

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590182

研究課題名（和文）顎顔面正中部の形成を担う神経堤細胞の挙動と制御：発生系譜をふまえた解析

研究課題名（英文）Regulation of cellular behavior of cranial neural crest during medial cartilage formation of the skull base.

研究代表者

和田 直之（WADA NAOYUKI）

東京理科大学・理工学部・准教授

研究者番号：50267449

研究成果の概要（和文）：本研究では、ニワトリ胚頭蓋底軟骨の発生起源やその形成に関与する分子機構について調べた。頭蓋底軟骨を形成する頭部神経堤細胞の由来を調べた結果、頭蓋底軟骨は正中部領域とそれを挟んだ両側の軟骨から構成されていた。正中部領域の形成過程では Foxd3 が強く発現し、軟骨分化への関与が示唆された。また、正中部領域の軟骨原基では PNA レクチンが結合する糖鎖が発現していたのに対し、両側軟骨原基での発現は弱かった。以上から、頭蓋底軟骨は性質の異なる二つの軟骨原基から構成されることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this project, we analyzed the developmental origin of the prechordal chondrocranium, which act as the skull base in the head and midline skeleton in the face, and also investigated molecules that are involved in formation of the chondrocranium. By fate map analysis of cranial neural crest cells, the prechordal cranium is composed from three elements, the paired lateral cartilages, and the single medial cartilage. During medial cartilage formation, Foxd3, a transcription factor which regulates neural crest differentiation, was expressed in precursor cells of the cartilage. In addition, cells in the medial cartilage also expressed a carbohydrate chain, which is detected by peanut lectin (PNA). By contrast, expression of PNA-positive molecules on cells in the lateral cartilage was weak. These results suggest that the cells in the medial cartilage have distinct cellular properties from cells in the lateral cartilage.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：顎顔面発生，頭蓋底軟骨，神経堤細胞，発生系譜，糖鎖

### 1. 研究開始当初の背景

顎顔面の正中部を構成する頭蓋底骨格は

脳を支える構造として重要なだけでなく、鼻中隔など顔面の中央部を形成して顔の形態

を左右する点でも非常に重要な構造といえる。頭蓋底を構成する一群の骨格は、発生過程では最初に脳胞底部に移動した頭部神経堤細胞に由来する軟骨として形成される。頭蓋底軟骨は、脳胞底部に形成される一対の梁軟骨が正中部で融合して形成されると考えられている。申請者はゼブラフィッシュを用いてこの過程を再検討し、脳胞底部に分布する神経堤細胞は、眼胞後方を移動する集団と眼胞前方を移動する集団からなること、梁軟骨は後方を移動した神経堤細胞が形成するが、梁軟骨の間の軟骨は前方を移動した細胞群が形成することを報告した (Wada et al., *Development* 132, 3977-3988, 2005)。この結果は、頭蓋底原基は発生起源の異なる神経堤細胞からなる中央部とその両側領域から構成されることを示唆している。この仮説の実証には、他の動物の頭蓋底形成も同様の領域特異性があることや、軟骨原基の形成過程に細胞・分子レベルでの領域特異性があること、等を示す必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、ニワトリ胚を用いて頭蓋底骨格を構成する軟骨の発生起源と、その領域特異性の有無を改めて検討することを目指した。眼胞の前方と後方を移動する神経堤細胞に注目し、それぞれの細胞群が頭蓋底軟骨原基のどの領域を形成するのかを調べ、従来均一とされてきた頭蓋底骨格の不均一性を検討した。また頭蓋底軟骨形成過程で原基やその周辺で発現する分子について検討し、軟骨の不均一性を示す分子の存在について検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 動物：ニワトリ胚として白色レグホンを、一方ウズラ胚として日本ウズラを購入し、それぞれ目的となる発生段階まで 37°C で孵卵して用いた。

