



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	<a href="https://doi.org/10.18910/101534">https://doi.org/10.18910/101534</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

学位論文

口蓋突起癒合における  
*Rreb1* 遺伝子の役割についての検討

2025 年 3 月

大阪大学大学院歯学研究科 口腔科学専攻  
顎顔面口腔外科学講座

藤原 采香

# 序論

1 口唇裂・口蓋裂は、体表に現れる先天奇形の中では最も頻度の高い疾患のひとつであ  
2 り、日本では発症頻度が比較的高く、出生 1 万人当たり 17.3～19.05 人（約 550 人に 1  
3 人）の割合で発症している<sup>1)</sup>。口蓋裂は遺伝的要因と環境的要因との相互作用で病態が  
4 発現する多因子疾患であることはよく知られている。最近の研究により、口蓋裂の遺伝  
5 的および環境的病因が明らかにされつつあるが、いまだ不明な点が多く残されている<sup>2)</sup>。  
6 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研  
7 究に用いられている。胎生 11.5 日頃に上顎突起より発生した口蓋突起が伸長し始め、  
8 胎生 15 日で口蓋突起先端が接触する<sup>3,4)</sup>。口蓋突起の先端には、周囲の上皮細胞とは異  
9 なり、Medial Edge Epithelial cell（以下 MEE 細胞）と呼ばれる上皮細胞が存在する。口  
10 蓋突起間に介在する MEE 細胞が融合し完全に消失することで、口蓋突起の癒合が完了  
11 し、二次口蓋が形成される。MEE 細胞の消失過程が正常に行われない場合、口蓋突起  
12 の癒合不全が生じ、口蓋裂が生じることが明らかとなっている。MEE 細胞消失のメカ  
13 ニズムは、上皮間葉転換（Epithelial Mesenchymal Transition :以下 EMT）、細胞遊走、ア  
14 ポトーシスの 3 つが関与しており、特に EMT は MEE 細胞に高発現している  
15 Transforming growth factor (TGF) - $\beta$ 3 によって誘導されることが報告されている<sup>5)</sup>。  
16 マウスおよびヒトにおいて、TGF- $\beta$ 3 のノックアウトが口蓋裂を引き起こすことから、  
17 TGF- $\beta$ 3 の存在は口蓋突起の癒合に必須であることが明らかにされている<sup>6-8)</sup>。口蓋癒合

1 時の MEE 細胞の消失における TGF- $\beta$ 3 の役割は広く研究されているが、他のシグナル  
2 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。  
3 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  
4 極めて重要な役割を果たしている<sup>9)</sup>。活性化した RAS は、RAF-MEK-ERK (RAF1-  
5 MAP2K-MAPK)、phosphoinositide 3-kinase (PI3K)、Rho GTPase などの広範な下流のタ  
6 一ゲットと相互作用する<sup>10)</sup>。TGF- $\beta$  シグナルは Ras シグナルと協調してがん細胞の  
7 EMT を制御することがすでに報告されている<sup>11)</sup>。TGF- $\beta$  は、I型およびII型受容体の  
8 チロシン残基、または Shc のチロシン残基のリン酸化を誘導する。リン酸化チロシン  
9 残基は、Grb2/Sos を誘導し、RAS、RAF、およびそれらの下流の MAPK カスケードを  
10 介して ERK を活性化する。ERK は Smad と協調し、下流の転写因子を介して標的遺  
11 伝子の転写を制御し、EMT を制御する。  
12 Ras-responsive element-binding protein 1 (RREB1) は、Ras シグナル下流で働く転写因  
13 子であり、細胞増殖、転写調節、DNA 損傷修復などの生物学的プロセスに広く関与す  
14 るジンクフィンガー転写因子のひとつである<sup>12, 13)</sup>。肺がん細胞の EMT の誘導に必要  
15 な因子として RREB1 が同定され、RREB1 と SMAD2/3 の遺伝子結合パターンが重複  
16 しており、SMAD2/3 による EMT 調節因子遺伝子の発現調節には RREB1 が必要であ  
17 ることが明らかとなり、RREB1 が胚発生における EMT においても SMAD と協調的  
18 に作用し重要な役割を果たしていることが近年報告された<sup>14)</sup>。また、ヒトでは口蓋癒合

1 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  
2 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。Ras シグナルは、  
3 Noonan 症候群、心臓顔面皮膚症候群、コステロ症候群などの遺伝性疾患と関連してい  
4 ることが報告されており、Noonan 様症候群の一部の症例で口唇裂および口蓋裂の表現  
5 型が認められることが報告されている<sup>15,16)</sup>。6pter-p24 欠失症候群 (OMIM #612582) は、  
6 *Rreb1* 遺伝子を含む領域である 6 番染色体短腕 (6p) の末端欠失を有する染色体疾患で  
7 あり、発達遅滞、精神遅滞、筋緊張低下、ダンディ・ウォーカー奇形、難聴、眼の異常、  
8 心臓の異常、およびしばしば口蓋裂を伴う頭蓋顔面の異常を特徴とする<sup>17,18)</sup>。RREB1  
9 は、口蓋裂を含む頭蓋顔面異常を伴う DiGeorge 症候群の病因の候補因子でもある<sup>19)</sup>。  
10 これらの報告は、ヒトにおける口蓋裂の病因に *Rreb1* 遺伝子が関与している可能性を  
11 示唆している。しかしながら、口蓋形成過程において、MEE 消失における RREB1 の  
12 役割は、いまだ明らかにされていない。  
13 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*  
14 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  
15 った。  
16  
17  
18

# 方法

## 1. 実験動物

2 本研究におけるすべての動物実験は大阪大学歯学研究科動物実験委員会の規定(動物  
3 実験委員会承認番号:動歯 R-31-002-0)と動物の愛護および管理に関する法律を順守して  
4 行った。妊娠した野生型 C57BL/6J 雌性マウス (CLEA, Tokyo, Japan) および cytokeratin-  
5 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]  
6 (大阪大学大学院顎顔面口腔矯正学講座, 犬伏俊博先生の御厚意により供与) を使用し  
7 た<sup>20)</sup>。遺伝子導入マウスは、皮膚表面の緑色蛍光により同定した。C57BL/6J 雌性マウ  
8 スを K14-GFP 雄性マウスと一晩交配させ、膣栓が確認された日を妊娠 0 日とした。  
9 C57BL/6J マウスおよび K14-GFP マウスの胎仔を摘出し、上顎を解剖し各実験に用い  
10 た。  
11

## 2. 解剖および器官培養

12  
13 E14.5 の野生型 C57BL/6J マウス胚を BGJb 培地 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)  
14 に迅速に浸した。解剖顕微鏡下で、メスおよび鑷子を用いて口蓋突起を切除した。単離  
15 した口蓋突起は、35mm の組織培養用ディッシュ (Corning, NY, USA) 上に、鼻腔側を  
16 下にして、MEE 領域を接触させながら、0.4μm の多孔性フィルター (Merck, Darmstadt,  
17 Germany) 上に 2 枚ずつ置いた。コントロール群は BGJb 培地を使用し、実験群は器官  
18

1 培養の 6 時間前に BGJb 培地に Pan-Ras-IN-1 (MedChemExpress, NJ, USA) または  
2 SB431542 (Merck) を添加しサンプルを前処理した。口蓋突起は 37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養  
3 し、培地は 24 時間ごとに交換した。

4

5 **3. タイムラプス画像撮影**

6 E14.5 の K14-GFP マウスの口蓋突起の半側を切除し、MEE 領域をガラスボトムディイ  
7 ッシュ (松浪硝子工業株式会社, Osaka, Japan) の底面側になるように位置付け器官培養  
8 を行った。時間の経過による組織の移動を防ぐ目的で BGJb 培地にアガロース (和光純  
9 葉工業株式会社, Osaka, Japan) を添加し、0.6%アガロース培養液を使用した。口蓋突起  
10 のタイムラプス画像は、GFP (励起波長 475 nm、蛍光波長 525 nm) および 4',6-diamidino-  
11 2-phenylindole (DAPI ; 励起波長 360 nm、蛍光波長 460 nm) 用のフィルターを備えたオ  
12 ールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X700, Keyence, Osaka, Japan) で撮影した。顕微鏡の BZ  
13 Viewer Version 1.0 ソフトウェアおよび BZ-II Analyzer ソフトウェアで画像解析を行つ  
14 た。

15

16 **4. 口蓋の癒合の評価と組織学的分析**

17 口蓋の表現型は、まず解剖顕微鏡で評価した。組織学的分析のため、サンプルを 4%  
18 パラホルムアルデヒド/ PB (pH7.4) で固定し、10%、20%、30%スクロース/PBS に順

1 に浸漬して平衡化し、Tissue-Tek O.C.T. compound (サクラファインテックジャパン株式  
2 会社, Tokyo, Japan) に包埋した。クリオスタッフ (CM1950, Leica, Wetzlar, Germany) を  
3 用いて 15  $\mu\text{m}$  の薄切凍結切片を前頭断にて作製した。凍結切片における H&E 染色は  
4 ヘマトキシリン溶液 (武藤化学株式会社, Tokyo, Japan) 、1% エオジンアルコール (武  
5 藤化学株式会社) を用いて通法に従い染色した。

6

## 7 **5. 免疫組織化学染色および TUNEL 染色**

8 凍結切片における E-cadherin および p63 を目的抗原とした免疫組織化学染色は、以  
9 下の手順で行った：凍結切片を 1 時間風乾させ、撥水性サークル作成ペンで組織周囲を  
10 囲み、PBS で洗浄した後、Tris-EDTA バッファー (pH9.0) を用いて、オートクレーブ  
11 にて 121°C で 15 分間加熱し抗原賦活処理を行った。PBS で洗浄し、ブロッキングは  
12 M.O.M Immunodetection Kit (Vector Laboratories, CA, USA) を用いて M.O.M Mouse Ig  
13 Blocking Regent を添加し 60 分間室温で処理した。PBS で洗浄し、一次抗体を M.O.M  
14 Protein Concentrate で希釈し、4°C で一晩反応させた。PBS で洗浄し、二次抗体を PBS  
15 で希釈し室温で 3 時間反応させた。核の対比染色には DAPI (和光純薬工業株式会社)  
16 を使用した。

