口蓋の形成におけるメカニカルストレスの影響

永田 倭代

#### 緒言

頭蓋顔面の発生には多数の遺伝子及びその転写産物が関与しており,これらの発現は時 間・空間的に精妙に制御されている.様々な外的ストレスや遺伝子変異,外来性の催奇形 因子により,この遺伝子発現の調和が破綻すると,先天性奇形を引き起こす.なかでも唇顎 口蓋裂は,頭蓋顔面における先天性奇形の中でも高頻度に発症する事が知られている<sup>1)</sup>.

口蓋は、左右の口蓋突起の垂直的な成長、舌上での挙上、正中方向への伸展、正中部での 癒合、癒合後の三次元的な成長により形成される組織であり<sup>2)</sup>、口蓋突起の癒合不全により 口蓋裂が引き起こされることが報告されている<sup>3)</sup>. 口蓋の形成は複雑な一連のシグナル伝 達によって制御されており、口蓋突起の癒合には transforming growth factor beta (Tgf $\beta$ ) が密接に関与している事が古くから報告されている<sup>4)</sup>. 中でも Tgf $\beta$ 3 は口蓋突起癒合部の 上皮消失に関与しているとの報告<sup>5)</sup>があり、細胞増殖に関与していることで知られる $\beta$ catenin は、この Tgf $\beta$ 3 の発現を制御することにより口蓋突起の癒合に関与していること が報告されている<sup>6)</sup>. また、口蓋突起の伸長には sonic hedgehog (Shh) が正のフィードバ ックを介して fibroblast growth factor 10 (Fgf10)の発現を制御し、細胞増殖を制御してい ることも報告されている<sup>7)</sup>.

ロ蓋突起の癒合不全は遺伝子発現の変異以外に,環境要因の関与が指摘されている<sup>8)</sup>.重 度身体障害者の妊婦では,低出生体重児が出生する頻度が高く<sup>9)</sup>,低出生体重児では唇顎口 蓋裂の発症率が高いことが報告されている<sup>10)</sup>.重度身体障害者の妊婦では,妊娠中に胎児 に与えるメカニカルストレスが小さいと考えられることから,これらの点を総合すると, 母体の運動により生じる適度なメカニカルストレスは,全身の臓器組織の発育に密接に関 与しており,正常な口蓋形成においても重要な役割を果たす可能性があると考えられる.

メカニカルストレスの伝達経路は、その1つに Hippo 経路が挙げられる. Hippo 経路は yes-associated protein/transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (YAP/TAZ)が 核内移行することにより、細胞の分化や器官サイズの制御、再生などの多くの生物学的プ ロセスを制御する、組織発生に重要な制御機構である<sup>11)</sup>. この核内移行には YAP/TAZ の 脱リン酸化が必要であり, YAP/TAZ のリン酸化が進んだ場合, ユビキチン化され, 分解さ れることによりその量は制限される<sup>12)</sup>.また, 細胞外マトリックスの1つであるインテグ リンは, 細胞接着機構からメカニカルストレスを受容することより, YAP/TAZ の活性化を 調節し, メカニカルストレスの細胞内部への伝達に関与している事が報告されている<sup>13)</sup>.

メカニカルストレスは、組織の形成に関与することが数多く報告されている. 口蓋と関 わりの深い頭蓋顔面の形成では、歯胚形成において、細胞増殖速度の差により生じるメカ ニカルストレスが歯胚の形態を制御すること<sup>14)</sup>、頭蓋骨の成長において、脳の成長により 頭蓋骨に与えるメカニカルストレスが、頭蓋骨縫合部の骨形成を促進することなどが報告 されている<sup>15)</sup>. 口蓋においては、ヒアルロン酸の蓄積や YAP/TAZ による細胞外マトリッ クスのリモデリング、アクトミオシンの収縮により生じる内因性のメカニカルストレスが 口蓋突起の垂直的な伸展に関与している事が示唆されている<sup>16)</sup>. また、左右の口蓋突起の 癒合においては、アクトミオシンの収縮や、Piezo イオンチャネルの調節により生じる内因 性のメカニカルストレスが関与する可能性についても報告されている<sup>17)</sup>. しかし、これら は胎児の口蓋組織内部で発生する内因性のメカニカルストレスに関する報告であり、母体 の運動により生じる外因性のメカニカルストレスが口蓋形成において、どのような影響を 与えるのか、その詳細は明らかになっていない. そこで、本研究では口蓋の発生段階におけ る一連の流れのうち、口蓋突起の挙上後の水平方向への成長に注目し、母体の運動に起因 する外因性のメカニカルストレスを実験的に再現し、メカニカルストレスが口蓋形成に与 える影響について解明する事を目的とした.

