

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09822

研究課題名(和文) マウス舌の形態形成を制御する分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms governing tongue morphogenesis in embryonic mice

研究代表者

田谷 雄二 (Taya, Yuji)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：30197587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：舌の形態形成に働くシグナル分子に着目し、免疫組織化学と遺伝子発現により解析した。マウス舌形態形成では、外側舌隆起の形成時期でShh, Patched1, Igf1, Bmp4の発現が上昇し、Endothelin-1シグナルは上皮で発現するShh, Bmp4, Fgf8の上流分子を示唆する結果が得られた。Endothelin-1欠損マウスやShh阻害実験の解析結果から、下顎突起正中部の上皮と筋前駆細胞との接触不全ならびに外側舌隆起の非筋系譜間葉細胞の増殖活性低下が小舌症発症の要因と考えられた。以上から、舌の形態形成では被覆上皮と舌筋および非筋系譜間葉の細胞間相互作用で働く分子機構が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

舌は咀嚼や嚥下・構音などの口腔機能において重要な器官であり、舌癌での切除手術後の舌再建や無舌症・小舌症などの先天異常ではその機能障害が問題となっている。舌の再生医療や疾患治療の実現には、舌発生の時期からの知見を集積していくことが重要と考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the signaling molecules that act in tongue morphogenesis and investigated their molecular regulatory mechanisms. In the search for signaling molecules, expression of Shh, Patched1, Igf1, and Bmp4 was upregulated during the formation of the lateral lingual swellings (LLS). Endothelin-1 (ET-1) signaling was found to be an upstream molecule of Shh, Bmp4, and Fgf8 expressed in the epithelium of LLS. The microtia in ET-1-deficient mice and in Shh knockdown in an organ culture was thought to be due to the inability of muscle progenitor cells to make contact with the epithelium of the medial mandibular arches (MA), resulting in a non-muscle lineage mesenchymal cell population that lost proliferative activity and suppressed the formation of the LLS. Taken together, these findings reveal molecular regulatory mechanisms that operate in the cell-to-cell interactions among the coating epithelium, tongue muscle and non-muscle mesenchyme in the morphogenesis of tongue.

研究分野：顎顔面発生

キーワード：舌形態形成 上皮間葉相互作用 分子ネットワーク

1. 研究開始当初の背景

下顎突起部の上皮-間葉相互作用による組織分化と形態形成に関する従来の研究では、メッケル軟骨や下顎骨、歯の発生と比べ、舌の形態形成に着目した研究は少なく不明なことが数多く残っている。舌発生の形態学的な最初の指標となる外側舌隆起は、第1鰓弓由来の下顎突起背側で誘導され、正中溝を挟んだ左右対称の2峰として識別できる(胎生11.5日)。これが舌原基となり、辺縁部では被覆上皮の一部が陥入し、その後、第2~4鰓弓由来の組織との複合体として舌形態を成していく。舌原基は被覆する鰓弓上皮、筋系譜の細胞、神経堤由来・中胚葉由来の間葉細胞で構成されるが、将来的に筋組織が舌体の大半を占めることから、筋発生を中心とした研究が進められてきた。

外側舌隆起の形成時期では後頭体節由来の筋前駆細胞が正中溝直下に移住・集結し、筋芽細胞への分化を経て筋系譜の細胞集団を構築する(Taya and Aoba, 2007)。私たちはこの細胞集団の周縁に位置する筋前駆細胞は正中溝上皮と基底膜を介して接触しており、外側舌隆起の形成時期を通してこの接触が維持されていることも見出した。この連結はギャップ結合様の形状を呈しており、上皮と筋系譜とのクロストークが予想される。この一連の研究から、外側舌隆起の実体と思われた筋系譜の細胞集団は正中基部に留まっており、外側舌隆起は主に非筋系譜の間葉細胞(神経堤由来と推察)が増殖したものであることがわかった(藤武ら, 2004)。このように筋系譜と非筋系譜の細胞集団が正中基部と隆起部で棲み分けており、近接する領域で異なる細胞動態を示す背景として、複数のシグナル中心と領域特異的なシグナル回路の存在が推定された。

