

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	<a href="https://doi.org/10.18910/76303">https://doi.org/10.18910/76303</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

# 学位論文

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

歯学研究科 口腔科学専攻

口腔分化発育情報学講座（顎顔面口腔矯正学教室）

虫明 仁

指導教授 山城 隆 教授

本研究内容は第 78 回日本矯正歯科学会学術大会（2019 年 11 月）にて発表を行った。

## 緒言

頭蓋顎顔面領域の奇形はヒトにおいて最も頻繁に見られる先天異常の一つである[1]。頭蓋顎顔面領域には様々な感覚器官が含まれている。胎児期において、顔面突起や鰓弓の成長及び癒合が複雑に組み合わさることで、頭蓋顎顔面領域が発達していく[2, 3], [4]。その発達の各段階において、顔面突起の成長や癒合に何らかの問題が生じることで、唇顎口蓋裂に代表される頭蓋顎顔面領域の先天的な奇形が引き起こされる[5]。

後鼻孔閉鎖 (Choanal atresia; CA) とは、鼻腔と鼻咽頭の間が完全に閉鎖されてしまう疾患であり、呼吸機能障害や哺乳障害を呈する。ヒトにおいては出生者の 5000~7000 人に 1 人の割合で発生するとされているが[6, 7]、出生直後の呼吸不全により死亡してしまう症例や未診断の症例も存在すると考えられることから、正確な発症率を算出するのは困難である。また、CHARGE 症候群、Treacher Collins 症候群、Crouzon 症候群、HDR (Hypoparathyroidism, Deafness, and Renal Dysplasia) 症候群のような頭蓋顎顔面領域に奇形を引き起こす症候群においても CA が併発することが確認されている[8-11]。特に CHARGE 症候群においては主症状の一つとして CA が挙げられる[12]。

片側性の CA は鼻閉症状のみを呈し、発見されずに経過する場合もあるが、生後 1 週間以内では呼吸困難を呈する場合があり、同じ CA でもその症状に多様なバリエーションを認める[13]。乳児は解剖学的に喉頭の相対的な位置が高く、鼻呼吸が主であるため、両側性の CA では重篤な呼吸機能障害を引き起こし、致死的となる場合がある。両側性の CA を伴い出生した場合、出生直後からの人工呼吸器による呼吸の補助や後鼻孔へのステントの留置、及び内視鏡下での手術が必要となる[14]。

このように、CA は呼吸機能障害等の重篤な症状を有する疾患であるにも関わらず、CA の発生に関しては細胞学的、分子生物学的に解明されていない部分が多く、CA の発症の予防や診断技術の開発・向上のためにさらなる基礎研究の遂行が必要である。

これまでの研究では、*Tbx22* の変異や *Aldh1a3* の変異により CA が発生することが動物実験において確認されている[15, 16]。しかし、前述の通り、頭蓋顎顔面領域の発生は多くの因子が複雑に組み合わさることから、上記の遺伝子が制御するシグナル経路のみで CA の発生機序を説明することは困難である。過去に我々は、正常な顎顔面形成において重要であるレチノイン酸シグナル活性に必要な *Rdh10* を胎生 7.5 日目 (E7.5) にて除去したマウス (*Ert2Cre;Rdh10<sup>fl/fl</sup>*) では重篤な顎顔面領域の形成不全と CA を引き起こすことを確認しており、*Rdh10* 及びそれに制御される RA シグナルが CA の発生に関与することが示されている[17]。さらに、RA シグナル経路の下流について詳細な検証を行うため、上記 *Ert2Cre;Rdh10<sup>fl/fl</sup>* 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

1 たところ、*Gata3*の発現が著しく低下していることを発見した。さらに、タンパク質相互作用ネットワークの解析結果より、*Gata3*とレチノイン酸シグナル受容体 A (*Rara*) との間  
2 に相互作用があることが確認された (未発表データ)。  
3

4 *Gata3*は Zinc finger ファミリーに属する転写因子の一つであり、造血細胞、腎臓、神経  
5 の発生のほか、T リンパ球の発生にも関与している[18, 19]。また、染色体 10p14 上にあ  
6 る *GATA3* のミスセンス突然変異もしくはナンセンス突然変異によるハプロ不全により  
7 HDR 症候群が引き起こされることが知られている[20, 21]。HDR 症候群では、副甲状腺機  
8 能低下、心奇形、免疫不全、腎臓奇形、生殖器の奇形などが認められるほか、頭蓋顎顔面領  
9 域においては感音性難聴に加え、CA が起こることが確認されている[22-30]。また、Kim ら  
10 の報告によると、*Gata3* 欠損マウスの胎仔において下顎の劣成長をはじめとする頭蓋顎顔  
11 面領域での重度の奇形が観察されている [31, 32]。さらに興味深いことに、ゲノムワイド関  
12 連解析 (genome wide associated study:GWAS) において、*GATA3*領域近傍の塩基変異と  
13 ヒトの半側小顔症や永久歯の齲蝕の発生に相関関係があることも示されている[33]。以上の  
14 ことから、*Gata3*が顎顔面領域の発生に関与していることが強く示唆される。しかし、その  
15 詳細なメカニズムについては未だ解明されていない。そこで、本研究では、*Gata3*が顎顔面  
16 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  
17 とした。

## 18 実験方法

### 19 1.動物実験

#### 20 ① 実験動物

21 *Ert2Cre;Gata3<sup>flx/flx</sup>*雄性マウスと *Gata3<sup>flx/flx</sup>*雌性マウスを交配させ、その胎仔を対象  
22 とした[34]。胎仔のうち、*Gata3<sup>flx/flx</sup>*マウスを対照群とし、*Ert2Cre;Gata3<sup>flx/flx</sup>*を実験群  
23 とした。本研究は、大阪大学動物実験委員会及び大阪大学遺伝子組み換え実験委員会  
24 の承認を得て行った (動物実験承認番号：動歯-29-011-0 号、遺伝子組み換え実験承認  
25 番号：3796)。  
26

27 野生型マウスの観察には C57BL/6J 野生型マウス (日本クレア社) を用いた。

28 *In vivo*におけるレチノイン酸シグナル活性部位を確認するため、*retinoic acid*  
29 *response element (Rare)* の下流に *Hsp68* 遺伝子のコアプロモーター及び *lacZ* の  
30 翻訳領域を連結した配列をゲノム内に持つレポーターマウス (*Rare-LacZ*マウス：  
31 Tg(RARE- Hspa1b/lacZ)12Jrt/J, Jax stock #008477) を用いた[35]。

1 低ビタミン A 状態の母親が妊娠した実験群の胎仔の観察を行うため、妊娠前の母親  
2 マウスに 1 週間以上低ビタミン A 飼料（日本クレア社）を給餌し、低ビタミン A 状態  
3 となった母親マウスが妊娠した実験群の胎仔を観察した。

#### 4 ② 妊娠判定

5 全ての実験動物は 12 時間ずつ明暗期周期にて飼育し、雌性マウスの膣栓を確認して  
6 交配の成立と判定した。妊娠成立の時刻は判定日の午前 0 時を胎生 0 日 0 時間とした。

#### 7 ③ タモキシフェンの調整及び投与

8 胎仔の *Cre* リコンビナーゼを活性化するため、妊娠した *Gata3<sup>fl/fl</sup>* マウスにタモキシ  
9 フェン溶液を腹腔内投与した。投与量は、体重 1g あたりタモキシフェンが 40 $\mu$ g となる  
10 よう調整した。タモキシフェン/コーンオイル溶液はコーンオイル（SIGMA-ALDRICH  
11 社）と 100%エタノール（和光純薬工業株式会社）を 9 : 1 で混合した溶媒にタモキシフ  
12 ェン（SIGMA-ALDRICH 社）を溶解させ、濃度が 5 mg/ml となるよう調整した。全て  
13 の実験において、タモキシフェン溶液の投与は E9.0 で行った。

#### 14 ④ 上顎の摘出及び固定

15 得られた胎仔を E13.0 で摘出し、実体顕微鏡（SZ6045TR-CVT, オリンパス社）下で  
16 頭部を摘出した。得られた組織を 4%パラホルムアルデヒド（以下 4% PFA）/0.1M PBS  
17 溶液（pH7.4）にて 4℃で一晩固定した後、0.1M PBS（和光純薬工業株式会社）で洗浄  
18 した。洗浄した組織を 25%メタノール/PBT、50%メタノール/PBT、75%メタノール/PBT  
19 で 10 分ずつ処理し、100%メタノールに浸漬した状態で-20℃にて保存した。

## 21 2.観察方法

### 22 ① 野生型マウスを用いた *Gata3* mRNA の発現及びレチノイン酸シグナルの時空間的発 23 現解析

24 野生型マウスと *Rare-LacZ* マウスの胎仔を E10.5, E11.5, E13.5 で摘出し、*Gata3*  
25 mRNA 及びレチノイン酸シグナル活性部位の時空間的発現解析を行った。*Gata3*  
26 mRNA 発現部位の検出は *In situ* ハイブリダイゼーション法にて染色を行った。

27 実験方法④に記載した手法にて固定した標本を 75%メタノール（和光純薬工業株式  
28 会社）、50%メタノール、25%メタノールで室温で 5 分ずつ処理し、PBT で 5 分ずつ 2  
29 回洗浄した。その後、30 % 過酸化水素/PBT 混合液にて室温で 1 時間処理し、PBT で  
30 5 分ずつ 3 回洗浄した。次に、0.05 % Proteinase K/PBT 混合液（invitrogen 社）を用  
31 いて室温で 20 分間処理し、2 mg/ml のグリシン/PBT 溶液を用いて室温で 10 分間処理  
32 してから PBT で 5 分ずつ 2 回の洗浄した。0.08 % 4%PFA/25%グルタルアルデヒド  
33 混合液を用いて室温で 20 分間固定し、PBT で 5 分ずつ 2 回洗浄した。その後 50 % ハ

1 イブリダイゼーションバッファー/PBS 溶液 (25% ホルムアミド, 25% 20×SSC 溶液,  
2 10% 10%SDS 溶液, 0.001% 50 µl/ml 酵母 RNA, 0.001% 50 µl/ml ヘパリン) を用いて  
3 室温で 20 分間処理した。さらにハイブリダイゼーションバッファーを用いて 60°Cで  
4 10 分間、さらにハイブリダイゼーションバッファーを交換して 60°Cで 1 時間処理し  
5 た。その後 1000 倍希釈のプローブを加え、60°Cで一晩インキュベートした。