#### 材料ならびに方法

## 1. 口蓋組織の器官培養およびメカニカルストレスの計測

本研究は、岡山大学動物実験委員会承認 (OKU-2020705) のもと実施した. 妊娠 ICR マウス (CLEA, Tokyo, Japan) を二酸化炭素及び断頭法にて安楽死させた後, 13.5 及び 14.5 日齢 のマウス胎児を断頭法にて安楽死させ、胎児の口蓋組織を取り出し、組織培養、及び組織学 的解析に供した. 13.5 日齢は 17 匹, 14.5 日齢は 18 匹のマウス胎児を用いた. 回収した組織を 既報の論文<sup>18)</sup>を参考に、加温加湿の環境下 (37 ℃, 酸素 95 %, 二酸化炭素 5 % の混合 気体) で、メカニカルストレスを負荷しない unload 群と負荷する load 群に分け, 24 時間器 官培養を行い、外因性メカニカルストレスの口蓋形成への影響を観察することとした. 培

養に使用した組織は,器官培養時に組織内部まで酸素を行き渡らせるため、マウス胎児の 頭蓋底から上顎までの範囲を含む組織を一塊として摘出した.通常の培養では培養液への 空気の循環及び培養組織の浮遊のため、培養時に回転培養器を用いるが、本研究では unload 群は通常通り回転培養器 (Rotary mixer NRC-200, Nissin, Shinonome, Hiroshima, Japan), load 群では振盪器 (振動数: 1 回/秒, Sunflower mini-shaker, Funakoshi, Hongo, Tokyo, Japan)を用いて培養した (図 1A).培養は組織培養用 25 mL フラスコ (Tissue Culture Flask Canted Neck Blue Vented Cap; Corning Incorporated, Corning, NY, USA)中に口蓋 組織及び 10 mL の BGJbメディウム (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)を入れて 行った.また,振盪の強度に関しては、培養液水面に生じる、波の高さと 1 分間に計測され る波の回数を測定し、算出された波の大きさと波の周期から、波エネルギーとして組織に 加えられたメカニカルストレスを算出した (図 1B).波エネルギー (P) は P=pg<sup>2</sup>H<sup>2</sup>T/32  $\pi$ (P: 波エネルギー (W/s), p: 比重, g: 重力加速度, H: 波の高さ (m), T: 周期 (秒))で求め, p=1, g=9.8 (m/s<sup>2</sup>) として算出した <sup>19)</sup>.さらに W=1/4.184s (cal) が成り立つことから、波エネ ルギーをカロリーに換算し, 1 分間のウォーキングにより消費されるエネルギーを 3.0 kcal としてヒトで消費されるエネルギーに換算し、メカニカルストレスの大きさを評価した.

#### 2. Micro CT 撮影

14.5 日齢のマウス胎児を 24 時間器官培養後, Micro CT 撮影を行い, unload 群と load 群にて 口蓋の体積を比較することとした.本研究の観察組織は軟組織であることから, Micro CT 撮 影画像の明瞭化のため, 組織を製造元のプロトコルに従って造影剤にて染色し, 撮影を行 った. すなわち, 15 mL チューブに, 精製水にて希釈した 1% リンタングステン酸溶液 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 7%エタノールを入れ, リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, Thermo) で希釈した 4 %パラホルムアルデヒド溶液 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) に て固定した組織を 24 時間常温で染色した.染色後は流水にて洗浄の後, 7%エタノール中で 保管し, Micro CT (Skyscan 1174, Brucker, Kontich, Belgium)を用いて撮影を行った.撮影は lpixel=12.9 $\mu$ m, ピーク電圧 50 kV, ピーク電流 800 mA で, 0.5 mm のアルミニウムフィルタ ーを使用し,撮影した.SkyScan ソフトウェア (NRecon, CTAn, Dataviewer, Belgium)を使用 し, unload 群, load 群共に, 0.1 mm<sup>2</sup>の長方形を関心領域と設定し,前頭断にて二次口蓋が確 認された地点から後方に 1.1 mm, 撮影された 88 枚の画像を解析し, 関心領域に対するエ ックス線不透過像を示す, 口蓋突起部の体積の割合を計測し,比較解析した.