これまでに舌発生に関して筋前駆細胞の移住、筋分化、舌筋の形成異常を表現型とする遺伝子改変マウスやノックダウン実験系の解析を進めているなかで、「舌原基における筋前駆細胞と正中溝上皮との接触」や「上皮由来シグナルを受けた非筋系譜細胞の増殖」などの事象に関して、筋発生の視点のみで形態的・機能的発達との関与を考察することは困難であった。そこで本研究では、舌原基を構成する上皮、筋系譜、非筋系譜の発現分子ネットワークを時空間的に連結させることにより舌発生制御機構を包括的に捉えることを目指すことにした。

2. 研究の目的

本研究では、舌の形態形成に寄与する鰓弓上皮と筋系譜・神経堤由来の間葉間の相互作用の機序を実証することを目的とする。これまでに得てきた研究データに加えて、それぞれの組織で働く遺伝子(分子)の同定と分子機能の解析を通して、マウス舌初期発生での上皮-間葉(筋系譜と神経堤由来)間相互作用を担う分子ネットワークとその制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

日本歯科大学生命歯学部動物実験委員会のガイドラインにしたがって、実験動物としてICR妊娠マウスを使用し、所定の妊娠時期まで飼育した。試料採取に際しては、胎生9.5~14.5日の妊娠マウスを安楽死後、速やかに胎仔個体を摘出し、舌原基および舌組織を採取した。

ICRマウス胎仔(胎生9.0~18.5日)から、舌原基を含む連続薄切切片を作製し、鰓弓上皮や筋系譜細胞を含む細胞マーカー分子および細胞増殖核に対する特異抗体を用いた免疫組織化学による解析を行った。舌の形態形成に関わるシグナル分子の探索ではDNAマイクロアレイならびにリアルタイムPCRによる遺伝子発現の解析を行うとともに、シグナル分子のノックダウンと過剰発現、ならびに遺伝子欠損モデルによる解析を併用した。得られたデータに基づいて、舌

の形態形成に寄与する鰓弓上皮と筋系譜・神経堤由来の間葉間の相互作用に働く分子ネットワークを構築した。

4. 研究成果

胎生 10.5 日からの下顎突起正中部での癒合と背側正中部での二峰性を成す外側舌隆起の形成が確認できた。後頭体節から下顎突起背側正中部への舌筋系譜の細胞移住と細胞集団の形成がみられ、舌筋系譜の細胞集団は釣鐘状の分布を呈し、釣鐘の上端部分が舌原基の正中溝上皮と基底膜を介して接しているのが観察できた。これらの結果から、舌原基では被覆する上皮と上皮下の舌筋系譜の細胞集団、並びに非筋系譜の細胞に分布領域を分けており、各細胞間での相互作用を推察しうる所見が得られた。