6 標本を溶液 1 (50% ホルムアミド, 25% 20×SSC 溶液, 10% 10%SDS 溶液) を用い  
7 て 60°Cで 30 分ずつ 3 回洗浄し、溶液 2 (50% ホルムアミド, 10% 20×SSC, 0.1%  
8 Tween20) を用いて 60°Cで 30 分ずつ 3 回洗浄したのち、1 % Tween20/TBS 溶液  
9 (TBST, 和光純薬工業株式会社) を用いて室温で 5 分ずつ 3 回洗浄した。そして 1%  
10 BSA/TBST 溶液を用いて室温で 1 時間ブロッキングを行い、0.02 % anti-  
11 DIG+BSA/TBST 溶液を用いて 4°Cで一晩抗体反応を行った。

12 その後、標本を TBST を用いて室温で 5 分ずつ 3 回洗浄し、さらに TBST で 1 時間  
13 ずつ 5 回洗浄したのち、4°Cで一晩 TBST にて洗浄を行った。

14 洗浄後のサンプルは NTMT 溶液 (100mM 塩化ナトリウム, 100mM Tris-塩酸塩、  
15 50mM 塩化マグネシウム, 0.1% Tween20) を用いて室温で 10 分ずつ 3 回インキュベ  
16 ートした。NTMT 溶液を除去し、発色液 (0.25% NBT, 0.25% BCIP, in NTMT 溶液)  
17 を用いて遮光下で発色を行った。発色時間については発色の強度を目視にて確認し、標  
18 本ごとに適宜調整した。発色後、PBS で 5 分ずつ 3 回洗浄し、4%PFA を用いて 4°Cで  
19 固定を行った。

20 染色した標本は実体顕微鏡下で観察した。また、下記の手順にて組織切片を作製し、  
21 発現部位の詳細な観察を行った。

22 凍結切片作製の組織は上記の手順にて染色したマウスの上顎を、10%、20%、30%  
23 スクロース/0.1 M PBS 溶液 (pH7.4) の順で浸漬した。凍結包埋は Tissue-Tek Oct  
24 compound (サクラファインテックジャパン社) を用いて行い、実験に使用するまで、  
25 -30°C暗所にて保管した。クリオスタット (CM1950, Leica 社) を用いて 10µm の連続  
26 切片を前頭断にて作製した。

27 レチノイン酸シグナル発現部位を *Rare-LacZ* の X-gal 染色により検出した。X-gal 染  
28 色にはβ-galactosidase Staining kit (Cell signaling 社) を用いた。摘出した *Rare-LacZ*  
29 マウスの胎仔を 10 倍希釈した 10×fixtasive solution に浸漬し、4°Cで 1 時間固定し  
30 た。PBS で 5 分ずつ 2 回洗浄し、Staining solution (5% X-gal, 9.3% 10×Staining  
31 solution, 1% 100×Solution A, 1% 100×Solution B) を用いて遮光下で発色を行った。  
32 発色時間については発色の強度を目視にて確認し、標本ごとに適宜調整した。発色後、  
33 PBS で 5 分ずつ 3 回洗浄し、4%PFA を用いて 4°Cで固定を行った。

1 ② Whole mount DAPI 染色による鼻腔周囲の組織の形態観察

2 実験方法④に記載した手法で固定したマウスの上顎を 0.1%DAPI (DAKO 社) /0.1M  
3 PBS 溶液に浸漬させ、染色した。染色した組織は蛍光顕微鏡下で蛍光波長 405nm にて  
4 観察した。

5 ③ マイクロ CT を用いた鼻腔の三次元的形態観察

6 固定したマウスの上顎を 1%リン酸タンゲステン/エタノール溶液に浸漬させ、造影  
7 した。造影したサンプルをマイクロ CT (R\_mCT2, リガク社) で撮影した。管電圧を  
8 90kV、管電流を 200  $\mu$ A とし、スライス厚は 10  $\mu$ m に設定して撮影した。

9 得られた CT 断層画像の解析を ITK-SNAP (General Public License) を使用して行  
10 った。断層画像の鼻腔粘膜の表層部を境界として鼻腔の部分を 1 枚ずつトレースし、  
11 三次元構築して鼻腔の形態解析を行った。

12 ④ ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色による顎顔面及び鼻腔周囲の組織学的観察

13 組織切片を作製し、HE 染色を用いて鼻腔周囲の組織学的観察を行った。

14 パラフィン切片作製用の組織は固定したマウスの上顎をパラフィン包埋機にて包埋  
15 し、マイクロトーム (Reichert-Jung 2050, Leica 社) を用いて 10  $\mu$ m の連続切片を前頭  
16 断にて作製した。

17 パラフィン切片作製用の組織には、4%PFA 溶液で固定したマウスの上顎を PBS で  
18 洗浄したものを用いた。洗浄した組織を 70%エタノール (和光純薬工業株式会社) に  
19 1 時間浸漬したのち、新たな 70%エタノールに一晩浸漬し、80%エタノール、90%エタ  
20 ノール、99.5%エタノールに 1 時間ずつ浸漬して脱水を行った。脱水した組織を D-リ  
21 モネン (和光純薬工業株式会社) に 1 時間ずつ 3 回浸漬させ、組織内のエタノールを  
22 除去したのち、D-リモネン：パラフィン=1：1 にした混合液に 45°C で 3 時間浸漬さ  
23 せ、65°C で融解させたパラフィンに 1 時間ずつ 3 回浸漬させ、組織内にパラフィンを  
24 浸透させ、パラフィン包埋を行った。

25 ⑤ 多重免疫染色を用いた鼻腔周囲の細胞増殖及び細胞死の検証

26 凍結切片作製用の組織は固定したマウスの上顎を、10%、20%、30%スクロース/0.1  
27 M PBS 溶液 (pH7.4) の順で浸漬した。凍結包埋は Tissue-Tek Oct compound (サク  
28 ラファインテックジャパン社) を用いて行い、実験に使用するまで、-30°C 暗所にて保  
29 管した。凍結切片を用いて多重免疫染色を行い、細胞増殖及び細胞死を起こした細胞の  
30 検出を行った。細胞増殖の検出は、抗リン酸化ヒストン H3 抗体 (Anti-phospho-Histone  
31 H3 (Ser10) Antibody, SIGMA-ALDRICH 社; PHH3) を用いた。凍結切片を PBT で  
32 5 分ずつ 3 回洗浄したのち、80°C の TBST で 20 分間抗原賦活処理を行った。抗原賦活  
33 した凍結切片を PBS で 5 分ずつ 3 回洗浄し、3.6 % M.O.M.<sup>TM</sup> Mouse IgG Blocking



1 Reagent/PBS 溶液を用いて 1 時間ブロッキング処理を行った。ブロッキング後、凍結  
2 切片を PBS で 5 分間洗浄したのち、8% Protein Concentration/PBS 溶液 (M.O.M™  
3 Diluent) で 5 分間インキュベートし、M.O.M™ Diluent で 500 倍希釈した一次抗体  
4 (Phosphohistone H3 (PHH3) Rabbit Polyclonal Antibody, E-Cadherin (4A2) Mouse  
5 mAb #14472) を用いて 4°C で一晩インキュベートした。その後、PBS を用いて室温で  
6 5 分ずつ 3 回洗浄し、M.O.M™ Diluent で 5000 倍希釈した二次抗体 (Alexa Fluor 546  
7 rabbit, Alexa Fluor 488 mouse) を用いて室温で 3 時間抗体反応を行った。その後 PBS  
8 を用いて室温で 5 分ずつ 3 回洗浄し、M.O.M™ Diluent で 1000 倍希釈した DAPI を  
9 用いて室温で 5 分間処理し、対比染色を行った。染色した凍結切片を蒸留水で洗浄し、  
10 Fluorescence Mounting Medium (Dako 社) を用いて封入を行った。

11 アポトーシスの検出は TUNEL 染色法を用いた。TUNEL 染色には In Situ Cell  
12 Detection Kit (Roche 社) を用いて、染色した。染色したスライドは、共焦点レーザー  
13 走査型顕微鏡 (TCS SP-8, Leica 社) を用いて観察を行った。

#### 14 ⑥ 統計学的解析

15 多重免疫染色により得られた観察像から対照群及び実験群の鼻腔周囲の上皮組織と  
16 間葉組織について細胞増殖及び細胞死が検出された細胞数を計測し、比較検討を行な  
17 った。上皮組織については鼻腔を形成する周囲の組織の上皮における細胞増殖マーカ  
18 ー陽性細胞およびアポトーシス陽性細胞の数を計測した (図 5,6-A,B 黄破線)。間葉組  
19 織については E11.5 の胎仔では内側鼻突起の領域にて 200 µm 四方の観察範囲を選択  
20 し、E13.5 の胎仔では鼻中隔口腔側の領域について 200 µm 四方の観察範囲を選択し  
21 (図 6-A 黄四角)、同様に計測した。3 個体、5 スライドずつ左右の組織でそれぞれ計  
22 測し、統計学的に解析した。

23 スチューデントの  $t$  検定を用いて両群間の細胞増殖陽性及びアポトーシス陽性の細  
24 胞数の平均値に有意差があるかを検討し、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

25 摘出した対照群および実験群の胎仔のうち、後鼻腔が水平的に狭窄し、前後径が短く  
26 なっているものを後鼻腔狭窄 (Choanal Stenosis; CS)、後鼻腔が完全に閉鎖している  
27 ものを CA として定義し、それぞれの表現型の発生率を計測し、統計学的に解析した。  
28 母比率の差の検定を行い、 $p < 0.05$  を有意差ありとして対照群および実験群の表現型  
29 の発生率の比較を行った。