#### 3.免疫組織化学的解析

口蓋組織へのメカニカルストレス負荷が、細胞増殖および、古典的 Wnt/β-catenin 経路 との関与が示唆される骨芽細胞マーカー<sup>20)</sup>の発現に与える影響を比較するため, phosphohistone H3 及び Osterix に対する免疫組織化学的解析を行った.器官培養後の組織は河本ら の方法<sup>21)</sup>に準じて、リン酸緩衝生理食塩水で希釈した4%パラホルムアルデヒド溶液にて 固定後, スクロース置換し, Tissue-Tek O.C.T compound (Sakura Finetek, Torrance, California, USA)を用いて凍結包埋した. さらに、 クライオスタット(CM3050S, Leica, Tokyo)を用いて フィルム法<sup>22)</sup>にて厚さ 6.0 μm の切片を作製した. 観察面は前頭断面とし, 切歯孔から後 方へ 500 μmの領域の連続切片を作製した. 作成した切片をランダムに選出し (選出枚数 は各図説に記載),リン酸緩衝生理食塩水で希釈した 0.3%triton X にて活性後, PBS で希釈 した4 %パラホルムアルデヒド溶液にて後固定し, Blocking One histo (Nacalai Tesque)を用 いて 10 分間ブロッキングした. 一次抗体を4 ℃にて一晩反応させ, 二次抗体を室温で1時 間反応させた. 加えて, 核染色のため, Hoechst<sup>®</sup>(Thermo Scientific, #33342) を 10 分間反応さ せ、フィルムをスライドガラス (Matsunami, Osaka, Japan) に回収し, Dako Fluorescence Mounting Medium (Agilent, LA, USA) にて封入し、カバーガラス (Matsunami) にて固定し た. 撮影は共焦点レーザー顕微鏡 LSM780 (Carl-Zeiss-Promenade, Jena, Germany) にて行い, 蛍光画像は, Image J (NIH, Bethesda, MD, USA) を使用して比較範囲の総細胞数を計測した. 陽性細胞数は著明な染色細胞を目視にて確認し, 計測した. また, 比較範囲は, 口蓋突起鼻 腔側の隅角及び唇溝堤を結んだ直線から突起末端部までとした (図1C). 抗体に関しては、 一次抗体として E-cadherin (Invitrogen, Waltham, MA, USA, #14-3249-82), phospho-histone H3 (Abcam, Cambridge, U.K., #ab1791), Osterix (Abcam, #ab209484), 二次抗体として Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, #A11008), 594 goat anti-mouse IgG (Invitrogen, #A11005) を用いた.

## 4.TUNEL アッセイ

免疫組織化学的解析と同様に作成した同範囲の凍結切片をランダムに選出し, PBS で希 釈した4%パラホルムアルデヒド溶液にて室温で20分間後固定した後, TUNEL In Situ 細 胞死検出キット,フルオレセイン (Roche Applied Bioscience, Basel, Switzerland)を使用し, 製造元の指示に従って細胞死を測定した.核染色のために細胞を Hoechst<sup>®</sup>にて室温で10分 間反応させた.撮影は共焦点レーザー顕微鏡 LSM780 にて行い,免疫組織化学的解析と同 様の範囲を比較領域に設定した. 蛍光画像は Image J を使用し, 比較範囲 (図 C) における 陽性細胞数を計測した.

## 5.定量 RT-PCR 法

RNeasy Mini キット (Qiagen, Hilden, Germany) を製造元のプロトコルに従って使用し, Total RNA を抽出した. 逆転写反応は ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Kit (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて行った. 得られた complementary DNA (cDNA) は遺伝子特異的プライマーと SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO) を使用した quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) 分析により解析した. PCR 産物の相対レベルは, LightCycler<sup>®</sup>System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を使用して評価した. この実験 で使用した遺伝子特異的プライマーを表1に示す.

## 6.Western blot 解析

口蓋組織へのメカニカルストレス負荷による YAP の発現及び、口蓋形成への関与が報 告されているβ-catenin<sup>23)</sup>の発現への影響を検討することとした. Western blot 解析にて load 群, unload 群での YAP,  $\beta$ -catenin, phospho- $\beta$ -catenin 発現を比較することとし、サン プルは両群それぞれ, 細胞質と核に分けて検討を行った. 培養後の口蓋組織を PBS で洗浄 し, NE-PER<sup>TM</sup> Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific) を用い てタンパクを回収した. タンパク質量は BCA タンパク質アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) で定量し、細胞質を 1.0  $\mu g/\mu L$ , 核 0.5  $\mu g/\mu L$  となるように調整した. 各サン プルを SDS-PAGE によって分離し、フッ化ポリビニリデン (PVDF) 膜に転写した. 転写 されたメンブレンを TBS-T に溶解した 4 °C の 5 %スキムミルクで 60 分間ブロッキング し、一次抗体; β-catenin (Cell Signaling Technology, #D10A8) 及び phospho-β-catenin Ser552 (Cell Signaling Technology, #D8E11), YAP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, sc-271134, #B2720) と一晩反応させた. ローディングコントロールとして, GAPDH (Cell Signaling Technology, #2118) 及び Lamin B1 (Santa Cruz Biotechnology, #K1720) を使 用した.一晩のインキュベーション後,膜を十分に洗浄し,二次抗体である Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology, #7074) と常温で1時間反応させた. 結 合した抗体を 20X LumiGLO<sup>®</sup>化学発光システム (ChemiDoc<sup>™</sup> XRS +; Bio-Rad, Berkeley, CA, USA, 20×LumiGLO<sup>®</sup> Reagent and 20× Peroxide; Cell Signaling Technology, #7003) によ って検出した.