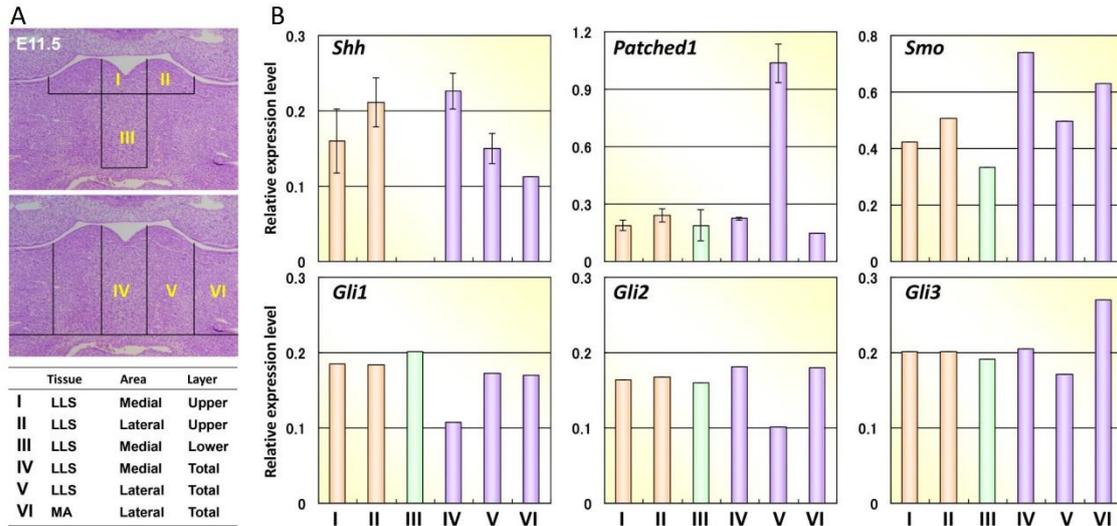


図1 遺伝子発現の解析結果の例示。(A) 顕微切断による採取部位と、(B) Shh シグナル系の遺伝子群のリアルタイム PCR による定量結果を示す。

さらに、透過型電子顕微鏡による観察から、筋前駆細胞は正中溝上皮と基底膜を介して接しているのが観察された。後頭体節から移住してきた舌筋系譜の筋前駆細胞は下顎突起背側正中部に集団を成して集積し、その一部の細胞が集団中央部では筋芽細胞へと分化を遂げていくが、細胞集団の周辺部では筋前駆細胞のまま推移し、とりわけ正中部最上部の筋前駆細胞は外側舌隆起の形成段階の時期に限定して正中溝上皮と接することが注目された。加えて、外側舌隆起は高度な増殖活性を有する非筋系譜の細胞によって膨隆することが明らかとなり、その後、外側舌隆起から舌の形状へ移行する段階では、筋系譜の細胞集団は正中溝上皮から切り離され、舌筋系譜の細胞集団が高度な増殖活性を有して競り上がり舌膨隆部内に侵入することによって舌の形状に変化していくことが分かった。

舌原基での DNA マイクロアレイ解析による遺伝子発現の解析では、舌原基での形態形成の段階により特異に発現する遺伝子群とそのアノテーションを突き止め、発現強度や Gene Ontology に基づいて整理・分類した。下顎突起正中部癒合から外側舌隆起形成までの段階（胎生 10.5 日⇒11.5 日）では、「骨格筋の発生」「器官発生」「筋組織の奇形」に関わる遺伝子群が上位（Zスコア>2 ; p value>2E-4）にあり、筋分化関連遺伝子群だけでなく、目的としている舌の形態形成を担う上皮筋系譜間・上皮間葉間・筋/非筋系譜の細胞間相互作用に働く遺伝子候補を列挙することができた。なお、今回の採取部位と解析方法の検証のために行った舌筋原基での骨格筋分化を制御する遺伝子群（*Pax3*, *Myod1*, *Myf5*, *Myog*, *Mef2c*, *Myf6*）のリアルタイム PCR 解析では想定通りの発現変化を示した。

DNA マイクロアレイ解析結果を検証するためにリアルタイム PCR による遺伝子発現の解析を行い、*Shh*・*Fgf*・*Bmp*・*Igf*・*Endothelin-1*などの発現が確かめられ、シグナルパスウェイや細胞接着関連因子の遺伝子発現について舌形態形成と関係している候補分子が列挙できた。これらの検証結果は、正中溝上皮・筋系譜細胞集団・非筋系譜である神経堤由来の間葉細胞が相互に影響し合っている可能性を支持している。これらの発現する遺伝子群に基づいて、舌の形態形成を担う上皮筋系譜間・上皮間葉間・筋/非筋系譜の細胞間相互作用に働く分子ネットワークを構築した。

さらに、外側舌隆起の形成機序を明らかにするために、筋系譜と非筋系譜の細胞の挙動（細胞増殖・細胞死・細胞移動等）について、以前解析していた舌の形態形成を再現できる鰓弓器官培養系や遺伝子改変動物の表現型解析を用いた実験系、特に、鰓弓器官培養系での *Shh* の阻害剤 Jervine を用いた実験系、ならびに *Endothelin-1* 遺伝子欠損マウスのデータを再検討することにより、外側舌隆起の形成不全に起因した小舌症の表現型を見出した。このことから、*Shh*、*Endothelin-1* のシグナル系は舌筋細胞の分化にも関与するだけでなく、舌筋細胞の周囲の神経堤由来の間葉細胞の増殖に直接関与することで外側舌隆起の形成を制御していることが明らかとなった。さらに、*Fgf* のシグナル系の *Fgf2*, *4* は外側舌隆起の形成促進に関与し、*Fgf8* は神経堤由来の間葉細胞のサバイバルに関与することが明らかとなった。