## 30 31 研究結果

- 32 1. 野生型マウスを用いた *Gata3* mRNA の発現及びレチノイン酸シグナルの時空間的発現  
33 解析

1 E10.5 の頭部では、内側鼻突起 (MNP, medial nasal process) 及び外側鼻突起 (LNP,  
2 lareral nasal process) の口腔側及びその癒合部の上皮及び間葉組織において *Gata3*  
3 mRNA の発現が確認された (図 1-A,B 赤矢頭)。 *Rare-LacZ* は内側鼻突起及び外側鼻  
4 突起の癒合部での発現が確認された (図 1-C,D 赤矢頭)。

5 E11.5 の頭部では、内側鼻突起及び外側鼻突起の口腔側及びその癒合部で *Gata3* の  
6 発現が確認された (図 1-E)。上顎の前頭断の切片では内側鼻突起及び外側鼻突起の癒  
7 合部の上皮及び間葉組織で発現が確認された (図 1-F 赤矢頭)。 *Rare-LacZ* は内側鼻突  
8 起及び外側鼻突起の癒合部で発現が確認された (図 1-G,H 赤矢頭)。

9 E13.5 の頭部では鼻中隔の口腔側で *Gata3* mRNA の強い発現が確認された (図 1-I)。  
10 また、上顎の前頭断の切片では鼻中隔口腔側の間葉組織での発現が確認された (図 1-J  
11 赤矢頭)。 *Rare-LacZ* は鼻中隔口腔側の上皮及び間葉組織での発現が確認された (図 1-  
12 K,L 赤矢頭)。

13 これらの結果より、 *Gata3* は E10.5 と E11.5 の内側鼻突起及び外側鼻突起の口腔側  
14 及びその癒合部の上皮組織と間葉組織、E13.5 の鼻中隔口腔側の間葉組織にて発現が確  
15 認された。 *Rare-LacZ* は E10.5 と E11.5 の内側鼻突起及び外側鼻突起の口腔側及びそ  
16 の癒合部の上皮組織と間葉組織に加え、頭側の上皮組織に発現が見られたほか、E13.5  
17 の鼻中隔口腔側の間葉組織及び鼻中隔上皮に発現を認めた。以上より、 *Gata3* と *Rare-*  
18 *LacZ* が E10.5 と E11.5 の内側鼻突起及び外側鼻突起の上皮組織と間葉組織、E13.5 の  
19 鼻中隔口腔側の間葉組織で共通して発現していることが示された。

## 20 2. Whole mount DAPI 染色による鼻腔周囲の組織の形態観察

21 *Gata3<sup>flx/flx</sup>* の胎仔と *Ert2Cre;Gata3<sup>flx/flx</sup>* の胎仔の後鼻孔の形態の比較を行うため、  
22 whole mount DAPI 染色を行い、上顎複合体の形態観察を口腔側から行った (図 2-A-  
23 F)。

24 E13.0 の対照群の胎仔では後鼻孔が形成されていた (図 2-B,C 赤矢頭) のに対し、実  
25 験群の胎仔では CA を呈する個体が確認された (図 2-E,F 赤矢頭)。後鼻孔閉鎖を呈す  
26 る個体では両側に発症するものと片側のみに発症するものが確認された。さらに、実験  
27 群の胎仔では両側性、片側性に CA や後鼻孔狭窄 (Choanal stenosis; CS) を示す個体  
28 が確認された。

29 得られた胎仔のうち、実験群の胎仔は 85 匹中 35 匹であり、その比率は 41%であっ  
30 た。実験群のうち、CA や CS などの後鼻孔の形成不全 (Choanal deformation; CD) を  
31 起こしていた個体は 35 匹中 11 匹であり、その比率は 31%であった。実験群のうち、  
32 E13.0 以前に胎生致死を示した個体は 35 匹中 12 匹であり、その比率は 34%であった。

33 対照群として使用した個体数は 50 匹であった。その中で後鼻孔の形成不全を起こし

1 ていた個体は確認されなかった。対照群のうち、2匹が胎生致死を示しており、その比  
2 率は4%であった。摘出した胎仔のうち、CD及び胎生致死を示した個体の比率を両群  
3 で比較し、二群の比率の差の検定を行ったところ、実験群ではCD及び胎生致死を合  
4 せた発生率が有意に上昇していた(表1)。

5 *In situ* ハイブリダイゼーション法にて *Ert2Cre;Gata3<sup>flx/flx</sup>* の胎仔の *Gata3 mRNA* の  
6 発現解析を行ったところ、*Gata3<sup>flx/flx</sup>* の胎仔と比較して *Gata3 mRNA* の発現が低下して  
7 いることが確認された(データ未掲載)。

### 8 3. マイクロCTを用いた鼻腔周囲の組織及び鼻腔の三次元的形態観察

9 E13.0の対照群の胎仔では、前方から後方にかけて鼻腔の空間が連続的に形成されて  
10 おり、中央部で外側へと空間が分岐していた(図3-A,B)。また、鼻腔の後方、口腔側に  
11 後鼻孔が形成されていることが確認された(図3-C 白矢頭)。それに対して、実験群の  
12 胎仔では鼻腔の連続性が失われており(図3-D,E 白アスタリスク)、後鼻孔も形成され  
13 ていなかった(図3-E 白矢頭)。さらに、実験群の胎仔では、対照群の胎仔と比較して、  
14 鼻腔の水平的な幅径が狭窄していることが確認された。

### 15 4. HE染色による鼻腔の組織学的観察

16 マウス胎仔の発生途中の鼻腔の組織学的観察を行うため、頭部の前頭断の組織切片を  
17 作製し、HE染色を行って観察した。組織切片は頭部の前方から後方のそれぞれの部位  
18 で観察した(図4-A)。

19 E13.0の対照群の胎仔では前方部では上顎突起と鼻中隔が口腔側で癒合していたが  
20 (図4-B 黒矢頭)、後方部では分離し、後鼻孔が形成されていた(図4-C 黒矢頭)。

21 実験群の胎仔では前方部から後方部にかけて上顎突起と鼻中隔が口腔側で癒合して  
22 おり(図4-E,F 黒矢頭)、後鼻孔が形成されておらず、後鼻孔閉鎖が認められた。

### 23 5. 多重免疫染色を用いた鼻腔周囲の細胞増殖及び細胞死の比較

24 鼻腔の形成は上皮の陥入によって引き起こされ、最終的に非常に複雑な形態となる。  
25 Kondoらは、ショウジョウバエの気門は上皮の陥入の際に、部位特異的な細胞増殖を引  
26 き起こすことで上皮の陥入が引き起こされ、形成されると報告している[36]。このこと  
27 から、マウスの鼻腔の形成においても細胞増殖が重要であると考え、発生途中の鼻腔周  
28 囲での細胞増殖と細胞死について検証を行うこととした(図5,6)。

29 対照群と実験群の鼻腔周囲の組織での細胞増殖を比較するため、細胞増殖マーカーで  
30 あるPHH3を用いて多重免疫染色を行った。E11.5,E13.0の胎仔についてそれぞれの  
31 PHH3陽性細胞の数を比較した(図5-A-F、図6-A-F)。E11.5の胎仔において両群の  
32 PHH3陽性細胞の数を比較したところ、上皮組織(図5-E)及び間葉組織(図5-F)の  
33 どちらにおいても実験群ではPHH3陽性細胞の数が有意に減少していた。E13.0の胎

1 仔において両群の PHH3 陽性細胞の数を比較したところ、上皮組織 (図 6-E) 及び間葉  
2 組織 (図 6-F) のどちらにおいても実験群では PHH3 陽性細胞の数が有意に減少してい  
3 った。

4 対照群と実験群の鼻腔周囲の組織でのアポトーシス陽性細胞の数を比較するため、  
5 TUNEL 法を用いて細胞死を検出した (図 5-G-L、図 6-G-L)。E11.5 の胎仔において両  
6 群を比較したところ、実験群において、上皮組織 (図 5-K) 及び間葉組織 (図 5-L) に  
7 おいて細胞死が有意に減少していた。E13.0 の胎仔において両群を比較したところ、実  
8 験群において、上皮組織では細胞死が有意に減少していた (図 6-K)。一方、間葉組織で  
9 は両群間に有意差は認められなかった (図 6-L)。

#### 10 6. ビタミン A 欠乏状態のマウスが妊娠した *Gata3<sup>flx/flx</sup>* および *Ert2Cre;Gata3<sup>flx/flx</sup>* 胎仔の観 11 察

12 *Gata3* シグナルとレチノイン酸シグナルの関連を調べるために、母親に低ビタミン A  
13 飼料 (日本クレア社) を給餌し、母親がレチノイン酸供給不足になった状態での実験群  
14 の胎仔の観察を行った (表 2)。

15 E13.0 で摘出された対照群のうち、鼻腔の形成不全を示す個体は確認されなかった。  
16 14 匹中 1 匹は E13.0 以前に体内で死亡しており、その比率は 7%であった。実験群のう  
17 ち、17 匹中 1 匹に CA が確認された。17 匹中 16 匹は E13.0 以前に胎内で死亡してお  
18 り、鼻腔の形成不全と胎生致死を示す胎仔の比率は 100%であった。母親に 10 日間低  
19 ビタミン A 飼料を与えた実験群は 2 匹中 1 匹に鼻腔の形成不全を認め、1 匹は胎生致  
20 死であった。11 日以上母親に低ビタミン A 飼料を投与した実験群では 15 匹中 15 匹が  
21 胎生致死であった。

22 母親が 10 日間低ビタミン A 飼料を給餌されていた場合では実験群のうち、E13.0 の  
23 時点で生存している個体が確認されたが、11 日間以上低ビタミン A 飼料を給餌されて  
24 いた場合、実験群は全て E13.0 以前に胎内で死亡していた。通常の飼料を給餌した母親  
25 から得られた実験群と比較して、低ビタミン A 飼料を給餌した母親から得られた実験  
26 群の胎内での CD 及び胎生致死を合わせた発生率は有意に上昇していた (表 2)。

### 28 考察

29 過去の報告では、*Gata3* が腎管の発達をレチノイン酸シグナルと共に制御していること  
30 や [37]、T 細胞の分化の制御において *Gata3* とレチノイン酸シグナルが関与している可能  
31 性が報告されている [38]。これらの報告から、*Gata3* はレチノイン酸シグナルと協働して  
32 器官の発達に関与していることが示されているが、顎顔面領域において両者が関連してい  
33 る報告はこれまでされていなかった。