17 pERK または Ki-67 を目的抗原とした免疫組織化学染色は、上記の手順のブロッキン  
18 グを 5% ヤギ血清/0.3% Triton X-100/PBS に変更して行った。

1 以下の抗体を使用した： polyclonal rabbit anti-E-cadherin (1:50; ab15148, abcam,  
2 Cambridge, UK)、 monoclonal rabbit anti-Ki67 (1:50; ab16667, abcam)、 monoclonal mouse anti-  
3 p63 (1:50; B1320, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)、 monoclonal rabbit anti-pERK (1:1000;  
4 4370, Cell Signaling Technology, MA USA)、 Alexa Fluor 488-labeled goat anti-rabbit IgG  
5 (1:500; A11034, Invitrogen, MA, USA)、 Alexa Fluor 555-labeled goat anti-mouse IgG(1:500;  
6 A21422, Invitrogen) 、 Alexa Fluor 555-labeled goat anti-rabbit IgG (1:500; A21428, Invitrogen)。  
7 アポトーシス細胞は、 *In Situ* Cell Death Detection Kit (11684795910, Roche, Basel,  
8 Switzerland) を用いて、 製造元の指示に従って同定した。

9

10 **6. ウェスタンブロッティング法**

11 E14.0 の口蓋突起を、 50 mmol/l Tris-HCl バッファー (pH 7.6)、 150 mmol/l NaCl、 1%  
12 Nonidet P40 Substitute、 0.5% デオキシコール酸ナトリウム、 および 0.1% SDS を含む氷  
13 冷 RIPA バッファーで溶解した。 プロテアーゼ阻害剤カクテルは Promega (Walldorf,  
14 Germany) から購入した。 氷上で 30 分間溶解させた後、 溶解サンプルを 4°C で 20,000g、  
15 20 分間遠心分離し、 溶解物を調製した。 その後、 10 µg の溶解物を 8-16% Tris-glycine ゲ  
16 ル (Invitrogen) で SDS-PAGE に供し、 その後、 Immobilon PVDF 膜 (Merck) にブロッ  
17 ティングした。 Chemi-Lumi One L (ナカライトスク株式会社, Kyoto, Japan) を使用して  
18 シグナルを検出した。

1 以下の抗体を使用した： monoclonal mouse anti-RREB1 (1:200; B-7, Santa Cruz  
2 Biotechnology)、 monoclonal rabbit anti-pSmad2/3 (1:1000; 8685, Cell Signaling Technology)、  
3 monoclonal rabbit anti-Smad2/3 (1:1000; 8685, Cell Signaling Technology)、 monoclonal rabbit  
4 anti-pERK (1:1000; 4370, Cell Signaling Technology)、 polyclonal rabbit anti-ERK (1:1000; 9102,  
5 Cell Signaling Technology)、  $\alpha$ -tubulin (1:1000; T6074, Merck)、 horseradish peroxidase-  
6 conjugated goat anti-rabbit IgG (1:500; 1706565, Bio-Rad, CA, USA)、 horseradish peroxidase-  
7 conjugated goat anti-mouse IgG (1:500; 1706515, Bio-Rad)。

8

9 **7. 口蓋培養における siRNA トランスフェクション**

10 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。 その  
11 後、 製造元の指示に従って、 培地を siRNA 含有培地に交換した。 トランスフェクショ  
12 ナ試薬 (Lipofectamine RNAiMax, Invitrogen) を、 マウス *Rreb1* を標的とする siRNA ま  
13 たはスクランブルコントロール (Silencer Select siRNA, Thermo Fisher Scientific) と混合  
14 した。 マウス *Rreb1* について 2 種類の異なる siRNA を使用した。 口蓋突起を siRNA  
15 含有培地で 48 時間培養したのち、 器官培養、 ウエスタンブロッティング、 リアルタイ  
16 ム PCR のために使用した。

17

18 **8. RNA 抽出および qPCR 解析**

1 E14.0 の口蓋突起の可能な限り MEE 領域のみを解剖顕微鏡下で鋸子を用いて解剖し  
2 た。IsogenII (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を製造元のプロトコールに従って使用し、解  
3 剖した組織から全 RNA を抽出した。その後、オリゴ (dT) と逆転写酵素 (タカラバイ  
4 オ株式会社, Shiga, Japan) を用いて cDNA に逆転写した。リアルタイム PCR では、  
5 cDNA の一部を TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) を  
6 用いて増幅した。データ取得と解析は、Step One Software, Version 2.1 (Applied Biosystems)  
7 を使用した Step One Real-Time PCR System で行った。PCR 産物は、*Gapdh* 内在性コン  
8 トロールとして使用して定量した。プライマーと TaqMan プローブは Applied  
9 Biosystems から購入した。

10

11 **9. Whole-mount *in situ* hybridization**

12 E14.0、E14.5 の口蓋を固定し、Whole-mount *in situ* hybridization を行った。ジゴキシ  
13 ゲニン (DIG) 標識 RNA プローブは、製造元のプロトコール (Roche) に従って、DIG  
14 RNA -labeling kit を用いて、各 cDNA クローンを鑄型として調製した。プローブは、  
15 *Rreb1* の断片 (Allen Institute for Brain Science, WA, USA) から合成し、T7 および SP6  
16 アダプタープライマーを用いて PCR で増幅した。ハイブリダイゼーション後、抗 DIG  
17 アルカリホスファターゼ結合 Fab フラグメント (Roche) との免疫反応性に応じてシグ  
18 ナルを可視化した。

1     10. 統計学的解析

2     統計的手法はサンプルサイズの事前決定には使用されなかった。統計分析は GraphPad

3     Prism 8 (GraphPad Software, MA, USA) を使用した。正規分布と類似した分散の遵守を

4     前提として、Student's two-tailed t-test および two-way ANOVA を使用した。 $P < 0.05$  を

5     有意であるとみなした。値は平均±標準偏差で表した。これらの実験すべてにおいて、

6     群間の分散は類似しており、データは対称的に分布していた。示したデータは代表的な

7     画像であり、各分析は各遺伝子型につき少なくとも 3 匹のマウスで実施した。免疫染色

8     は少なくとも 3 回実施した。

9

# 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

2 口蓋突起接触モデルは、口蓋上皮の癒合を調べるための確立された方法である<sup>21)</sup>  
3 (Fig.1-A)。口蓋突起癒合における Ras シグナルの役割を調べるために、口蓋器官培養に  
4 おいて Ras 阻害剤 (Pan-Ras-IN-1) を使用した。Pan-Ras-IN-1 は、Ras シグナルの阻害  
5 剤として十分に特徴づけられている<sup>22)</sup>。また、口蓋器官培養において口蓋の癒合を抑制  
6 することが実証されている、TGF- $\beta$  RI (TGFBR1) の特異的阻害剤である SB431542 も  
7 使用した<sup>23, 24)</sup>。培養 48 時間後、コントロール群では口蓋突起の完全な癒合が認められ  
8 た (Fig.1-B)。20 $\mu$ M SB431542 投与群では、MEE 細胞で覆われた口蓋突起の完全な癒  
9 合不全が観察された。同様に、20 $\mu$ M Pan-Ras-IN 投与群も、口蓋器官培養における口蓋  
10 突起の癒合が抑制された。

11 E-cadherin は、口蓋突起を覆う上皮細胞に特異的なマーカーとして最も一般的に使用  
12 されている。MEE 細胞消失前に E-カドヘリンが消失する EMT 様の上皮の喪失は、口  
13 蓋突起癒合の際に不可欠な過程である<sup>25)</sup>。p63 は、ヒトおよびマウスにおいて、その変  
14 異が口蓋裂を引き起こす主要な転写因子の 1 つである<sup>26, 27)</sup>。口蓋突起の MEE 細胞に  
15 おける p63 のダウンレギュレーションは、MEE 細胞の増殖能力を低下させ、口蓋の癒  
16 合に必要である<sup>28)</sup>。E-cadherin および p63 の免疫組織化学染色により、コントロール  
17 群では培養 48 時間後に口蓋突起の接触領域から E-cadherin および p63 の二重陽性  
18 群では培養 48 時間後に口蓋突起の接触領域から E-cadherin および p63 の二重陽性

1 MEE 細胞が消失することが示された (Fig.1-C)。一方、SB431542 および Pan-Ras-IN-1  
2 投与群では口蓋突起を強制的に接触させたにもかかわらず、MEE 細胞において E-  
3 cadherin と p63 の発現が観察された。ERK 経路は Ras タンパク質の下流経路のひと  
4 つであるため、器官培養におけるリン酸化 (p) ERK の発現に対する Pan-Ras-IN-1 の  
5 影響を調べた。Pan-Ras-IN-1 投与群では、免疫組織化学的染色により示されるように、  
6 残存する MEE 領域における pERK の発現が大幅に低下していた (Fig.1-D)。山本らは、  
7 口蓋の組織片に EGF 処理を行うと口蓋の癒合が阻害され、MEK 阻害剤が EGF 誘発  
8 性の口蓋癒合阻害を回復させることを実証している<sup>29)</sup>。これらの結果は、正常な口蓋の  
9 癒合には適切な ERK 経路の活性化が必要であることを示している。

10 ウエスタンブロッティングにより、Pan-Ras-IN-1 投与群では pERK の発現が低下し、  
11 SB431542 投与群では pSmad2/3 の発現が低下することが示された (Fig.1-E)。これら  
12 の結果から、口蓋の癒合に不可欠な MEE 細胞の消失には Ras シグナル伝達が必要で  
13 あることが示された。

14

15 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

16 二次口蓋の発生過程における MEE 細胞の挙動を追跡するために、上皮-GFP 標識マ  
17 ウスを用いた口蓋突起半側器官培養モデルが有用であることが報告されている<sup>30)</sup>。こ  
18 のモデルでは、MEE 細胞は口蓋突起の接触とは無関係に、単一の口蓋突起の内側縁か

