



Title	顎顔面及び鼻腔の発生におけるGata3の役割についての研究
Author(s)	虫明, 仁
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/76303
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(虫明仁)	
論文題名	顎顔面及び鼻腔の発生における <i>Gata3</i> の役割についての研究
論文内容の要旨 以下本文	
<p>【緒言】 頭蓋顎顔面領域の発生には様々な顎面突起の成長および癒合が必要であり、これらの成長や癒合の各段階において問題が生じることで口唇口蓋裂や顎面裂などの顎顔面形成不全が引き起こされる。鼻腔の陷入および形成も頭蓋顎顔面領域の発生の過程で行われ、気道および鼻腔の正常な機能の獲得のために重要である。鼻腔の形成が適切に行われなくなることで引き起こされる顎顔面形成不全の一つとして、後鼻孔閉鎖 (Choanal atresia;CA) が挙げられる。しかしながら同じ顎顔面形成不全である口唇口蓋裂等と比較して、その分子生物学的な発生機序について未解明な部分が多く、さらなる研究の余地がある。過去の我々の研究において、胎生7.5日目にレチノイン酸シグナル活性に必要不可欠な<i>Rdh10</i>の発現を除去したマウス (<i>Ert2Cre;Rdh10^{flox/flox}</i>)においてCAが引き起こされることを発見した。更なるCAの病態解明のため、上記<i>Ert2Cre;Rdh10^{flox/flox}</i>マウスの発生中の上顎複合体を用いた網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、<i>Gata3</i>の発現が著しく低下する事を発見した。興味深い事に<i>Gata3</i>の変異はCAを始めとした顎顔面形成不全が認められるHDR症候群の原因となる事が知られている。このような背景から、本研究では、<i>Gata3</i>が顎顔面形態、特に鼻腔及び後鼻孔の形成をどのように制御しているかを明らかにすることを目的とした。</p> <p>【実験方法】</p> <p>実験1 <i>Gata3</i>の発現及びレチノイン酸シグナルの時空間的発現解析 C57BL/6J野生型マウスを用いてマウス胎仔の顎顔面発生途中の鼻腔周囲での<i>Gata3</i>の発現部位を検証した。レチノイン酸シグナル活性部位についてもレポーターマウス (<i>Rare-LacZ</i>) を用いて同様に検証を行い、両者の発現部位について比較を行なった。</p> <p>実験2 胎生時期特異的<i>Gata3</i>ノックアウトマウスの作製および解析 マウスの鼻腔の形成における<i>Gata3</i>の役割を明らかにするために、<i>Cre/loxP</i>システムを用い、<i>Gata3</i>の発現をタモキシフェンの投与により胎生時期特異的に除去可能なマウス (<i>Ert2Cre;Gata3^{flox/flox}</i>) を作製した。<i>Gata3</i>欠失による胎生致死を回避するため、全ての実験においてタモキシフェンの投与は胎生9.0日目 (E9.0) で行った。</p> <p>実験3 Whole mount DAPI染色およびマイクロCTを用いた鼻腔周囲の組織の形態観察 <i>Ert2Cre;Gata3^{flox/flox}</i>マウスの胎仔をE13.0で摘出し、上顎を離断し、whole mount DAPI染色を行なって後鼻孔の形態観察を行なった。更に胎仔の頭部をリン酸タングステン溶液で造影し、マイクロCTを用いて撮影して顎顔面形態や鼻腔の形態観察を行なった。得られた画像をITK-SNAPを用いて鼻腔内の空間を三次元構築し、観察を行なった。</p> <p>実験4 ヘマトキシリソエオジン (HE) 染色による<i>Ert2Cre;Gata3^{flox/flox}</i>マウスの顎顔面及び鼻腔の組織学的観察 <i>Ert2Cre;Gata3^{flox/flox}</i>マウスの胎仔をE13.0で摘出し、組織切片を作製し、HE染色を行い、組織学的観察を行なった。</p> <p>実験5 多重免疫染色を用いた鼻腔周囲の細胞増殖および細胞死の検証 対照群および実験群の胎仔をE13.0で摘出し、組織切片を作製し、多重免疫染色を行なった。細胞増殖の検出には細胞増殖マーカーであるリン酸化ヒストンH3 (PHH3) を用いて免疫染色を行なった。細胞死の検出はTUNEL法にて行なった。鼻腔周囲の上皮および間葉組織について細胞増殖および細胞死が検出された細胞の数を計測し、比較解析を行なった。写真撮影は共焦点レーザー走査型顕微鏡 (TCS SP-8 Leica社) を用いて行なった。</p> <p>実験6 妊娠中マウスへ低ビタミンA飼料を給餌した<i>Ert2Cre;Gata3^{flox/flox}</i>マウス胎仔の観察 レチノイン酸供給量不足を呈する状態での<i>Ert2Cre;Gata3^{flox/flox}</i>マウスの表現型を確認し、<i>Gata3</i>とレチノイン酸シグナルの関連を検証した。妊娠前に1週間以上低ビタミンA飼料 (日本クレア社) を給餌した母親マウスが妊娠した胎仔の観察を行なった。</p>	

