OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Baraitser-Winter syndromeにおけるACTB変異の機能解析
Author(s)	辻本, 貴行
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/91866
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

Baraitser-Winter syndrome における

ACTB **変異の機能解析**

大阪大学大学院歯学研究科　口腔科学専攻

顎顔面口腔矯正学教室

辻本　貴行

指導教授　山城　隆　教授

緒言

Baraitser-Winter syndrome (BWS, OMIM: 243310) は低身長、両眼隔離、眼瞼下垂、無脳回・脳回肥厚症等を特徴とする先天性の疾患である [1,2]。本疾患における顎顔面領域の特徴として口唇口蓋裂が挙げられ、約 20%の割合で発症する [1]。一般的に、口唇口蓋裂は顎口腔顔面領域における最も頻度の高い先天性疾患であり [5-7]、その発症には口蓋発生中の障害が関与している。口蓋発生には複数の遺伝的要因 [8-13] と環境的要因 [14-17] の相互作用 [18-21] が重要であり、口唇口蓋裂はそれらの異常が原因となり発症する多因子性疾患であると考えられている。本疾患のようなに症候群性の口唇口蓋裂では、シークエンス技術の飛躍的な進歩により多くの遺伝的要因が明らかとなっている。しかしながら個々の遺伝的要因がどの様なメカニズムで口唇口蓋裂を発症するのかは不明な部分が多く、更なる研究が必要である。BWS の原因遺伝子として知られる *Actin-β* (*ACTB*) においても近年新たな変異部位が報告されている [22] が、それぞれの変異の機能解析は詳細には実施されておらず、遺伝子型と表現型の相関等不明な点が多い。また、口唇口蓋裂を有する患者は顔面形態の異常に加えて咀嚼や嚥下、構音、聴覚などの機能的障害を伴うことが多く、患者自身や家族に時間的負担・経済的負担を強いることとなる [23,24] ため、口唇口蓋裂の予防法の開発が望まれる。

BWS の原因遺伝子である *Actin-β* (*ACTB*) は、細胞骨格を構成するアクチンフィラメントを形成する [3]。これ は数百にもおよぶタンパク質と結合して複合体を形成することにより様々な機能を果たすことが報告されている [25]。代表的な機能としては、仮足形成による細胞の遊走や細胞接着等が挙げられる [26-28]。細胞の移動は、フィロポディアやラメリポディアの先端部が細胞外基質へと接着し、これを支点にして、細胞体の牽引と接着の解除が繰り返し行われることで進行方向へと移動する [29]。細胞接着は細胞間

結合部に局在しているアクチンフィラメントが E-cadherin を介して接着結合を形成することにより達成される [27]。いずれの機能にもアクチン蛋白の重合脱重合といった恒常的なプロセスが重要であることが知られており、重合の際に重要なアクチン結合蛋白として CAP1 や Profilin が、脱重合の際には Cofilin が必要である [30]。しかしながら BWS に見られる *ACTB* や *ACTG* の変異がどのようにこれらのアクチン結合蛋白の動態に寄与するかは未知な部分が多い。また、BWS は高い頻度で口唇口蓋裂を発症するがその発症機構については不明である。

口蓋は切歯孔より前方の一次口蓋と後方の二次口蓋から構成される。二次口蓋の形成は、ヒトでは胎生 6 週頃、近交系実験マウスでは胎生 11.5 日頃に開始する。上顎突起から発生した左右の二次口蓋突起は舌の側方において垂直方向に成長した後、突起の伸長とともに舌の上方へ挙上し、やがて正中で互いに接触することで癒合が開始する。このとき、口蓋突起癒合部には正中上皮索 (midline edge epithelial seam: MES) と呼ばれる口蓋突起由来の上皮層が残存しており、二次口蓋の形成が進むにつれて MES が完全に消失し癒合は完了する [31,32]。この MES が消失するメカニズムは広範に研究されており、上皮細胞の遊走 [33-35] やアポトーシス [34,36]、上皮間葉形質転換 (epithelial-mesenchymal transformation: EMT) [37]、細胞突出 [38] などが提唱されている。これらの口蓋突起の伸長や挙上、癒合などいずれの形成過程が障害されても口蓋裂となりうる。今回我々は当科を訪れた口唇口蓋裂を伴う BWS 患者から *ACTB* の病的なミスセンス変異 (c.1043C>T: p.S348L) を同定し、その変異の口唇口蓋裂発症におけるメカニズムを解明する事を目的とした。

実験方法

① エクソーム解析

患者およびその両親から同意を得たうえで採血を行い、エクソームシークエンスを行った。変異の同定は未診断疾患患者に対する網羅的遺伝子診断プロジェクト (IRUD) の協力の元、大阪大学 IRUD 診断委員会にて行われた (大阪大学ヒトゲノム研究審査承認番号: 727-2) 。

② 実験動物

使用実験動物は、胎生 9.0, 10.5, 14.5 日の ICR 系統野生型マウス胎仔を対象とした。本研究は、大阪大学動物実験委員会の承認を得て行った (動物実験承認番号: 動歯-26-009-0) 。

③ 凍結切片の作製

胎生 14.5 日のマウス胎仔を 4%パラホルムアルデヒド (以下 4%PFA) 溶液 (pH7.4) にて 4℃で一晩浸漬固定を行った後、10%、20%、30%スクロース/0.1M PBS 溶液 (pH7.4) の順で浸漬させた。凍結包埋は Tissue-Tek Octcompound (サクラファインテックジャパン社, 東京, 日本) を用いて行い、実験に使用するまで-20℃暗所にて保管した。クリオスタット (CM1950, Leica 社, Wetzlar, Germany) を用いて口蓋組織を 12 um の厚みで連続切片を前頭断にて作製した。

④ *In situ* hybridization

胎生 9.0, 10.5, 14.5 日のマウス胎仔を 4%PFA 溶液にて 4℃で一晩浸漬固定を行った後、メタノールにて脱水を行い 100%メタノール内で-30℃にて保存した。DIG 標識 RNA プローブは、DIG RNA 標識キット (Roche 社, Basel, Switzerland) を使用して調製した。プローブ配列は、*Actb* (Allen Institute for Brain Science, Seattle, USA) を参考に決定した。作製したアンチセンスプローブを用いてハイブ

リダイゼーション後、抗 DIG-AP Fab フラグメント抗体 (Roche 社, Basel, Switzerland) を用いて標識した。可視化は NBT/BCIP (Roche 社, Basel, Switzerland) を用いて行った。染色後の胎生 14.5 日のマウス胎仔頭部は前述した方法を用いて包埋し、20um の薄切切片を作製した後に観察を行った。

⑤ 免疫組織化学染色

妊娠 14.5 日目の胎仔頭部を前述方法にて凍結包埋し 12um の厚さにて凍結切片を作製した。PBS にて洗浄後、クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) に浸し、オートクレープ (121℃、15 分) により賦活化処理を施した。その後、M.O.M (Mouse on Mouse) Blocking Reagent (Vector Laboratories 社, Burlingame, USA) を使用してブロッキングを行った。一次抗体として、抗 ACTB 抗体 (20536-1-AP, プロテインテック, Rosemont, USA) 、抗 E-cadherin 抗体 (#14472, Cell Signaling Technology 社, Danvers, USA) を使用し、4℃で一晩反応させた。翌日、PBS で切片を洗浄し、二次抗体として、抗マウス IgG 抗体 (A21202, Thermo Fisher Scientific 社, Waltham, USA) 、抗ウサギ IgG 抗体 (A10040, Thermo Fisher Scientific 社, Waltham, USA) を用いて室温で 2 時間反応させた。PBS にて洗浄後、蛍光色素の DAPI solution (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) を用いて室温で 20 分反応させた。PBS にて洗浄後、Dako Fluorescence Mounting Medium (Agilent 社, Santa Clara, USA) にて封入を行い、蛍光顕微鏡 (TCS SP8, Leica 社, Wetzlar, Germany) を用いて観察した。

⑥ 細胞培養および観察

MDCK 細胞 (国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンク, 大阪, 日本) は 、10%胎仔血清 (以下 FBS) (Thermo Fisher Scientific 社, Waltham, USA) と 1%ペニシリン-ストレプ

トマイシン溶液 (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) を 含む MEM α, no nucleosides (Thermo Fisher Scientific 社, Waltham, USA) にて 37℃、5%二酸化炭素気相下で培養した。

観察対象の細胞については、4%PFA にて 10 分間常温で固定した後、0.1%Triton-X を含む PBS にて透過処理を行った。Alexa Flour594 ファロイジンプローブ (A12381, Thermo Fisher Scientific 社, Waltham, USA) および Alexa Flour350 ファロイジンプローブ (A22281, Thermo Fisher Scientific 社, Waltham, USA) を用いて室温で 2 時間反応させた。PBS にて洗浄後、蛍光色素の DAPI solution (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) を用いて室温で 20 分反応させた。PBS にて洗浄後、Dako Fluorescence Mounting Medium (Agilent 社, Santa Clara, USA) にて封入を行い、蛍光顕微鏡 (TCS SP8, Leica 社, Wetzlar, Germany) を用いて観察した。

⑦ ACTB および Profilin 発現ベクターの構築および遺伝子導入

E13.5 マウス頭部から作製した cDNA を用いて ACTB をコードする領域を Polymerase chain reaction (PCR) により増幅し (Fw; 5'-ACGACTCACTATAGGTATAAAACCCGGCGGCGC-3', Rv; 5'-TTAGGTGACACTATAGTTTGTGTAAGGTAAGGTGTGC-3') 、pcDNA3 (Thermo Fisher Scientific 社, Waltham, USA) に In Fusion kit (Takara 社, 滋賀, 日本) を使用してクローニングすることにより ACTB 蛋白を発現するベクター作製した。また、広島大学両生類学研究所鈴木誠先生から供与された pCS2-LifeAct-mEGFP ベクターを用いて GFP をコードする領域を PCR により増幅し (Fw; 5'-ACGACTCACTATAGGATGGTGAGCAAGGGCGAGG-3', Rv; 5'-GATATCGTCATCCATCTTGTACA-GCTCGTCCATGCC-3') 、作製した ACTB 発現ベクターの 5 末端にクローニングすることで GFP-ACTB 結合蛋白を発現するベクター (以下 GFP-ACTB 発現ベクター) を作製した。さらに、作製した