1 ら消失する。さらに、この上皮消失のタイミングは、過去の研究で *in vivo* で報告された  
2 MEE 細胞の消失と非常に類似している<sup>31,32</sup>。この培養システムにはいくつかの限界が  
3 あるが、二次口蓋の表面における上皮細胞の移動を含む挙動を観察することができる。  
4 したがって、口蓋癒合時の MEE 細胞の細胞挙動における Ras シグナル伝達の役割を  
5 さらに詳しく調べるために、この口蓋突起半側器官培養モデルを使用した (Fig.2-A)。  
6 その結果、20μM SB431542 投与群と 20μM Pan-Ras-IN-1 投与群の両方において、MEE  
7 細胞の移動とそれに続く間葉細胞の露出が強く抑制された (Fig.2-B)。さらに、SB431542  
8 投与群および Pan-Ras-IN-1 投与群の両方において、前頭断面で口蓋突起が MEE 細胞  
9 で覆われていることが確認され、E-cadherin の発現が MEE 領域で維持されていること  
10 が確認された (Fig.2-C)。これらの結果から、口蓋形成における MEE 消失の必須プロ  
11 セスである E-cadherin の消失に Ras シグナル伝達が必要であることが示唆された。  
12

13 **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**  
14 アポトーシスは、癒合した口蓋突起から MEE 細胞が除去される際に重要な細胞事象  
15 とされているため、口蓋器官培養における MEE 細胞のアポトーシスに対する Ras シ  
16 グナル阻害の影響を調べた。Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling  
17 (TUNEL) アッセイにより、残存 MEE 細胞における TUNEL 陽性細胞の数が、コン  
18 トロール群と比較して、Pan-Ras-IN-1 投与群および SB431542 投与群で顕著に減少し

1 ていることが明らかになった (Fig.3-A)。Ki67 の免疫組織化学染色により、Pan-Ras-IN-  
2 1 投与群および SB431542 投与群では、残存 MEE 細胞において増殖活性が維持され  
3 ていることが示された (Fig.3-B)。これらの結果から、Ras 阻害剤を投与した MEE 細  
4 胞は増殖を継続し、アポトーシスを起こさないことが示された。

5

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

8 口蓋器官培養における口蓋癒合に対する TGF- $\beta$  シグナル伝達と Ras シグナル伝達  
9 の相乗効果を調べるため、SB431542 と Pan-Ras-IN-1 を同時に適用した。SB431542 を  
10 1 $\mu$ M 以下の濃度で、または Pan-Ras-IN-1 を 5 $\mu$ M 以下の濃度で単独で投与しても、口蓋  
11 突起癒合は抑制されなかった (Fig.4-A, B)。しかし、0.5  $\mu$ M SB431542 と 5  $\mu$ M Pan-  
12 Ras-IN-1 を同時に投与すると、口蓋器官培養における MEE 細胞の消失を阻害するこ  
13 とで口蓋突起癒合は抑制される傾向にあった (Fig.4-C)。以上の結果から、口蓋突起癒  
14 合時の MEE 細胞の消失過程において、TGF- $\beta$  シグナル伝達と Ras シグナル伝達の協  
15 調的な役割が関与することが示唆された。

16

17 **5. Rreb1 は口蓋形成期の口蓋上皮で発現している**

18 RREB1 は胚発生中期の口蓋形成期における EMT に重要な役割を果たしていること

1 が示された<sup>14)</sup>。本研究において、RREB1 が口蓋の癒合における MEE 細胞の消失に関  
2 与している可能性があるという仮説を立てた。しかし、口蓋形成期における *Rreb1* の  
3 発現パターンについてはまだ報告がないため、口蓋形成期における *Rreb1* mRNA の発  
4 現パターンを調べた。E14.0 および E14.5 の胚の Whole-mount *in situ* hybridization にお  
5 いて、*Rreb1* mRNA は二次口蓋の MEE 領域および口蓋皺襞で発現していた (Fig.5-A)。  
6 また、*Rreb1* の発現は二次口蓋の癒合面でも顕著であった (Fig.5-B)。これらの結果か  
7 ら、*Rreb1* は口蓋形成期における口蓋突起の MEE 細胞を含む上皮において、重要な役  
8 割を担っている可能性が示唆された。

9

## 10 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

11 口蓋癒合時の口蓋突起における *Rreb1* の発現に対する Ras シグナル伝達阻害の影  
12 韻を調べた。Pan-Ras-IN-1 で 6 時間処理した後の *Rreb1* の発現は顕著に低下し、24 時  
13 間処理後もコントロールと比較して発現は抑制されていた (Fig.6-A)。Pan-Ras-IN-1 によ  
14 る 24 時間の処理は、口蓋突起における RREB1 タンパク質の発現を減少させた (Fig.6-  
15 B)。これらの結果から、口蓋突起における *Rreb1* の発現には Ras シグナル伝達が不可  
16 欠であることが示された。

17

## 18 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

19 RNA interference (RNAi) は、標的遺伝子を特異的かつ効率的にノックダウンできる

1 ため、口蓋器官培養モデルで利用されてきた<sup>5)</sup>。口蓋の癒合における MEE 細胞に対する  
2 *Rreb1* の役割を調べるため、口蓋突起器官培養実験で siRNA を用いて *Rreb1* をノ  
3 ックダウンした。*Rreb1* mRNA および RREB1 タンパク質の *Rreb1* ノックダウン群に  
4 おける発現低下は、それぞれ定量的 PCR (qPCR) およびウエスタンブロッティングに  
5 より確認された (Fig.7-A, B)。pERK の発現は、*Rreb1* ノックダウン群においてわずか  
6 に低下した (Fig.7-B)。*Rreb1* ノックダウン群では、口蓋突起の癒合が抑制されること  
7 が示された (Fig.7-C)。免疫組織化学的染色により、*Rreb1* ノックダウン群の MEE 細  
8 胞では E-cadherin および p63 の発現が維持されていた (Fig.7-D)。TUNEL アッセイに  
9 より、コントロール群と比較して、*Rreb1* ノックダウン群では残存 MEE 細胞における  
10 TUNEL 陽性細胞の数が大幅に減少していることが示された (Fig.7-E)。Ki67 の免疫組  
11 織化学染色により、*Rreb1* ノックダウン群における残存 MEE 細胞では増殖活性が維持  
12 されていることが明らかになった (Fig.7-F)。これらの口蓋器官培養における *Rreb1* ノ  
13 ックダウンの効果は、Pan-Ras 阻害剤処理による器官培養で観察された結果と一致して  
14 いた。  
15  
16  
17  
18

## 1 考察

2 本研究では、RREB1 が TGF- $\beta$  シグナルと Ras シグナルを協調させ、口蓋突起の癒  
3 合における MEE 細胞を消失させているのではないかという仮説を立て、検討を行つ  
4 た。

5 マウス口蓋突起の器官培養法は、癒合前の口蓋突起を対にして癒合予定領域を接触  
6 させた状態で静置し培養する口蓋突起接触モデルが一般的に古くから有用とされ使用  
7 されており、本実験においてもこのモデルを採用した<sup>21)</sup>。MEE 細胞の遊走について  
8 の検討においては、口蓋突起半側培養モデルを用いた<sup>30)</sup>。このモデルは口蓋突起にお  
9 ける上皮細胞の移動を含む上皮の挙動を観察することができ、過去の研究で *in vivo*  
10 で報告された MEE 細胞の消失と非常に類似していると報告されている<sup>31)</sup>。このモデ  
11 ルにおいて、MEE 細胞は対になる口蓋突起の接触や上皮性縫合の形成とは無関係に単  
12 一の口蓋突起の内側縁から消失する。しかしながら、ヒトやマウスの羊水にはマウス  
13 の單一口蓋突起において内側縁上皮の消失を抑制する作用があることが明らかにされ  
14 ている<sup>32)</sup>。また、羊水は口蓋突起の癒合後に生じた破裂を速やかに上皮化させる作用  
15 を有する<sup>33)</sup>。これらの報告から、口蓋突起半側培養モデルが実際の子宮内で起こる口  
16 蓋癒合を正確に再現できていない可能性を考慮する必要がある。

17 本研究では、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  
18 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

1 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  
2 ポトーシスを抑制し、TGF- $\beta$  阻害剤の効果と一致していた。TGF- $\beta$  シグナルおよび  
3 Ras シグナルは、MEE 細胞消失過程において EMT、細胞遊走、アポトーシスを制御  
4 しており、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  
5 された。ただし、両シグナルともに阻害剤を高濃度で適用した場合に口蓋突起癒合は  
6 抑制され、一定の濃度を下回ると口蓋突起は正常に癒合し、阻害剤の作用を及ぼさな  
7 かったことから、阻害剤には作用発現に適切な濃度が存在すると考えられる。単独で  
8 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  
9 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  
10 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- $\beta$  シグナルと Ras シ  
11 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  
12 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  
13 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  
14 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  
15 された。これらの結果は、胚発生過程において Smad タンパク質と RREB1 の相互作  
16 用を介した TGF- $\beta$  シグナルと Ras シグナルのクロストークが存在するという Su ら  
17 の報告と矛盾しない<sup>14)</sup>。しかしながら、本研究では口蓋癒合過程における RREB1 と

1 Smad との直接的な相互作用の存在の有無までは検討できておらず、今後クロマチン  
2 免疫沈降シーケンシングなどの手法を用いることで解析が可能となると考えられる。

3 p63 は上皮細胞の増殖と分化の重要な調節因子であり、TGF-β-Smad および Ras シ  
4 グナル伝達のダウンストリームで作用する。MEE 細胞における TGF-β3 による p63  
5 のダウンレギュレーションは、MEE 細胞の移動を促進し、正常な口蓋癒合に必要であ  
6 ると報告されている<sup>28)</sup>。この報告において、*Tgfb3-/- ; p63+/+* マウスは口蓋裂を示し  
7 たが、*Tgfb3-/- ; p63+/-* マウスにおいて口蓋の発達は正常に進行することが明らかとな  
8 り、*Tgfb3-/-* マウスにおける p63 のダウンレギュレーションは、口蓋裂の表現型を回  
9 復すると示された。今後、口蓋突起器官培養において、*Rreb1* ノックダウンでの p63  
10 の発現の検討や *Rreb1* ノックダウンの表現型が p63 のダウンレギュレーションによ  
11 り回復可能か検討することで、RREB1 が MEE 細胞を制御する分子メカニズムがよ  
12 り詳細に解明されると考えられる。