#### 7.統計解析

各実験系におけるデータは平均±標準偏差 (SD) として表した.2 群間の比較は Unpaired t-test で行った. 差は p < 0.05 の場合に有意であるとみなした.

#### 結果

#### メカニカルストレスの負荷と定量

器官培養時の振盪により培養液水面に生じる, 波の高さと1分あたりの波の回数を測定した. その結果, unload 群では波の高さが 1.0 mm, 波の回数が 150 回/分であり, カロリーに換算したところ, 13.8 kcal のメカニカルストレスが負荷されていた. 一方, load 群では波の高さが 4.0 mm, 波の回数が 67 回/分であり, 496.0 kcal のメカニカルストレスが負荷されていた (図 2 A,B, 表 2). また, load 群においてこれ以上のメカニカルストレスを負荷した場合, 全てのサンプルで口蓋突起の癒合が妨げられることが確認された.

## メカニカルストレス負荷による口蓋組織の YAP 発現の変化

24 時間の器官培養を行った, 13.5 日齢のマウス胎児の口蓋において, Western blot 法にて YAP の発現を比較した. その結果, 核内における YAP の発現は unload 群に対し load 群に て有意に増加していることが示された. (図 3A, B).

#### メカニカルストレス負荷が口蓋組織の成長に及ぼす影響

24 時間の器官培養を行った, 14.5 日齢のマウス胎児の口蓋の, unload 群, load 群での垂直 的な口蓋突起の厚みの比較を行った . その結果, unload 群に対し load 群の厚みはいずれの 計測部位でも有意に大きいことが確認された(図 4B).

また, Micro CT 撮影を用いた口蓋体積の比較を行った結果, unload 群に対し load 群での口 蓋突起の体積は有意に大きいことが確認された(図 4C).

#### メカニカルストレス負荷による口蓋の細胞増殖,細胞死への影響

24 時間の器官培養を行った, 13.5 日齢のマウス胎児の口蓋を TUNEL 染色し, 陽性細胞の割合を比較した. その結果, unload 群と load 群にて細胞死を示す細胞の割合に有意差は

認められなかった(図5A).

次に, phospho-histone H3 に対する陽性細胞の割合を比較したところ, unload 群に対し, load 群にて有意な増加を認めた (図 5B).

## メカニカルストレス負荷によるβ-cateninの発現への影響

器官培養を行った, 13.5 日齢のマウス胎児の口蓋における,  $\beta$ -catenin の発現を Western blot 法にて確認した. その結果, load 群にて $\beta$ -catenin の核内移行を認めた (図 6A).

さらに, phospho- $\beta$ -catenin の発現を Western blot 法にて確認した結果,  $\beta$ -catenin と同様に, load 群において phospho- $\beta$ -catenin の有意な核内移行の増加を認めた (図 6B).

## メカニカルストレス負荷の骨分化能への影響

24 時間の器官培養を行った, 14.5 日齢のマウス胎児の口蓋に対し, Osterix の産生を免疫 染色にて確認した. その結果, Osterix の産生は unload 群に対し load 群にて増加していた (図 7A).

また, 24 時間の器官培養を行った, 14.5 日齢のマウス胎児の口蓋に対し, 定量 RT-PCR 法 を用いて *Osteocalcin* の発現を比較した. その結果, unload 群に対し load 群での有意な発 現増加を認めた(図 7B).

