

171. ヒアルロン酸を標的にした口腔疾患への新たな取り組み

犬伏 俊博

大阪大学 大学院歯学研究科 顎顔面口腔矯正学教室

Key words : ヒアルロン酸, Tmem2, 神経堤細胞, 頭蓋顎顔面, 先天異常

緒言

グリコサミノグリカン糖鎖 (以下、GAG 糖鎖) であるヒアルロン酸は機能性糖鎖と呼ばれ、特に胚発生時において羊水や胎児組織で豊富に存在しているため、ヒアルロン酸を介した細胞機能、特に細胞移動 (遊走) の制御が器官形成には極めて重要であると考えられているが、その詳細については明らかになっていない。近年、ヒアルロン酸の合成・分解異常により口蓋裂や小顎症といった頭蓋顎顔面の先天異常が引き起こされることが明らかになってきており [1]、ヒアルロン酸が頭蓋顎顔面の形態形成に深く関わっていることは疑いが無いが、その分子機構については国内外において未だ明らかにされていない。本研究では、ヒアルロン酸合成酵素 2 (HAS2) の頭蓋顎顔面特異的 (Wnt1-Cre) コンディショナルノックアウトマウス (以下、ホモ変異体; Has2^{flx}:Wnt1-Cre、ヘテロ変異体; Has2^{flw}:Wnt1-Cre) の胎児を作製し用いた。対照群には同腹兄弟 (Has2^{flx}、Has2^{flw}) を用いた。摘出した胎児は実体顕微鏡下での観察に加え、造影剤を用いたマイクロ CT 撮影により形態学的解析を行った。

方法

1. コンディショナルノックアウトマウス作製と形態学的解析

これまでに Matsumoto らは、ヒアルロン酸合成酵素 2 (以下、Has2) の四肢特異的コンディショナルノックアウトマウスを作製し、関節軟骨の形成異常による四肢の著しい短小化が認められることを報告している [2]。そこで、本実験では、HAS2 (Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute、山口祐先生より供与) の頭蓋顎顔面特異的 (Wnt1-Cre、東京医科歯科大学、井関先生から供与) コンディショナルノックアウトマウス (以下、ホモ変異体; Has2^{flx}:Wnt1-Cre、ヘテロ変異体; Has2^{flw}:Wnt1-Cre) の胎児を作製し用いた。対照群には同腹兄弟 (Has2^{flx}、Has2^{flw}) を用いた。摘出した胎児は実体顕微鏡下での観察に加え、造影剤を用いたマイクロ CT 撮影により形態学的解析を行った。

結果

1. Has2 遺伝子は胎生 9.5、10.5 日齢において顔面領域に発現する

胎生 9.5 日 (E9.5)、10.5 日 (E10.5) 齢の野生型マウス胎児における Has2 遺伝子の発現を *In situ* hybridization 法にて解析した結果、E9.5 では顔面突起 (FP)、第一鰓弓 (PA1)、第二鰓弓 (PA2)、後根神経節 (DRG) において発現が見られた。E10.5 では E9.5 に比べて発現は強くなっており、顔面突起 (FP)、第一鰓弓 (PA1)、第二鰓弓 (PA2) などで強発現が認められた (図 1)。

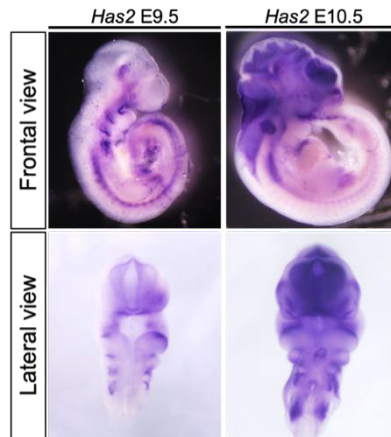


図 1. *Has2* 遺伝子は胎生 9.5、10.5 日齢において顔面領域に発現する
In situ hybridization 法による *Has2* mRNA 発現パターン。上段は側面観、
下段は正面観。

2. 顎顔面特異的 (Wnt1-Cre) *Has2*CKO マウスは小顎症を含む種々の顔面奇形を呈する

面特異的 *Has2*CKO マウス (CKO) は、出生後すぐに死亡することが分かった。E18.5 においては、上下顎の著しい劣成長が認められた (図 2A)。その他、眼の異常、外脳症などといった種々の顔面奇形を認めた。E16.5 においても CKO では、既に著明な上下顎骨の低形成 (矢頭) を認めた (図 2B)。一部では目の形成不全 (矢印) や外脳症 (データ示さず) を認めた。図 2C には E18.5 にて取り出した遺伝子型 (Genotype) の一覧を示した。ホモノックアウトマウス (Homozygote) はメンデルの法則での予測値より低い出生率を示し、一部は胎生初期において致死であると考えられた。