【研究結果】

実験1 *Gata3*の発現及びレチノイン酸シグナルの時空間的発現解析

In situ ハイブリダイゼーション法により *Gata3*の発現部位を確認した結果、E10.5、E11.5、E13.5の胎仔の内側鼻突起および外側鼻突起を始めとして後鼻孔の周囲での強い発現を確認した。Rare-LacZの発現部位との比較を行ったところ、目と鼻腔周囲に共通して発現していることを確認した。

実験2 胎生時期特異的*Gata3*ノックアウトマウスの作製および解析

摘出した胎仔のうち、85匹中35匹が *Ert2Cre;Gata3^{flox/flox}* であり、その割合は41%であった。摘出した *Ert2Cre;Gata3^{flox/flox}* マウスのうち、CAや後鼻孔狭窄 (Choanal stenosis;CS) 等の後鼻孔の形成不全を起こしていたものやE13.0以前に胎生致死を示した個体総数は35匹中23匹であり、その割合は66%であった。

実験3 Whole mount DAPI染色およびマイクロCTを用いた鼻腔周囲の組織の形態観察

Whole mount DAPI染色の結果では、対照群では50匹中48匹の個体で後鼻孔が形成されていたのに対し、*Ert2Cre;Gata3^{flox/flox}* マウスではCAやCSを呈する個体が確認された。マイクロCTでの観察結果では、*Gata3^{flox/flox}* では鼻腔の空間に連続性が認められたのに対し、*Ert2Cre;Gata3^{flox/flox}* マウスでは空間の連続性が認められず、また、鼻腔の体積の減少が認められた。

実験4 HE染色による鼻腔の形態観察

HE染色による組織切片の観察の結果、対照群と比較し、CAを呈する個体では鼻腔の狭窄を引き起こしていることが確認された。

実験5 多重免疫染色を用いた鼻腔周囲の細胞増殖および細胞死の検証

対照群においては鼻腔の上皮および鼻中隔の間葉組織において細胞増殖が多く確認されたが、*Ert2Cre;Gata3^{flox/flox}* マウスにおいてはE11.5、E13.0の両段階において上皮及び間葉細胞の増殖が有意に減少していた。E11.5の *Ert2Cre;Gata3^{flox/flox}* マウスの上皮及び間葉組織における細胞死は対照群と比較して有意に減少していた。E13.0の *Ert2Cre;Gata3^{flox/flox}* マウスの上皮組織における細胞死は対照群と比較して有意に減少していたが、間葉組織では両群間に有意差はなかった。

実験6 ビタミンA低投与マウスが妊娠した胎仔の観察

低ビタミンA飼料を給餌した母親が妊娠した胎仔のうち対照群では異常が見られなかつたが、*Ert2Cre;Gata3^{flox/flox}* マウスの94%は胎内で死亡していた。また、2週間以上低ビタミンA飼料を給餌した母親が妊娠した *Ert2Cre;Gata3^{flox/flox}* マウスは全てE13.0以前に死亡していた。

【考察】

*Gata3*とレチノイン酸シグナル (Rare-LacZ) が胎仔発生中の顎顔面領域、特に鼻腔周辺において共通して発現していたことから、両者が協奏して鼻腔発生の制御を行なっている可能性が示唆された。*Ert2Cre;Gata3^{flox/flox}* マウスにおいてCAを認め、鼻腔周囲の細胞増殖が減少していたことから、*Gata3*の機能不全により鼻腔周囲の細胞増殖が抑制され、鼻腔の形成が適切に行われなくなる可能性が示唆された。また、*Ert2Cre;Rdh10^{flox/flox}* マウスではCAの他にも顎顔面形成不全を認めたが、*Ert2Cre;Gata3^{flox/flox}* マウスにおいては後鼻孔形成不全以外の異常を認めなかつたことから、*Gata3*が鼻腔の形成に対し、特異的な役割を持つ可能性が示唆された。さらに、母体のビタミンAが不足している状態で妊娠した *Ert2Cre;Gata3^{flox/flox}* マウスの大多数が胎内で死亡していたことから、*Gata3*とレチノイン酸シグナルは協奏的に胎仔発生に関与している可能性が強く示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名(虫明仁)		
	(職)	氏名
論文審査担当者	主査 教授	山城 隆
	副査 教授	阪井 丘芳
	副査 准教授	波多 賢二
	副査 講師	佐藤 淳

論文審査の結果の要旨

本研究の目的は、顎顔面、特に鼻腔の発生過程において *Gata3* が果たす役割を詳細に解明することである。本研究結果から *Gata3* の機能阻害を行ったマウスでは後鼻孔閉鎖を始めとした顎顔面形成不全が引き起こされることが示された。また同マウスの発生中の鼻腔周囲では、上皮及び間葉組織における細胞増殖が抑制され、細胞死が亢進していることが明らかとなった。これらの結果は顎顔面形成不全、特に後鼻孔閉鎖の病因として *Gata3* の機能障害が存在する事を強く示唆する結果である。

以上のことにより、本研究は未解明の部分が多い後鼻孔閉鎖の病態における *Gata3* の役割の一端を明らかにしたことから、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。