GFP-ACTB 発現ベクターに本ミスセンス変異 (*Actb* c.1043C>T) を In Fusion kit (Takara 社, 滋賀, 日本) を用いて導入し (Fw; 5'-CCTGGCCTTACTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGG-3', Rv; 5'-GACAGTAAGGCCAGGATGGAGCCACC-3') 、GFP-変異型 ACTB (p.S348L) 結合蛋白を発現するベクター (以下 GFP-変異型 ACTB 発現ベクター) を作製した。

Profilin 発現ベクターは、マウス cDNA から Profilin をコードする領域を PCR により増幅し (Fw; 5'-AATTCCGGACTCAGAATGGCCGGGTGGAACGCC-3', Rv; 5'-TAGGTGACACTATAGTCAGTAC-TGGGAACGCCGC-3') 、pcDNA3 に In Fusion kit (Takara 社, 滋賀, 日本) を使用してクローニングすることにより作製した。また、広島大学両生類学研究所鈴木誠先生から供与された pCS2-LifeAct-mRFP ベクターを用いて RFP をコードする領域を PCR により増幅し (Fw; 5'-ACGACTCACTATA-GGATGGTGTCTAAGGGCGAAGAG-3', Rv; 5'-TTGCATGTCAGCCATTCTGAGTCCGGAATTAAGT-TTGTGC-3') 、作製した Profilin 発現ベクターのうち Profilin の 5 末端にクローニングを行うことで RFP-Profilin 結合蛋白を発現するベクター (以下 RFP-Profilin 発現ベクター) を作製した。

すべての発現ベクターは QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Valencia, USA) およびフェノールクロロホルム抽出により精製し実験に用いた。MDCK 細胞への遺伝子導入は NEPA21 electroporator (NEPAGENE 社, 千葉, 日本) を用いて行った。2mm gap のキュベット電極に、Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific 社, Waltham, USA) に溶解したサンプル 100µl (8x10^5cells, DNA:10µg) を入れ、Poring Pulse：電圧 150V, パルス幅 5ms, パルス間隔 50ms, 回数 2 回, 減衰率 10%, 極性+、Transfer Pulse：電圧 20V, パルス幅 50ms, パルス間隔 50ms, 回数 5 回, 減衰率 40%, 極性+/-に設定して電気穿孔法を行った。目的遺伝子を組み込んだプラスミドと MDCK 細胞を Opti-MEM に溶解し、NEPA

キュベット電極 (NEPAGENE 社, 千葉, 日本) を用いて電気穿孔法により遺伝子導入を行った。その後、37℃、5%二酸化炭素気相下にて 24 時間培養した。

⑧ 創傷治癒アッセイ

GFP-ACTB 発現ベクターと GFP-変異型 ACTB 発現ベクターをそれぞれ MDCK 細胞に遺伝子導入した後、Culture-Insert 2 Well (Ibidi, Gräfelfing, Germany) を付与した 35mm ガラスボトムディッシュ (松浪硝子工業, 大阪, 日本) にて 24 時間 37℃、5%二酸化炭素気相下にて培養した。その後、Culture-Insert 2 Well のみを撤去し、蛍光顕微鏡 (BZ X-700, Keyence 社, 大阪, 日本) を用いて 15 分毎 (計 10 時間) の経時的観察を行った。

⑨ LatrunculinA 添加実験

GFP-ACTB 発現ベクターと GFP-変異型 ACTB 発現ベクターをそれぞれ遺伝子導入した MDCK 細胞を 37℃、5%二酸化炭素気相下にて培養した。24 時間後に LatrunculinA を含むエタノール溶液 (最終濃度：0.25μg/ml) を添加して蛍光顕微鏡 (BZ X-700, Keyence 社, 大阪, 日本) により 5 分毎 (計 30 分) の経時的観察を行った。また、同様の薬剤を添加後 1 時間培養し 4%PFA にて 10 分間常温で固定、0.1%Triton-X を含む PBS にて透過処理を行った後 Alexa Flour594 ファロイジンプローブ (A12381, Thermo Fisher Scientific 社, Waltham, USA) を用いて室温で 2 時間反応させた。PBS にて洗浄後、DAPI solution (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) を用いて室温で 20 分反応させた。PBS にて洗浄後、Dako Fluorescence Mounting Medium (Agilent 社, Santa Clara, USA) にて封入を行い、蛍光顕微鏡 (TCS SP8, Leica 社, Wetzlar, Germany) を用いて観察した。

⑩ 統計処理

すべての実験は 3 回以上行った。Adobe Photoshop Creative Cloud 2017 (Adobe Inc, San Jose, USA) を使用して観察対象の面積の計測と 256 段階の階調による GFP 強度の算出を行い、平均値および標準誤差をグラフに示した。スチューデントの t 検定を用いて 2 つの群の有意差を検討した。$p < 0.05$ を有意差ありとした。

研究結果

1. 未診断疾患患者の遺伝子解析

遺伝的要因が病態に強く関与する症候群性の患者には確定診断がついていない患者が一定多数存在する。当科を訪れるまで未診断であった両側性唇顎口蓋裂 (図 1-A-C) ・両眼隔離 (図 1-A) ・心房心室中隔欠損・頭蓋骨形成不全 (図 1-C) を有する 9 歳男児と健常両親のトリオエクソーム解析を行った結果、患児においてのみ Pathogenic な *ACTB* のミスセンス変異 (c.1043C>T: p.S348L) を同定した (図 1-D) 。この変異は exon5 に位置し、過去に同じミスセンス変異が BWS の原因として報告されている (図 1-E) [39]。

2. 顎顔面発生段階における部位特異的な *Actb* mRNA・ACTB 蛋白の発現解析

ACTB は細胞骨格の主成分であるアクチンフィラメントを構成する必要不可欠なタンパク質であり、ほとんどすべての細胞で発現していることが知られている [4]。

胎生 9.0, 10.5, 14.5 日のマウス胎仔を用いて *Actb* の whole mount *in situ* hybridization を行った結果、胎生 9.0 日では *Actb* mRNA は全身に一様に発現していることを確認した (図 2-A) 。一方、胎生 10.5 日では鼻上顎突起や前後肢芽により強い発現を認め、組織毎に異なった発現強度を示した (図 2-A-B) 。また、胎生 14.5 日では二次口蓋癒合部に *Actb* mRNA の強い発現を認めた (図 2-C) 。同部の組織切片を用いた観察では口蓋突起癒合部の上皮組織に *Actb* mRNA が強く発現しているのを確認した (図 2-D) 。さらに、mRNA と同様に口蓋突起癒合時の上皮組織に ACTB 蛋白の集積を認めた (図

2-E-F)。これらのことから、*ACTB* は胎児期における顎顔面発生過程、特に二次口蓋突起癒合時に上皮細胞において何らかの役割を果たす可能性が示唆された。

3. 変異型 ACTB (p.S348L) を強制発現させた MDCK 細胞における細胞遊走の解析

二次口蓋の癒合の際には口蓋突起間の上皮を除去することが必要であり、上皮細胞の自発的な遊走が必要である事が知られている [33-35]。細胞遊走には ACTB の重合脱重合の繰り返しによる仮足形成が必要である [26]。そこで変異型 ACTB (p.S348L) が上皮細胞の遊走に与える影響を解析することとした。野生型 ACTB と変異型 ACTB (p.S348L) を強制発現させた MDCK 細胞を用いて創傷治癒アッセイを行った結果、野生型 ACTB 強制発現細胞群に比べて変異型 ACTB (p.S348L) 強制発現細胞群では、時間の経過に従い創傷治癒の遅れが認められた (図 3-A-D)。同様の実験を 3 回行い経時的に創傷部が細胞移動によって埋められた面積を計測した結果、創傷治癒アッセイ開始から 7 時間以降では変異型 ACTB (p.S348L) 強制発現細胞群の面積が有意に小さいことが示された (図 3-E)。

さらに、創傷治癒開始後に固定・細胞染色を行った結果、野生型 ACTB 強制発現細胞では遊走方向に活発なラメリポディアの形成を認めたのに対して、変異型 ACTB (p.S348L) 強制発現細胞においてはラメリポディアの形成異常が認められた (図 4-A-D)。これらの結果から変異型 ACTB (p.S348L) を強制発現させた細胞はラメリポディアの形成不全等を引き起こし細胞遊走に影響を与える事が示唆された。

4. 細胞間接着部位における野生型および変異型 ACTB (p.S348L) の局在

アクチンフィラメントは接着分子を介することで細胞接着に関与しており、その機能を果たすにはACTB が細胞接着部に局在していることが重要である [27,28]。そこで、野生型 ACTB と変異型 ACTB (p.S348L) をそれぞれ MDCK 細胞に強制発現させた後に免疫染色を行うことで局在の違いを解析した。その結果、野生型 ACTB 強制発現細胞では GFP で標識された野生型 ACTB が細胞間接着部位に有意に局在する (図 5-A, C) のと比較して、変異型 ACTB (p.S348L) 強制発現細胞では GFP で標識された変異型 ACTB (p.S348L) は細胞間接着部位への局在が限定的であることを確認した (図 5-B, D) 。また、細胞間接着部の GFP 輝度を計測した結果からも変異型 ACTB (p.S348L) が野生型 ACTB と比較して有意に細胞間接着部位への局在が抑制されている事が示された (図 5-E) 。