(2) in situ hybridization (ISH) および免疫組織化学 (IHC)：ISH と IHC はニワトリ胚を用いた常法に基づいて行った (Wada et

al. *Dev. Biol.* 264, 550-563, 2003)。IHC の一部は異なる蛍光色素を用いた二重染色法によって行った。また通常の抗体染色と同時に蛍光標識レクチン PNA を用いた二重染色も行った。

(3) 神経堤細胞の系譜解析：間脳-中脳境界付近に発生し、眼胞に沿って移動する神経堤細胞を蛍光色素 PKH26 により標識した。標識胚は 24 時間後に固定し、蛍光標識された神経堤細胞の分布を観察した。一方、特定の神経堤細胞が生じる領域の系譜解析のために、ニワトリ胚にウズラ胚の相同部位を移植したキメラ胚を作製した。頭蓋底軟骨形成後、ウズラ特異的抗体を用いた IHC によりウズラ胚の分布範囲を調べた (Wada et al., 2011)

(4) 細胞培養と遺伝子導入：正中部軟骨を形成する間葉細胞の培養は先行研究の手法に準じて行った (Wada et al., 2003)。培養した細胞は固定した後、免疫染色によって軟骨分化領域を調べた。また目的遺伝子を組み込んだ発現プラスミドを Lipofectamine 2000 (Invitrogen) により細胞に導入し、目的遺伝子を過剰発現させた。

## 4. 研究成果

(1) 頭蓋底軟骨の発生起源の解析：ニワトリ胚を用い、頭蓋底軟骨に相当する眼間軟骨 (interorbital cartilage) やその前方の形成される篩骨など軟骨性骨格の発生過程を調べた。これらの頭蓋底軟骨は口腔天井と脳胞下部に挟まれた領域に形成され、まず梁軟骨となる一対の棒状軟骨塊が分化した。次いで梁軟骨が融合する過程では、梁軟骨前端が正中に向けて増殖して融合する組織像は IHC では明瞭ではなく、むしろ梁軟骨間に別の細胞凝集が形成され梁軟骨と融合する様子が見られた。

次に頭蓋底形成領域に分布する神経堤細胞について、それらの発生起源を調べた。その結果、この領域には眼胞前方または後方を移動する二つの頭部神経堤細胞が分布することがわかった (眼前神経堤細胞と眼後神経

堤細胞，以下それぞれ眼前細胞と眼後細胞とする)。それぞれの細胞が頭蓋底軟骨のどの領域を形成するかについて，細胞系譜を蛍光標識法およびニワトリ-ウズラキメラ法を用いて追跡した(図1)。その結果，眼後細胞は主に梁軟骨形成部位に分布するのに対し，眼前細胞は梁軟骨の間に分布して梁軟骨間にできる軟骨構造に分化していた。

