

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32670

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10260

研究課題名(和文) 口腔・咽頭器官の発生におけるShhの役割

研究課題名(英文) Shh signalling in the development of oral and pharyngeal organs

研究代表者

奥原 滋 (OKUHARA, Shigeru)

日本女子大学・家政学部・研究員

研究者番号：10451973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：喉頭蓋の発生を研究した。喉頭蓋は主に弾性軟骨からなる。本研究では2系統の喉頭蓋低形成モデルマウス(ShhEGFP;MFCS4delとFoxc1ch/ch)を用いた。喉頭蓋をなす弾性軟骨は頭部神経堤細胞由来と分かった。モデルマウスでは喉頭蓋の他、舌骨や甲状軟骨・披裂軟骨も弾性繊維に乏しいと分かった。弾性繊維の産生にはproelastin遺伝子Elnに加え成熟させる酵素群が必要だが、両モデルマウスともElnの発現は低下するが、酵素遺伝子の発現は低下していなかった。これらから、喉頭蓋軟骨は頭部神経堤由来細胞がShhシグナリングやFoxc1に依存してElnを発現することで発生すると明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喉頭蓋が誤嚥を防ぐ役割を果たすには、弾性軟骨であること、周囲の骨・軟骨との間に靭帯や筋肉で結合していることが必要である。従って喉頭蓋軟骨が先天性低形成であるヒトは、胎児期・乳児期のみならず生涯誤嚥のリスクと戦う。本研究はヒト喉頭蓋低形成や誤嚥の原因を複数示唆している。遺伝子発現としては、弾性軟骨の主成分である弾性繊維の生成に必要なproelastin遺伝子の発現に、sonic hedgehogシグナリングとFoxc1転写因子が影響を及ぼすこと、組織学的には喉頭蓋軟骨自体とその周囲への結合に弾性繊維が多く含まれていることから、弾性繊維に乏しいために喉頭蓋の動作・機能が低下しうることを示唆できた。

研究成果の概要(英文)：Development of the epiglottis was examined utilising two mutant mice of hypoplastic epiglottis (ShhEGFP;MFCS4del, Foxc1ch/ch). Epiglottis in major consist of elastic cartilage. The cellular lineage was derived from cranial neural crest cells. In both model mice, histological examination revealed that the elastic fibre was poor not only in the epiglottis but also in the cartilage and bone of the vicinity such as thyroid and cricoid cartilages, and hyoid bone. Connective tissue or ligament also contains much elastic fibre between these cartilages and bones, which were also found to be poor in the mutants. To grow mature elastic fibre, proelastin gene (Elastin, Eln) expression and subsequent genes of maturation enzyme were required. In the mutants, Eln expression was lower than that of the wildtype, but no significant decrease in any of maturation enzyme genes. In total, the epiglottal cartilage develops by Eln gene expression, which depends on Shh signaling and Foxc1 transcription factor.

研究分野：発生学

キーワード：喉頭蓋 嚥下 弾性軟骨

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

呼吸気と食物を正しく肺および食道へと振り分け導く喉頭蓋は喉頭を構成する器官の中でも特に重要である。しかし、食道や気管の発生の研究はあるが、喉頭蓋の発生についての研究はこれまで一切ない。

2. 研究の目的

喉頭蓋の発生機序を解明することで、その構造・機能を理解する。

3. 研究の方法

2 系統の喉頭蓋低形成モデルマウスを用いた。一つは ShhEGFP; MFCS4del または MFCS4del/del である。ShhEGFP は、Sonic hedgehog (Shh) 遺伝子発現を欠失しているアレルで、MFCS4del は、Shh のエンハンサーのひとつである MFCS4 領域が欠失しているアレルである。その結果、これらの複合ヘテロ個体または MFCS4del のホモ接合個体では Sonic hedgehog 遺伝子の発現が口腔・咽頭・喉頭で低下していることと、喉頭蓋が菲薄で咽頭後壁に届かない短さであることが報告されている。もう一つのモデルマウスは Foxc1ch/ch で、Foxc1 転写因子が全身でほぼ機能不全になっているマウスである。喉頭蓋軟骨が欠失している他、水頭症も発症することが報告されている。