13 本研究の限界は、口蓋突起の分析に *Rreb1* 欠損の遺伝子組み換えマウスを使用しな  
14 かったことである。*Rreb1* ノックアウトマウスは、胚発生の初期において致死となるた  
15 め、コンベンショナルノックアウトマウスモデルでは、*Rreb1* ノックアウトマウスの  
16 口蓋裂の表現型を調べることができない<sup>14,34)</sup>。Cre/loxP システムを用いた *Rreb1* のコ  
17 ンディショナルノックアウトマウスを作成することができれば、将来的には *Rreb1* の  
18 上皮特異的ノックアウトの表現型の検討が可能となると考えられる。口蓋器官培養に

1 における低分子阻害剤や RNAi を用いた本研究のアプローチでは、非特異的なオフタ  
2 ゲット効果を完全に排除することはできないが、これらのアプローチは遺伝子改変マ  
3 ウスモデルが利用できない場合の代替法として有効であると考えられる。

4 本研究により、口蓋形成期における MEE 細胞の消失には TGF- $\beta$  シグナル伝達お  
5 よび Ras シグナル伝達が不可欠であることが示された。また、Ras シグナル伝達の下  
6 流で作用する転写因子として知られる RREB1 は、MEE 領域で発現しており、口蓋  
7 癒合時の MEE 細胞の消失に必要であることが示され、口蓋裂発生における極めて重  
8 要な因子であることが示唆された。

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

## 1 結語

2 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  
3 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  
4 が示唆された。

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

## 謝辞

1  
2 本論文を作製するにあたり、本研究を行う機会を与えていただき、終始御懇切なる  
3 御指導を賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎顔面口腔外科学講座・田中晋教授に  
4 深謝いたします。本研究を遂行するにあたり御指導くださいました、大阪大学大学院  
5 歯学研究科顎顔面口腔外科学講座・内橋俊大 助教、大阪大学大学院歯学研究科顎顔面  
6 口腔矯正学講座 犬伏俊博講師に深謝いたします。  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16

## 引用文献

1. Takeuchi M, Yoshida S, et al: Association of maternal heavy metal exposure during pregnancy with isolated cleft lip and palate in offspring: Japan Environment and Children's Study (JECS) cohort study. *PLoS One* 17(3):e0265648, 2022.
2. Dixon M J, Marazita M L, et al: Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet* 12(3): 167-78, 2011.
3. Bush J O, Jiang R, et al: Palatogenesis: morphogenetic and molecular mechanisms of secondary palate development. *Development* 139(2): 231- 243, 2012.
4. Ferguson M W: Palate development. *Development* 103: 41-60, 1988.
5. Nakajima A, Shuler C F, et al: TGF- $\beta$  signaling and the epithelial-mesenchymal transition during palatal fusion. *Int J Mol Sci* 19(11): 3638, 2018.
6. Lidral A C, Romitti P A: Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans. *Am J Hum Genet* 63(2):557-568, 1998.
7. Taya Y, O'Kane S, et al: Pathogenesis of cleft palate in TGF-beta3 knockout mice. *Development* 126(17):3869-3879, 1999.
8. Zhu J, Hao L, et al: MTHFR, TGFB3, and TGFA polymorphisms and their association with the risk of non-syndromic cleft lip and cleft palate in China. *Am J Med Genet A* 152A(2):291-298, 2010.
9. Zhang Y E: Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* 19(1):128-139, 2009.
10. Downward J: Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3(1):11-22, 2003.
11. Rajalingam K, Schreck R, et al: Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochim Biophys Acta* 1773(8):1177-1195, 2007.
12. Mukhopadhyay N K, Cinar B, et al: The zinc finger protein ras-responsive element binding protein-1 is a coregulator of the androgen receptor: implications for the role of the Ras pathway in enhancing androgenic signaling in prostate cancer. *Mol Endocrinol* 21(9): 2056-2070, 2007.
13. Deng Y N, Xia Z, et al: Transcription Factor RREB1: from Target Genes towards Biological Functions. *Int J Biol Sci* 16(8):1463-1473, 2020.
14. Su J, Morgani S M, et al: TGF- $\beta$  orchestrates fibrogenic and developmental EMTs via the RAS effector RREB1. *Nature* 577(7791): 566-571, 2020.
15. Nava C, Hanna N, et al: Cardio-facio-cutaneous and Noonan syndromes due to mutations in the RAS/MAPK signalling pathway: genotype-phenotype relationships and overlap with Costello syndrome. *J Med Genet* 44(12): 763-771, 2007.
16. Couser N L, Keelean-Fuller D: Cleft palate and hypopituitarism in a patient with Noonan-

- 1 like syndrome with loose anagen hair-1. *Am J Med Genet A* 176(9):2024-2027, 2018.
- 2 17. Davies S J, Wise C, et al: Mapping of three translocation breakpoints associated with orofacial  
3 clefting within 6p24 and identification of new transcripts within the region. *Cytogenet  
4 Genome Res* 105(1):47-53, 2004.
- 5 18. Topping A, Harris P, et al: The 6p deletion syndrome: a new orofacial clefting syndrome and  
6 its implications for antenatal screening. *Br J Plast Surg* 55(1):68-72, 2002.
- 7 19. Guo T, Chung J H, et al: Histone Modifier Genes Alter Conotruncal Heart Phenotypes in  
8 22q11.2 Deletion Syndrome. *Am J Hum Genet* 97(6):869-877, 2015.
- 9 20. Vaezi A, Bauer C, et al: Actin cable dynamics and Rho/Rock orchestrate a polarized  
10 cytoskeletal architecture in the early steps of assembling a stratified epithelium. *Dev Cell*  
11 3(3): 367-381, 2002.
- 12 21. Brunet C L, Sharpe P M, et al: Inhibition of TGF-beta 3 (but not TGF-beta 1 or TGF-beta 2)  
13 activity prevents normal mouse embryonic palate fusion. *Int J Dev Biol* 39(2): 345-355, 1995.
- 14 22. Welsch M E, Kaplan A, et al: Multivalent Small-Molecule Pan-RAS Inhibitors. *Cell* 168(5):  
15 878-889, 2017.
- 16 23. Dudas M, Nagy A, et al: Tgf-beta3-induced palatal fusion is mediated by Alk-5/Smad  
17 pathway. *Dev Biol* 266(1): 96-108, 2004.
- 18 24. Inman G J, Nicolás F J, et al: SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming  
19 growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4,  
20 ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* 62(1):65-74, 2002.
- 21 25. Nawshad A, LaGamba D, et al: Transforming growth factor beta (TGFbeta) signalling in  
22 palatal growth, apoptosis and epithelial mesenchymal transformation (EMT). *Arch Oral Biol*  
23 49(9): 675-689, 2004.
- 24 26. Thomason H A, Dixon M J, et al: Facial clefting in Tp63 deficient mice results from altered  
25 Bmp4, Fgf8 and Shh signaling. *Dev Biol* 321(1): 273-282, 2008.
- 26 27. van Bokhoven H, Brunner H G: Splitting p63. *Am J Hum Genet* 71(1): 1-13, 2002.
- 27 28. Richardson R, Mitchell K, et al: p63 exerts spatio-temporal control of palatal epithelial cell  
28 fate to prevent cleft palate. *PLoS Genet* 13(6):e1006828, 2017.
- 29 29. Yamamoto T, Cui X M, et al: Role of ERK1/2 signaling during EGF-induced inhibition of  
30 palatal fusion. *Dev Biol* 262(2):512-521, 2003.
- 31 30. Aoyama G, Kurosaka H, et al: Observation of Dynamic Cellular Migration of the Medial  
32 Edge Epithelium of the Palatal Shelf in vitro. *Front Physiol* 10:698, 2019.
- 33 31. Charoenchaikorn K, Yokomizo T, et al: Runx1 is involved in the fusion of the primary and  
34 the secondary palatal shelves. *Dev Biol* 326(2):392-402, 2009.
- 35 32. Takigawa T, Shiota K: Terminal differentiation of palatal medial edge epithelial cells in vitro  
36 is not necessarily dependent on palatal shelf contact and midline epithelial seam formation.