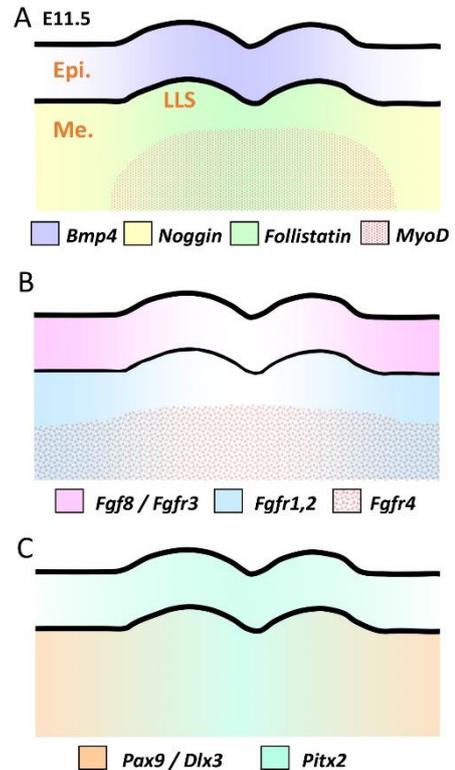


図2 遺伝子発現解析に基づいた各種シグナル系の発現部位のマッピング。それぞれの遺伝子は色と模様により識別して表示している。

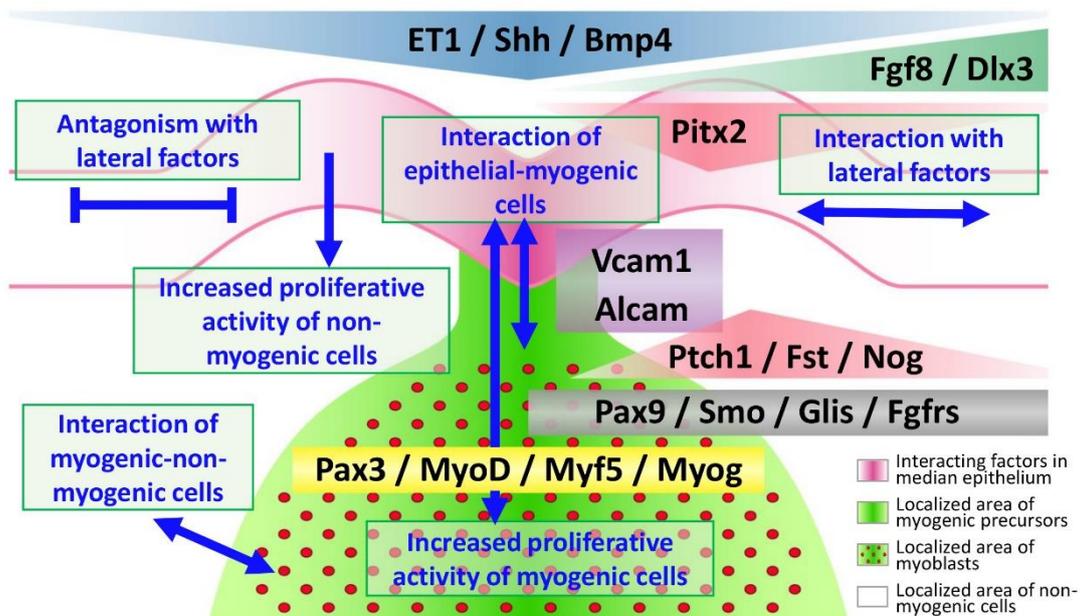


図3 本研究で得られたデータに基づいた模式図。外側舌隆起の形態形成に働く上皮間葉相互作用と部位特異的なシグナル分子を示す。

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawamoto S, Hani T, Fujita K, Taya Y, Sasaki Y, Kudo T, Sato K, Soeno Y	4. 巻 65
2. 論文標題 Nuclear factor 1 X-type-associated regulation of myogenesis in developing mouse tongue	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 88-96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2023.01.003	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 Shimazu Y, Taya Y, Soeno Y, Kudo T, Sato K, Takeda M	4. 巻 243
2. 論文標題 The relationship between Meckel's cartilage resorption and incisor tooth germ in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Anatomy	6. 最初と最後の頁 534-544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/joa.13875	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 Hani T, Fujita K, Kudo T, Taya Y, Sato K, Soeno Y	4. 巻 57
2. 論文標題 Tissue-Targeted Transcriptomics Reveals SEMA3D Control of Hypoglossal Nerve Projection to Mouse Tongue Primordia	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Acta Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 35-46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1267/ahc.23-00073	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田谷雄二, 川本沙也華, 埴 太宥, 工藤朝雄, 佐藤かおり, 添野雄一
2. 発表標題 マウス舌の形態形成と細胞挙動
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 佐藤かおり, 川本沙也華, 田谷雄二, 佐々木康成, 埴 太宥, 坪崎健斗, 工藤朝雄, 添野雄一
2. 発表標題 転写因子Nfixによる胎生期マウスの舌筋分化制御
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 埴 太宥, 田谷雄二, 佐々木康成, 川本沙也華, 工藤朝雄, 佐藤かおり, 添野雄一
2. 発表標題 セマフォリン系とネトリン系のシグナル経路を介した舌下神経軸索誘導
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 工藤朝雄, 中村千晶, 川本沙也華, 埴 太宥, 藤田和也, 佐藤かおり, 田谷雄二, 新宅勇太, 綿貫宏史朗, 添野雄一