これら 2 系統を、それらを交配で得る際に得られる同腹野生型個体と発生組織学的な研究方法で比較検討した。具体的には、まず喉頭蓋発生時期を明らかにし、その時期における喉頭蓋原器の形態・分子発現・遺伝子発現を組織学的な観察で明らかにし、モデルマウスでの変化を観察した。具体的には、組織切片に組織学的染色(Hematoxylin-Eosin(H.E.)染色、Van Gieson Elastica (VGE) 染色) 遺伝子発現を検出する in situ hybridization 法を中心に実験を行った。

その他、発生学的細胞系譜を追跡するため、頭部神経堤細胞系譜には Wnt1-cre、中胚葉由来細胞系譜には Mesp1-cre を、それぞれ R26R-LacZ マウスと交配することで、X-gal 染色による細胞系譜同定を行った。

研究においては、文献検索も重要な情報源である。論文のみならず成書にも情報・知見を求め、動物種間の比較も行った。

4. 研究成果

4 - (1) 喉頭蓋の発生過程

野生型マウス胎児を用いて喉頭蓋の発生過程を組織学的に観察した結果、以下を得た。

喉頭蓋の発生は胎齢 (E) 11.5 に舌の後端の上皮が肥厚することに端を発していた。この肥厚の直下には舌骨の原器が、同心円状に配列された細胞凝集として既に観察された。その後肥厚は舌内を後方向きに陥入し、その結果舌後端の一部が陥入で隔てられるようにして喉頭蓋原器が発生していた。

上皮の肥厚は細胞増殖を伴うもので、肥厚に必要な細胞数を増やしているものと考えられた。また、肥厚の下で舌骨原器や、将来喉頭蓋軟骨になる領域では、E12.5 で特に顕著に細胞増殖が高かった。細胞系譜は頭部神経堤細胞であった。

上皮では E11.5 以降 Shh が発現していることが知られているが、その受容体である Ptch1 や更に下流にある転写因子 Gli1-3 の発現を in situ hybridization 法 (以下 ISH) で調べると、舌骨原器や喉頭蓋発生領域で発現を検出した。

喉頭蓋は主に軟骨からなるので、一般に軟骨の発生を示す Sox9 の発現を in situ hybridization 法で検出した。喉頭蓋原器の中に、将来喉頭蓋軟骨となる軟骨原器ができるのは、周囲の骨・軟骨である舌骨や甲状軟骨と比べて 2 日ほど遅く E15 になってからであった。このことを、更に Sox9 による転写制御を受ける Col2a1 遺伝子発現についての ISH でも確認した。喉頭蓋軟骨は弾性軟骨であるが、その特徴的な成分である弾性繊維について VGE 染色したところ、弾性繊維は喉頭蓋軟骨内にとどまらず、喉頭蓋軟骨と周囲の骨 (舌骨) ・軟骨 (甲状軟骨) との間でも顕著であった。

これらのことから、喉頭蓋の発生過程は、E11.5 での上皮の肥厚と Shh の分泌を、頭部神経堤細胞群がその表面に発現する Ptch1 で受容し、細胞内で転写因子 Gli1-3 が働き、細胞増殖と、E15 以降の Sox9 発現とを導くことで発生する機序であると示唆された。

4 - (2) モデルマウスにおける変異

方法の欄に示した通り、過去に喉頭蓋が小さいと報告されている ShhEGFP;MFCS4del マウスと、過去に喉頭蓋軟骨が欠失していると報告されている Foxc1ch/ch を用いた。

こうして得られた喉頭蓋発生の時間軸に沿って、ShhEGFP;MFCS4del と Foxc1ch/ch における喉頭

蓋発生過程の検討を行った。ShhEGFP;MFCS4del 個体では、上皮の肥厚が野生型に比べて薄く、陥入も浅く、最終的に出生時での喉頭蓋も喉頭蓋軟骨も小さかった。モデルマウスのうち、Foxc1ch/ch は過去の文献で喉頭蓋軟骨がないと報告されていたが、我々の用いたマウスでは小さいながら存在していた。

更に詳細な組織学的観察を行ったところ、H.E.染色では、喉頭蓋の頂点よりやや背側で口腔側の重層扁平上皮から喉頭蓋背側の多列線毛上皮へ切り替わる様子が観察できたが、この切り替わりはモデルマウスと野生型に変わりがなかった。