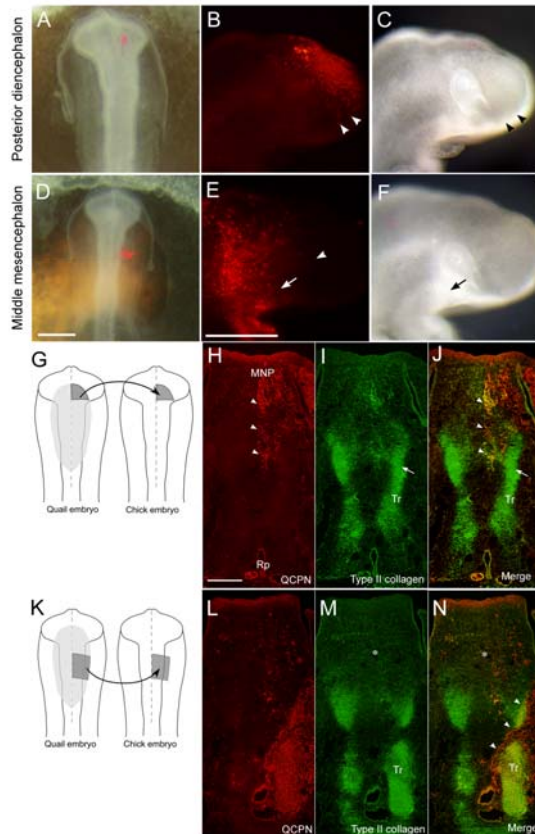


図1. 脳脊領域に生じた頭部神経堤細胞の系譜。A-F, PKH26標識の結果。間脳領域に生じた神経堤細胞は眼胞前方を移動する(A-C)が，後脳領域に生じた細胞は眼胞後方を移動する(D-F)。G-N, ニワトリ-ウズラキメラによる神経堤細胞の分布解析。眼胞前方を移動する細胞は正中部の無対称軟骨を形成する(G-J)が，眼胞後方を移動する細胞は，梁軟骨を形成する(K-N)。梁軟骨の前端には分布しない。

以上をまとめたのが図2である。従来，頭蓋底軟骨の大部分は梁軟骨が融合して形成されると説明されてきたが，本研究により，頭蓋底軟骨の前半部の中央は梁軟骨とは別の軟骨からなること，従って，頭蓋底軟骨は2つの梁軟骨とその間の軟骨という3領域から構成されることが示唆された。

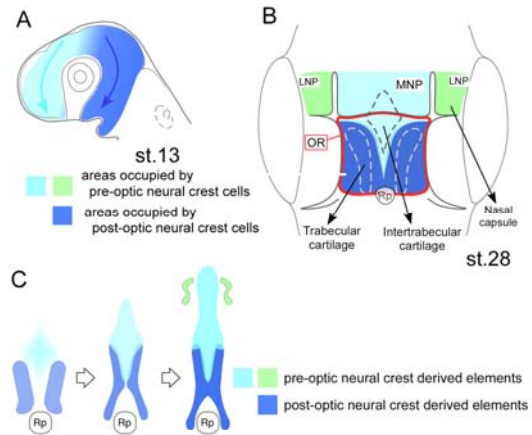


図2. 頭部神経堤細胞の移動経路と，顔面骨格原基の対応(Wada et al., Dev. Biol. 356, 259-540 (2011).) 眼胞の前方と後方を移動する神経堤細胞はそれぞれ顔面原基の異なる部位を形成する(A, B)。頭蓋底軟骨形成時には，それぞれ正中部とその両側の軟骨を形成する(C)。

## (2) 頭蓋底軟骨形成細胞での Foxd3 の発現と，その機能解析

フォークヘッド型転写因子の Foxd3 は，発生初期に胚背側に発現して神経堤細胞の形成や分化維持に関わる分子とされている。一方，Foxd3 の機能変異動物では顔面正中部の顕著な低形成/欠損が観察されることから，Foxd3 は移動後の神経堤細胞の分化や顎顔面形成過程にも関与することを考え，この仮説を検証する実験を行った。

まず，成果(1)で注目した2群の神経堤細胞について，それぞれが移動する発生段階と軟骨が分化・形成される発生段階での Foxd3 の発現を調べた。その結果，移動段階にある眼前および眼後細胞においては発現量に大きな差は認められなかった。一方，移動後から顔面原基が形成される発生段階において，Foxd3 は主に眼前細胞に由来する間葉細胞が分布する部位で発現していた(図3A, B)。さらに軟骨分化が始まる発生段階では，Foxd3 は従来報告されていた神経細胞に加えて，顔面の軟骨を形成する間葉細胞でも発現することが観察された。Foxd3 の発現は内側鼻隆起を構成する間葉細胞のうち，軟骨形成領域よりも先端部にある細胞で強く，軟骨分化領域の細胞での発現は低下していた(図