- 1           Int J Dev Biol 48(4):307-317, 2004.
- 2   33. Takigawa T, Shiota K: Amniotic fluid induces rapid epithelialization in the experimentally
- 3        ruptured fetal mouse palate--implications for fetal wound healing. Int J Dev Biol 51(1):67-
- 4        77, 2007.
- 5   34. Morgani S M, Su J, et al: The transcription factor Rreb1 regulates epithelial architecture,
- 6        invasiveness, and vasculogenesis in early mouse embryos. Elife 10:e64811, 2021.
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34

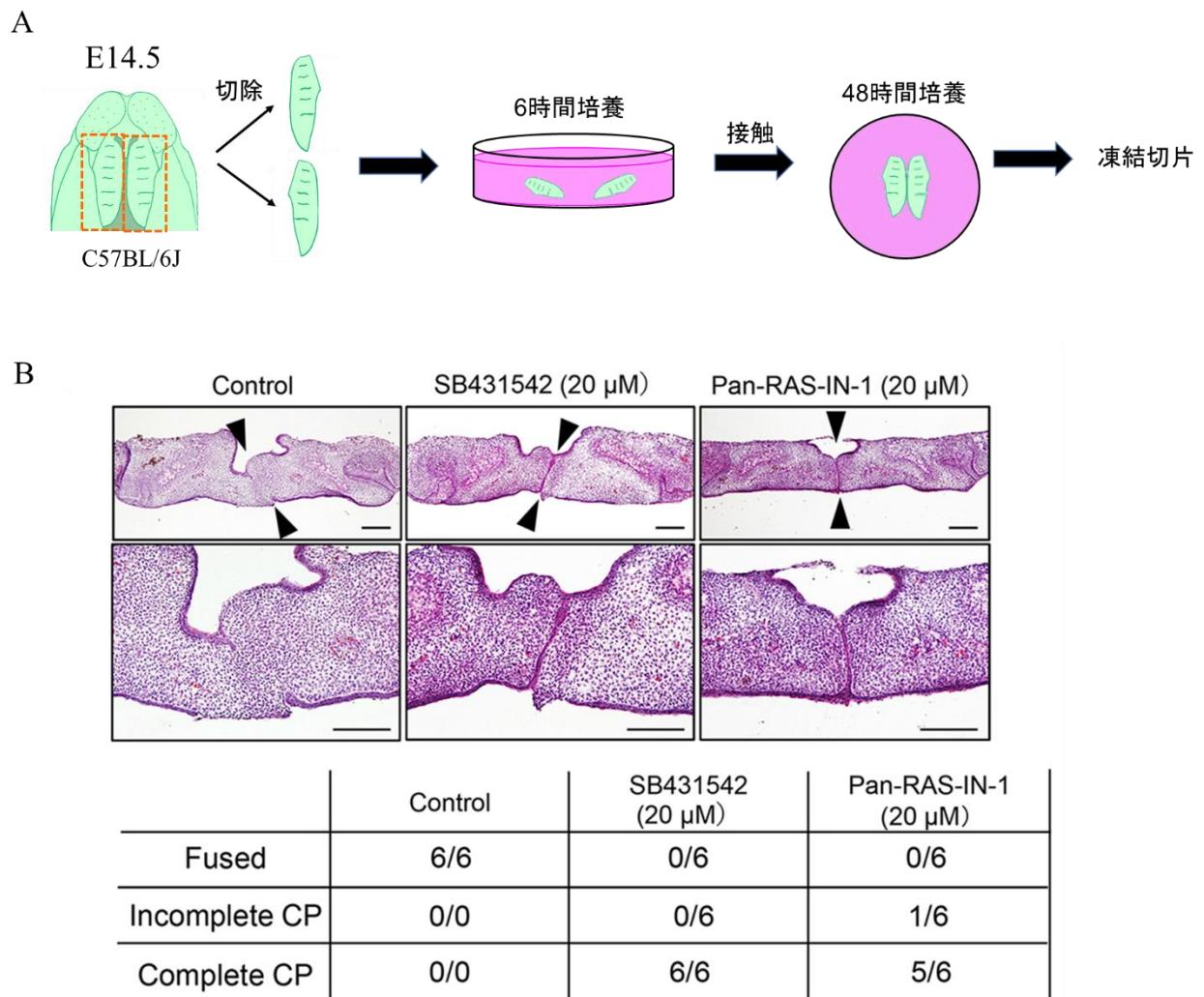


Fig. 1 Ras 阻害剤投与による口蓋突起癒合への影響の検討

- A. E14.5 の野生型 C57BL/6J マウスから解剖した一対の口蓋突起を用いて器官培養を行った。6 時間前に口蓋突起を SB431542 (20  $\mu$ M)、Pan-Ras-IN-1 (20  $\mu$ M)、またはジメチルスルホキシド (DMSO) で前処理した後、口蓋突起を接触させて 48 時間器官培養を行った。
- B. 口蓋突起の前頭断 H&E 染色像では、SB431542 投与群および Pan-Ras-IN-1 投与群において、口蓋突起の癒合不全と MEE 細胞の残存を認めた。矢印は、口蓋突起の接触領域を示している。下段は、各群における口蓋の癒合率を示している。
- CP; 口蓋裂, スケールバー; 200  $\mu$ m

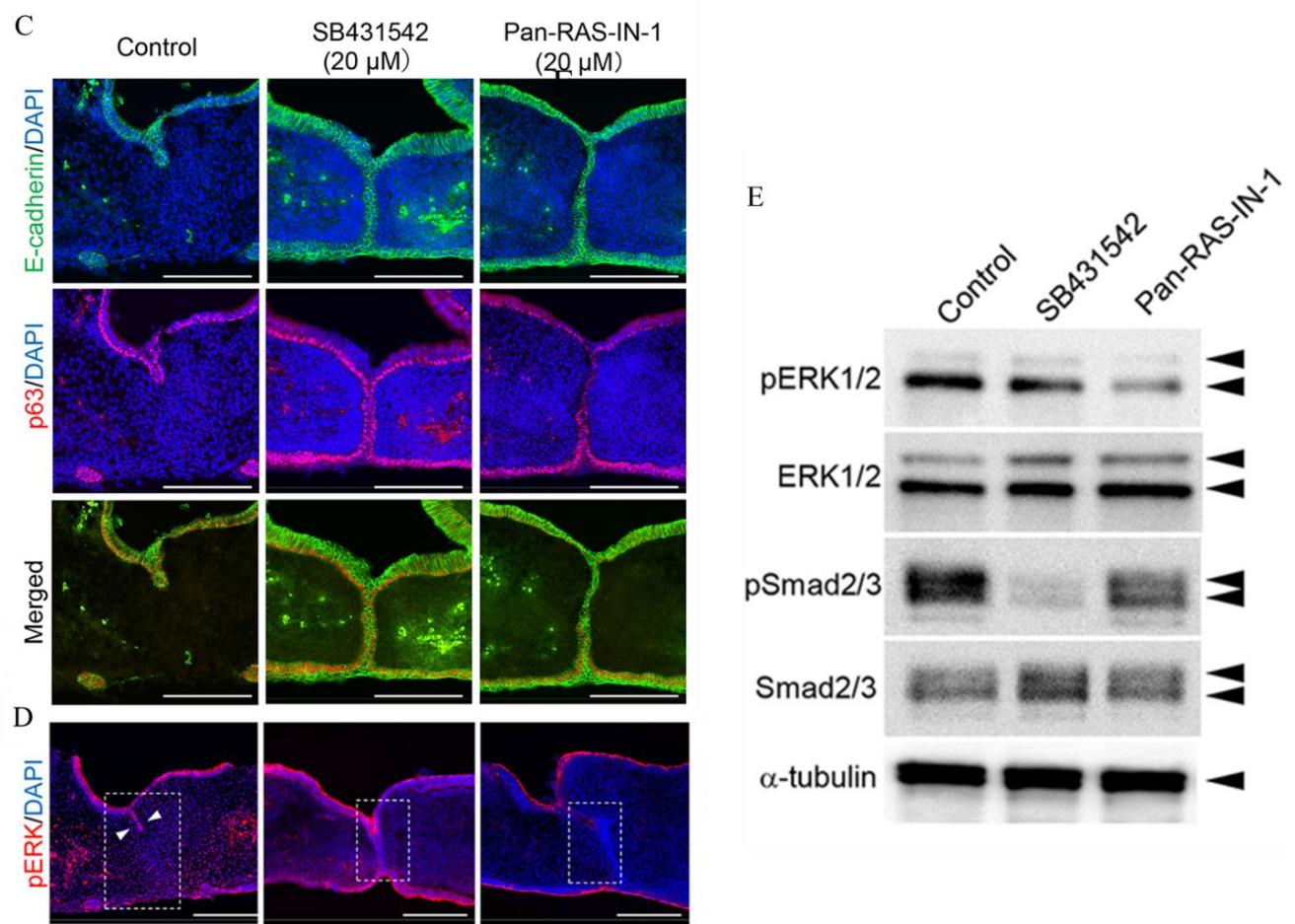


Fig. 1 Ras 阻害剤投与による口蓋突起癒合への影響の検討

C. SB431542 および Pan-Ras-IN-1 投与群では、MEE 領域において E-cadherin および p63 の持続的な発現を認めた。

スケールバー;200 $\mu$ m

D. Pan-Ras-IN-1 投与群では、リン酸化(p)ERK の全体的な発現が減少していた。コントロール群の残存 MEE 領域では、pERK 発現を認めた(矢印)。Pan-Ras-IN-1 投与群では、MEE 領域における pERK の発現が大幅に減少していた。