5. 変異型 ACTB (p.S348L) の重合に与える影響

アクチン蛋白は重合することにより繊維状のアクチンフィラメントを形成する。このアクチンフィラメントは細胞の遊走や細胞接着において重要な役割を果たす。また、これらの機能にはアクチン蛋白の恒常的な重合と脱重合が重要であると知られている [26-28]。そのため、アクチン蛋白の動態解析として重合阻害剤を用いた実験系が広く用いられてきた。その中でもアクチン蛋白の ATP 結合領域に結合する LatrunculinA は凡庸性が高く [40,41]、本疾患の機能解析における報告でも用いられている [3,42]。そのため、今回の実験でも LatrunculinA を用いてアクチン蛋白の重合阻害を誘発し、変異型 ACTB (p.S348L) の挙動を解析することとした。

野生型 ACTB と変異型 ACTB (p.S348L) をそれぞれ MDCK 細胞に強制発現させた後に LatrunculinA を投与した結果、野生型 ACTB 強制発現細胞において投与前に比べて投与後では Phalloidin の著しい断片化が認められた (図 6-A-B) 。また興味深い事に断片化された Phalloidin 像と GFP で標識された

野生型 ACTB が共局在を示す部位が多く認められた (図 6B) 。一方、変異型 ACTB (p.S348L) 強制発現細胞においては LatrunculinA を添加後に Phalloidin の断片化像を認めたものの GFP で標識された変異型 ACTB の局在に大きな変化は認めなかった (図 6-C-D) 。この結果を確認するために経時的なライブイメージング観察も行ったところ、同様の結果が得られた (図 6-E-T) 。これらの事から変異型 ACTB (p.S348L) は適切にアクチンフィラメントを形成する能力を喪失しており、細胞内における適切な部位に局在する能力が低いことが示唆された。

6. 変異型 ACTB (p.S348L) とともに Profilin を強制発現させることによる重合脱重合への影響

ACTB は様々なタンパク質との相互作用で恒常的な重合・脱重合を制御している。そこで、アクチン結合蛋白である Profilin に着目した [43]。Profilin は ACTB 単量体に結合し、ADP-ACTB のヌクレオチド交換を触媒することで ATP-ACTB を貯えアクチンフィラメントへの重合を誘導する [44]。また、興味深いことに本症例の変異部位 (p.S348L) は Profilin の結合部位の近傍に位置していた [45]。

そこで、ACTB と同様に Profilin の発現ベクターを作製し、変異型 ACTB (p.S348L) とともに MDCK 細胞に強制発現を行った。実験 3 と同様に野生型 ACTB 強制発現細胞 (図 7-A, D) に比べて変異型 ACTB (p.S348L) 強制発現細胞 (図 7-B, E) では GFP により標識された変異型 ACTB (p.S348L) の細胞間結合部位への局在が低下していることが確認された。さらに、興味深いことに変異型 ACTB (p.S348L) とともに Profilin の発現ベクターを強制発現させた細胞では、GFP により標識された変異型 ACTB (p.S348L) の細胞間接着部位への局在が回復する傾向が確認できた (図 6-C, F) 。また、実験 3 と同様に細胞間接着部位における GFP の輝度を比較した結果、変異型 ACTB (p.S348L) 単独の強制発現細胞に比べて変異型 ACTB (p.S348L) とともに Profilin の発現ベクターを強制発現させた細

胞では有意に細胞間接着部位への局在が回復することを確認した (図 7-G) 。これらの結果は、変異型 ACTB (p.S348L) は Profilin との結合性が低下することにより異常な挙動を引き起こすことを示唆している。

考察

1. 未診断疾患患者の遺伝子解析

当科を訪れるまで未診断であった両側性唇顎口蓋裂・両眼隔離・心房心室中隔欠損を有する患児と健常両親のトリオエクソーム解析を行った結果、患児のみにおいて Pathogenic な *ACTB* のミスセンス変異 (c.1043C>T: p.S348L) を同定した。これまで報告されている BWS における *ACTB* の変異に好発部位はなく様々なエキソンにおけるミスセンス変異が報告されている。これまでの報告では *ACTB* における遺伝子型と表現型の関連性は不明な点が多く更なる探索が必要である [1]。今回発見された *ACTB* の変異 (c.1043C>T: p.S348L) は近年一症例報告されたが、口唇口蓋裂との関連性は不明である [39]。

シークエンス技術の飛躍的な進歩により疾患の原因となる遺伝子変異も多数同定されており、現在では、ターゲットシークエンスのみならず網羅的な遺伝子検査も臨床現場における診断ツールとして位置づけられている。遺伝子検査の適応範囲の拡大に伴い今後も遺伝性疾患における新たな遺伝子変異が多く同定される事が予想される。ただし遺伝子変異の機能解析には膨大な労力と時間を費やす必要があり、様々な疾患や病態に対する適切な疾患モデルの開発が必要である。本研究では希少疾患である BWS における口唇口蓋裂の発症メカニズム解明の為に MDCK 細胞を用いた実験を行った。

2. BWS におけるこれまでの知見

BWS は低身長、両眼隔離、眼瞼下垂、無脳回・脳回肥厚症等を特徴とする先天性の疾患であり [1,2]、病態に関する機能的な解析もいくつか行われている。BWS 患者 (変異部位; p.R183W, p.A196H) か

ら採取したリンパ芽球様細胞を用いた研究において、細胞突起の増加による細胞周径の増加や、LatrunculinA に対するアクチンフィラメントの抵抗性の増加を有するという結果が報告されている[3,46]。それに対し、BWS 患者 (変異部位; p.T160A) から採取した末梢血単核細胞では、健常細胞に比べて細胞周径が減少しているという結果も報告されている[22]。また、*ACTB* とともに BWS の原因遺伝子となる *ACTG* に関する機能解析では、繊維芽細胞培養細胞株である NIH 3T3 細胞に変異型 ACTG (変異部位; p.K118N, p.I34M, p.M82I, p.I165V) を強制発現する研究が行われており、変異型 ACTG がアクチンフィラメントに取り込まれないという報告もされている[47]。今回の変異 (p.S348L) による ACTB 分子の挙動は過去の BWS の研究報告と完全に一致するわけではなく、*ACTB* は変異部位によって異なる挙動を示す可能性がある。また異なる細胞種を用いた研究も多く、変異を持つ細胞種毎に異なる表現型を呈する可能性がある。

興味深いことに、ヒト *ACTB* の機能喪失型変異では精神発達遅滞、内臓奇形、成長不全、特徴的顔貌等の症状を認める事が知られている[48]。これまでの研究から BWS の原因は *ACTB* もしくは *ACTG* のドミナントネガティブあるいは機能獲得型変異とされていた[3]が、*ACTB* 喪失型変異を持つ患者の表現型が BWS と一部重複していることから BWS の発症メカニズムは *ACTB* の機能獲得型変異のみでなく、機能喪失型変異なども原因として引き起こされる可能性が提唱されている[48]。以上から *ACTB* のミスセンス変異が細胞挙動に及ぼす分子生物学的な影響や BWS の病態における役割は未だ不明な部分が多い。加えて *ACTB* のミスセンス変異と口蓋裂の発生メカニズムについてはこれまで解析された研究はない。

3. 顎顔面発生段階における部位特異的な *Actb* mRNA・ACTB 蛋白の発現解析

Tondeleir らは胎児発生中の異なるステージにおける *Actb* mRNA の局在について報告しており、発生ステージが進むにつれて部位特異的な発現強度の違いが現れると結論づけている [4]。これらの事から、ACTB の生殖系列における変異が及ぼす機能障害は全身に一様に現れるのではなく、ACTB が強く発現する組織においてより大きな影響を受ける可能性が示唆される。

今回我々は二次口蓋突起癒合時に除去される予定の上皮組織に *Actb* mRNA・ACTB 蛋白ともに強く発現している事を発見した。

口蓋突起癒合時の上皮の除去には上皮細胞の遊走 [33-35] やアポトーシス [34,36]、上皮間葉形質転換 (epithelial-mesenchymal transformation: EMT) [37]、細胞突出 [38] などが関与することが提唱されている。また、細胞遊走や細胞突出にはアクチン蛋白が深く関与している [26-28]。以上から、口蓋突起が癒合する際に必要不可欠なイベントである口蓋突起の上皮組織の消失に *ACTB* のミスセンス変異が関与していることが示唆される。

4. 変異型 ACTB (p.S348L) を強制発現させた MDCK 細胞の細胞遊走解析と変異型 ACTB (p.S348L) の細胞内における局在

これまで、マウス胎児線維芽細胞株である 3T3 細胞に ATP 結合部位近傍の変異を有する変異型 ACTB (p.R183W) を強制発現した研究が報告されており、同変異はアクチンフィラメントの重合促進と脱重合低下を引き起こすという結論を見出している [46]。この解析手法を参考に、野生型 ACTB と変異型 ACTB (p.S348L) それぞれに GFP を結合させた発現ベクターを作製した。また、細胞については上皮の研究にて広く用いられている MDCK 細胞を使用した [49]。MDCK 細胞はイヌの腎臓から樹

立された細胞株であり、上皮細胞全般と類似した特性を有している[49]。また、MDCK 細胞を用いて、膜結合型グアニル酸キナーゼである mLin-2/CASK と SAP9 のタンパク質相互作用が口唇口蓋裂発症に関与することを示した研究も存在し[50]、MDCK 細胞が胎生口蓋上皮の解析を行う上でも適切なモデルとなることが証明されている。