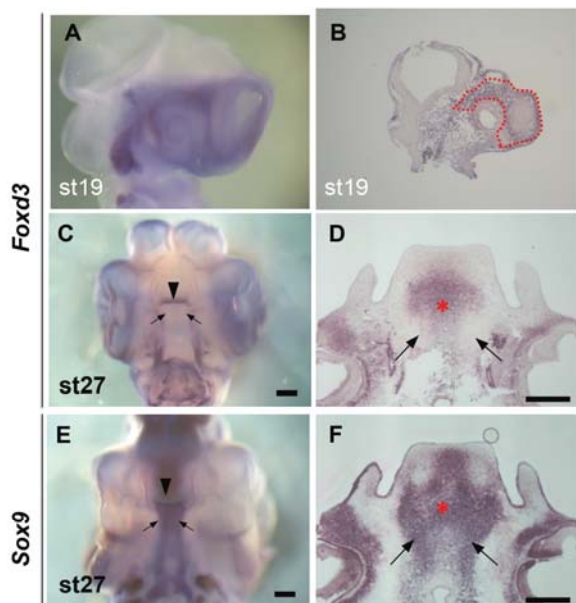


図3. 頭部軟骨形成時のFoxd3の発現。A-B, 発生段階19。顔面全体で発現するが、特に眼胞の前部で強い。C-D, 発生段階27。内側鼻隆起で明瞭に発現する(C, 矢先; D, 星印)。この領域は正中部の無対性軟骨の初期形成部位と一致する。一方、梁軟骨の形成部位での発現は弱い(C-D, 矢印)。E-F, 初期軟骨分化マーカーSox9の発現。正中部軟骨を示す。

3C-F)。細胞種を反映した PNA-BM の発現は細胞培養時にも観察された (図 4A, B)。眼前神経堤細胞由来の間充織の培養では Foxd3 が明瞭に発現したのになら、眼後神経堤細胞由来の間充織での発現は弱かった。このことから、Foxd3 は正中部軟骨分野やその形態形成へ関与する可能性が考えられた。

次に Foxd3 と軟骨分化との関連を調べるために、眼前細胞および眼後細胞に由来する間葉細胞を培養して Foxd3 を過剰発現させ、軟骨分化への影響を調べた (図 4C, E)。その結果、対照群に比べて軟骨分化が抑制されることがわかった。一方、眼後神経堤由来の間充織細胞では Foxd3 過剰発現の効果は明瞭ではなかった (図 4D, F)。他グループの報告で、Foxd3 の K0 マウスでは頭部軟骨/骨の分化亢進が報告されていることから (Mundell and Labosky. *Development* 138, 641-652, 2011)、顔面隆起間充織で発現する Foxd3 は神経堤細胞の軟骨分化を負に制御すると考えられた。

以上より Foxd3 は、神経堤細胞の移動後は眼前神経堤細胞由来の間充織で強く発現すること、この発現は軟骨分化を負に制御しな

がら正常発生に関わることが示唆された。

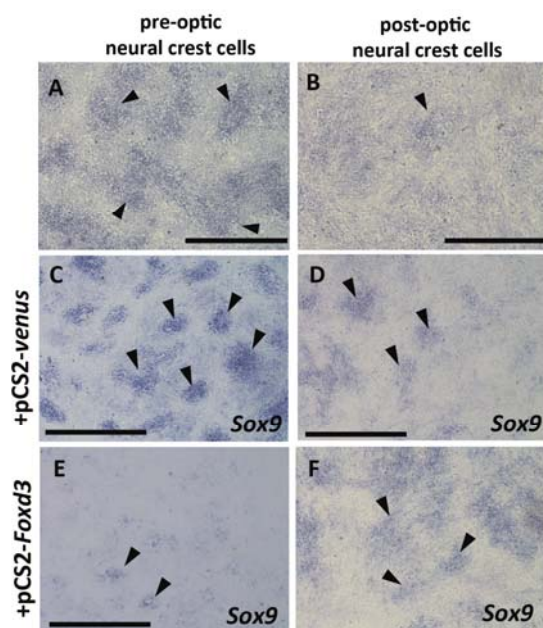


図4. A-B, 顔面原基由来の間葉細胞を培養した時のFoxd3の発現。眼前前部に分布する細胞ではFoxd3は強く発現する(A)が、眼胞後部の細胞での発現は弱い(B)。Foxd3の過剰発現と軟骨分化。眼前細胞ではFoxd3の過剰発現で軟骨分化が抑制される(E, Cが対照)。一方、眼後細胞では過剰発現によっても軟骨分化に大きな変化は出ない(F, Dが対照)。