#### 考察

口蓋は,左右の口蓋突起の垂直的な成長,舌上での挙上,正中方向への伸展,正中部で の癒合,癒合後の三次元的な成長により形成される組織である.これまでに,口蓋の形成に ついて様々な研究がなされているが,一連の形成の流れの中でも,口蓋突起癒合後の三次 元的な成長についての報告は少ない.また,内因性に生じるメカニカルストレスの影響に ついては報告されているが<sup>16,17)</sup>,外因性のメカニカルストレスが口蓋突起の形成にどのよ うな影響を与えるのか,その詳細は明らかになっていない.さらに,外因性メカニカルスト レスを用いた研究としては伸長刺激や圧縮刺激を用いたものが多く報告されているが<sup>24,25)</sup>, 器官培養時の振動によるストレス負荷の報告はない.そこで本研究では,波エネルギーを 利用して外因性にメカニカルストレスを負荷し,マウス胎児の口蓋を24時間器官培養した 際の,口蓋の形成について検討を行った.また,本研究では実際の生体内で胎児にかかるメ カニカルストレスを想定し,浮遊培養の条件下で口蓋組織に外因性メカニカルストレスを 与えることに成功した.さらに,波の大きさと単位時間あたりの波の回数から波エネルギ ーを算出し, unload 群にて 13.8 kcal, load 群にて 496.0 kcal のメカニカルストレスが負荷さ れている事が確認できた (図 2).この大きさは,ヒトの運動により消費されるエネルギー に換算した場合,24 時間あたり unload 群が 4.6分, load 群が 2.8 時間のウォーキングにあた り,負荷されたメカニカルストレスの大きさが過剰ではない事が確認された.

本研究では、外因性のメカニカルストレスが口蓋突起の成長に与える影響を検討するた め、load 群と unload 群にて口蓋突起の三箇所の垂直的な厚みと体積を比較したところ、 load 群にて口蓋突起の厚みはどの部位においても増加を示し、その体積も優位に大きい事 が確認された(図4).この結果から、メカニカルストレスは口蓋の部位に関わらず、口蓋 の成長を促す可能性が示唆され、unload 群に対して load 群では細胞死の減少、あるいは細 胞増殖の増加が起こっている事が予想された.この仮説を検討するために、細胞増殖およ び細胞死を示す細胞数を比較したところ、load 群では有意に細胞増殖が促進されているこ とが確認され(図5)、メカニカルストレスは細胞増殖を促進させることにより、口蓋突起 の成長を促す可能性が示唆された.

組織内の細胞がメカニカルストレスの影響を受けていることを確認するため Yap の発現 を確認したところ, load 群にて核内移行が確認された(図3).このことから,メカニカル ストレスの影響で Hippo 経路が活性化され, YAP が核内移行していることが示唆された. しかし,本研究では細胞質内での YAP の発現量は概ね変化しなかった. Hippo 経路が活性 化された場合,細胞質内の YAP の発現量は核内移行により減少を示すと考えられるが,メ カニカルストレスにより細胞全体での YAP の発現が増加したことにより,細胞質内の YAP の発現は大きく変化しなかった可能性が考えられる.

メカニカルストレスによる細胞増殖の機序を解明するため、 $\beta$ -catenin の発現とメカニカ ルストレスの関与についても検討した.その結果, load 群にて $\beta$ -catenin の核内移行が確認 された. $\beta$ -catenin は古典的 Wnt/ $\beta$ -catenin 経路における主要なメディエーターであり、 その核内移行は本シグナル伝達系の活性化を示す主要な特徴の1つである.よって、メカ ニカルストレスによって Wnt/ $\beta$ -catenin 経路が活性化される可能性が示唆される.これま でに、ヒト人工多能性幹細胞 (hiPSC) へのメカニカルストレス負荷により、 $\beta$ -catenin の 発現が増加することや<sup>26)</sup>,核内移行した YAP が核内における $\beta$ -catenin の安定化に関与し ており, $\beta$ -catenin による標的遺伝子の転写を活性化させることが報告されている<sup>27)</sup>. こ れらのことから,本研究において,メカニカルストレスの影響で核内移行した YAP が, $\beta$ catenin による転写を活性化させることにより,細胞増殖が活性化された可能性が示唆され た.

また、別の報告では $\beta$ -catenin が口蓋突起の被覆上皮にも発現しており、これが抑制され た場合、左右の突起同士が癒合出来ず、口蓋裂を発症することが報告されている<sup>6)</sup>. このこ とから、被覆上皮における $\beta$ -catenin の発現低下を原因とする口蓋裂症例においては、メカ ニカルストレスにより $\beta$ -catenin の発現を促進させることで、口蓋の癒合不全を改善でき る可能性が推察される.本研究では上皮特異的な $\beta$ -catenin の発現には注目していないが、 外因性メカニカルストレスは $\beta$ -catenin の発現を調節する可能性が示唆されたため、今後 は上皮における $\beta$ -catenin の発現に着目し、メカニカルストレスと口蓋突起の癒合への関 連についてもさらに検討することで、口蓋の形成や口蓋裂の発現への理解を深めることが できると考えられる.