細胞遊走は、G タンパク質共役型受容体やインテグリンなどの細胞外受容体による刺激から誘導され、この刺激は Rho ファミリー低分子量蛋白質 (Rho, Cdc42, Rac1 など) によるシグナル経路を介してラメリポディア・フィロポディアの形成を制御する[51-53]。また、集団移動を行うグループの先頭の細胞は選択的にこれらを伸長するが、後ろの細胞ではほとんど突起が伸長しないことが知られている[54]。

創傷治癒アッセイの結果、変異型 ACTB (p.S348L) 強制発現細胞群では細胞遊走の低下が認められた。さらに、その途中で固定し染色を行った結果では、変異型 ACTB (p.S348L) 強制発現細胞群の先頭の細胞においてラメリポディアの形成異常が認められた。

過去の研究において、3T3 細胞に Rho のエフェクター分子である Rock のインヒビターを投与することでラメリポディアの形成は阻害され細胞遊走が低下することが明らかにされている[55]。以上から、変異型 ACTB (p.S348L) がラメリポディアの形成を抑制したことにより細胞移動が阻害された事が示唆される。また二次口蓋の器官培養においても Rock インヒビターを作用させる事で上皮の遊走が阻害され上索の除去が不完全になり口蓋裂の原因となる[35,38]。これらの事は BWS における口唇口蓋裂の発症の機序には ACTB 変異による上皮細胞遊走の障害が含まれる事を示唆している。

二次口蓋の初期接触には上皮同士の細胞接着が重要である[56,57]。また、その後の口蓋の形成の過程で口蓋突起癒合部に残存した口蓋突起由来の上皮層である MES は取り除かれる必要があり、その機序として提唱されている上皮間葉形質転換には E-cadherin を介した細胞接着が関与している[58]。

本研究では変異型 ACTB (p.S348L) が細胞接着部位に局在する割合が少ない事を見出だした。

細胞接着部に局在している ACTB は重合したアクチンフィラメントであるとともに、E-cadherin を介して接着結合を形成する事により細胞接着に重要な役割を果たしてしていると報告されている[27]。また、ヒトの眼球網膜から分離した HTM 細胞にアクチンの重合阻害剤である LatrunculinA 処理した研究では細胞間接着が低下していることが示されている[59]。以上から、変異型 ACTB (p.S348L) はアクチンフィラメントの形成障害により細胞内局在に異常が生じ、細胞接着に影響を及ぼしていることが示唆された。さらに、これらの事は BWS における口唇口蓋裂の発症の機序に ACTB 変異による上皮細胞接着の障害が含まれる事を示唆している。また、アクチンフィラメントはインテグリンを介して細胞外基質とも接着しており、細胞が遊走するうえで重要な役割を果たしている[60]。そのため細胞内局在の変化は前述している細胞遊走にも影響を与えることが考えられる。

これまでの報告より BWS における様々な ACTB の変異部位が同定されていたため、代表的な変異部位 (G74S, T120I, A196H, R183W) を抽出してベクターを作製し、同様に細胞間結合部の発現も確認したが、本変異以外では細胞間結合部における ACTB 発現の低下は確認できなかった (データ提示せず) 。BWS における *ACTB* の変異に好発部位はなく、これまで様々な変異部位が同定されているが、それぞれの変異部位によって症状に多少の差異が生じている[1]ことからも遺伝子型と表現型の相関が示唆される。

今回の結果は *in vitro* の実験系で得られた結果であるため今後は動物モデルの作製を行うことにより生体内での変異型 ACTB (p.S348L)の生物学的意義の解析を行う必要がある。

5. 変異型 ACTB (p.S348L) の重合に与える影響

今回の結果では、重合阻害剤により野生型 ACTB 強制発現細胞群では内在性アクチンフィラメントを染色する Phalloidin と外来性の GFP で標識された野生型 ACTB が両方断片化し共局在を示したのに対し、変異型 ACTB (p.S348L) 強制発現細胞群では Phalloidin のみが断片化し GFP で標識された変異型 ACTB (p.S348L) は動態の変化が認められなかった。前述した変異型 ACTB (p.S348L) の細胞接着部位への局在が低下した結果と併せると変異型 ACTB (p.S348L) は適切にアクチンフィラメントを形成する能力を喪失していることが示唆された。

本結果では、両群ともに LatrunculinA 処理後に Phalloidin の蛍光強度が増加しているが、これはアクチンフィラメントが断片化し凝集することが関係していると考えられる。

6. 変異型 ACTB (p.S348L) とともに Profilin を強制発現させることによる重合脱重合への影響

変異型 ACTB (p.S348L) とともに Profilin を MDCK 細胞に強制発現させたところ、変異型 ACTB (p.S348L) のみを強制発現させた細胞に比較して Profilin をともに強制発現させた細胞では変異型 ACTB (p.S348L) の細胞間接着部位への局在が回復することが確認できた。

Profilin は ACTB 単量体に結合し、ADP-ACTB のヌクレオチド交換を触媒することで ATP-ACTB を貯えアクチンフィラメントへの重合を促進する役割を持つ[44]。また、本変異 (p.S348L) 箇所は ACTB と Profilin が結合する約 4 か所のうちの一つに近接していた。[25,61]。本研究の結果から本変異 (p.S348L)

ではミスセンス変異により三次元構造が変化し、ACTB-Profilin の結合が抑制されたことが考えられる。これは、変異型 ACTB (p.S348L) は適切にアクチンフィラメントを形成する能力を喪失しているという前述の結果とも合致している。さらに、Profilin は、ラメリポディアの形成に関与する Rac1 やフィロポディアの形成に関与する Cdc42 と相互作用を有することが指摘されている [53,62]。そのため、細胞間接着部位への局在のみならず変異型 ACTB (p.S348L) の強制発現によって低下した細胞遊走能も回復する可能性がある。また、これらの結果から、*ACTB* のミスセンス変異 (c.1043C>T: p.S348L) を原因とした口蓋裂の発生に Profilin 投与による予防の可能性が期待される。しかしながら、本結果でも示すように変異型 ACTB (p.S348L) とともに Profilin を強制発現させた細胞では野生型 ACTB 強制発現細胞ほど回復していないことから、Profilin の容量依存的に ACTB の機能が回復しているのみであり、ACTB 自体が本来の機能を完全に取り戻すわけではない。また、Profilin は ACTB の重合脱重合以外にも様々な分子生物学な調節因子として機能することが知られており [62]、Profilin は機能獲得型のミスセンス変異により筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を発症することが報告されている [63]。また、イネ科花粉に対する IgE 抗体が食物に含まれる Profilin と交差反応性を示したことから Profilin は食物アレルギーの原因物質と知られている [64]。この様な背景から変異型 ACTB (p.S348L) への Profilin の補充による機能改善は更なるメカニズムの解明が必要である。

結論

ACTB 蛋白が胎児発生中において組織特異的な役割を持つことが示唆された。さらに、今回我々が同定した *ACTB* のミスセンス変異 (c.1043C>T:p.S348L) は上皮細胞において Profilin との結合不足に起因したアクチン分子多量体形成の異常が生じており、ACTB の細胞内での局在変化やアクチンのダイナミクスが阻害されている事が示された。口蓋突起上皮組織消失時にも同様の機能異常が生じていることが推測され、この機能異常が上皮組織の残存を引き起こすことで口蓋裂発生に関連していることが示唆された。

謝辞

本研究を行う機会を与えて頂き、終始ご懇意なるご指導とご鞭撻を賜りました顎顔面口腔矯正学教室 山城 隆 教授に深甚なる感謝の意を表します。本研究を遂行するにあたり、直接のご指導を賜りました同教室 黒坂 寛 准教授に心より感謝し、篤く御礼申し上げます。また、様々なご助言とご高閲を賜りました 犬伏 俊博 講師に謹んで感謝の意を表します。

最後に、本研究を行うに際し、ご理解とご協力を賜りました顎顔面口腔矯正学教室の皆様に篤く御礼申し上げます。

文献

1. Verloes A, Di Donato N, Masliah-Planchon J, et al. Baraitser-Winter cerebrofrontofacial syndrome: delineation of the spectrum in 42 cases. Eur J Hum Genet. 2015; 23 (3): 292-301.

2. Baraitser M, Winter RM. Iris coloboma, ptosis, hypertelorism, and mental retardation: a new syndrome. J Med Genet. 1988; 25 (1): 41-43.

3. Rivière JB, van Bon BW, Hoischen A, et al. De novo mutations in the actin genes ACTB and ACTG1 cause Baraitser-Winter syndrome. Nat Genet. 2012; 44 (4): 440-444, S441-442.

4. Tondeleir D, Vandamme D, Vandekerckhove J, Ampe C, Lambrechts A. Actin isoform expression patterns during mammalian development and in pathology: insights from mouse models. Cell Motil Cytoskeleton. 2009; 66 (10): 798-815.

5. Vanderas AP. Prevalence of craniomandibular dysfunction in children and adolescents: a review. Pediatr Dent. 1987; 9 (4): 312-316.

6. Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC. Cleft lip and palate. Lancet. 2009; 374 (9703): 1773-1785.

7. Schutte BC, Murray JC. The many faces and factors of orofacial clefts. Hum Mol Genet. 1999; 8 (10): 1853-1859.

8. Celli J, Duijf P, Hamel BC, et al. Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. Cell. 1999; 99 (2): 143-153.

9. FitzPatrick DR, Carr IM, McLaren L, et al. Identification of SATB2 as the cleft palate gene on 2q32-q33. Hum Mol Genet. 2003; 12 (19): 2491-2501.

10. Wong FK, Hagg U. An update on the aetiology of orofacial clefts. Hong Kong Med J. 2004; 10 (5): 331-336.

11. Sarper SE, Kurosaka H, Inubushi T, et al. Runx1-Stat3-Tgfb3 signaling network regulating the anterior palatal development. Sci Rep. 2018; 8 (1): 11208.