### (3) 頭蓋底軟骨の不均一性の指標となる細胞表面分子の解析

四肢軟骨や脊椎骨などの体幹部軟骨では、分化初期の凝集段階でピーナツレクチンの PNA が結合する分子 (PNA-binding molecule; PNA-BM) が発現する (Hall and Miyake, 2000 など)。このことに注目し、ニワトリ胚頭蓋底の形成過程で PNA-BM の発現を調べた。

その結果、頭蓋底中央部を構成する軟骨では形成初期の凝集段階から PNA-BM の発現が観察された。PNA-BM は、軟骨分化の指標として用いられる 2 型コラーゲンの発現に先行して発現した。これに対し、正中部軟骨を挟むように形成される梁軟骨では、2 型コラーゲンの発現とは無関係に PNA 結合分子の発現はごく弱かった (図 5A-F)。様々な発生段階や発現部位を比較した結果、PNA-BM は頭蓋底軟骨の正中部全体で強く発現し、ここに近接する梁軟骨中央付近でも発現することがわか

った (図 5G)。

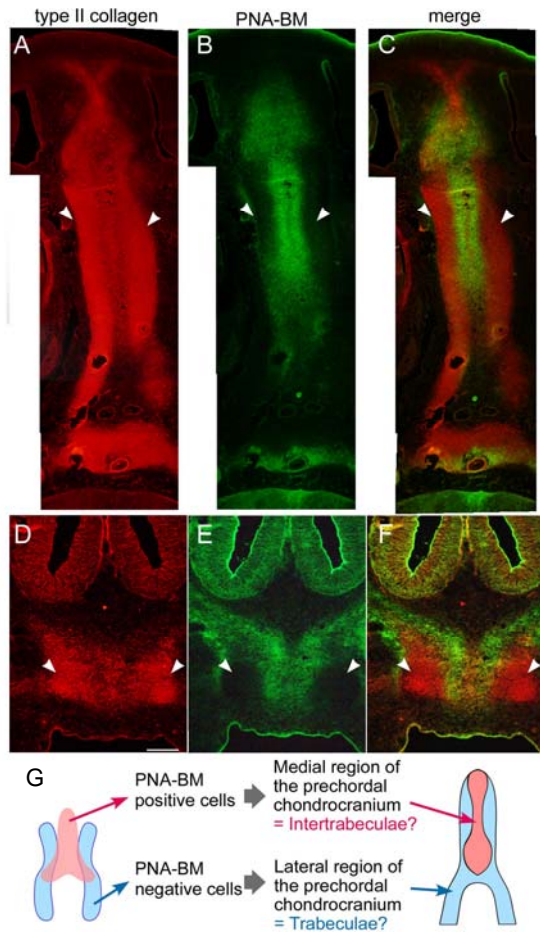


図5. 頭蓋底軟骨発生時におけるPNA-BMの発現。A-C, 水平断面; D-F, 正面断面。PNA-BMは正中部軟骨で強く発現する(B, E)。一方梁軟骨での発現は弱い(矢先)。G, PNA-BM発現領域のまとめ。頭蓋底軟骨のうち, 正中部領域全体と梁軟骨の中間付近で発現する。