β-catenin は細胞増殖以外に,骨分化にも関与している可能性が報告されている<sup>28)</sup>. そこ で、メカニカルストレスによる骨芽細胞分化への影響についても検討したところ, unload 群に対して load 群での Osterix の発現は有意に増加しており、メカニカルストレスは骨芽 細胞の分化にも影響を与える可能性が示された. これまでに、Wnt7b が inidian hedgehog (Ihh) の下流にて骨芽細胞の分化に関与していること<sup>29)</sup>や、古典的 Wnt/β-catenin 経路に おける Wnt リガンドは、骨芽細胞の分化に必須とされる Runt-related transcription factor2 (Runx2) の発現を誘導すること<sup>30)</sup>が報告されている. β-catenin は Hippo 経路と古典的 Wnt/β-catenin 経路の共通するエフェクターであり、これら経路の関わりが口蓋形成にも 重要な役割を持つ可能性も考えられ、今後検討を要する.

#### 結論

外因性のメカニカルストレスは Hippo 経路の活性化及びβ-catenin の核内移行促進により細胞増殖を促し、口蓋の形成を促進させる可能性が示唆された.また、口蓋においてメカ

ニカルストレスは、骨分化能にも影響を与える可能性が示された.

#### 謝辞

稿を終えるにあたり, 懇篤なるご指導, 御校閲を賜りました岡山大学学術研究院医歯薬 学域歯科矯正学分野の上岡寛教授に心より感謝の意を評します.また,本研究の遂行に際 し, 御指導, 御協力いただきました岡山大学学術研究院医歯薬学域歯科矯正学分野の早野 暁講師, 井澤俊准教授, 分子医科学分野の大野充昭准教授に謹んで感謝の意を表します.最 後に,本研究を行うにあたり多くの貴重な御援助と御協力をいただきました岡山大学学術 研究院医歯薬学域歯科矯正学分野の諸先生に厚く御礼申し上げます.

# 文献

 Martinelli M, Palmieri A, Carinci F, Scapoli L. Non-syndromic Cleft Palate: An Overview on Human Genetic and Environmental Risk Factors. Front Cell Dev Biol. 2020; 20(8): 22.
 Li C, Lan Y, Jiang R. Molecular and Cellular Mechanisms of Palate Development. J Dent Res. 2017; 96(11): 1184-91.

 Richardson R, Mitchell K, Hammond NL, Mollo MR, Kouwenhoven EN, Wyatt ND, Donaldson IJ, Zeef L, Burgis T, Blance R, van Heeringen SJ, Stunnenberg HG, Zhou H, Missero C, Romano RA, Sinha S, Dixon MJ, Dixon J. p63 exerts spatio-temporal control of palatal epithelial cell fate to prevent cleft palate. PLoS Genet. 2017; 13(6):e1006828.
 Proetzel G, Pawlowski SA, Wiles MV, Yin M, Boivin GP, Howles PN, Ding J, Ferguson MW, Doetschman T. Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. Nat Genet. 1995;11(4): 409-14.

5) Nakajima A, F Shuler C, Gulka AOD, Hanai JI. TGF-β Signaling and the Epithelial-Mesenchymal Transition during Palatal Fusion. Int J Mol Sci. 2018; 19(11): 3638.
6) He F, Xiong W, Wang Y, Li L, Liu C, Yamagami T, Taketo MM, Zhou C, Chen Y. Epithelial Wnt/β-catenin signaling regulates palatal shelf fusion through regulation of Tgf β 3 expression. Dev Biol. 2011; 350(2): 511-9.

7) Wang X, Li C, Zhu Z, Yuan L, Chan WY, Sha O. Extracellular Matrix Remodeling During Palate Development. Organogenesis. 2020; 16(2): 43-60.

8) Pratt RM. Receptor-dependent mechanisms of glucocorticoid and dioxin-induced cleft palate. Environ Health Perspect. 1985; 61: 35-40.

9) Morton C, Le JT, Shahbandar L, Hammond C, Murphy EA, Kirschner KL. Pregnancy outcomes of women with physical disabilities: a matched cohort study. PM R. 2013; 5(2): 90-8.

10) Kawasaki H, Yamada T, Takahashi Y, Nakayama T, Wada T, Kosugi S; Neonatal Research Network of Japan. Epidemiology of Birth Defects in Very Low Birth Weight Infants in Japan. J Pediatr. 2020; 226: 106-111.e10.

11) Li X, Li K, Chen Y, Fang F. The Role of Hippo Signaling Pathway in the Development of the Nervous System. Dev Neurosci. 2021; 43(5): 263-70.

12) Zhao B, Li L, Lu Q, Wang LH, Liu CY, Lei Q, Guan KL. Angiomotin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. Genes Dev. 2011; 25(1): 51-63.