12. Braybrook C, Doudney K, Marçano AC, et al. The T-box transcription factor gene TBX22 is mutated in X-linked cleft palate and ankyloglossia. Nat Genet. 2001; 29 (2): 179-183.

13. Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, et al. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. Nat Genet. 2002; 32 (2): 285-289.

14. Zheng Z, Xie G, Yang T, Qin J. Congenital malformations are associated with secondhand smoke among nonsmoking women: A meta-analysis. Birth. 2019; 46 (2): 222-233.

15. Wyszynski DF, Beaty TH. Review of the role of potential teratogens in the origin of human nonsyndromic oral clefts. Teratology. 1996; 53 (5): 309-317.

16. Källén B. Maternal drug use and infant cleft lip/palate with special reference to corticoids. Cleft Palate Craniofac J. 2003; 40 (6): 624-628.

17. Gordon JE, Shy CM. Agricultural chemical use and congenital cleft lip and/or palate. Arch Environ Health. 1981; 36 (5): 213-221.

18. Shaw GM, Wasserman CR, Lammer EJ, et al. Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor-alpha gene variants. Am J Hum Genet. 1996; 58 (3): 551-561.

19. van Rooij IA, Wegerif MJ, Roelofs HM, et al. Smoking, genetic polymorphisms in biotransformation enzymes, and nonsyndromic oral clefting: a gene-environment interaction. Epidemiology. 2001; 12 (5): 502-507.

20. Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, et al. C677T variant form at the MTHFR gene and CL/P: a risk factor for mothers? Am J Med Genet. 2001; 98 (4): 357-360.

21. Lammer EJ, Shaw GM, Iovannisci DM, Finnell RH. Periconceptional multivitamin intake during early pregnancy, genetic variation of acetyl-N-transferase 1 (NAT1), and risk for orofacial clefts. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2004; 70 (11): 846-852.

22. Kailai N. Identification of a De Novo Heterozygous Missense ACTB Variant in Baraitser–Winter Cerebrofrontofacial Syndrome. In. Vol 13 Front. Genet. 2022: 828120.

23. Kaufman FL. Managing the cleft lip and palate patient. Pediatr Clin North Am. 1991; 38 (5): 1127-1147.

24. Campbell A, Costello BJ, Ruiz RL. Cleft lip and palate surgery: an update of clinical outcomes for primary repair. Oral Maxillofac Surg Clin North Am. 2010; 22 (1): 43-58.

25. Dominguez R, Holmes KC. Actin structure and function. Annu Rev Biophys. 2011; 40: 169-186.

26. Katsuya S, Kenta N, et al. In Situ Observation and Measurement of Actin Stress Fiber Deformation in Stretched Osteoblast like Cell. Adv. biosci. biotechnol. 2017; 8: 421-433.

27. Braga V. Spatial integration of E-cadherin adhesion, signalling and the epithelial cytoskeleton. Curr Opin Cell Biol. 2016; 42: 138-145.

28. Vaezi A, Bauer C, Vasioukhin V, Fuchs E. Actin cable dynamics and Rho/Rock orchestrate a polarized cytoskeletal architecture in the early steps of assembling a stratified epithelium. Dev Cell. 2002; 3 (3): 367-381.

29. Trepat X, Chen Z, Jacobson K. Cell migration. Compr Physiol. 2012; 2 (4): 2369-2392.

30. Ono S. The role of cyclase-associated protein in regulating actin filament dynamics - more than a monomer-sequestration factor. J Cell Sci. 2013; 126 (Pt 15): 3249-3258.

31. Ferguson MW. Palate development. Development. 1988; 103 Suppl: 41-60.

32. Bush JO, Jiang R. Palatogenesis: morphogenetic and molecular mechanisms of secondary palate development. Development. 2012; 139 (2): 231-243.

33. Carette MJ, Ferguson MW. The fate of medial edge epithelial cells during palatal fusion in vitro: an analysis by DiI labelling and confocal microscopy. Development. 1992; 114 (2): 379-388.

34. Cuervo R, Covarrubias L. Death is the major fate of medial edge epithelial cells and the cause of basal lamina degradation during palatogenesis. Development. 2004; 131 (1): 15-24.

35. Aoyama G, Kurosaka H, Oka A, et al. Observation of Dynamic Cellular Migration of the Medial Edge Epithelium of the Palatal Shelf. Front Physiol. 2019; 10: 698.

36. Cuervo R, Valencia C, Chandraratna RA, Covarrubias L. Programmed cell death is required for palate shelf fusion and is regulated by retinoic acid. Dev Biol. 2002; 245 (1): 145-156.

37. Shuler CF, Halpern DE, Guo Y, Sank AC. Medial edge epithelium fate traced by cell lineage analysis during epithelial-mesenchymal transformation in vivo. Dev Biol. 1992; 154 (2): 318-330.

38. Kim S, Lewis AE, Singh V, Ma X, Adelstein R, Bush JO. Convergence and extrusion are required for normal fusion of the mammalian secondary palate. PLoS Biol. 2015; 13 (4): e1002122.

39. Sibbin K, Yap P, Nyaga D, et al. A de novo ACTB gene pathogenic variant in identical twins with phenotypic variation for hydrops and jejunal atresia. Am J Med Genet A. 2022; 188 (4): 1299-1306.

40. Belmont LD, Patterson GM, Drubin DG. New actin mutants allow further characterization of the nucleotide binding cleft and drug binding sites. J Cell Sci. 1999; 112 (Pt 9): 1325-1336.

41. Morton WM, Ayscough KR, McLaughlin PJ. Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. Nat Cell Biol. 2000; 2 (6): 376-378.

42. Spector I, Shochet NR, Kashman Y, Groweiss A. Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. Science. 1983; 219 (4584): 493-495.

43. Yarmola EG, Bubb MR. Profilin: emerging concepts and lingering misconceptions. Trends Biochem Sci. 2006; 31 (4): 197-205.

44. Nejedla M, Sadi S, Sulimenko V, et al. Profilin connects actin assembly with microtubule dynamics. Mol Biol Cell. 2016; 27 (15): 2381-2393.

45. Haarer BK, Brown SS. Structure and function of profilin. Cell Motil Cytoskeleton. 1990; 17 (2): 71-74.

46. Procaccio V. A Mutation of b-Actin That Alters Depolymerization Dynamics Is Associated with Autosomal Dominant Developmental Malformations, Deafness, and Dystonia In. Am J Hum Genet. 2006 Jun; 78(6): 947–960.

47. Miyajima H, Moteki H, Day T, et al. Novel ACTG1 mutations in patients identified by massively parallel DNA sequencing cause progressive hearing loss. Sci Rep. 2020; 10 (1): 7056.

48. Cuvertino S, Stuart HM, Chandler KE, et al. ACTB Loss-of-Function Mutations Result in a Pleiotropic Developmental Disorder. Am J Hum Genet. 2017; 101 (6): 1021-1033.

49. Devany J, Sussman DM, Yamamoto T, Manning ML, Gardel ML. Cell cycle-dependent active stress drives epithelia remodeling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021; 118 (10): e1917853118.

50. Lee S, Fan S, Makarova O, Straight S, Margolis B. A novel and conserved protein-protein interaction domain of mammalian Lin-2/CASK binds and recruits SAP97 to the lateral surface of epithelia. Mol Cell Biol. 2002; 22 (6): 1778-1791.

51. Levayer R, Lecuit T. Biomechanical regulation of contractility: spatial control and dynamics. Trends Cell Biol. 2012; 22 (2): 61-81.

52. Rottner K, Stradal TE. Actin dynamics and turnover in cell motility. Curr Opin Cell Biol. 2011; 23 (5): 569-578.

53. Ridley AJ. Life at the leading edge. Cell. 2011; 145 (7): 1012-1022.

54. Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009; 10 (7): 445-457.

55. Patel RA, Liu Y, Wang B, Li R, Sebti SM. Identification of novel ROCK inhibitors with anti-migratory and anti-invasive activities. Oncogene. 2014; 33 (5): 550-555.

56. Jin JZ, Li Q, Higashi Y, Darling DS, Ding J. Analysis of Zfhx1a mutant mice reveals palatal shelf contact-independent medial edge epithelial differentiation during palate fusion. Cell Tissue Res. 2008; 333 (1): 29-38.

57. Dudas M, Kim J, Li WY, et al. Epithelial and ectomesenchymal role of the type I TGF-beta receptor ALK5 during facial morphogenesis and palatal fusion. Dev Biol. 2006; 296 (2): 298-314.

58. Kitase Y, Shuler CF. Microtubule disassembly prevents palatal fusion and alters regulation of the E-cadherin/catenin complex. Int J Dev Biol. 2013; 57 (1): 55-60.

59. Cai S, Liu X, Glasser A, et al. Effect of latrunculin-A on morphology and actin-associated adhesions of cultured human trabecular meshwork cells. Mol Vis. 2000; 6: 132-143.

60. Wiesner S, Legate KR, Fässler R. Integrin-actin interactions. Cell Mol Life Sci. 2005; 62 (10): 1081-1099.

61. Perelroizen I, Marchand JB, Blanchoin L, Didry D, Carlier MF. Interaction of profilin with G-actin and poly(L-proline). Biochemistry. 1994; 33 (28): 8472-8478.

62. Witke W. The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. Trends Cell Biol. 2004; 14 (8): 461-469.

63. Tanaka Y, Nonaka T, Suzuki G, Kametani F, Hasegawa M. Gain-of-function profilin 1 mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis cause seed-dependent intracellular TDP-43 aggregation. Hum Mol Genet. 2016; 25 (7): 1420-1433.

64. van Ree R, Voitenko V, van Leeuwen WA, Aalberse RC. Profilin is a cross-reactive allergen in pollen and vegetable foods. Int Arch Allergy Immunol. 1992; 98 (2): 97-104.