1 今回行った *Gata3* mRNA の発現及びレチノイン酸シグナルの時空間的発現解析の結果  
2 より、顎顔面発生において、これらのシグナル経路が重要な役割を果たすことが示唆され  
3 た。さらに、胎生時期特異的に *Gata3* の機能を阻害された実験群では、胎生致死や  
4 CA,CS といった多様な表現型が認められた。今回、胎仔の表現型の重症度に差異が見られ  
5 た原因の一つとして、母体のタモキシフェンの代謝効率の差が考えられる。*Ert2Cre* は、  
6 タモキシフェンが体内で代謝されることで生成される 4-OH タモキシフェンと結合するこ  
7 とで核内へと移行し、標的遺伝子部位の DNA リコンビネーションを引き起こすとされて  
8 いる[39, 40]。そのため、母体のタモキシフェンの代謝効率が低かった場合には十分な  
9 DNA のリコンビネーションが行われず、胎仔の表現型が軽減される可能性が考えられ  
10 る。また、タモキシフェン投与時期の誤差も胎仔の表現型の差異が見られた原因の一つと  
11 して考えられる。胎生致死を示した個体は後鼻孔の形成不全を起こしている個体よりも重  
12 度の表現型を示していると考えられる。しかし、今回胎生致死を示した個体については、  
13 顔面領域の詳細な形態観察が不可能であるため、今後の実験で詳細な確認が必要となる。  
14 そのために、胎生致死を回避する手段として、Lim らが行った実験を参考とし[31]、母体  
15 にカテコールアミンを投与することで胎仔を生存させることでさらなる表現型の観察を行  
16 える可能性がある。また、*Ert2Cre;Gata3<sup>flx/flx</sup>* マウスの胎生致死の原因には、顎顔面領域の  
17 形成不全のみならず、全身的な要因も存在すると考えられる。過去においても *Gata3* とレ  
18 チノイン酸シグナルが腎管の発達の制御や T 細胞の分化の制御を共にに行なっていることが  
19 知られていることから[37]、*Gata3* とレチノイン酸シグナルが協働して発生や分化の制御  
20 を行なっている器官や組織が他にも存在する可能性がある。それらの制御に障害が生じる  
21 ことで、胎生致死となることも考えられるため、胎仔の全身的な表現型の解析が今後必要  
22 となる。

23 Beites らの報告によると、マウスの鼻腔は E10.5 から鼻板の陥入が引き起こされ、  
24 E11.5 において外側鼻突起と内側鼻突起が癒合することで独立した空間となるとされてい  
25 る[41]。また、Kondo らの報告によると、ショウジョウバエの気門も上皮の陥入が起こる  
26 ことで形成されるとされている[36]。さらに、Kondo らの 2013 年の報告によると、ショ  
27 ウジョウバエの気管原基において、上皮細胞の分裂期における球形化が上皮シートの陥入  
28 を誘導するとされている[42]。このことから、上皮細胞の細胞増殖が阻害されることによ  
29 り、上皮細胞の球形化が阻害され、上皮シートの陥入が適切に行われなくなることが予測  
30 される。マイクロ CT での鼻腔の形態観察の結果より、CA を呈する実験群の個体では鼻  
31 腔周囲の組織の形態が不規則になっており、また、上皮の陥入が適切に行われていなかった。  
32 そして、今回行った多重免疫染色の結果より、CA や CS といった鼻腔の形成不全を  
33 認めた実験群の個体では上皮及び間葉組織の細胞増殖が減少しており、上皮の細胞死が抑

1 制されていることも確認されたことから、実験群では、*Gata3*の機能不全により、鼻腔周  
2 囲の上皮および間葉の組織の増殖に障害が引き起こされ、鼻腔の形成不全を引き起こして  
3 いる可能性が示唆された。Nishimura らの報告によると、神経上皮細胞では、細胞の先端  
4 におけるアクトミオシン依存性の収縮により神経板の折りたたみを引き起こすとされてい  
5 る[43]。今後、鼻腔周囲の上皮及び間葉組織における細胞極性に着目することで、上皮の  
6 陥入による 鼻腔形成の新たな原理の解明に繋がると考えられる。

7 Kurosaka らの報告では *Rdh10* コンディショナルノックアウトマウスでは鼻腔周囲の  
8 上皮の細胞増殖の減少及び癒合部での細胞死の増加が確認されており、レチノイン酸シグ  
9 ナルが鼻腔の形成において重要な役割を担っていることが示唆されている[17]。*Rdh10*  
10 と *Gata3*がともに鼻腔上皮における細胞増殖及び細胞死を制御していることから、*Gata3*  
11 がレチノイン酸シグナルと協働して鼻腔の発生制御を行っている可能性が示唆された。

12 *Ert2Cre;Rdh10<sup>fl/fl</sup>*マウスの上顎複合体を用いた網羅的遺伝子発現解析の結果から、*Gata3*  
13 はレチノイン酸シグナルの下流として働いている可能性がある。実際に、*Rdh10<sup>fl/fl</sup>*マウ  
14 スでは *Gata3*の発現が減少していることが確認されている（未発表データ）。さらに、  
15 *Ert2Cre;Rdh10<sup>fl/fl</sup>*マウスと実験群の鼻腔周囲での細胞増殖シグナルは共に減少してお  
16 り、*Gata3*がレチノイン酸シグナルの下流で鼻腔周囲の上皮及び間葉組織での細胞増殖を  
17 制御している可能性が示唆される。また、E11.5 の *Ert2Cre;Rdh10<sup>fl/fl</sup>*マウスと本研究に  
18 おける実験群の鼻腔周囲での細胞死がともに増加していたことから、*Gata3*が細胞死に関  
19 してもレチノイン酸シグナルの下流で制御を行なっていることが考えられる。また、過去  
20 の報告において *Rdh10* コンディショナルノックアウトマウスでは CA の他にも顎顔面形成  
21 不全を認めたが、*Ert2Cre;Gata3<sup>fl/fl</sup>*マウスの顎顔面形成においては後鼻孔形成不全以外の  
22 大きな異常を認めなかったことから、*Gata3*が顎顔面領域において、鼻腔の形成に対し、  
23 特異的な役割を持つ可能性が示唆された。さらに、*Ert2Cre;Rdh10<sup>fl/fl</sup>*マウスでは、*Fgf8*  
24 の後鼻孔周囲における特異的な発現亢進が認められたことから、*Gata3*も *Fgf8*の発現制  
25 御を行なっていることが予測され、今後さらなる解析を行う余地がある。

26 レチノイン酸はビタミン A の活性本体であり、ビタミン A がレチノール脱水素酵素  
27 (*Rdh10*)、レチナル脱水素酵素 (*Aldh1a*) の 2 段階の酵素反応により生成される。

28 Sandell らの報告によると、ビタミン A の代謝に不可欠な *Rdh10* が先天的に欠損してい  
29 るマウスは胎生致死であり、レチノイン酸シグナルが胎仔の発生に非常に重要な役割を持  
30 つことが示されている[44]。

31 今回、母体のビタミン A が不足し、胎仔のレチノイン酸シグナルが低下している状態を  
32 低ビタミン A 飼料を母マウスに投与することにより再現した。ヒトにおけるビタミン A  
33 は肝臓の多くに貯蔵されるため、短期間のビタミン A の不足による影響は少ない。そのた

1 め、ビタミン A 不足による身体の機能障害は慢性的なビタミン A 不足が原因であると考え  
2 られる。このことから、本実験においては妊娠マウスの慢性的なビタミン A 不足の状態を  
3 再現するべく、妊娠前に 1 週間以上低ビタミン A 飼料を給餌し、さらに妊娠後、胎仔摘出  
4 を行うまでの間も低ビタミン A 飼料を給餌することとした。レチノイン酸シグナルが低下  
5 した状態の実験群の胎仔の胎生致死の割合が上昇していたことから、母親のビタミン A が  
6 不足している状態で胎仔の *Gata3* の発現が低下することで、後鼻孔形成不全や胎生致死の  
7 リスクが高くなることが示された。また、長期にわたり母親のビタミン A が不足すると  
8 そのリスクがより高まることも示された。ビタミン A は肝臓に貯蔵されるため、低ビタミン  
9 A 飼料の投与期間が短期であれば肝臓に貯蔵されたビタミン A により母体のレチノイン  
10 酸シグナルのレベルは維持される。そのため、低ビタミン A 飼料の投与期間が短期であれ  
11 ば、胎仔への影響が軽減されることが予測される。レチノイン酸シグナルと *Gata3* シグナ  
12 ルは鼻腔の形成について別の経路で発生制御を行っている可能性があるため、*Gata3* の機  
13 能不全を呈する胎仔に対し、ビタミン A を投与することで表現型に改善が見られる可能性  
14 が考えられる。また、ヒトの慢性的なビタミン A 不足に対し、ビタミン A を補充的に投与  
15 することで症状が軽快することから、母親の妊娠後に低ビタミン A 飼料から通常飼料へと  
16 切り替えた場合も同様に胎仔の表現型は改善されると考えられる。しかし、ビタミン A の  
17 過剰投与は胎仔の顔面領域での奇形を誘発することが知られており、表現型の改善のため  
18 にビタミン A を投与することでさらなる奇形を誘発する可能性も考えられる。また、ビ  
19 タミン A の過剰投与によりレチノイン酸分解酵素である *Cyp26* の発現が上昇するため  
20 [45]、かえってレチノイン酸シグナルの活性が低下することも考えられ、重症化すること  
21 も予測される。

22 本研究では、*Gata3* が鼻腔の発生制御に関与し、その機能障害は後鼻孔閉鎖の原因の一  
23 つとなることを示した。さらに、*Gata3* とレチノイン酸シグナルが胎仔における顎顔面領  
24 域、特に鼻腔の発生に協奏的に関与している可能性が強く示唆された。