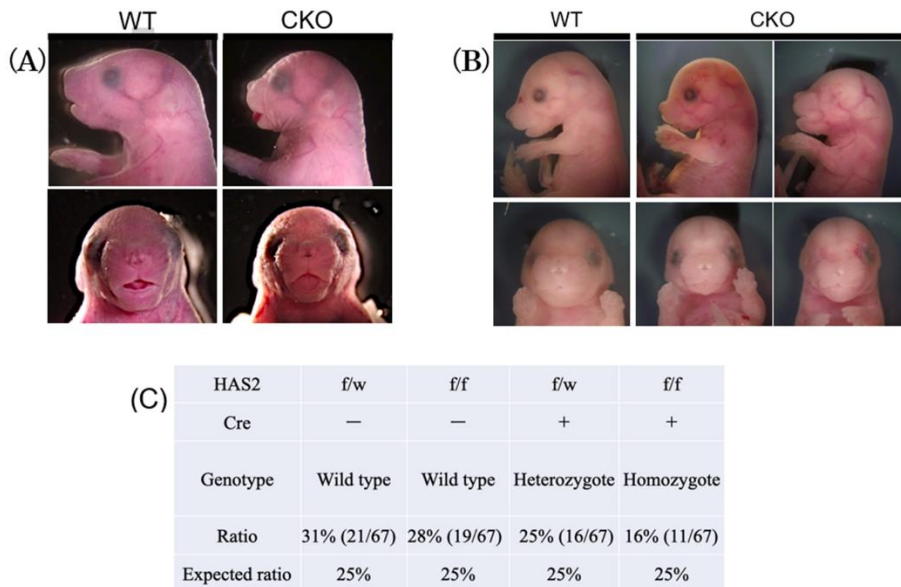


図 2. 顎顔面特異的 (Wnt1-Cre) *Has2*CKO マウスは小顎症を含む種々の顔面奇形を呈する

- A) E18.5 の野生型 (WT) ならびに顎顔面特異的 *Has2* コンディショナルノックアウトマウス (CKO) の正面観ならびに側面観。
B) E16.5 の野生型 (WT) ならびに顎顔面特異的 *Has2* コンディショナルノックアウトマウス (CKO) の正面観ならびに側面観。
C) 遺伝子形と出生個体数の表。

3. 顎顔面特異的 *Has2*CKO マウスは完全口蓋裂を発症する

E15.0 においても CKO において上下顎の劣成長が認められた (図 3A)。野生型マウス (WT) では E14.5 から E15.0 にかけて 2 次口蓋の癒合が起こるが、CKO では癒合が起こらず、全例において完全口蓋裂を発症することが明らかとなった (図 3B)。下段には DAPI 染色を行った E15.0 の上顎を示している。

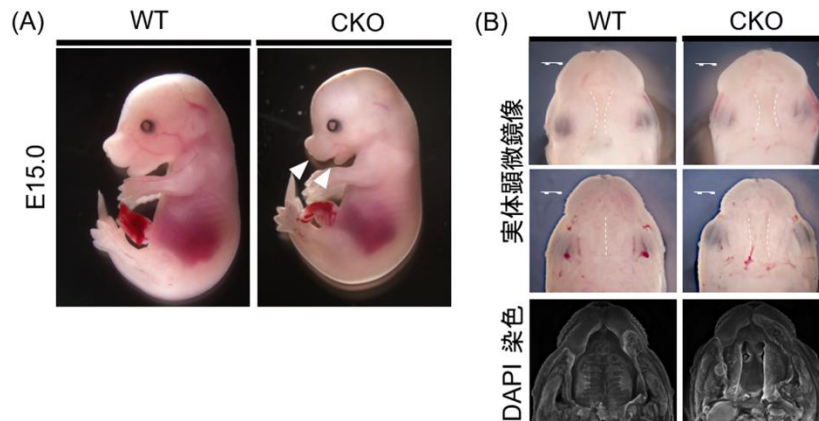


図 3. 顎顔面特異的 *Has2*CKO マウスは完全口蓋裂を発症する

- A) E15.0 の野生型 (WT) ならびに顎顔面特異的 *Has2* コンディショナルノックアウトマウス (CKO) の側面観。上下顎の劣成長を認める (矢印)。
- B) E15.0 の野生型 (WT) ならびに顎顔面特異的 *Has2* コンディショナルノックアウトマウス (CKO) の上顎の咬合面観。上段は実態顕微鏡像。下段は DAPI 染色像。CKO は完全口蓋裂を示す。