図表

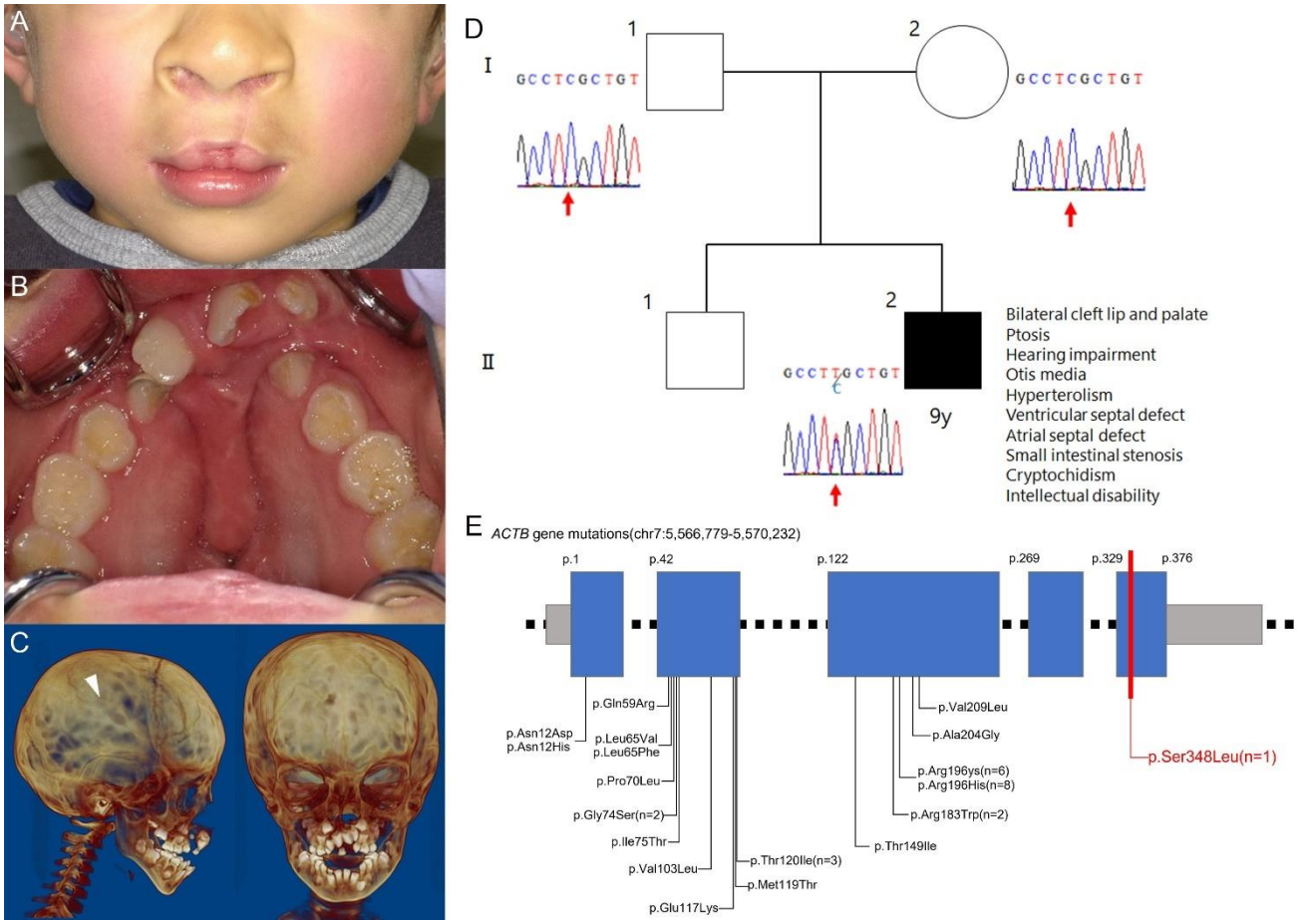


図 1　未診断疾患患者の所見と遺伝子解析結果

A)　顔貌所見　B)　上顎咬合面観

両側性唇顎口蓋裂を認める

C)　CT 像

▷白矢頭：頭蓋骨の菲薄部位を示す

D)　家系図

E)　既報の *ACTB* 変異部位と本患者における変異部位

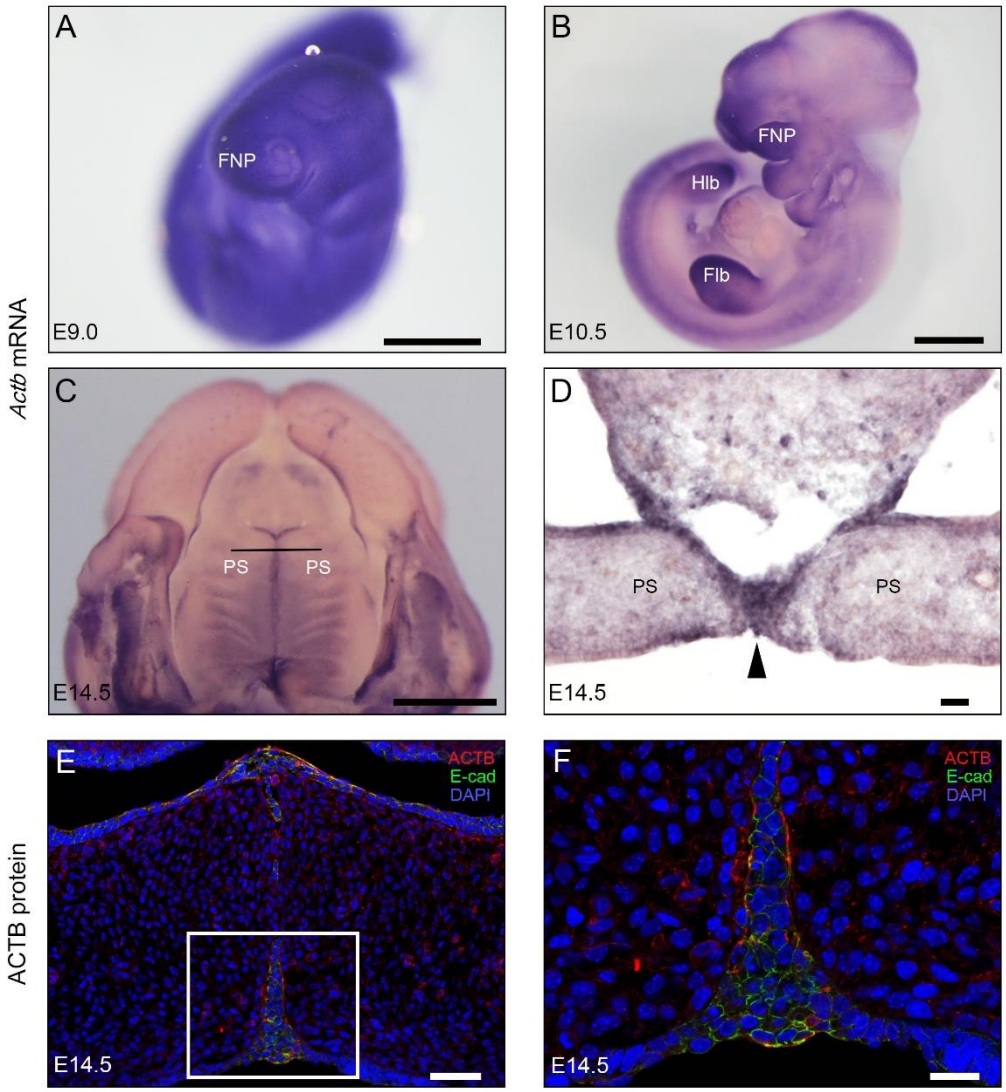


図 2　顎顔面発生段階における部位特異的な *Actb* mRNA・ACTB 蛋白の発現

A)-C)　Whole mount による *In situ* hybridization 染色像

A) 胎生 9.0 日 (Scale bar: 0.5 mm)、B) 胎生 10.5 日 (Scale bar: 1.0 mm)

C) 胎生 14.5 日の口蓋を下方から観察(Scale bar: 1.0 mm)

D)　胎生 14.5 日のマウス胎仔前頭断凍結切片の *In situ* hybridization 染色像 (Scale bar: 50 μm)

▶黒矢頭：口蓋突起癒合部の上皮を示す

E)-F)　野生型マウスにおける前頭断凍結切片における免疫染色の蛍光顕微鏡像

D) Scale bar: 50μm、E) Scale bar: 50 μm、F) Scale bar: 20 μm

F) E)□部位の拡大像を示す

赤: ACTB、緑: E-cadherin、青: DAPI を示す

FNP, front nasal process; Flb, forelimb bud; Hlb, hind limb bud; PS, palatal shelf