25 今後、*Ert2Cre;Gata3<sup>flx/flx</sup>* マウスに後鼻孔閉鎖の要因となる遺伝的、環境的要因を作用さ  
26 せることにより、鼻腔の発生及び後鼻孔閉鎖の発症について詳細に解析することが可能で  
27 あると考えられる。さらに、*Rdh10* と *Gata3* の二つの遺伝子の発現を同時に特異的に除  
28 去したマウスを作成することで、*Gata3* とレチノイン酸シグナルの関連性について詳細な  
29 解析を行うことが可能であると考えられる。前述の通り、両側性の後鼻孔閉鎖は致死的で  
30 あり、新生児の出生直後の死亡原因の一つであると考えられている。今回、*Gata3* の機能  
31 不全とレチノイン酸シグナルの異常が後鼻孔閉鎖の原因である可能性が示唆されたこと  
32 で、将来的に出生前の後鼻孔閉鎖の発症リスクの予測が可能となると考えられる。*Gata3<sup>flx/flx</sup>*  
33 マウスは胎生致死であり [32]、*Gata3<sup>+/+</sup>* のマウスは無症状であるため、HDR 症候群のモデ

1 ルマウスとして表現型を確認することは困難であった。しかし、本実験系で用いたコンデ  
2 イショナルノックアウトマウスは胎生期早期での胎生致死を回避し、表現型の確認が可能  
3 であったことから、HDR 症候群のモデルマウスとして顔面領域だけでなく、全身の表現  
4 型を解析することができると思われる。

5

6

## 結論

7 *Ert2Cre;Gata3<sup>flx/flx</sup>* マウスにおける顎顔面領域、特に鼻腔及び後鼻孔の形態を観察するこ  
8 とにより、*Gata3* の顎顔面及び鼻腔の発生における役割について検討した。その結果、以  
9 下のことが示された。

- 10 1. *Gata3* がマウスの鼻腔周囲の組織において細胞増殖及び細胞死の制御を行うことが示  
11 された。
- 12 2. 胎仔の発生において、*Gata3* シグナルとレチノイン酸シグナルが協奏的に顎顔面の発  
13 生、特に後鼻孔の形成に関与している可能性が示唆された。

14

15

## 謝辞

16 本論文は筆者が大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻博士後期課程に在籍中の研究成  
17 果をまとめたものである。同専攻教授 山城 隆 先生には指導教官として本研究の実施の  
18 機会を与えていただき、その遂行にあたって終始ご指導をいただいた。ここに深謝の意を  
19 表す。また、黒坂 寛先生にも研究実施、論文作成において終始ご指導をいただいた。  
20 ここに深謝の意を表す。本専攻顎顔面口腔矯正学教室の各位には研究遂行にあたり日頃  
21 より有益なご討論、ご助言をいただいた。ここに感謝の意を表す。



## 参考文献

1  
2  
3  
4  
5  
6  
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

1. Abramyan, J. and J.M. Richman, *Craniofacial development: discoveries made in the chicken embryo*. Int J Dev Biol, 2018. **62**(1-2-3): p. 97-107.
2. Trainor, P.A., *Craniofacial birth defects: The role of neural crest cells in the etiology and pathogenesis of Treacher Collins syndrome and the potential for prevention*. Am J Med Genet A, 2010. **152a**(12): p. 2984-94.
3. Trainor, P.A. and B.T. Andrews, *Facial dysostoses: Etiology, pathogenesis and management*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2013. **163c**(4): p. 283-94.
4. Kurosaka, H., et al., *Disrupting hedgehog and WNT signaling interactions promotes cleft lip pathogenesis*. J Clin Invest, 2014. **124**(4): p. 1660-71.
5. Dixon, M.J., et al., *Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(3): p. 167-78.
6. Ramsden, J.D., P. Campisi, and V. Forte, *Choanal atresia and choanal stenosis*. Otolaryngol Clin North Am, 2009. **42**(2): p. 339-52, x.
7. Samadi, D.S., U.K. Shah, and S.D. Handler, *Choanal atresia: a twenty-year review of medical comorbidities and surgical outcomes*. Laryngoscope, 2003. **113**(2): p. 254-8.
8. Burrow, T.A., et al., *Characterization of congenital anomalies in individuals with choanal atresia*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2009. **135**(6): p. 543-7.
9. Stieve, M., H.G. Kempf, and T. Lenarz, *Management of choanal atresia in cases of craniofacial malformation*. J Maxillofac Oral Surg, 2009. **8**(1): p. 52-4.
10. Andrade, E.C., et al., *Treacher Collins Syndrome with choanal atresia: a case report and review of disease features*. Braz J Otorhinolaryngol, 2005. **71**(1): p. 107-10.
11. Kita, M., Y. Kuwata, and T. Usui, *Familial congenital choanal atresia with GATA3 associated hypoparathyroidism-deafness-renal dysplasia syndrome unidentified on auditory brainstem response*. Auris Nasus Larynx, 2018.

- 1 12. Blake, K.D. and C. Prasad, *CHARGE syndrome*. Orphanet J Rare Dis, 2006. **1**: p. 34.
- 2
- 3 13. Wiatrak, B.J., *Unilateral choanal atresia: initial presentation and*  
4 *endoscopic repair*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 1998. **46**(1-2): p. 27-35.
- 5 14. Kwong, K.M., *Current Updates on Choanal Atresia*. Front Pediatr, 2015.  
6 **3**: p. 52.
- 7 15. Dupe, V., et al., *A newborn lethal defect due to inactivation of*  
8 *retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid*  
9 *treatment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(24): p. 14036-41.
- 10 16. Pauws, E., et al., *Tbx22null mice have a submucous cleft palate due to*  
11 *reduced palatal bone formation and also display ankyloglossia and choanal*  
12 *atresia phenotypes*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(21): p. 4171-9.
- 13 17. Kurosaka, H., et al., *Rdh10 loss-of-function and perturbed retinoid*  
14 *signaling underlies the etiology of choanal atresia*. Hum Mol Genet, 2017.  
15 **26**(7): p. 1268-1279.
- 16 18. Chen, G.Y., et al., *Interaction of GATA-3/T-bet transcription factors*  
17 *regulates expression of sialyl Lewis X homing receptors on Th1/Th2*  
18 *lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(45): p. 16894-9.
- 19 19. Zheng, W. and R.A. Flavell, *The transcription factor GATA-3 is necessary*  
20 *and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells*. Cell, 1997.  
21 **89**(4): p. 587-96.
- 22 20. Hengerer, A.S., T.M. Brickman, and A. Jeyakumar, *Choanal atresia:*  
23 *embryologic analysis and evolution of treatment, a 30-year experience*.  
24 Laryngoscope, 2008. **118**(5): p. 862-6.
- 25 21. Muroya, K., et al., *GATA3 abnormalities and the phenotypic spectrum of*  
26 *HDR syndrome*. J Med Genet, 2001. **38**(6): p. 374-80.
- 27 22. Van Esch, H., et al., *GATA3 haplo-insufficiency causes human HDR*  
28 *syndrome*. Nature, 2000. **406**(6794): p. 419-22.
- 29 23. Ali, A., et al., *Functional characterization of GATA3 mutations causing the*  
30 *hypoparathyroidism-deafness-renal (HDR) dysplasia syndrome: insight*  
31 *into mechanisms of DNA binding by the GATA3 transcription factor*. Hum  
32 Mol Genet, 2007. **16**(3): p. 265-75.

- 1 24. Barakat, A.Y., et al., *Familial nephrosis, nerve deafness, and*  
2 *hypoparathyroidism*. J Pediatr, 1977. **91**(1): p. 61-4.
- 3 25. Bilous, R.W., et al., *Brief report: autosomal dominant familial*  
4 *hypoparathyroidism, sensorineural deafness, and renal dysplasia*. N Engl J  
5 Med, 1992. **327**(15): p. 1069-74.
- 6 26. Ferraris, S., et al., *HDR syndrome: a novel "de novo" mutation in GATA3*  
7 *gene*. Am J Med Genet A, 2009. **149a**(4): p. 770-5.
- 8 27. Fukami, M., et al., *GATA3 abnormalities in six patients with HDR*  
9 *syndrome*. Endocr J, 2011. **58**(2): p. 117-21.
- 10 28. Hernandez, A.M., et al., *Novel mutation in the gene encoding the GATA3*  
11 *transcription factor in a Spanish familial case of hypoparathyroidism,*  
12 *deafness, and renal dysplasia (HDR) syndrome with female genital tract*  
13 *malformations*. Am J Med Genet A, 2007. **143a**(7): p. 757-62.
- 14 29. Watanabe, T., et al., *Autosomal dominant familial hypoparathyroidism and*  
15 *sensorineural deafness without renal dysplasia*. Eur J Endocrinol, 1998.  
16 **139**(6): p. 631-4.
- 17 30. Yumita, S., et al., *Familial idiopathic hypoparathyroidism and progressive*  
18 *sensorineural deafness*. Tohoku J Exp Med, 1986. **148**(2): p. 135-41.
- 19 31. Lim, K.C., et al., *Gata3 loss leads to embryonic lethality due to*  
20 *noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system*. Nat Genet,  
21 2000. **25**(2): p. 209-12.
- 22 32. Pandolfi, P.P., et al., *Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe*  
23 *abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis*. Nat  
24 Genet, 1995. **11**(1): p. 40-4.
- 25 33. Zhang, Y.B., et al., *Genome-wide association study identifies multiple*  
26 *susceptibility loci for craniofacial microsomia*. Nat Commun, 2016. **7**: p.  
27 10605.
- 28 34. Zhu, J., et al., *Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in*  
29 *T(H)1-T(H)2 responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(11): p. 1157-65.
- 30 35. Rossant, J., et al., *Expression of a retinoic acid response element-hsplacZ*  
31 *transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse*  
32 *embryogenesis*. Genes Dev, 1991. **5**(8): p. 1333-44.

