

## 論文名 : Cleft Palate Caused by Ectopic Bone Formation in Mutation of Intraflagellar Transport Protein

新潟大学大学院医歯学総合研究科

氏名 渡部 桃子

口蓋裂は最も頻度の高い先天異常の一つである。これは口蓋形成がわずかな分子変動にも反応する敏感な器官であることを意味し、口蓋の正常発生過程における分子制御の詳細な把握が必須となる。一次繊毛は脊椎動物のほとんどの体細胞に存在する細胞小器官で、様々なシグナルの活性化に関わることが知られている。一次繊毛の機能異常による疾患は繊毛病と総称され、多くの繊毛病患者に口蓋裂が認められる。しかし一次繊毛の口蓋形成における役割は未だ不明のままである。そこで本研究では、一次繊毛の構成タンパクの一つである *Ift88* 欠損マウスを作成し、一次繊毛の口蓋形成での機能を検索した。

全細胞で *Ift88* を欠損させたマウスは、口蓋発生開始前の胎生初期に致死となるため、上皮組織特異的 *Ift88* 欠損マウス (*Ift88<sup>fl/fl</sup>;K14Cre*)、神経堤由来間葉組織特異的 *Ift88* 欠損マウス (*Ift88<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre*)、口蓋突起特異的 *Ift88* 欠損マウス (*Ift88<sup>fl/fl</sup>;Osr2-IresCre*) を作製し、形態学的、分子生物学的検索を行った。

*Ift88<sup>fl/fl</sup>;K14Cre* に口蓋裂は観察されなかったのに対し、全ての *Ift88<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre* で口蓋裂が認められた。口蓋の前方から後方にかけての全ての領域で口蓋裂が確認され、組織学的検索から口蓋突起の伸長の停止により口蓋裂が引き起こされることが明らかになった。神経堤細胞の口蓋領域への遊走に異常は認められなかった。口蓋突起における細胞増殖に変化は確認されなかったものの、アポトーシスの異常亢進が認められた。シグナル経路活性を確認すると、Shh シグナルの活性が有意に低下していた。そこで、Shh シグナルの間葉組織特異的欠損マウス (*Smo<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre*) を作製したところ、口蓋突起の伸長阻害による口蓋裂と、アポトーシスの亢進を認めた。*Ift88<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre*、*Smo<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre* マウスともに、アポトーシスによる口蓋突起伸長阻害が疑われたため、アポトーシスを誘導する因子である p53 の阻害剤 (pifithrin- $\alpha$ ) の投与を行ったところ、*Smo<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre* マウスの後方の口蓋裂の改善が認められた。しかし、*Ift88<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre* マウスの口蓋裂に、pifithrin- $\alpha$  投与による変化は観察されなかった。顔面頭蓋領域全体から *Ift88* を欠損させた *Ift88<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre* マウスには、口蓋以外の顔面頭蓋領域にも形態異常を認めるため、それらの異常により、口蓋裂が二次的に発生した可能性がある。そこで、口蓋突起特異的に *Ift88* を欠損させた *Ift88<sup>fl/fl</sup>;Osr2-IresCre* マウスを作製したところ、*Ift88<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre* と同様に口蓋裂が確認された。*Ift88<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre* マウス、*Ift88<sup>fl/fl</sup>;Osr2-IresCre* マウス共に、発生初期において、後方の口蓋突起相当領域に *Runx2* (骨芽細胞分化マーカー) の異所性の発現を認め、その後に異所性の骨形成が観察された。そこで、骨形成を抑制させるために、*Runx2* siRNA を作用させた所、*Ift88<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre* マウスの後方の口蓋裂が改善された。

## 【別紙2】

全ての *Ift88<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre* マウスで口蓋裂が認められたことから、間葉における *Ift88* が、口蓋形成に必須のものであることが示された。pifithrin- $\alpha$  投与により、*Smo<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre* マウスの後方の口蓋裂が改善されたものの、*Ift88<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre* マウスの口蓋裂に変化は認められなかった。このことは、*Ift88<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre* マウスにおいて認められた Shh シグナルの有益な減少やアポトーシスの亢進は、*Ift88* 欠損マウスの口蓋裂の原因でないことを示している。*Ift88<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre* の口蓋後方における *Runx2* の異所性発現と、それに続く異所性の骨形成、さらに *Runx2* siRNA の投与による口蓋裂の改善は、*Ift88<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre* の口蓋裂の原因が異所性の骨形成であることを示している。異所性の骨形成の認められた領域では、口蓋突起のマーカー遺伝子の発現が消失しており、間葉の *Ift88* の欠損により、口蓋突起間葉細胞が骨芽細胞へと転換され、口蓋突起細胞としての機能を失ったことが示唆される。一次繊毛の骨形成への関与は過去にも多数報告されている。本研究結果から、*Ift88* を介した一次繊毛の口蓋突起形成における機能は、間葉細胞の骨芽細胞への分化抑制により、正常な口蓋形成の誘導に関与することであることが明らかとなった。一方、それらとは別の *Ift88* の機能が前方の口蓋形成に関与することも示唆された。