弾性線維について VGE 染色を行ったところ、モデルマウスでは喉頭蓋軟骨内外共に著しく少なかった。舌骨内の弾性線維も著しく減少していた(図1)。

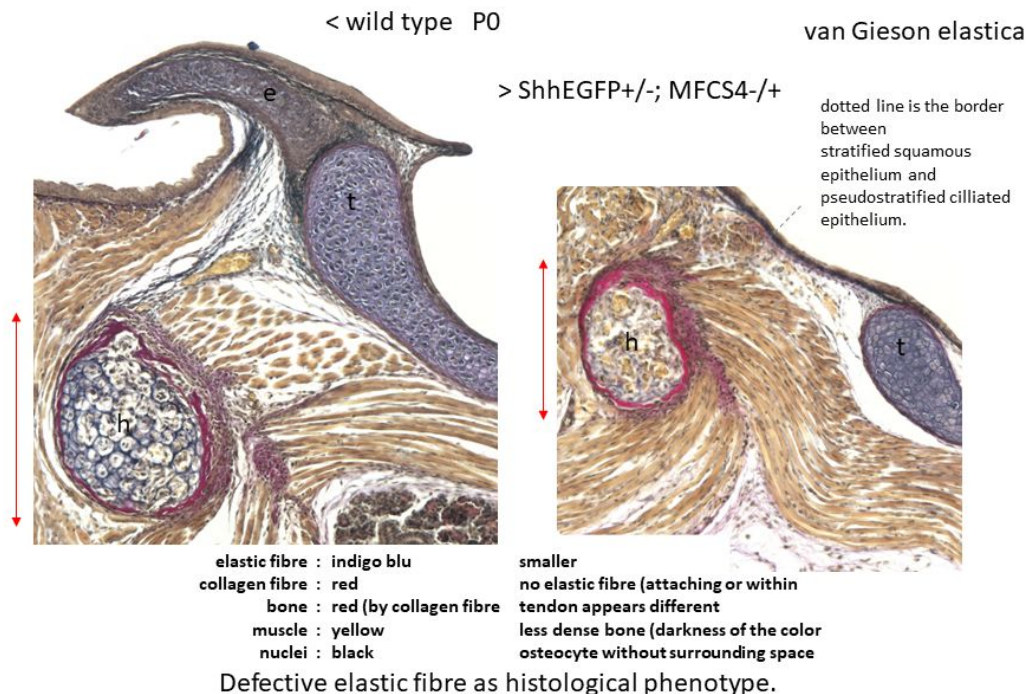


図1. ShhEGFP;MFCS4del と野生型の喉頭蓋周囲の弾性線維(紺)の比較(矢状断) 野生型(左)では、喉頭蓋原器(e)の中のみならず、舌骨原器(h)の中や、両者の間にも弾性線維が多く検出されたが、これらはモデルマウス(右)では著しく減少していた。一方、甲状軟骨は異常がなかった。

遺伝子発現を ISH で検討すると、上皮の肥厚から一定の距離に Ptch1 の発現が分布していること、喉頭蓋軟骨のみならず舌骨原器も細胞増殖して形成されてゆくこと、これら遺伝子発現および細胞増殖はモデルマウスでは低下していることが明らかにできた(図2)。