スケールバー;200 $\mu$ m

E. ウエスタンブロッティングにより、Pan-Ras-IN-1 投与群における pERK の発現減少を認めた。SB431542 投与群では pSmad2 の発現が減少した。

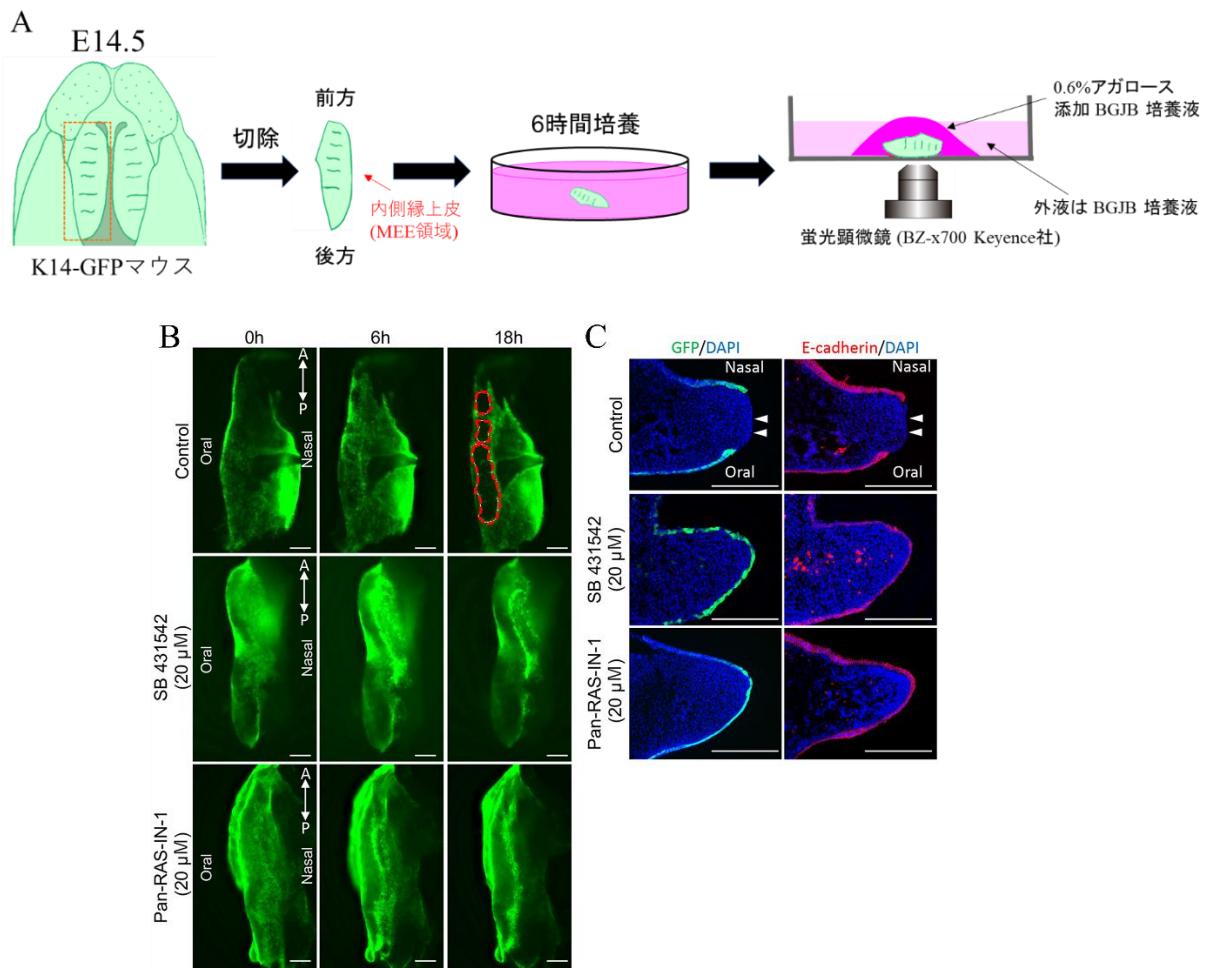


Fig. 2 Ras 阻害剤投与による MEE 細胞遊走への影響の検討

A. E14.5 の K-14GFP マウスから解剖した口蓋突起の半側を用いて器官培養を行った。6 時間に SB431542 (20  $\mu$ M)、Pan-Ras-IN-1 (20  $\mu$ M)、またはジメチルスルホキシド (DMSO) で前処理した後、MEE 領域をガラスボトムディッシュの底面側になるように位置付け器官培養を行い、タイムラプス画像撮影を行った。

B. 培養 0、6、18 時間後の口蓋突起半側器官培養モデルの内側縁を示す蛍光顕微鏡像。赤い破線は間葉細胞の露出部分を示す。SB431542 (20  $\mu$ M) および Pan-Ras-IN-1 (20  $\mu$ M) 処理により、MEE 細胞の移動およびそれに続く間葉細胞の露出が抑制された。

A; anterior, P; posterior, スケールバー; 200  $\mu$ m

C. 口蓋突起半側器官培養 18 時間後の K14-GFP マウスの口蓋突起の前頭断像。E-cadherin の発現は、SB431542 投与群および Pan-Ras-IN-1 投与群の両方において、MEE 領域で維持されていた。矢印は間葉細胞の露出部位を示す。

スケールバー; 200  $\mu$ m

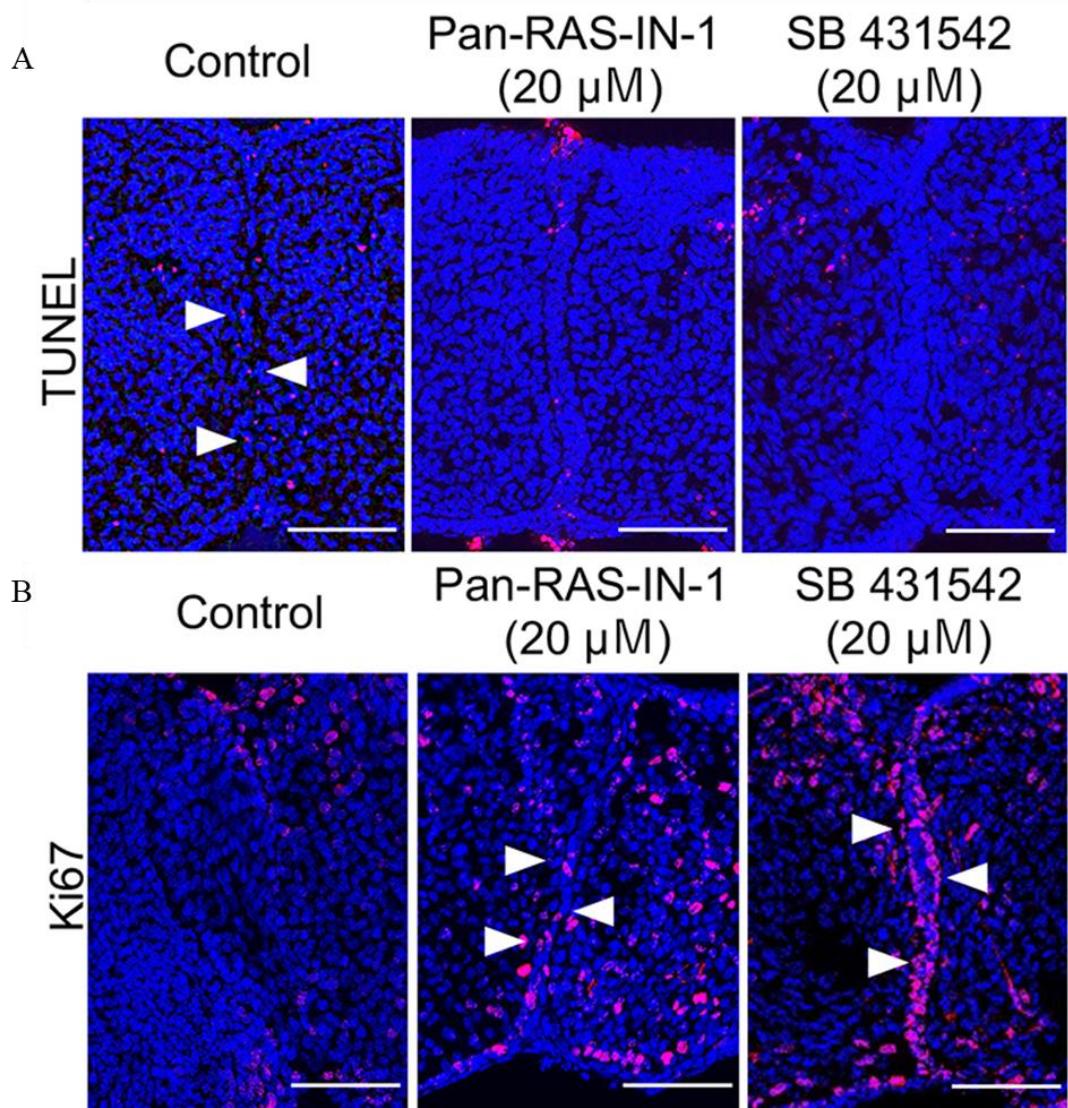


Fig. 3 Ras 阻害剤投与による MEE 細胞のアポトーシスへの影響の検討

- A. TUNEL アッセイによる口蓋突起器官培養 24 時間後のアポトーシスの分析。Pan-Ras-IN-1 投与群および SB431542 投与群では、残存 MEE 細胞(矢印)における TUNEL 陽性細胞の数が著しく減少していた。  
スケールバー;100μm
- B. Ki67 の免疫組織化学染色による口蓋突起器官培養 24 時間後の細胞増殖の分析。Pan-Ras-IN-1 投与群および SB431542 投与群では、残存 MEE 細胞(矢印)において増殖活性が維持されていた。  
スケールバー;100μm

