



Title	コンドロイチン硫酸転移酵素Chst11の口蓋形成における役割
Author(s)	横山, 美佳
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/87976
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

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 (横山 美佳)

論文題名 コンドロイチン硫酸転移酵素 *Chst11* の口蓋形成における役割

【諸言】

グルクロン酸 (GlcA) と N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) の 2 糖が反復する糖鎖に硫酸が結合した構造を持つコンドロイチン硫酸 (CS) は、プロテオグリカンとして細胞外マトリックス (ECM) や細胞表面に存在し、特に軟骨の基質に多く含まれている。CS の合成、代謝に関わる遺伝子の変異は軸前性短指症 (原因遺伝子: *CHSY1*) などの先天性の軟骨形成異常を引き起こすことが知られている。これらの先天性疾患では口蓋裂を含む顎顔面形態異常や歯の形成異常を併発するが、そのメカニズムについては明らかになっていない。

口蓋裂は、ヒトにおいて最も多く認められる先天性顎顔面形態異常の 1 つであり、発音障害、構音障害、審美障害を生じる。口蓋形成においては口蓋突起に CS プロテオグリカンが高発現しており、CS が口蓋形成において重要であると考えられている。CS をはじめとしたグリコサミノグリカン (GAG) の硫酸化修飾は他の ECM やタンパクとの相互作用において重要な役割を担っている。そこで本研究では、CS の硫酸化に関わる主要な遺伝子である *Chst11* 遺伝子のホモノックアウトマウスを用いて、口蓋形成における CS や *Chst11* の役割の解析を試みた。

【材料および方法】

1、実験動物

Chst11 遺伝子ホモノックアウトマウス (*Chst11-KO*) の胎仔と C57BL/6J 系統野生型雌性マウス (WT) の胎仔を使用した。また、K14-cre コンディショナルノックアウトマウスと Wnt1-cre コンディショナルノックアウトマウスを作製した。

2、実験方法

WT ならびに *Chst11-KO* の形態学的解析のため、E18.5 の胎仔を摘出し、1% リンタングステン酸を造影剤に用いた microCT 撮影、軟骨をアルシアンブルー、硬骨をアリザリンレッドで染色を行い、二重染色骨格標本の作製を行った。口蓋形成時期である E14.5~E15.5 における *Chst11* 遺伝子の発現部位を解析するために、WT の胎仔を摘出し、*Chst11* 遺伝子特異的なプローブを用いて *in situ* hybridization 法にて *Chst11* mRNA の検出を行った。組織学的解析のために E14.5、E18.5 の胎仔組織からパラフィン切片、凍結切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。細胞増殖能は、5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) 10 μ M を E14.5 胎仔の摘出 5 時間前に妊娠マウスの腹腔内に 200 μ l で投与を行い、作製した凍結切片を Click-iT® EdU assay kit を用いて EdU 陽性細胞を検出した。アポトーシスの検出には、TUNEL 染色法を用いた。口蓋形成における *Chst11* の役割を明らかにするために上皮特異的 (K14-cre) コンディショナルノックアウトマウスと間葉特異的 (Wnt1-cre) コンディショナルノックアウトマウスを作製し、経時的に観察した。遺伝子発現解析には、E14.5 胎仔の口蓋突起から RNA の抽出後、CAGE 法にて 5' 末端のシーケンスを行い、遺伝子発現パターンを GSEA にてエンリッチメント解析することで、*Chst11-KO* にて特異的なパスウェイを抽出した。口蓋突起挙上の時期における、口蓋突起組織内の ATP 量を測定するために、胎生 14.5 日齢 (E14.5) の胎仔の口蓋突起組織を採取、または初代培養口蓋突起間葉細胞を用いて、ATP Assay Kit-Luminescence (同仁化学) のプロトコルに従い、ATP 量を測定した。口蓋突起挙上時期における口蓋突起細胞の酸化ストレスの影響を検討するために、胎生 14.5 日齢 (E14.5) の胎仔の口蓋突起組織を採取した後、初代培養口蓋突起間葉細胞を用いて、96 ウェルプレートにて細胞播種を行い、24 時間培養後、200 μ M H₂O₂ 処理を行う群と非処理群に分けた。さらに 24 時間培養した後、MTT Assay (同仁化学) のプロトコルに従い、細胞増殖能の測定と、JC-1 Assay (同仁化学) のプロトコルに従い、ミトコンドリア膜電位の検出を行った。

【結果】

1、*Chst11-KO*の形態学的解析

*Chst11-KO*の全てが出生直後に死亡した。E18.5で胎仔を摘出し形態学的解析を行ったところ、WTと比較して四肢の短小化、上下顎骨の劣成長、高口蓋、切歯歯胚の短小化、軟骨の低形成を示したが硬骨の形成は認めた。また、胎仔の約30%に口蓋裂を生じた。

2、*Chst11*遺伝子の口蓋における発現パターンの解析

In situ hybridization法にて口蓋形成過程における*Chst11*遺伝子の発現パターンを解析した。口蓋形成時期であるE14.5の口蓋突起の上皮と間葉において、*Chst11*遺伝子の高発現を確認した。

