-GFP マウスの口蓋突起の半側を切除し、MEE 領域を底面側になるように位置付け器官培養を行った。口蓋突起のタイムラプス画像は、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X700) で撮影した。

4. 口蓋の癒合の評価と組織学的分析

口蓋の表現型を解剖顕微鏡で評価した。口蓋組織の前頭断の凍結切片を作製し、H&E 染色を通法に従い行った。

5. 免疫組織化学染色および TUNEL 染色

口蓋組織の凍結切片における E-cadherin および p63、pERK、Ki67を目的抗原とした免疫組織化学染色を行った。アポトーシス細胞は TUNEL 染色法を用いて同定した

6. ウエスタンブロッティング法

E14.0の口蓋突起を培養したもの用いた。一次抗体は抗 RREB1 抗体、抗 pSmad2/3 抗体、抗 Smad2/3 抗体、抗 pERK 抗体、抗 ERK 抗体を用い、二次抗体は抗マウス IgG 抗体、抗ウサギ IgG 抗体を用いた。

7. 口蓋培養における siRNA トランスフェクション

E13.5の口蓋突起を、血清および抗生物質を含まない培地で4時間前培養したのち、siRNA 含有培地に交換し48時間培養し、器官培養、ウエスタンブロッティング、リアルタイム PCR のために使用した。

8. RNA 抽出および qPCR 解析

E14.0の口蓋突起の可能な限り MEE 領域のみを切除し、全 RNA を抽出した。qPCR にて *Rreb1* mRNA の定量を行った。

9. Whole-mount *in situ* hybridization

E14.0、E14.5の口蓋を固定し、*Rreb1* の検出を行った。

【結果】

1. Ras 阻害剤は器官培養における口蓋突起の癒合を抑制する

Ras 阻害剤は TGF-β 阻害剤と同様に、器官培養における口蓋癒合を阻害した。コントロール群では口蓋接触領域から E-cadherin および p63 の二重陽性 MEE 細胞が消失したのに対し、TGF-β 阻害剤投与群、Ras 阻害剤投与群では E-cadherin と p63 の持続的な発現を認めた。

2. Ras 阻害剤は口蓋突起半側培養における MEE 細胞の遊走を抑制する

Ras 阻害剤は TGF-β 阻害剤と同様に、MEE 細胞の移動を抑制した。TGF-β 阻害剤投与群、Ras 阻害剤投与群ともに、前頭断で口蓋突起が MEE 細胞で覆われ、E-cadherin の発現が維持されていた。

3. Ras 阻害剤は器官培養における MEE 細胞のアポトーシスを抑制する

TGF-β 阻害剤投与群、Ras 阻害剤投与群ともに、コントロール群と比して、MEE 細胞における TUNEL 陽性細胞の数が減少しており、増殖活性が維持されていた。

4. 器官培養における口蓋突起癒合について TGF-β 阻害剤と Ras 阻害剤は相乗効果を示す

TGF-β 阻害剤を1μM以下の濃度で、または Ras 阻害剤を5μM以下の濃度で単独で投与しても、口蓋突起癒合は抑制されなかったが、0.5 μM TGF-β 阻害剤と5 μM Ras 阻害剤を同時に投与すると口蓋突起癒合が抑制される傾向にあった。

5. *Rreb1* は口蓋形成期の口蓋上皮で発現している

E14.0およびE14.5において、*Rreb1* mRNA は二次口蓋の MEE 領域および皺襞で発現していた。

6. Ras 阻害剤は口蓋器官培養における *Rreb1* の発現を低下させる

Ras 阻害剤を投与すると口蓋突起器官培養における *Rreb1* mRNA および RREB1 タンパクの発現が低下した。

7. *Rreb1* のノックダウンは器官培養における口蓋突起の癒合を抑制する

Rreb1 のノックダウンにより、口蓋突起癒合が抑制され、MEE 細胞における E-cadherin と p63 の発現が維持されていた。*Rreb1* ノックダウン群では、コントロール群と比して、MEE 細胞における TUNEL 陽性細胞の数が減少しており、増殖活性が維持されていた。

【考察】

口蓋突起器官培養において、Ras 阻害剤は口蓋突起の癒合を抑制したことから、口蓋の癒合に不可欠な MEE 細胞の消失には Ras シグナルが必要であることが示唆された。Ras 阻害剤は MEE 細胞における E-cadherin の消失、細胞遊走、アポトーシスを抑制し、TGF-β 阻害剤の効果と一致していた。MEE 細胞の正常な消失過程には両シグナルの存在が必要であることが示唆され、単独では阻害剤の作用を発現しなかった低濃度であっても、両阻害剤を同時に適用すると口蓋突起癒合が抑制される傾向にあったことから、両阻害剤は口蓋突起癒合の抑制に協調的な作用を及ぼしたと考えられ、口蓋形成過程において TGF-β シグナルと Ras シグナルのクロストークが存在する可能性があることが示唆された。また、*Rreb1* は口蓋形成期の口蓋突起の上皮で発現しており、ノックダウンにより口蓋突起の癒合を抑制したことから、RREB1 は MEE 細胞を含む口蓋上皮において重要な役割を担っており、Ras シグナルが RREB1 を介して MEE 細胞の消失を制御していることが示唆された。

【結語】

口蓋突起癒合に RREB1 を介した Ras シグナル伝達が必要であることが明らかとなり、RREB1 を介した Ras シグナル伝達の異常が口蓋裂の発症に関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名(藤原采香)		
	(職)	氏名
論文審査担当者	主査 教授	田中 晋
	副査 教授	鶴澤 成一
	副査 准教授	波多 賢二
	副査 講師	阿部 真土

論文審査の結果の要旨

本研究は、口蓋の発生過程における TGF- β シグナル、Ras シグナルおよび *RREB1* 遺伝子の役割を明らかにする目的で、マウス口蓋突起器官培養法を用いて検討を行った。その結果、口蓋突起の癒合において TGF- β シグナルと Ras シグナルのクロストークが存在する可能性が示唆された。また、*RREB1* は MEE 細胞を含む口蓋上皮に発現し、Ras シグナルが *RREB1* を介して MEE 細胞の消失を制御していることが明らかとなった。以上の結果は、口蓋突起癒合に *RREB1* を介した Ras シグナル伝達が関与していることを示すものであり、口蓋裂の発症機序を解明する上でも重要な知見を与えるものである。

よって、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。