13) Kim NG, Gumbiner BM. Adhesion to fibronectin regulates Hippo signaling via the FAK-Src-PI3K pathway. J Cell Biol. 2015; 210(3): 503-15.

14) Du W, Bhojwani A, Hu JK. FACEts of mechanical regulation in the morphogenesis of craniofacial structures. Int J Oral Sci. 2021; 13(1): 4.

 Zhang J, Xu S, Zhang Y, Zou S, Li X. Effects of equibiaxial mechanical stretch on extracellular matrix-related gene expression in human calvarial osteoblasts. Eur J Oral Sci. 2019; 127(1): 10-8.

16) Yonemitsu MA, Lin TY, Yu K. Hyaluronic acid is required for palatal shelf movement and its interaction with the tongue during palatal shelf elevation. Dev Biol. 2020; 457(1):57-68.

17) 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.

18) Yumoto K, Thomas PS, Lane J, Matsuzaki K, Inagaki M, Ninomiya-Tsuji J, Scott GJ, Ray MK, Ishii M, Maxson R, Mishina Y, Kaartinen V. TGF- $\beta$ -activated kinase 1 (Tak1) mediates agonist-induced Smad activation and linker region phosphorylation in embryonic craniofacial neural crest-derived cells. J Biol Chem. 2013 May 10;288(19):13467-80.

19) 近藤 俶郎. 海洋エネルギー利用技術. 近藤 俶郎, 経塚 雄策, 永田 修一, 池上 康之, 宮崎 武晃, 谷野 賢二, 第二版. 東京, 森北出版, 2015, 49-62.

20) Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. J Biol Chem. 2005; 280(39): 33132-40.

21) Tang S, Yonezawa T, Maeda Y, Ono M, Maeba T, Miyoshi T, Momota R, Tomono Y, Oohashi T. Lack of collagen  $\alpha$  6(IV) chain in mice does not cause severe-to-profound hearing loss or cochlear malformation, a distinct phenotype from nonsyndromic hearing loss with COL4A6 missense mutation. PLoS One. 2021 ;16(4): e0249909.

22) Kawamoto T. Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose freshfrozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants. Arch Histol Cytol. 2003 May;66(2):123-43.

23) Wang X, Liu W, Luo X, Zheng Q, Shi B, Liu R, Li C. Mesenchymal  $\beta$ -catenin signaling affects palatogenesis by regulating  $\alpha$ -actinin-4 and F-actin. Oral Dis. 2023 Nov;29(8):3493-3502.

24) Ikegame M, Ishibashi O, Yoshizawa T, Shimomura J, Komori T, Ozawa H, Kawashima H. Tensile stress induces bone morphogenetic protein 4 in preosteoblastic and fibroblastic cells, which later differentiate into osteoblasts leading to osteogenesis in the mouse calvariae in organ culture. J Bone Miner Res. 2000; 16(1): 24-32.

25) Rawlinson SC, Mosley JR, Suswillo RF, Pitsillides AA, Lanyon LE. Calvarial and limb bone cells in organ and monolayer culture do not show the same early responses to dynamic mechanical strain. J Bone Miner Res. 1995; 10(8): 1225-32.

26) Ruan JL, Tulloch NL, Saiget M, Paige SL, Razumova MV, Regnier M, Tung KC, Keller G, Pabon L, Reinecke H, Murry CE. Mechanical Stress Promotes Maturation of Human Myocardium From Pluripotent Stem Cell-Derived Progenitors. Stem Cells. 2015; 33(7): 2148-57.

27) Pan JX, Xiong L, Zhao K, Zeng P, Wang B, Tang FL, Sun D, Guo HH, Yang X, Cui S, Xia WF, Mei L, Xiong WC. YAP promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation by regulating  $\beta$ -catenin signaling. Bone Res. 2018; 6: 18.

28) Rodda SJ, McMahon AP. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. Development.

2006; 133(16): 3231-44.

29) Hu H, Hilton MJ, Tu X, Yu K, Ornitz DM, Long F. Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. Development. 2005; 132(1): 49-60.
30) Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. J Biol Chem. 2005; 280(39): 33132-40.

### 脚注

本論文の一部は以下の学会において発表した.

第82回 日本矯正歯科学会学術大会(2023年11月)

## 図表の説明

## 図1.器官培養及び計測方法

A: 器官培養装置. メカニカルストレスを負荷しない unload 群(回転培養器, 左図)と振動 によりメカニカルストレスを負荷する load 群(振盪器, 右図)にてそれぞれ 24 時間器官 培養を行った.