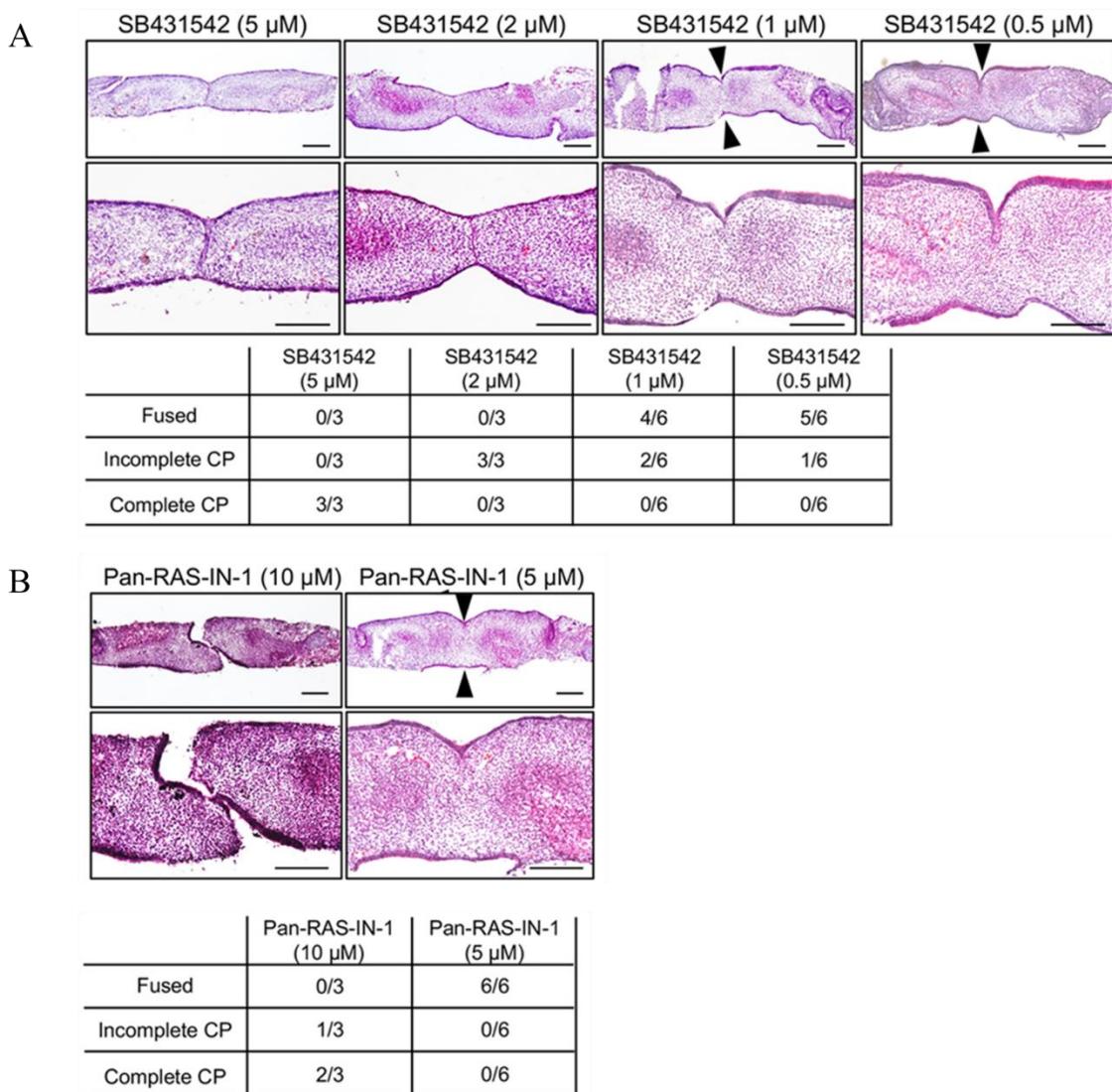


Fig. 4 口蓋突起癒合における TGF- $\beta$  阻害剤と Ras 阻害剤の相乗効果の検討

E14.5 の野生型 C57BL/6J マウスから解剖した一対の口蓋突起を用いて器官培養を行った。以下の阻害剤で前処理した後、口蓋突起を接触させて 48 時間器官培養を行った。前頭断組織切片を H&E 染色した。

- 5、2、1、0.5  $\mu$ M の SB431542 で口蓋突起を 6 時間前処理した。1  $\mu$ M 以下の濃度では口蓋突起癒合は抑制されなかった。
- 10  $\mu$ M または 5  $\mu$ M の Pan-Ras-IN-1 で 6 時間前処理した。5  $\mu$ M では口蓋突起癒合は抑制されなかった。

矢印は、口蓋突起の接触領域を示している。下段は、各群における口蓋の癒合率を示している。

CP; 口蓋裂, スケールバー; 200  $\mu$ m

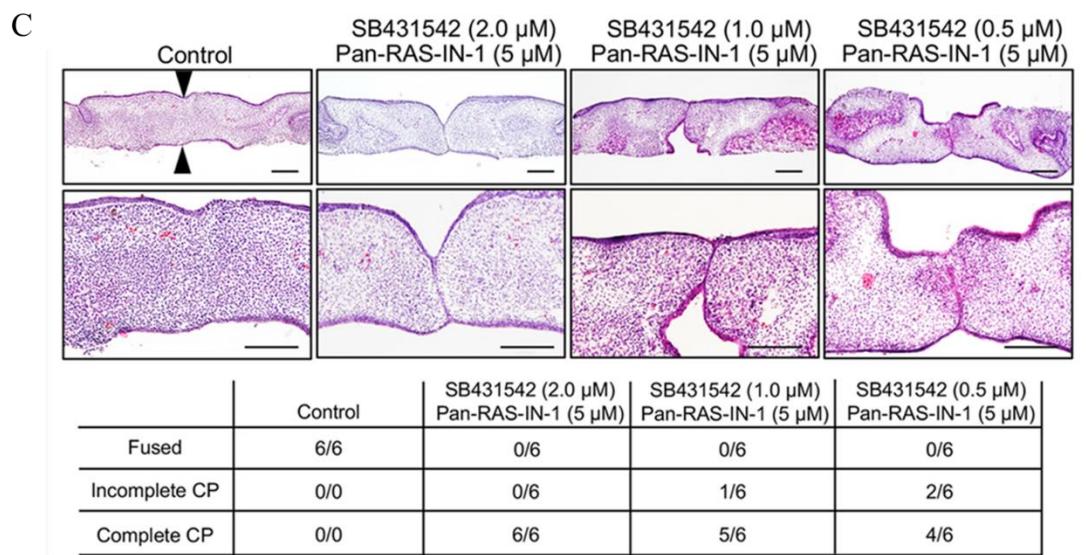


Fig. 4 口蓋突起癒合における TGF- $\beta$  阻害剤と Ras 阻害剤の相乗効果の検討

C. 2、1、0.5 $\mu$ M の SB431542 および 5  $\mu$ M の Pan-Ras-IN-1 で口蓋突起を 6 時間前処理した。0.5  $\mu$ M の SB431542 と 5  $\mu$ M の Pan-Ras-IN-1 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。

矢印は、口蓋突起の接触領域を示している。下段は、各群における口蓋の癒合率を示している。

CP; 口蓋裂, スケールバー; 200 $\mu$ m

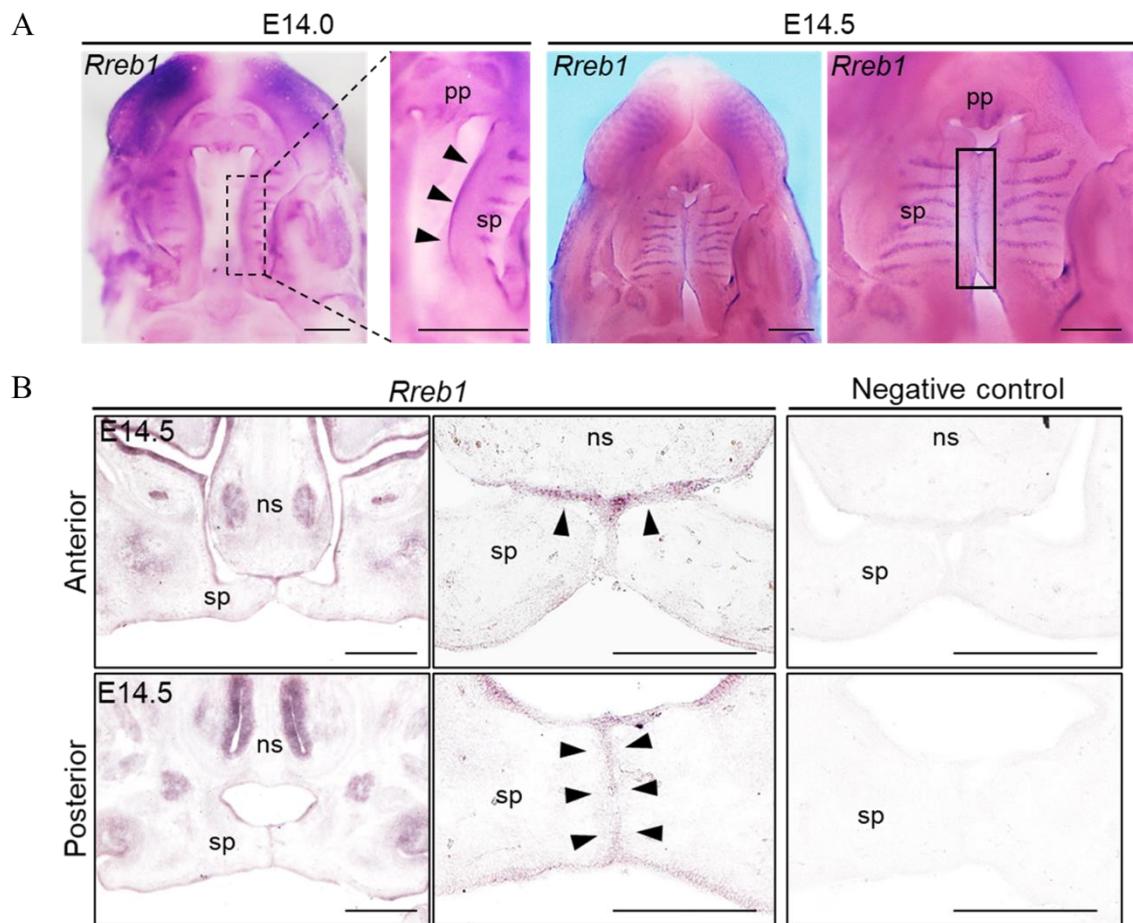


Fig. 5 口蓋突起における *Rreb1* mRNA の発現パターンの検討

A. E14.0 および E14.5 における野生型 C57BL/6J マウスの口蓋における *Rreb1* についての whole-mount *in situ* hybridization。*Rreb1* は前後軸に沿った二次口蓋の MEE 領域および口蓋皺襞に広く分布していた。矢印は MEE 領域を示す。黒線で囲まれた領域は癒合した口蓋突起の MEE 領域を示す。

pp;primary palate, sp;secondary palate, スケールバー;500μm

B. E14.0 における野生型 C57BL/6J マウスの前頭断組織切片の *in situ* hybridization。  
*Rreb1* は、口蓋の前方部および後方部の MEE 領域を含む口腔上皮において特異的に発現していた。矢印は MEE 領域における *Rreb1* の発現を示す。

ns;nasal septum, pp;primary palate, sp;secondary palate, スケールバー;500μm

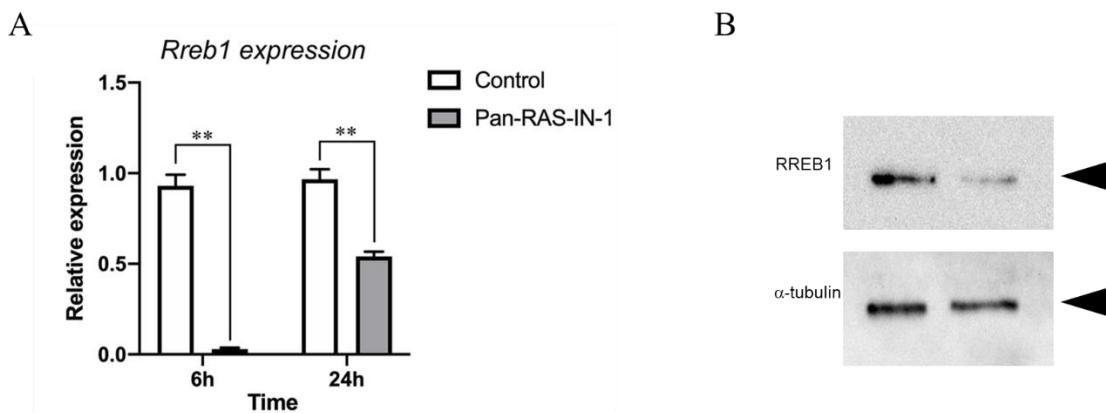


Fig. 6 口蓋突起器官培養における Ras 阻害剤投与による *Rreb1* 発現変化の検討

A. 20  $\mu$ M Pan-Ras-IN-1 の添加の有無による口蓋突起器官培養における *Rreb1* の発現を qPCR により評価した。*Gapdh* を内在性コントロールとして使用し、正規化した。平均値  $\pm$  標準偏差 ( $n=3$ )をグラフで示す。Pan-Ras-IN-1 を 6 時間または 24 時間添加したところ、*Rreb1* の発現が有意に減少した。