- 1 36. Kondo, T. and S. Hayashi, *Mechanisms of cell height changes that mediate*  
2 *epithelial invagination*. *Development, Growth & Differentiation*, 2015.  
3 **57**(4): p. 313-323.
- 4 37. Chia, I., et al., *Nephric duct insertion is a crucial step in urinary tract*  
5 *maturation that is regulated by a Gata3-Raldh2-Ret molecular network in*  
6 *mice*. *Development*, 2011. **138**(10): p. 2089-97.
- 7 38. Zhu, Y.F., et al., *All-transretinoic acid regulates Th1/Th2 balance in CD4+*  
8 *T cells when GATA-3 is deficient*. *Biomed Environ Sci*, 2013. **26**(9): p.  
9 774-7.
- 10 39. Gierut, J.J., T.E. Jacks, and K.M. Haigis, *Strategies to achieve conditional*  
11 *gene mutation in mice*. *Cold Spring Harb Protoc*, 2014. **2014**(4): p. 339-  
12 49.
- 13 40. Metzger, D., et al., *Conditional site-specific recombination in mammalian*  
14 *cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase*. *Proc Natl Acad*  
15 *Sci U S A*, 1995. **92**(15): p. 6991-5.
- 16 41. Beites, C.L., S. Kawauchi, and A.L. Calof, *Olfactory Neuron Patterning*  
17 *and Specification*. *Dev Neurobiol*, 2009. **7**: p. 145-156.
- 18 42. Kondo, T. and S. Hayashi, *Mitotic cell rounding accelerates epithelial*  
19 *invagination*. *Nature*, 2013. **494**(7435): p. 125-9.
- 20 43. Nishimura, T., H. Honda, and M. Takeichi, *Planar cell polarity links axes*  
21 *of spatial dynamics in neural-tube closure*. *Cell*, 2012. **149**(5): p. 1084-97.
- 22 44. Sandell, L.L., et al., *RDH10 is essential for synthesis of embryonic retinoic*  
23 *acid and is required for limb, craniofacial, and organ development*. *Genes*  
24 *Dev*, 2007. **21**(9): p. 1113-24.
- 25 45. Clagett-Dame, M. and D. Knutson, *Vitamin A in reproduction and*  
26 *development*. *Nutrients*, 2011. **3**(4): p. 385-428.
- 27

図表

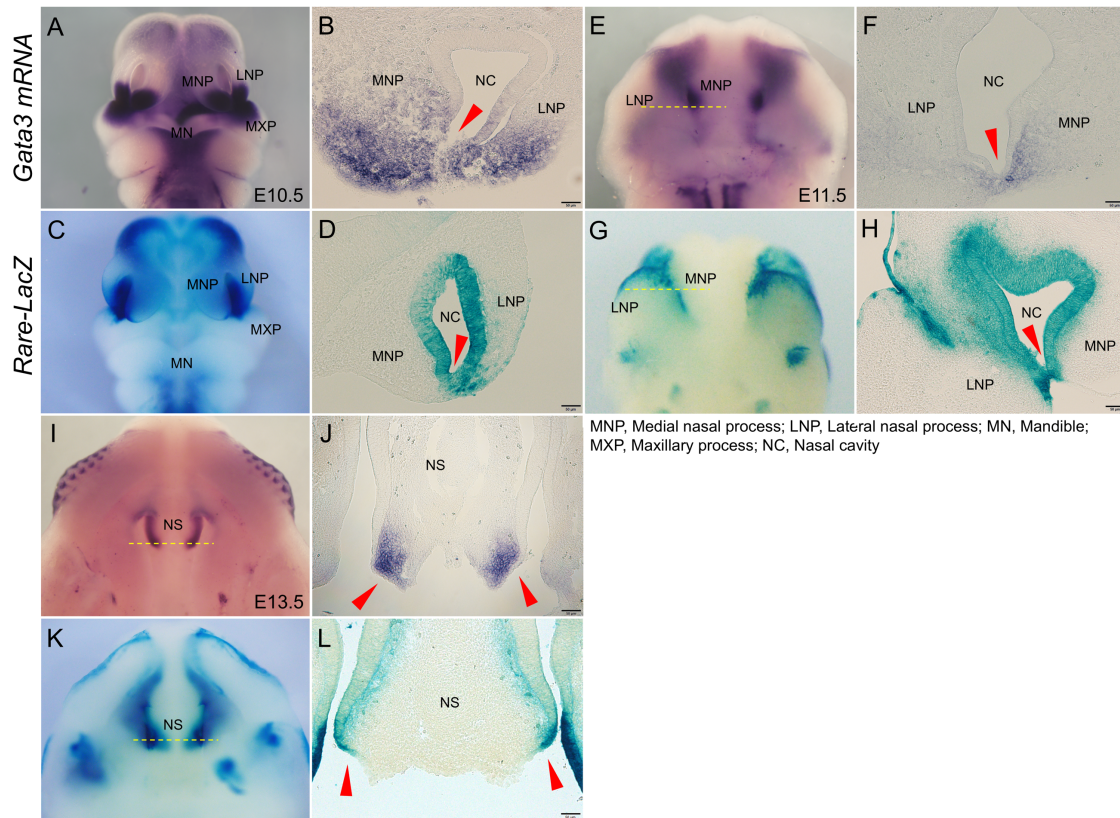
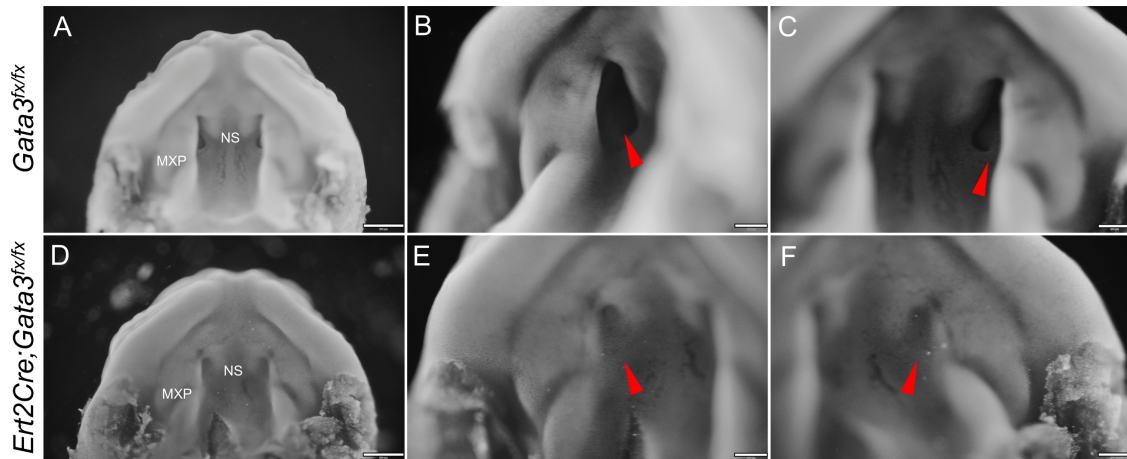


図1 *Gata3 mRNA* 及びレチノイン酸シグナルの時空間的発現解析

A. E10.5の野生型マウス頭部における *Gata3* の Whole mount *In situ* ハイブリダイゼーション像。紫色の部位が発現部位を示す。B. E10.5の野生型マウス頭部の凍結切片における *Gata3* の *In situ* ハイブリダイゼーション像 (Scale bar: 50  $\mu$ m)。紫色の部位が発現部位を示す。C. E10.5の野生型マウス頭部における *Rare-LacZ* の X-gal 染色像。青色の部位が発現部位を示す。D. E10.5の野生型マウス頭部の凍結切片における *Rare-LacZ* の X-gal 染色像 (Scale bar: 50  $\mu$ m)。青色の部位が発現部位を示す。E. E11.5の野生型マウス頭部における *Gata3* の Whole mount *In situ* ハイブリダイゼーション像。紫色の部位が発現部位を示す。F. E11.5の野生型マウス頭部の凍結切片における *Gata3* の *In situ* ハイブリダイゼーション像 (Scale bar: 50  $\mu$ m)。紫色の部位が発現部位を示す。G. E11.5の野生型マウス頭部における *Rare-LacZ* の X-gal 染色像。青色の部位が発現部位を示す。H. E11.5の野生型マウス頭部の凍結切片における *Rare-LacZ* の X-gal 染色像 (Scale bar: 50  $\mu$ m)。青色の部位が発現部位を示す。I. E13.5の野生型マウス頭部における *Gata3* の Whole mount *In situ* ハイブリダイゼーション像。紫色の部位が発現部位を示す。J. E13.5の野生型マウス頭部の凍結切片における *Gata3* の *In situ* ハイブリダイゼーション像 (Scale bar: 50  $\mu$ m)。紫色の部位が発現部位を示す。K. E13.5の野生型マウス頭部における *Rare-LacZ* の X-gal 染色像。青色の部位が発現部位を示す。L. E13.5の野生型マウス頭部の凍結切片における *Rare-LacZ* の X-gal 染色像 (Scale bar: 50  $\mu$ m)。青色の部位が発現部位を示す。黄破線部にて凍結切片を作成し、撮影した。