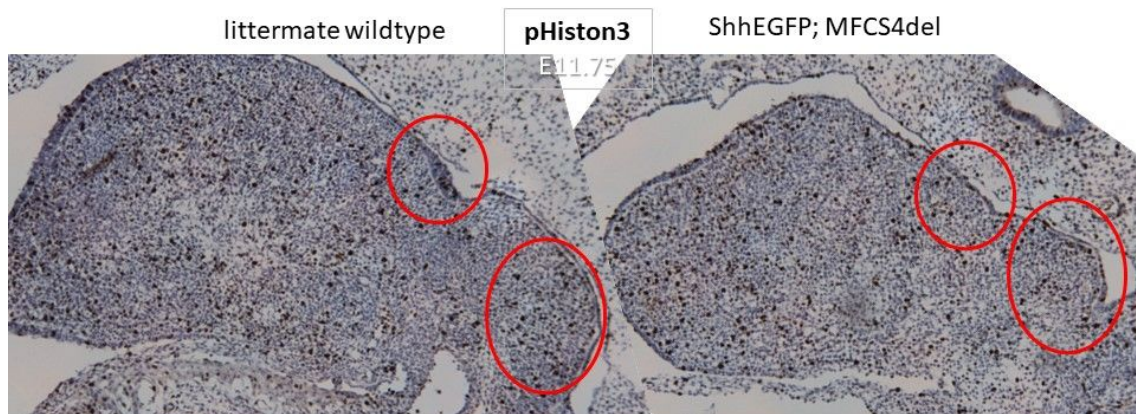


図2. ShhEGFP;MFCS4del (右) と野生型(左)の喉頭蓋周囲の細胞増殖(茶)の比較(E12.5 矢状断)

舌から喉頭蓋予定領域を後方に区別するような上皮の肥厚が、モデルマウスにはなかった。細胞増殖は上皮の陥入と喉頭蓋領域で特に顕著であった。

遺伝子発現を ISH で検討するにあたり、弾性繊維の生成にかかわる遺伝子群も検討した。弾性繊維の素となる proelastin をコードする Elastin 遺伝子、その proelastin を成熟弾性繊維にする酵素 lysyl oxidase の遺伝子群 (Lox, Lox1-4) の発現も検討した。その結果、Sox9 発現はモデルマウスで低下していた。Eln 発現は Sox9 と同時期に開始し、同じくモデルマウスで低下していたが、酵素群のうち喉頭蓋発生領域で発現しているのは Lox14 のみで、喉頭蓋軟骨の発生よりも早く E12.5 から発現していること、その遺伝子発現は低下していないことが明らかになった。Lox14 が E12.5 から発現している理由は、隣接する甲状軟骨などに含まれる弾性繊維を成熟させるためと考えられる。また、lysyl oxidase ファミリーは場所により使い分けられていることも明らかになった (図 3)。

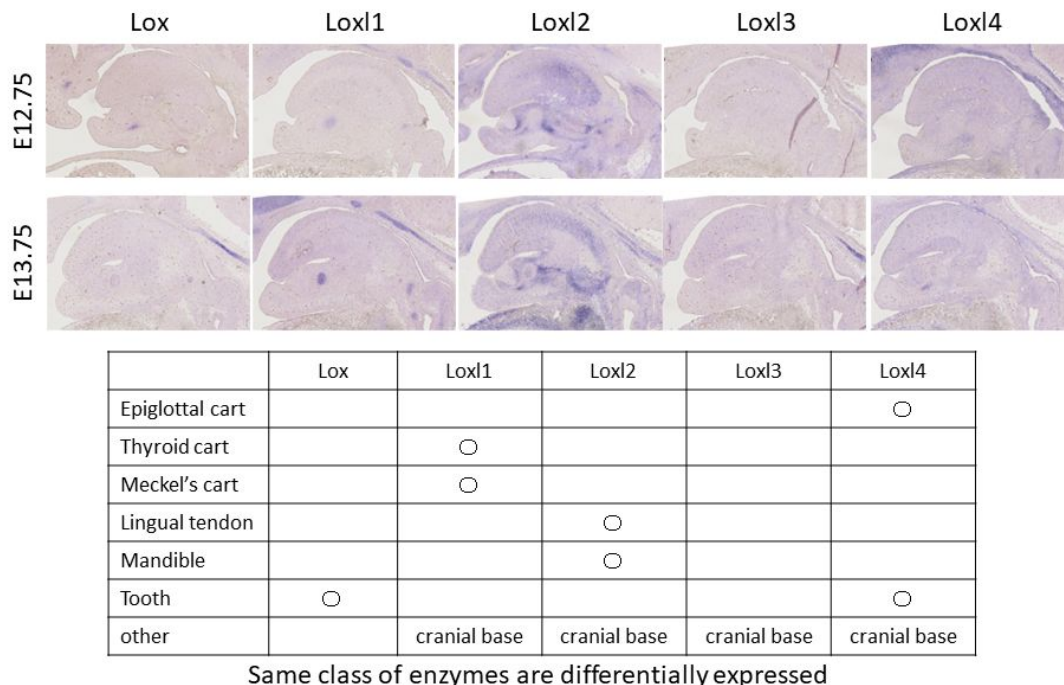


図 3. Lysyl Oxidase の遺伝子発現 (E12.75, E13.75, 矢状断)