\*\* $p<0.01$  (two-way ANOVA)

B. 20  $\mu$ M Pan-Ras-IN-1 の添加の有無による口蓋突起器官培養における RREB1 の発現をウエスタンブロッティングにより評価した。口蓋突起を RIPA バッファーで溶解し、細胞溶解物を RREB1 および  $\alpha$ -tubulin に対する抗体でプロットした。Pan-Ras-IN-1 を 24 時間添加したところ、RREB1 の発現は減少した。

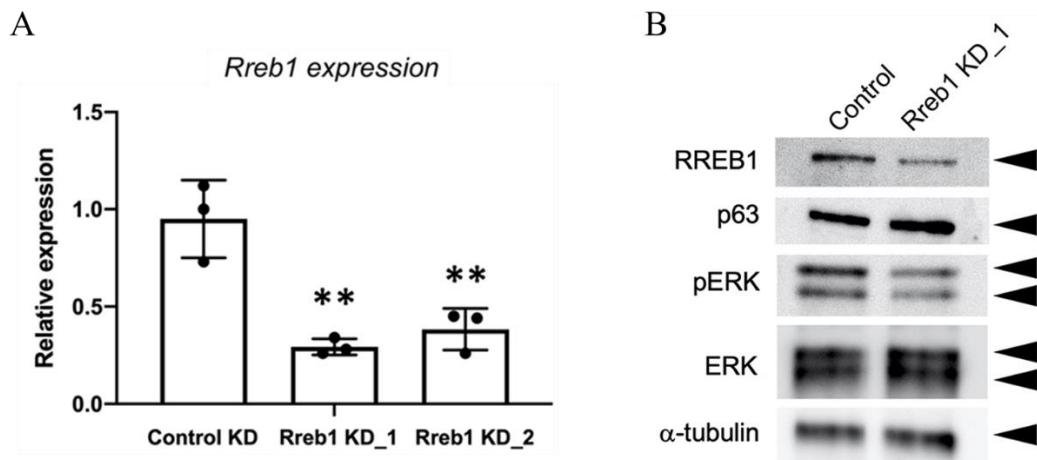


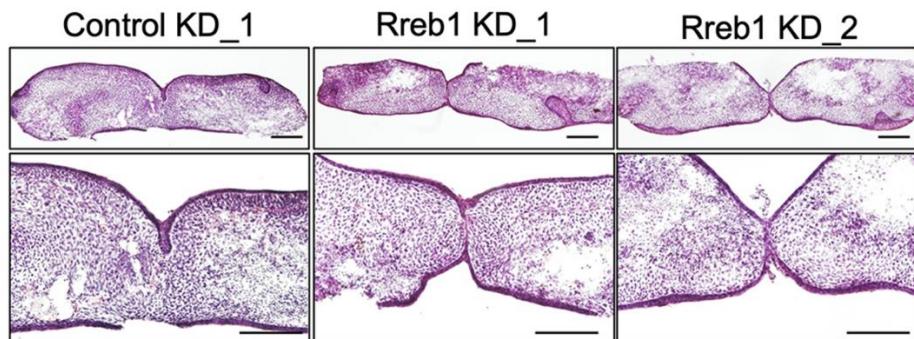
Fig. 7 *Rreb1* ノックダウンによる口蓋突起癒合への影響の検討

A. siRNA による *Rreb1* ノックダウンを 48 時間行い、口蓋突起器官培養における *Rreb1* の発現を qPCR により評価した。*Gapdh* を内在性コントロールとして使用し、正規化した。平均値±標準偏差( $n=3$ )をグラフで示す。*Rreb1* ノックダウン群では *Rreb1* の発現が有意に減少した。

\*\* $p<0.01$  (two-way ANOVA)

B. siRNA による *Rreb1* ノックダウンを 48 時間行い、口蓋突起器官培養における RREB1 の発現をウエスタンブロッティングにより評価した。口蓋突起を RIPA バッファーで溶解し、細胞溶解物を RREB1、p63、pERK、ERK および  $\alpha$ -tubulin に対する抗体でプロットした。*Rreb1* ノックダウン群では RREB1 の発現は減少し、p63 の発現はわずかに増加し、pERK の発現はわずかに減少した。

C



	Control KD_1	Rreb1 KD_1	Rreb1 KD_2
Fused	4/5	1/5	0/5
Incomplete CP	1/5	2/5	1/5
Complete CP	0/5	2/5	4/5

Fig. 7 *Rreb1* ノックダウンによる口蓋突起癒合への影響の検討

C. E13.5 の野生型 C57BL/6J マウスから解剖した一对の口蓋突起を用いて器官培養を行った。*Rreb1* の siRNA によるノックダウンは、口蓋突起の器官培養の 48 時間前に実施し、その後 24 時間培養した。口蓋突起の前頭断 H&E 染色像では、*Rreb1* ノックダウン群において口蓋突起の癒合不全と MEE 細胞の残存を認めた。下段は、各群における口蓋の癒合率を示している。

CP; 口蓋裂, スケールバー; 200μm

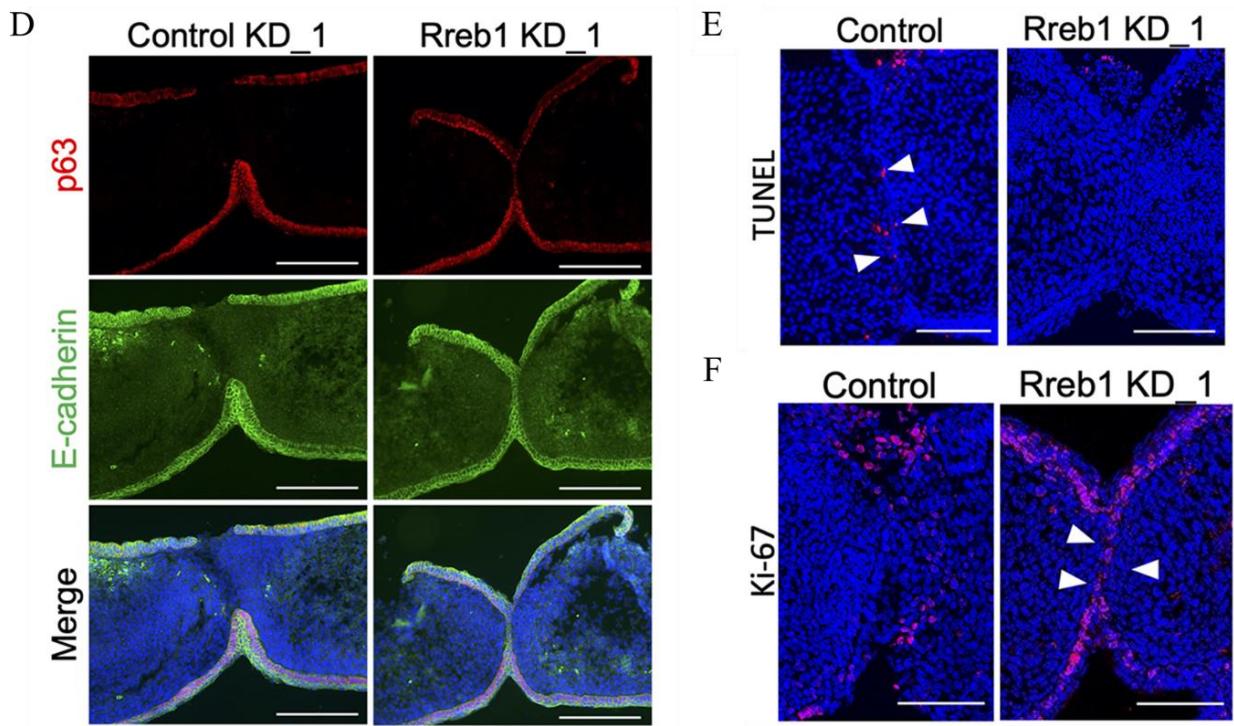


Fig. 7 *Rreb1* ノックダウンによる口蓋突起瘻合への影響の検討

D. *Rreb1* ノックダウン群では、MEE 領域において E-cadherin および p63 の持続的な発現を認めた。

スケールバー;200μm

E. TUNEL アッセイによる口蓋突起器官培養 24 時間後のアポトーシスの分析。*Rreb1* ノックダウン群では、残存 MEE 細胞(矢印)における TUNEL 陽性細胞の数が著しく減少していた。

スケールバー;100μm

F. Ki67 の免疫組織化学染色による口蓋突起器官培養 24 時間後の細胞増殖の分析。

*Rreb1* ノックダウン群では、残存 MEE 細胞(矢印)において増殖活性が維持されていた。

スケールバー;100μm