3、*Chst11-KO*の組織学的解析

E14.5のWTの約18.2%(2/11匹)、*Chst11-KO*の約80%(8/10匹)が口蓋突起の挙上を認めなかった。口蓋突起の挙上を認めなかった*Chst11-KO*の約半数は、その後口蓋突起の癒合が生じたと推察される。このことから、*Chst11-KO*群では、口蓋突起の挙上の遅延が生じ、その一部に口蓋裂を生じることが示唆された。

E14.5の*Chst11-KO*の口蓋突起の間葉細胞では、WTと比較して細胞増殖能が低下していたが、アポトーシスに差は認めなかった。これらのことから、*Chst11-KO*の口蓋形成不全にはアポトーシスではなく、細胞増殖能の低下が関与していることが示唆された。

4、コンディショナルノックアウトマウスを用いた解析

K14-creコンディショナルノックアウトマウスは生存可能であり、口蓋裂を示さなかった。一方で、Wnt1-creコンディショナルノックアウトマウスは全て生後直後に死亡し、口蓋裂の表現型を約37.5%の割合で示した。このことから、口蓋裂の発症は、間葉組織における*Chst11*の欠失に起因していることが示唆された。

5、遺伝子発現解析による*Chst11-KO*の口蓋突起の解析

E14.5の口蓋突起組織からRNAを抽出し、*Chst11-KO*において特異的な発現を示す遺伝子の網羅的な解析を行ったところ、*Chst11-KO*において酸化的リン酸化に関与する遺伝子群の発現が有意に低下していた。

6、*Chst11-KO*の口蓋突起組織におけるATPの測定

酸化的リン酸化はミトコンドリアにおけるATP産生に関与しており、酸化的リン酸化の低下によりATP産生量が低下することが推察されたため、*Chst11-KO*の口蓋突起組織において、ATP量の測定を行ったところ、ATP量の低下を認めた。口蓋突起間葉における細胞増殖能の低下にはATPの低下が関与していることが示唆された。

7、*Chst11-KO*の口蓋突起間葉細胞に対する酸化ストレスの影響

酸化ストレス下において*Chst11-KO*の口蓋突起間葉細胞の細胞増殖能とミトコンドリア膜電位は優位に低下した。これらの結果から、*Chst11*遺伝子の欠失により、口蓋突起間葉細胞の酸化ストレスに対する抵抗性が低下することが示唆された。

【考察】

本研究の結果より、*Chst11*遺伝子は口蓋突起の挙上の時期において口蓋突起の間葉細胞に高発現し、口蓋形成における間葉細胞の増殖に必要であることが示唆された。また、遺伝子発現解析の結果はそのメカニズムとして、*Chst11*遺伝子の欠失がミトコンドリアの機能異常を引き起こしていることを示唆していた。CSが抗酸化作用を有していることがすでに報告されており、口蓋突起におけるCSの欠失は、酸化ストレスに対する抵抗性が低下することでミトコンドリアの機能異常を引き起こしている可能性が考えられ、*Chst11*遺伝子はマウス口蓋形成において口蓋突起間葉細胞の増殖と口蓋突起の伸長と挙上に必要であることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (横 山 美 佳)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	山城 隆
	副 査	教授	豊澤 悟
	副 査	准教授	前田 隆史
	副 査	講師	村上 智彦
論文審査の結果の要旨 プロテオグリカンとして細胞外マトリックスや細胞表面に存在するコンドロイチン硫酸（CS）の合成や代謝に関わる遺伝子の変異により、先天性の口蓋裂を生じることが知られている。本研究の目的は、CS の硫酸化転移酵素をコードする遺伝子である <i>Chst11</i> の口蓋形成における役割を解明することである。<i>Chst11</i> 遺伝子のホモノックアウトマウス（<i>Chst11-KO</i>）は口蓋突起の挙上時期である胎生 14.5 日において挙上の遅延を生じ、胎生 18.5 日において約 30%に口蓋裂を認めた。<i>Chst11</i> は胎生 14.5 日の口蓋突起の間葉細胞に高発現した。また、<i>Chst11-KO</i>では口蓋突起間葉細胞の増殖能が低下した。遺伝子発現解析の結果は、<i>Chst11</i> の欠失がミトコンドリアの機能異常を引き起こすことを示唆した。抗酸化作用を有する CS の欠失により、ミトコンドリアの機能異常を引き起こす可能性がある。これらのことから、CS の欠失によるミトコンドリアの機能異常が口蓋突起間葉細胞の増殖能を低下させた結果、口蓋裂を生じたと考えられる。これまでにミトコンドリア機能の異常と口蓋裂との関係については報告がなかったが、CS 欠失によるミトコンドリアの機能異常はヒト口蓋裂の発症の新規メカニズムとして考えられる。今後、ミトコンドリア機能を回復することで口蓋裂の発症を予防することが期待される。 以上のことより、本研究は <i>Chst11</i> がマウス口蓋形成において口蓋突起間葉細胞の増殖と口蓋突起の伸長と挙上に必要であること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。			