軟骨特異的な PNA-BM の発現は軟骨前駆細胞を培養した時にも維持されていた (図 6)。正中部軟骨を形成する領域の細胞を培養し軟骨分化させると明瞭な PNA-BM の発現が観察された (図 6A-C)。一方, 梁軟骨形成部位から得られた細胞を培養した場合は PNA-BM の発現は弱かった (図 6D-F)。いずれの細胞も 2 型コラーゲンの発現は同程度に観察された。従って, PNA-BM は軟骨分化とは直接関係なく, 軟骨の種類を反映して発現していると考えられた。

PNA-BM 発現領域の解析のため, 頭蓋底軟骨形成を促進する Sonic hedgehog (Shh) シグナル経路に注目した。Shh 経路阻害剤をニワトリ胚に滴下して発生させると, 頭蓋底軟骨の形態異常や形成不全が観察される。この時,

形態異常や形成不全の重篤度に並行して PNA-BM の発現が低下する様子が観察された (未発表)。

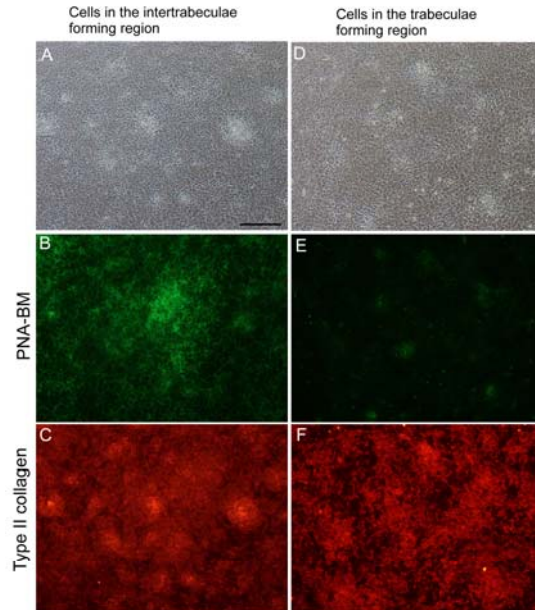


図6. 細胞培養時におけるPNA-BMの発現。A-Cは正中部無対称軟骨を形成する細胞, D-Fは梁軟骨形成細胞を培養した結果。2型コラーゲンの発現からいずれも軟骨分化していることがわかるが, PNA-BMは正中部軟骨細胞でしか発現しない(B)。

以上から, 頭蓋底軟骨原基は PNA-BM を発現する中央部軟骨と, その両側に位置し PNA-BM を発現しない梁軟骨に由来することが示唆され, PNA-BM は正常な頭蓋底形成のマーカーになると予想された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 報, 関連論文 3 報を記載。全て査読あり)

1. Kuratani, S., Adachi, N., Wada, N., Oisi, Y., Sugahara, F. (2013). Developmental and evolutionary significance of the mandibular arch and prechordal/pre-mandibular cranium in vertebrates: revising the heterotopy scenario of gnathostome jaw evolution. *J. Anat.* 222, 41-55.
2. Wada, N., Nohno, T., Kuratani, S. (2011). Dual origins of the prechordal cranium in the chicken embryo. *Dev. Biol.* 356, 529-540.
3. Alexander, C., Zuniga, E., Blitz, I. L.,

Wada, N., LePabic, P., Javidan, Y., Zhang, T., Cho, K. W., Crump, J. G., Schilling, T. F. (2011). Combinatorial roles for BMPs and endothelin 1 in patterning the dorso-ventral axis of the craniofacial skeleton. *Development* 138, 5135-5146.

〔学会発表〕（計 1 件）

和田直之, 飯田小百合, 齊藤嘉之, 佐伯嘉浩.  
ニワトリ胚の頭蓋底形成過程で正中部に発現する細胞表面分子. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013 年 3 月 26 日, 甲府市.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

和田 直之 (Wada Naoyuki)  
東京理科大学・理工学部・准教授  
研究者番号 : 50267449

### (2) 研究分担者

西松 伸一郎 (Nishimatsu Shin-ichiro)  
川崎医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 20222185

### (3) 連携研究者

なし