1 MXP, Maxillary process; NS, Nasal septum

2 図2 Whole mount DAPI 染色による鼻腔周囲の組織の形態観察

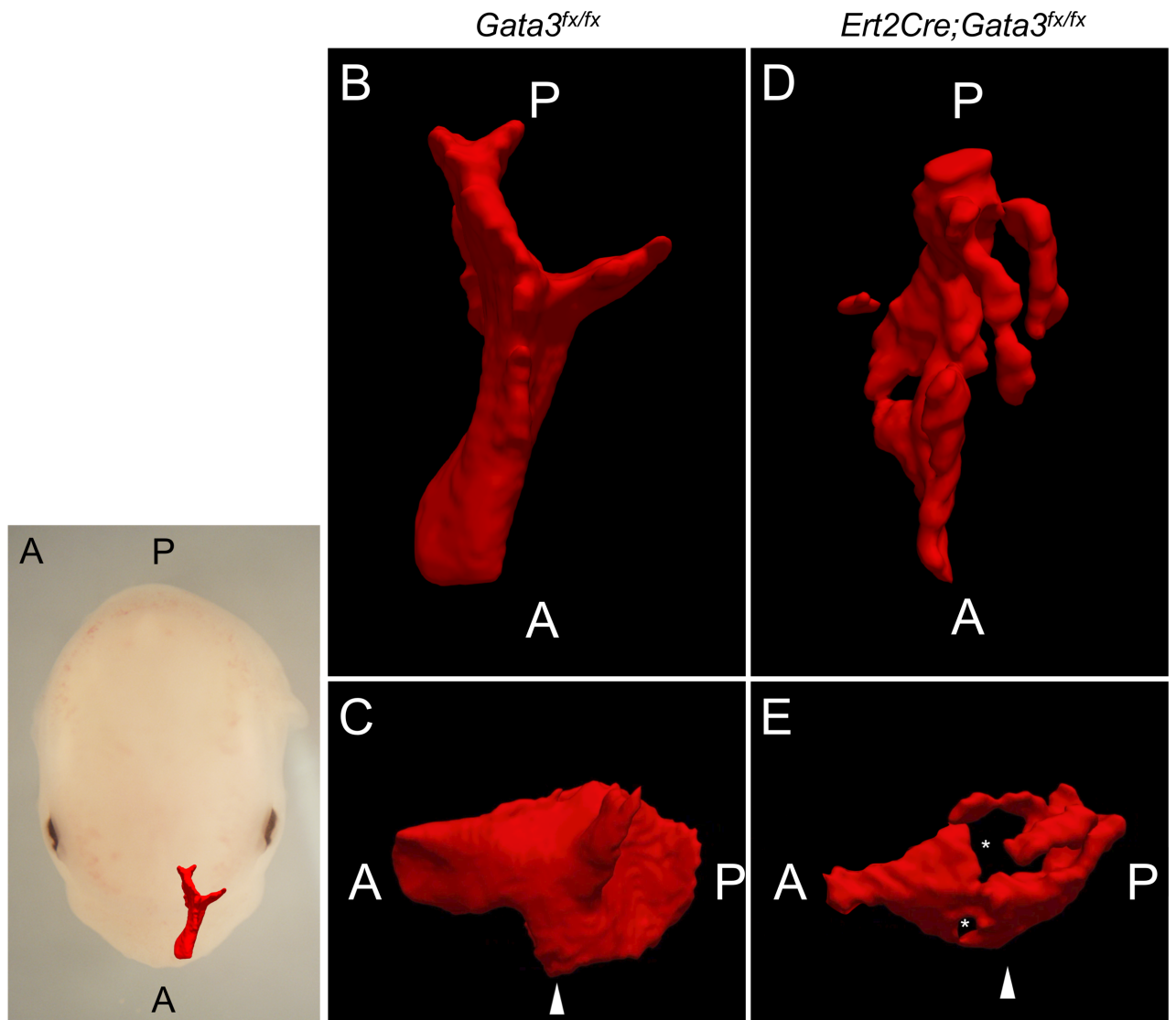
3 A. E13.0 の *Gata3<sup>fl/fl</sup>* マウスの上顎における Whole mount DAPI 染色像 (Scale bar: 500 μm)。

4 B. ,C. *Gata3<sup>fl/fl</sup>* マウスの後鼻孔の拡大像 (Scale bar: 200 μm)。赤矢頭は後鼻孔を示す。D. E13.0 の

5 *Ert2Cre;Gata3<sup>fl/fl</sup>* マウスの上顎における Whole mount DAPI 染色像 (Scale bar: 500 μm)。E. ,F.

6 *Ert2Cre;Gata3<sup>fl/fl</sup>* マウスの後鼻孔の拡大像 (Scale bar: 200 μm)。赤矢頭は解剖学的な後鼻孔の位置

7 を示す。



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9

図3 マイクロCTを用いた鼻腔周囲の組織及び鼻腔の三次元的形態観察

A. E13.0のマウス頭部における鼻腔の位置の模式図。赤い部分が鼻腔の位置を示す。Aは前方、Pは後方を示す。B. 頭側から観察した *Gata3<sup>fx/fx</sup>* マウスの鼻腔内の空間の三次元構築画像。C. 側面から観察した *Gata3<sup>fx/fx</sup>* マウスの鼻腔内の空間の三次元構築画像。白矢頭は後鼻孔に該当する部位を示す。D. 頭側から観察した *Ert2Cre;Gata3<sup>fx/fx</sup>* マウスの鼻腔内の空間の三次元構築画像。E. 左側から観察した *Ert2Cre;Gata3<sup>fx/fx</sup>* マウスの鼻腔内の空間の三次元構築画像。白矢頭は後鼻孔に該当する部位を示す。また、白アスタリスクは *Ert2Cre;Gata3<sup>fx/fx</sup>* マウスの鼻腔が不連続となっている部位を示す。

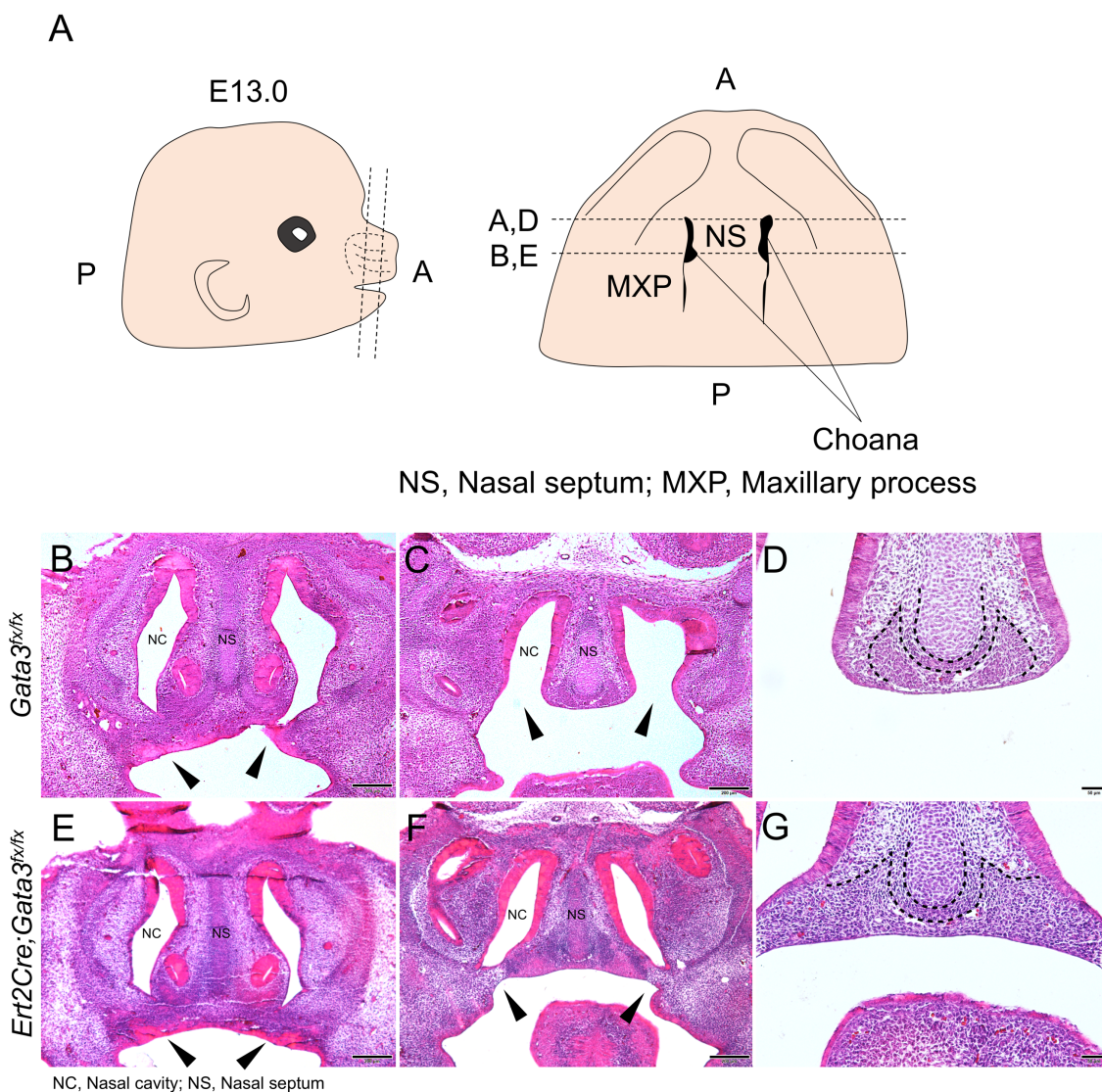


図 4 HE 染色による顎顔面及び鼻腔周囲の組織学的観察

- 1 A. HE 染色を行うための切片を作成した部位の模式図。黒破線部にてパラフィン切片を作成した。
- 2
- 3 A は前方、P は後方を示す。B. E13.0 における *Gata3<sup>fl/fl</sup>* マウスの頭部前方のパラフィン切片にお
- 4 ける HE 染色像 (Scale bar: 200  $\mu$ m)。黒矢頭は後鼻孔を示す。C. E13.0 における *Gata3<sup>fl/fl</sup>* マウスの
- 5 頭部後方のパラフィン切片における HE 染色像 (Scale bar: 200  $\mu$ m)。黒矢頭は後鼻孔を示す。D.
- 6 E13.0 における *Gata3<sup>fl/fl</sup>* マウスの鼻中隔の拡大像 (Scale bar: 50  $\mu$ m)。E. E13.0 における
- 7 *Ert2Cre;Gata3<sup>fl/fl</sup>* マウスの頭部前方のパラフィン切片における HE 染色像 (Scale bar: 200  $\mu$ m)。黒
- 8 矢頭は後鼻孔に該当する部位を示す。F. E13.0 における *Ert2Cre;Gata3<sup>fl/fl</sup>* マウスの頭部後方のパラ
- 9 フィン切片における HE 染色像 (Scale bar: 200  $\mu$ m)。黒矢頭は後鼻孔に該当する部位を示す。G.
- 10 E13.0 における *Ert2Cre;Gata3<sup>fl/fl</sup>* マウスの鼻中隔の拡大像 (Scale bar: 50  $\mu$ m)。
- 11