2. 発表標題 長期ホルマリン固定標本を用いた免疫染色の試み: 疾患コホート研究での活用検討
3. 学会等名 第10回アジア獣医病理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 工藤朝雄, 埴 太宥, 川本沙也華, 坪崎健斗, 村樫悦子, 佐藤かおり, 田谷雄二, 添野雄一
2. 発表標題 脈管オルガノイドを用いたin vitro口腔粘膜モデルの構築
3. 学会等名 令和4年度日本歯科大学歯学会第8回ウィンターミーティング
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 埴 太宥, 田谷雄二, 川本沙也華, 工藤朝雄, 坪崎健斗, 佐藤かおり, 添野雄一
2. 発表標題 網羅的発現解析で見出した舌下神経軸索誘導の旗振り役について
3. 学会等名 令和4年度日本歯科大学歯学会第8回ウィンターミーティング
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 埴 太宥, 田谷雄二, 堀江哲郎, 佐々木康成, 川本沙也華, 工藤朝雄, 佐藤かおり, 添野雄一
2. 発表標題 マウス舌下神経軸索の伸長誘導に関わる遺伝子群の網羅的解析
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川本沙也華, 田谷雄二, 佐々木康成, 埴 太宥, 工藤朝雄, 佐藤かおり, 添野雄一
2. 発表標題 胎生期マウス舌筋発生における筋芽細胞の分化制御
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田谷雄二, 川本沙也華, 埴 太宥, 工藤朝雄, 佐藤かおり, 添野雄一
2. 発表標題 成体イモリの顎再生と解剖・組織学的解析
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田谷雄二
2. 発表標題 発生から顎再生を考える 舌発生と舌筋分化
3. 学会等名 第8回イモリ型の臓器再生フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田谷雄二
2. 発表標題 発生から顎再生を考える 顎顔面領域のリンパ管の発生
3. 学会等名 第9回イモリ型の臓器再生フォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田谷雄二、埴 太宥、坪崎健斗、工藤朝雄、佐藤かおり、添野雄一
2. 発表標題 マウス舌の形態形成を制御する分子機構
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 田谷雄二, 添野雄一 [分担] 槻木恵一・岡田康男 [編]	4. 発行年 2023年
2. 出版社 学建書院	5. 総ページ数 215
3. 書名 新スタンダード口腔病理学 第2版 6章 口腔・顎顔面領域の先天異常	

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本歯科大学病理学講座HP
[http://www.ndu.ac.jp/~pathome/](http://www.ndu.ac.jp/~pathhome/)

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	豊田 健介 (Toyoda Kensuke) (40585874)	日本歯科大学・生命歯学部・准教授 (32667)	
研究分担者	添野 雄一 (Soeno Yuuichi) (70350139)	日本歯科大学・生命歯学部・教授 (32667)	
研究分担者	佐藤 かおり (Sato Kaori) (90287772)	日本歯科大学・生命歯学部・講師 (32667)	

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