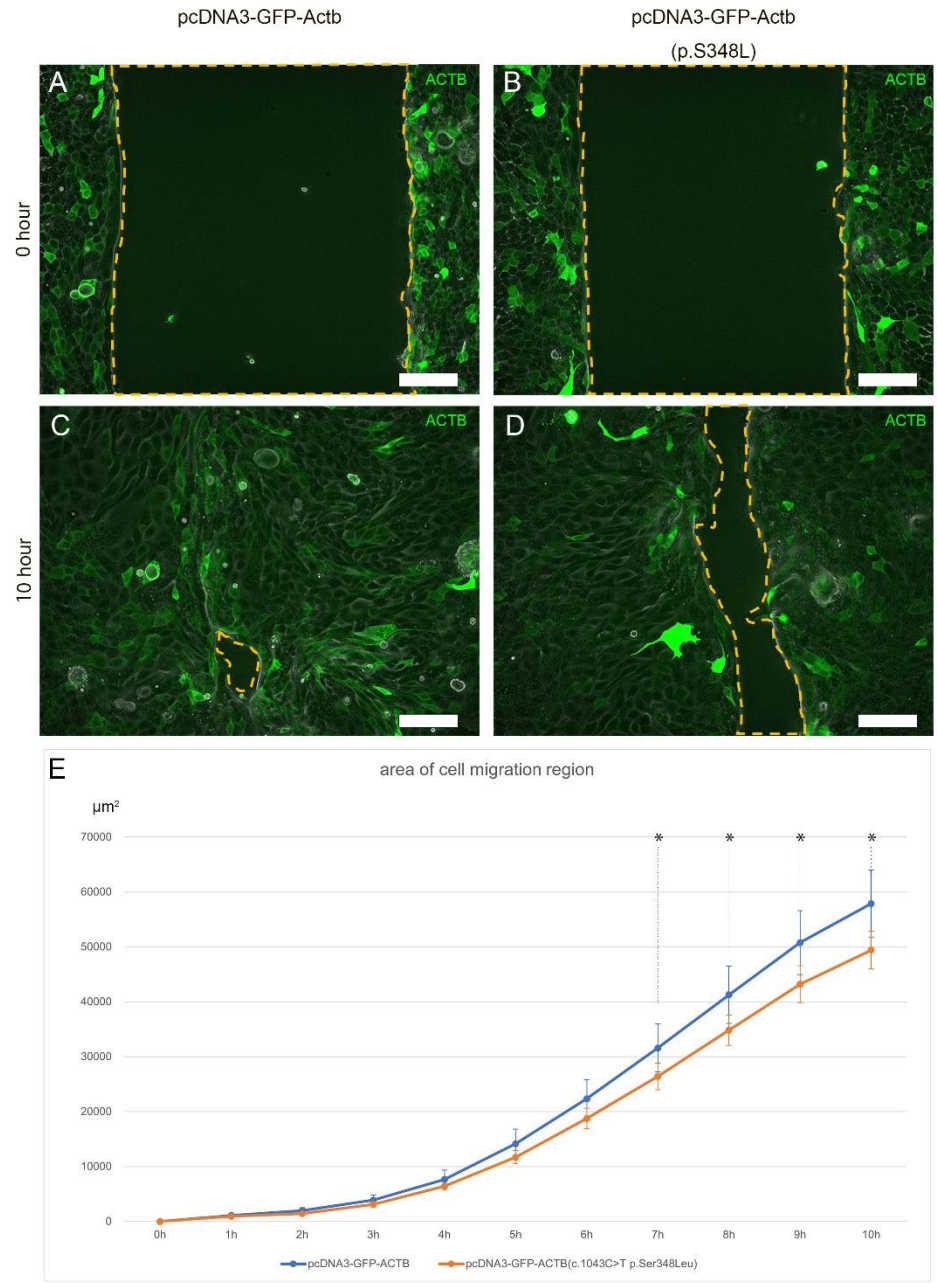


図 3　変異 ACTB (p.S348L) を強制発現させた MDCK 細胞における細胞遊走

A)-D)　ライブイメージング観察における MDCK 細胞の遊走 (Scale bar: 50 μm)

A), C) 野生型細胞群 (A: 0 時間, C: 10 時間)、B), D) 変異型細胞群 (B: 0 時間, D: 10 時間)

黄色線の領域は細胞がない領域を示す

緑: ACTB を示す

E)　細胞移動によって埋められた面積の比較

各サンプル n=9 (同様の実験を 3 回行い、それぞれ 3 か所を撮影し計測) , *: P<0.05

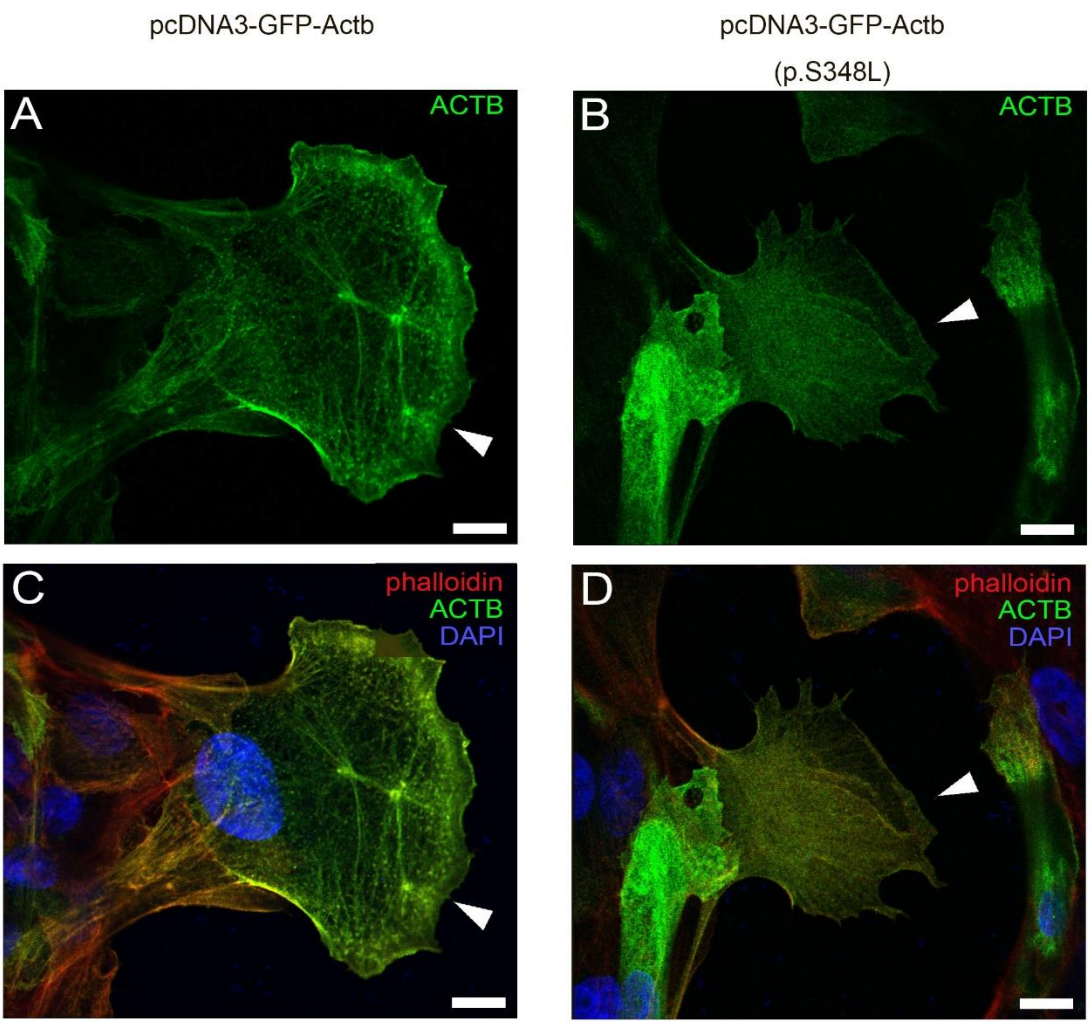


図 4　変異 ACTB (p.S348L) を強制発現させた MDCK 細胞における細胞動態

A)-D)　細胞遊走時の MDCK 細胞の蛍光顕微鏡像 (Scale bar: 10 mm)

A), C) 野生型細胞群、B), D) 変異型細胞群

▷白矢頭：ラメリポディアの形成異常を有する ACTB 陽性細胞を示す

赤: Phalloidin、緑: ACTB、青: DAPI を示す

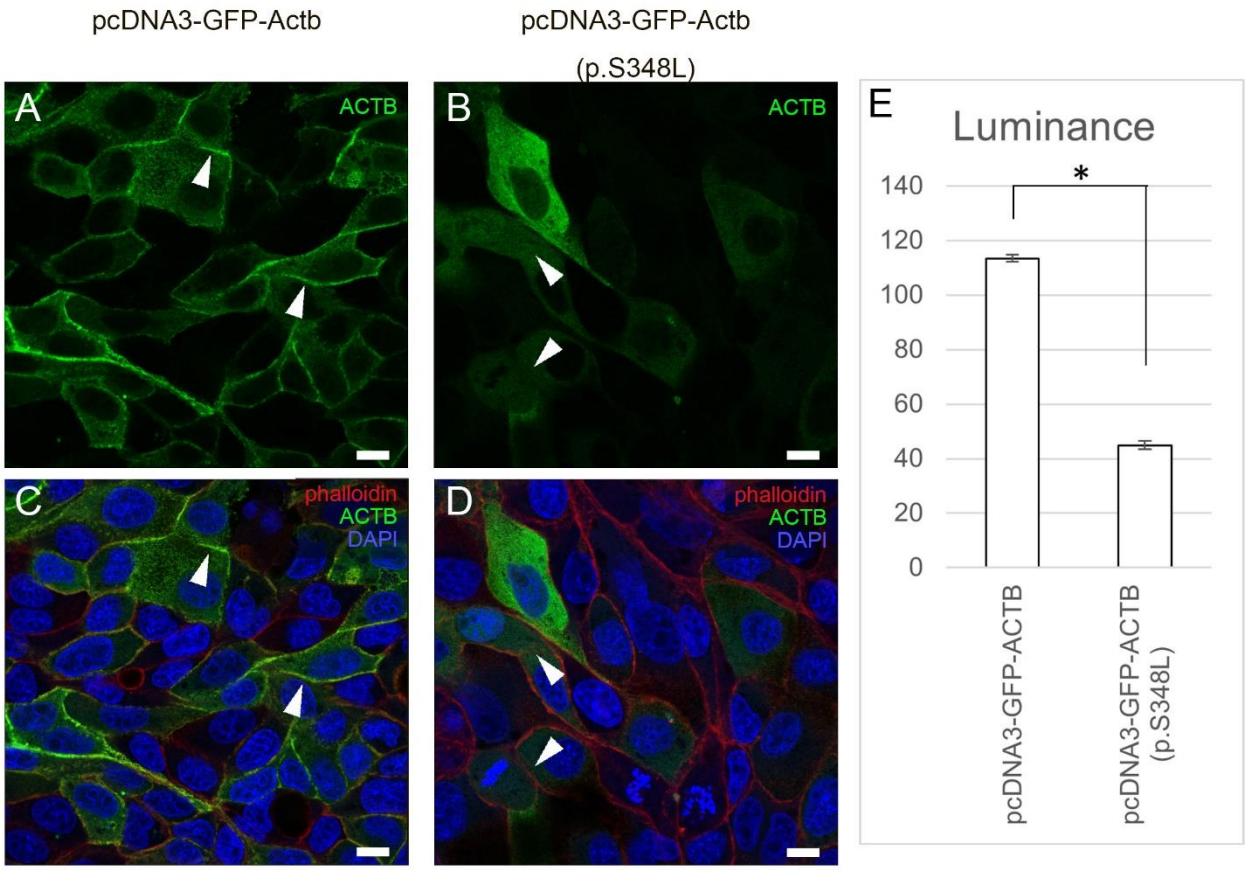


図 5　変異型 ACTB (p.S348L) を強制発現させた MDCK 細胞における変異型 ACTB の局在

A)-D)　強制発現後、細胞染色を行った MDCK 細胞の蛍光顕微鏡像 (Scale bar: 10 mm)