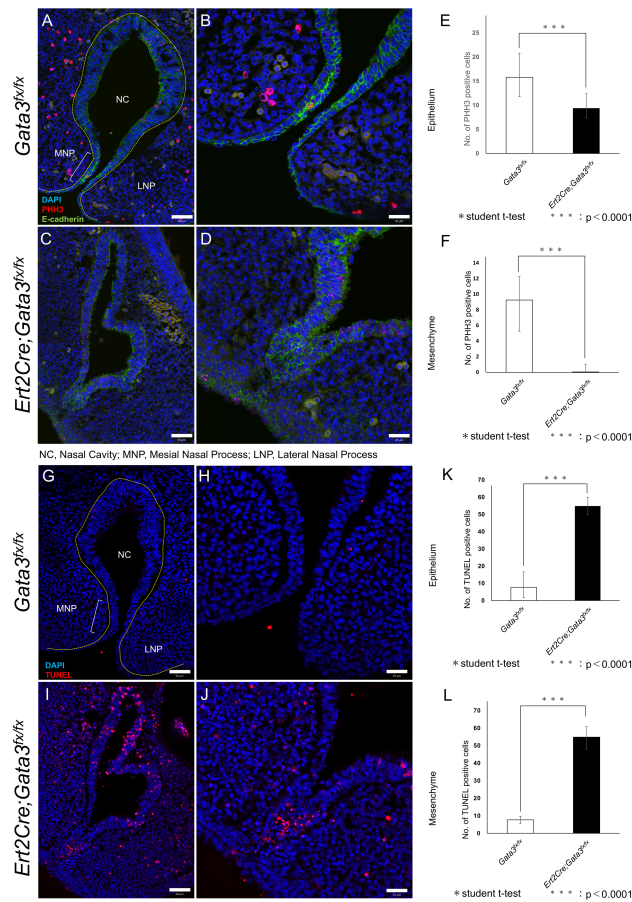
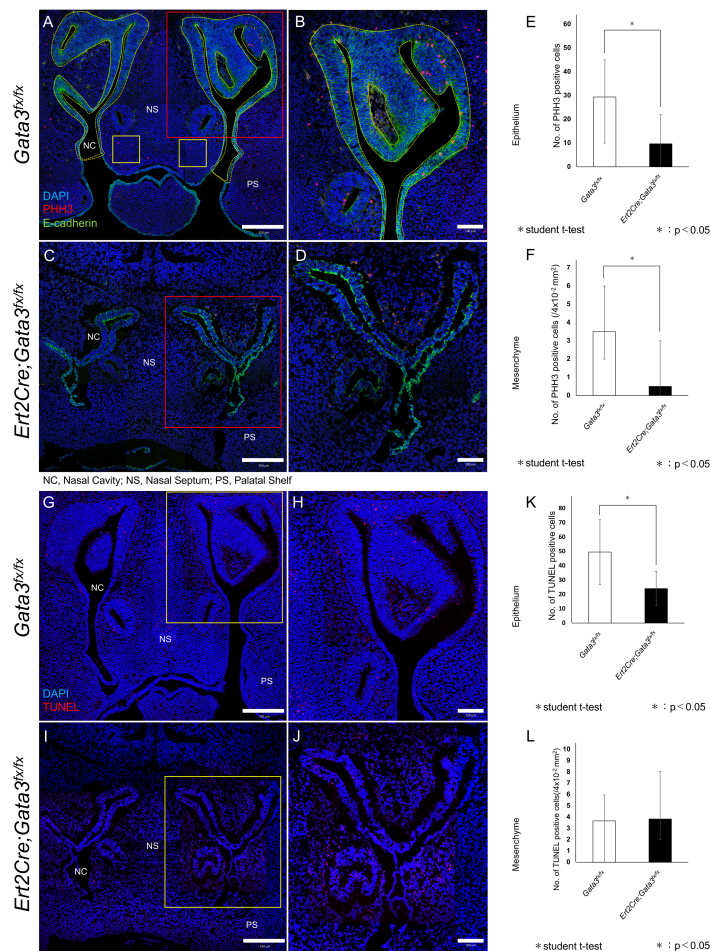


図5 E11.5の胎仔における多重免疫染色を用いた鼻腔周囲の細胞増殖及び細胞死の比較

A. E11.5の *Gata3<sup>flx/flx</sup>* マウスの凍結切片における多重免疫染色像 (Scale bar: 50  $\mu$ m)。赤く染色された細胞は PHH3 陽性細胞を示す。B. 図 A の後鼻孔周辺の拡大像 (Scale bar: 25  $\mu$ m)。C. E11.5 の *Ert2Cre;Gata3<sup>flx/flx</sup>* マウスの凍結切片における多重免疫染色像 (Scale bar: 50  $\mu$ m)。赤く染色された細胞は PHH3 陽性細胞を示す。D. 図 C の後鼻孔周辺の拡大像 (Scale bar: 25  $\mu$ m)。E. E11.5 のマウスの鼻腔の上皮において、*Ert2Cre;Gata3<sup>flx/flx</sup>* マウスでは PHH3 陽性細胞の数が有意に減少していた。F. E11.5 のマウスの鼻腔の間葉組織において、*Ert2Cre;Gata3<sup>flx/flx</sup>* マウスでは PHH3 陽性細胞の数が有意に減少していた。G. E11.5 の *Gata3<sup>flx/flx</sup>* マウスの凍結切片における多重免疫染色像 (Scale bar: 50  $\mu$ m)。赤く染色された細胞は TUNEL 陽性細胞を示す。H. 図 G の後鼻孔周辺の拡大像 (Scale bar: 25  $\mu$ m)。I. E11.5 の *Ert2Cre;Gata3<sup>flx/flx</sup>* マウスの凍結切片における多重免疫染色像 (Scale bar: 50  $\mu$ m)。赤く染色された細胞は TUNEL 陽性細胞を示す。J. 図 I の後鼻孔周辺の拡大像 (Scale bar: 25  $\mu$ m)。K. 図 I の後鼻孔周辺の拡大像。K. E11.5 のマウスの鼻腔の上皮において、*Ert2Cre;Gata3<sup>flx/flx</sup>* マウスでは TUNEL 陽性細胞の数が有意に増加していた。L. E11.5 のマウスの鼻腔の間葉組織において、*Ert2Cre;Gata3<sup>flx/flx</sup>* マウスでは TUNEL 陽性細胞の数が有意に増加していた。



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

図6 多重免疫染色を用いた鼻腔周囲の細胞増殖及び細胞死の比較

A. E13.0の *Gata3<sup>fl/fl</sup>* マウスの凍結切片における多重免疫染色像 (Scale bar: 250  $\mu$ m)。赤く染色された細胞は PHH3 陽性細胞を示す。B. 図 A の後鼻孔周辺の拡大像 (Scale bar: 100  $\mu$ m)。C. E13.0の *Ert2Cre;Gata3<sup>fl/fl</sup>* マウスの凍結切片における多重免疫染色像 (Scale bar: 250  $\mu$ m)。赤く染色された細胞は PHH3 陽性細胞を示す。D. 図 C の後鼻孔周辺の拡大像 (Scale bar: 100  $\mu$ m)。E. E13.0のマウスの鼻腔の上皮において、*Ert2Cre;Gata3<sup>fl/fl</sup>* マウスでは PHH3 陽性細胞の数が有意に減少していた。F. E13.0のマウスの鼻腔の間葉組織において、*Ert2Cre;Gata3<sup>fl/fl</sup>* マウスでは PHH3 陽性細胞の数が有意に減少していた。G. E13.0の *Gata3<sup>fl/fl</sup>* マウスの凍結切片における多重免疫染色像 (Scale bar: 250  $\mu$ m)。赤く染色された細胞は TUNEL 陽性細胞を示す。H. 図 G の後鼻孔周辺の拡大像 (Scale bar: 100  $\mu$ m)。I. E13.0の *Ert2Cre;Gata3<sup>fl/fl</sup>* マウスの凍結切片における多重免疫染色像 (Scale bar: 250  $\mu$ m)。赤く染色された細胞は TUNEL 陽性細胞を示す。J. 図 I の後鼻孔周辺の拡大像 (Scale bar: 100  $\mu$ m)。K. 図 I の後鼻孔周辺の拡大像。K. E13.0のマウスの鼻腔の上皮において、*Ert2Cre;Gata3<sup>fl/fl</sup>* マウスでは TUNEL 陽性細胞の数が有意に増加していた。L. E13.0のマウスの鼻腔の間葉組織において、*Ert2Cre;Gata3<sup>fl/fl</sup>* マウスでは TUNEL 陽性細胞の数が有意に増加していた。

1 表 1 鼻腔の形成不全及び胎生致死の発生率の比較

	Choanal Deformation ( CA + CS )	Lethal	CD + Lethal	
<i>Gata3<sup>fx/fx</sup></i>	0% ( 0/50 )	4% ( 2/50 )	4% ( 2/50 )	***
<i>Ert2Cre;Gata3<sup>fx/fx</sup></i>	31% ( 11/35 )	34% ( 12/35 )	66% ( 23/35 )	

CA, Choanal atresia; CS, Choanal stenosis; CD, Choanal deformation

\*Prop test \*\*\* : p<0.0001

2  
3 *Ert2Cre;Gata3<sup>fx/fx</sup>*マウスの胎仔では、*Gata3<sup>fx/fx</sup>*マウスの胎仔と比較して、CD 及び胎生致死  
4 を合わせた発生率は有意に上昇していた。

5  
6 表 2 低ビタミン A 飼料投与マウスにおける鼻腔の形成不全及び胎生致死の  
7 発生率の比較

	Choanal Deformation ( CA + CS )	Lethal	CD + Lethal	
<i>Gata3<sup>fx/fx</sup></i>	0% ( 0/50 )	4% ( 2/50 )	4% ( 2/50 )	**
<i>Ert2Cre;Gata3<sup>fx/fx</sup></i>	31% ( 11/35 )	34% ( 12/35 )	66% ( 23/35 )	
Vitamin A deficient <i>Gata3<sup>fx/fx</sup></i>	0% ( 0/14 )	7% ( 1/14 )	7% ( 1/14 )	
Vitamin A deficient <i>Ert2Cre;Gata3<sup>fx/fx</sup></i>	6% ( 1/17 )	94% ( 16/17 )	100% ( 17/17 )	

CA, Choanal Atresia; CS, Choanal Stenosis; CD, Choanal Deformation

\*Prop test \*\* : p<0.01

8  
9 低ビタミン A 飼料を給餌した母親から得られた *Ert2Cre;Gata3<sup>fx/fx</sup>*マウスの胎仔では、通常の  
10 飼料を給餌した母親から得られた *Ert2Cre;Gata3<sup>fx/fx</sup>*マウスの胎仔と比較して、胎内での CD 及  
11 び胎生致死を合わせた発生率は有意に上昇していた。