B: 負荷したメカニカルストレスの評価方法. 培養液に現れる波の高さと単位時間あたりの 波の回数から, 計測を行った.

C: 13.5 日齢, マウス胎児の口蓋の前頭断(H-E 染色). 図の点線で示す範囲を比較領域とし,反応を示した細胞数の比較を行った. (NS: 鼻中隔, PS: 口蓋突起)

## 図2. メカニカルストレスの計測

波エネルギー (P) は P =pg<sup>2</sup>H<sup>2</sup>T/32πにて算出できる(p=比重, g=重力加速度[m/s<sup>2</sup>], H=波の 高さ[m], T=周期[秒]). メディウムの比重 (p) を 1.0, 重力加速度(g)を 9.8 m/s<sup>2</sup> とした時, それぞれの波エネルギーは unload 群で, load 群でと算出できる. W=1/4.184s (cal) A: 振盪により unload 群にて計測された波の大きさ.

B: 振盪により load 群にて計測された波の大きさ.

## 図3. メカニカルストレス負荷によるマウス胎児口蓋の YAP 発現の比較

24 時間器官培養後の 13.5 日齢マウス胎児の口蓋において, Western blot 法を用いて YAP の発現を比較した. (\*p<0.05, エラーバーは SD, 各 n=5)

#### 図4. メカニカルストレス負荷によるマウス胎児口蓋の厚み及び体積の比較

A: 24 時間器官培養後の 14.5 日齢マウス胎児の前頭断. 左図に unload 群, 右図に load 群 を示す. それぞれ白矢印で示す, 左側最狭窄部(L), 癒合部(C), 右側最狭窄部(R)の三 箇所の垂直的な口蓋突起の厚みを計測した.

B: 各計測部位での口蓋突起の垂直的な厚みの計測結果.(\*p<0.05, エラーバーは標準偏差, 各 n=4)

C: Micro CT 画像における,24 時間器官培養後の胎生 14.5 日マウス胎児の前頭断. 白線の 範囲を比較領域とし,領域の中でエックス線不透過像性を示した,口蓋突起体積の比率(%) を計測し,比較した. (NS: 鼻中隔, PS: 口蓋突起,\*p<0.05, エラーバーは SD, 各 n=3)

## 図 5. メカニカルストレス負荷によるマウス胎児口蓋組織の蛍光免疫染色結果の比較

A: 24 時間器官培養後の 13.5 日齢マウス胎児の口蓋組織前頭断における, TUNEL 染色の蛍 光免疫染色画像. 左図に unload 群, 右図に load 群を示す.(\*p<0.05, エラーバーは標準偏 差, 各 n=4)

 B: 24 時間器官培養後の 13.5 日齢マウス胎児の口蓋組織前頭断における, phosphohistone H3 の蛍光免疫染色画像. 左図に unload 群, 右図に load 群を示す.(\*p<0.05, エラ ーバーは SD, 各 n=5)

## 図 6. メカニカルストレス負荷によるマウス胎児口蓋組織のβ-catenin の発現の変化

A: 24 時間器官培養後の 13.5 日齢マウス胎児の口蓋における, β-catenin の発現の比較. (\*p<0.05, エラーバーは標準偏差, 各 n=5)

B: 24 時間器官培養後の 13.5 日齢マウス胎児の口蓋における, phospho-β-catenin の発現の比較. (\*p<0.05,エラーバーは SD, n=7)

#### 図 7. メカニカルストレス負荷によるマウス胎児口蓋組織の骨分化能の比較.

A: 24 時間器官培養後の 14.5 日齢マウス胎児の前頭断における, Osterix の蛍光免疫染色画

像. 左図に unload 群, 右図に load 群を示す.

B: 24 時間器官培養後の 14.5 日齢マウス胎児の口蓋における, *Osteocalcin* の定量 RT-PCR 法 による結果. (\*p<0.05,エラーバーは SD, 各 n=6)

Primer	Direction	Sequence	
Gapdh	forward	5'-CATCACTGCCACCCAGAAGACT -3'	
	reverse	5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCA-3'	
Osteocalcin	forward	5'-GCAATAAGGTAGTGAACAGACT-3'	
	reverse	5'-CCATAGATGCGTTTGTAGGCGG-3'	

表 1. 本研究で用いたプライマーの塩基配列

# 表 2. メカニカルストレスの計測結果

	Unload	Load
wave hight (m)	0.01	0.04
wave frequency (/min)	150	67
wave cycle (sec)	0.4	0.9
wave energy (W/min)	0.03823	1.372
wave energy (kcal)	13.8	496

# ب 1 🗵 ب

÷



C

÷





÷









50 µm

Unload

Load



Unload

Load