4. 顎顔面特異的 *Has2*CKO マウスは歯の形成異常を伴う

出生直後における WT と CKO マウスをマイクロ CT にて撮影し、全身の表現形をスクリーニングした (図 4A)。その結果、腸管に液体の貯留を認めた (矢印)。矢状断面から、上下顎臼歯や上下顎切歯の形成について解析した (図 4B)。その結果、上下顎臼歯や上下顎切歯はいずれも CKO において小さく、上下顎臼歯の咬頭の形態異常を認めた。前頭断面から、CKO では口蓋裂 (Asterisk)、舌の形態異常ならびに上下顎臼歯の形態異常が確認できた (図 4C)。

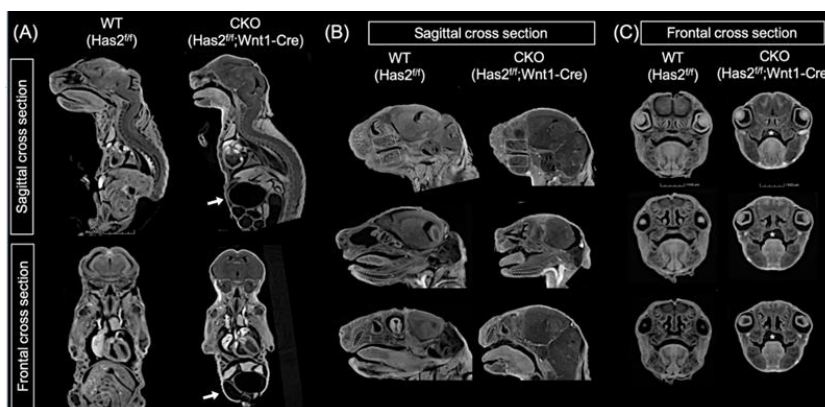


図 4. 顎顔面特異的 *Has2*CKO マウスは歯の形成異常を伴う

マイクロ CT による全身スクリーニングの結果。

- A) E18.5 の野生型 (WT) ならびに顎顔面特異的 *Has2* コンディショナルノックアウトマウス (CKO) の側面観。腸管に液体の貯留を認めた。
- B、C) E18.5 の野生型 (WT) ならびに顎顔面特異的 *Has2* コンディショナルノックアウトマウス (CKO) の側面観 (B) ならびに正面観 (C)。CKO は完全口蓋裂を示す。

考 察

本研究では、顎顔面形成を担う神経堤細胞において Cre を発現する Wnt1-Cre マウスを用いて、*Has2* をノックアウトした。結果として、胎生致死、上下顎の形成異常、眼の形成不全、外脳症、腸管神経系の異常を疑う所見や口蓋裂を認めた。これらの異常は神経堤細胞の遊走能の異常を示唆するものであり、さらに、ヒアルロン酸は胎生初期に細胞外基質として胎児組織に大量に存在していることから、ヒアルロン酸が胚発生において神経堤細胞の遊走や増殖に重要な働きをしていることを示している。

口蓋裂や小顎症といった頭蓋顎顔面形成異常は多因子性の疾患であり、ヒアルロン酸の合成・分解の異常は口蓋裂や小顎症といった頭蓋顎顔面形成異常の原因の一つとなっている可能性がある。今後、さらなる詳細な解析によりヒアルロン酸の合成・分解異常を標的にした新規治療法の開発が期待される。

文 献

- 1) Matsumoto K, Li Y, Jakuba C, Sugiyama Y, Sayo T, Okuno M, Dealy CN, Toole BP, Takeda J, Yamaguchi Y, Kosher RA. Conditional inactivation of *Has2* reveals a crucial role for hyaluronan in skeletal growth, patterning, chondrocyte maturation and joint formation in the developing limb. *Development* 136 (2009) 2825-2835. PMID: 19633173. PMCID: PMC2730409. DOI: 10.1242/dev.038505
- 2) Muggenthaler MM, Chowdhury B, Hasan SN, Cross HE, Mark B, Harlalka GV, Patton MA, Ishida M, Behr ER, Sharma S, Zahka K, Faqeih E, Blakley B, Jackson M, Lees M, Dolinsky V, Cross L, Stanier P, Salter C, Baple EL, Alkuraya FS, Crosby AH, Triggs-Raine B, Chioza BA. Mutations in *HYAL2*, Encoding Hyaluronidase 2, Cause a Syndrome of Orofacial Clefting and Cor Triatriatum Sinister in Humans and Mice. *PLoS Genet* 13 (2017) . PMID: 28081210. PMCID: PMC5230738. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006470