4-(3) 考察

上皮から発せられる Shh シグナリングが低下しているモデルマウスと正しい Foxc1 転写因子が存在しないモデルマウスの間で共通の表現型を示した。Shh シグナリングの下流端は Gli 転写因子が発現誘導する遺伝子群である。Foxc1 と Gli の両転写因子の標的遺伝子は共通なものがほとんどないので、標的遺伝子の転写制御領域上での Foxc1 と Gli の synergy は考えにくい。一方、シグナル伝達経路は異なっても最終的に喉頭蓋の発生に関与するシグナル伝達であることは明らかである。過去に軟骨の発生における両転写因子の相互作用についての報告があることから、同等の相互作用が喉頭蓋の発生でも起こっていると考えられる。

データベース予測からは、Shh シグナリングの転写因子 Gli は直接 Sox9 や Eln の発現プロモーター領域に結合するような予測がないこと、過去の報告では Eln の転写には Tgfb1 や Igf1 が関与するとの報告があることから、Gli がこれらの発現を調節することで Eln の発現を間接的に導いているのであろう。

喉頭蓋は気管軟骨である甲状軟骨と関節し、かつ筋と靭帯でも結合していて、気管の「蓋」として働くことから、また、本研究でも確認したように喉頭蓋の背側は気道系上皮の性質を持つことから、呼吸器系の一器官と考えることが可能だったが、細胞系譜や発生時期など呼吸器系とは独立である面が明らかになった。喉頭など気道と食道の共通空間を持った後に、呼吸気は気管を経て肺へ、食物は食道へと別れるような構造を持つ動物の中でも、喉頭蓋は陸生の哺乳類に現局していることが文献検索の考え合わせから明らかになったが、これについて研究代表者の理解が乏しいため、事実を記述するにとどめることとする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wongtim Keeratika, Ikeda Eri, Ohno Tatsukuni, Nagai Shigenori, Okuhara Shigeru, Kure Keitetsu, Azuma Miyuki	4. 巻 93
2. 論文標題 Overexpression of PD L1 in gingival basal keratinocytes reduces periodontal inflammation in a ligature induced periodontitis model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	6. 最初と最後の頁 146 ~ 155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/JPER.21-0017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shirabe Ohki, Kyoko Oka, Kayoko Ogata, Shigeru Okuhara, Mihoko Rikitake, Masako Toda-Nakamura, Shougo Tamura, Masao Ozaki, Sachiko Iseki, Takayoshi Sakai	4. 巻 11
2. 論文標題 Transforming Growth Factor-Beta and Sonic Hedgehog Signaling in Palatal Epithelium Regulate Tenascin-C Expression in Palatal Mesenchyme During Soft Palate Development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in physiology	6. 最初と最後の頁 532
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2020.00532.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Okuhara Shigeru, Birjandi Anahid A., Adel Al-Lami Hadeel, Sagai Tomoko, Amano Takanori, Shiroishi Toshihiko, Xavier Guilherme M., Liu Karen J., Cobourne Martyn T., Iseki Sachiko	4. 巻 146
2. 論文標題 Temporospatial sonic hedgehog signalling is essential for neural crest-dependent patterning of the intrinsic tongue musculature	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.180075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 張晨陽、奥原滋、永井重徳、東みゆき
2. 発表標題 新規免疫チェックポイント分子ILDR2の発現
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Farzana Sultana, Chenyang Zhang, Shigeru Okuhara, Sigenori Nagai, Miyuki Azuma
2. 発表標題 A novel immune checkpoint molecule, ILDR2 is upregulated in the inflammatory by brain.
3. 学会等名 第87回口腔病学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

「舌の発生とその形態・運動異常の仕組みを解明」 ソニック・ヘッジホッグ・シグナル伝達が鍵 http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20191127_1.pdf

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	森田 圭一 (MORITA Keiichi) (10396971)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
英国	King's College London		