A), C) 野生型細胞群、B), D) 変異型細胞群

▷白矢頭：ACTB 陽性細胞間の結合部を示す

赤: Phalloidin、緑: ACTB、青: DAPI を示す

E)　ACTB 陽性細胞間における GFP 輝度の比較

n=9 (同様の実験を 3 回行い、それぞれ 3 か所を撮影し計測) , *: P<0.05

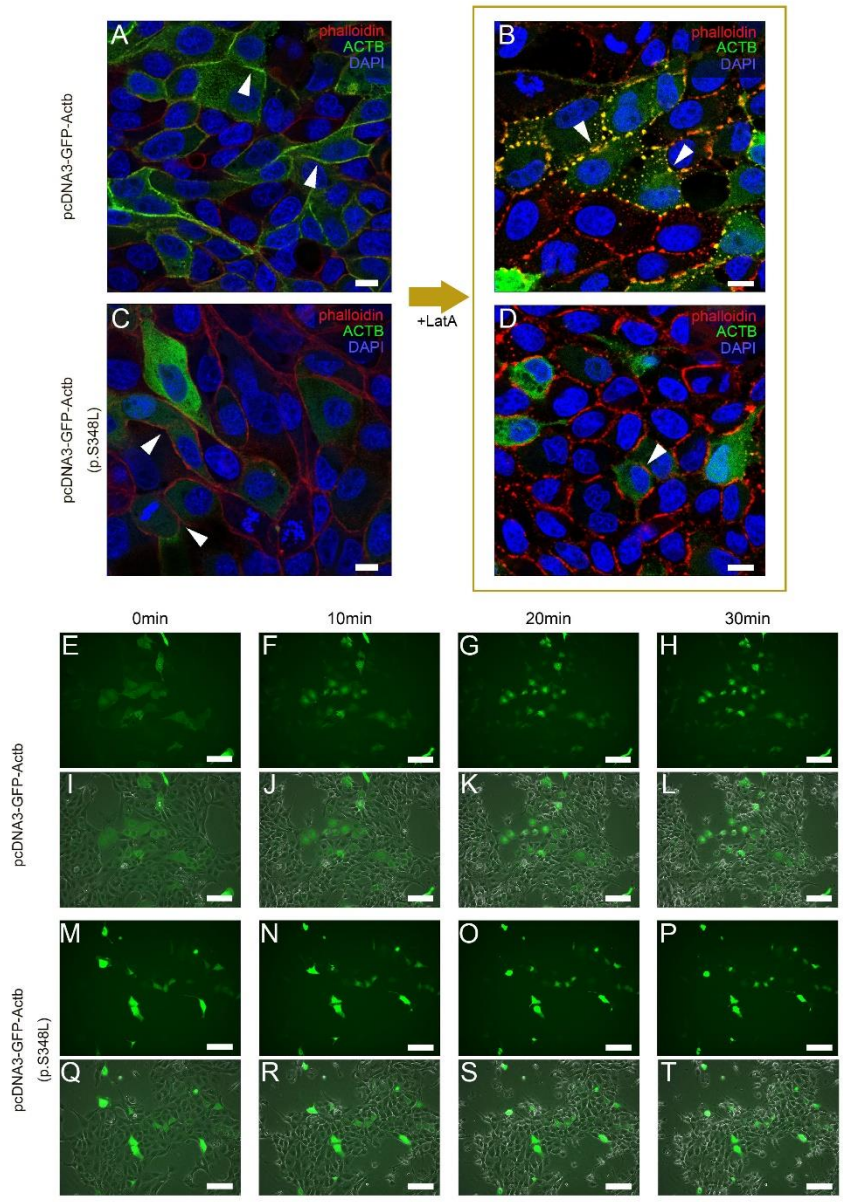


図 6　変異型 ACTB (p.S348L) を強制発現させた MDCK 細胞に対する LatrunculinA 処理後の経時的観察

A)-D)　LatrunculinA 処理前後の蛍光顕微鏡像 (bar: 10 μm)

A)-B) 野生型細胞群、C)-D) 変異型細胞群

▷ 白矢頭：ACTB 陽性細胞間の結合部を示す

赤: Phalloidin、緑: ACTB、青: DAPI を示す

E)-T)　LatrunculinA 処理後の経時的な蛍光顕微鏡像 (bar: 50 mm)

E)-L) 野生型細胞群、M)-T) 変異型細胞群

E-H, M-P) 蛍光像のみ、I-L, Q-T) 蛍光像＋明視野

緑: ACTB を示す

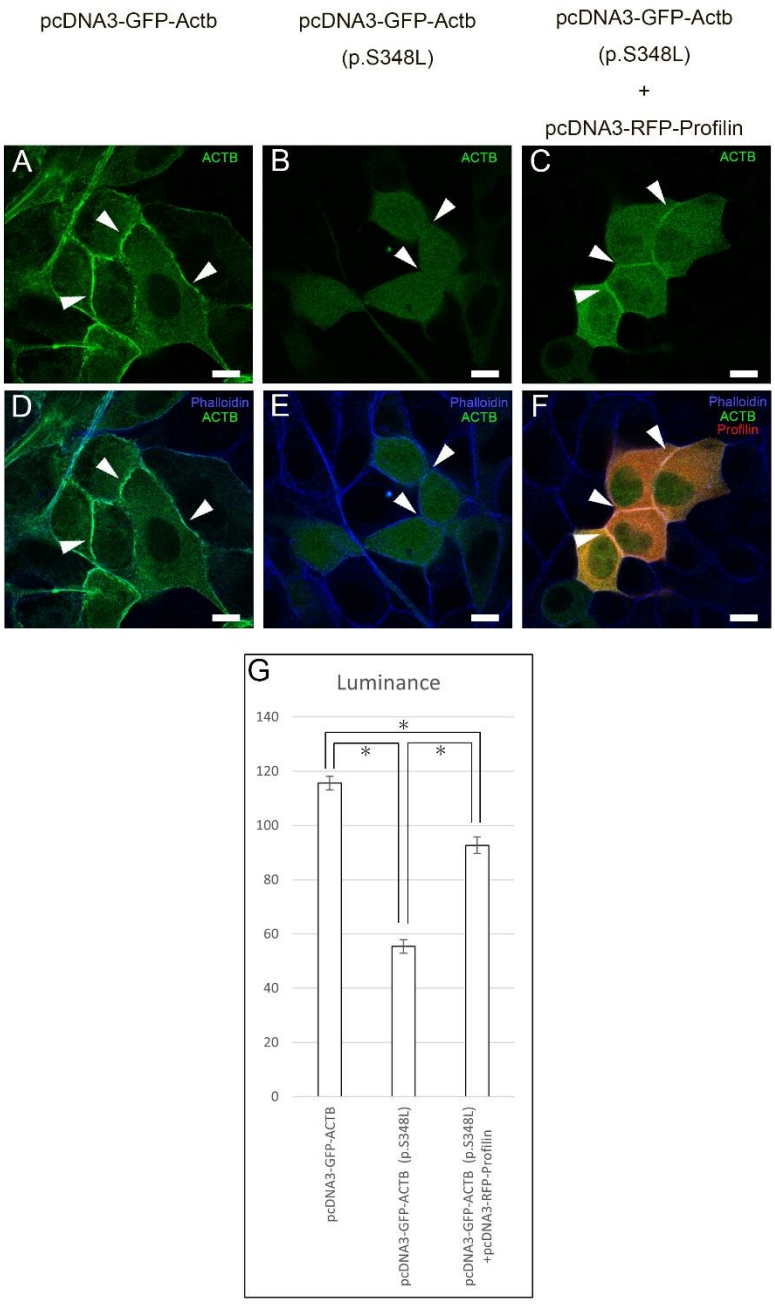


図 7　変異型 ACTB (p.S348L) とともに Profilin を強制発現させることによる細胞間局在への影響の観察

A)-F)　強制発現後、細胞染色を行った MDCK 細胞の蛍光顕微鏡像 (bar: 10 mm)

A), D) 野生型細胞群、B), E) 変異型細胞群、C), F) Profilin を強制発現させた変異型細胞群

▷白矢頭：ACTB 陽性細胞間の結合部を示す

赤: Profilin、緑: ACTB、青: Phalloidin を示す

G)　ACTB 陽性細胞間における GFP 輝度の比較

n=9 (同様の実験を 3 回行い、それぞれ 3 か所を撮影し計測) , *: P<0.05