

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17153

研究課題名（和文）顔面形成における細胞増殖活性の制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanisms of cell proliferative activity in facial development

研究代表者

永井 孝宏（TAKAHIRO, NAGAI）

新潟大学・医歯学総合研究科・非常勤研究員

研究者番号：70827675

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：器官形成は、細胞の増殖に差をつけることで達成される。つまり、細胞増殖をオンにする部位とオフにする部位の配置と、その増殖方向の制御によって、器官の形は決められていく。本研究による結果から、神経堤由来細胞の遊走後の細胞増殖活性は、遊走前の一時点での古典的Wntシグナル活性に制御されている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天異常の多くは、器官の形成不全を意味する。形成不全を未然に防ぐための生前診断や生前治療の開発には、形成不全の原因の解明が不可欠となる。本研究成果は、Wntシグナルの異常による細胞増殖の変化が先天異常の原因の一端を担う可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Organogenesis is achieved by differences of cell proliferation. In other words, it is determined by the arrangement of region with or without cell proliferation, and the controlling the direction of proliferation. The present results suggest the possibility that the cell proliferative activity of neural crest-derived cells after migration is regulated by Wnt signaling activity before migration.

研究分野：発生生物学

キーワード：顔面形成 - カテニン

## 1. 研究開始当初の背景

器官の形は、細胞群が作った枠組みを元に決定されていく。その枠組み作りは、それぞれの細胞の増殖に差をつけることで達成される。つまり、細胞増殖をオンにする部位とオフにする部位の配置と、その増殖方向の制御によって、器官の形は決められていく。複雑な形態をした器官であればあるほど、その配置や増殖方向も複雑となる。細胞増殖活性のオンとオフがパッチワークのように配置することに加え、その配置が経時的に変化することで、形づくりは達成されていく。顔面頭蓋は、体の他の部位に比べ、多くの凹凸を有する。つまり、顔面頭蓋は体の中で複雑な細胞増殖活性のオンとオフが要求される部位の一つである。しかし、顔面頭蓋における細胞増殖活性の制御メカニズムの多くは明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

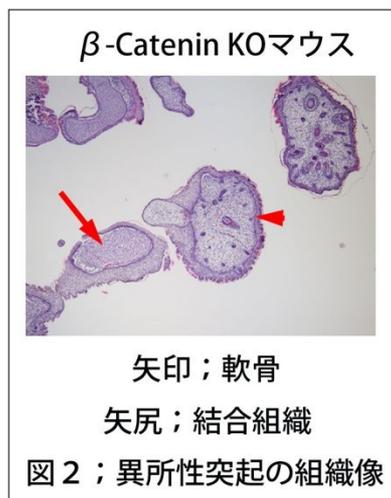
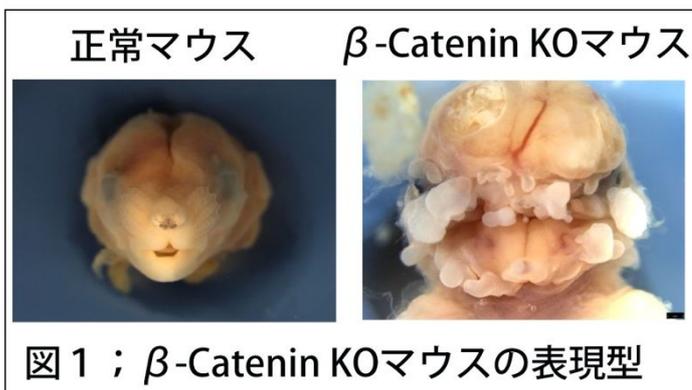
細胞増殖には数多くの分子が関与しており、それらのいずれの分子が顔面形成の細胞増殖のオン/オフに関与しているかを、手探りで検索していくことは難しい。一方で、器官形成の多くの細胞活性は、Fgf、Bmp、Shh、Wntなどのシグナル経路を介することが多い。古典的 Wnt シグナルは、様々な器官の発生に関わる主要なシグナルの一つであり、作用の一つに細胞増殖のコントロールがある。Wnt シグナルの検索から、顔面頭蓋における細胞増殖活性の制御メカニズムの解明を目指す。

## 3. 研究の方法

古典的 Wnt シグナルは受精後直後から発生に重要なシグナルであり、全細胞での欠損は、顔面形成前に致死となり解析の対象にならない。顔面の多くは神経堤由来細胞により形成される。そこで、神経堤由来細胞特異的に Wnt シグナルを欠損させたマウス ( $\beta$ -Catenin;Wnt1Cre マウス) を作成したところ、出生時に致死ではあるものの、顔面は形成されるため、解析可能と判断した。本研究は、 $\beta$ -Catenin;Wnt1Cre マウスのマウスの解析から、顔面頭蓋における細胞増殖活性の制御メカニズムを解析した。

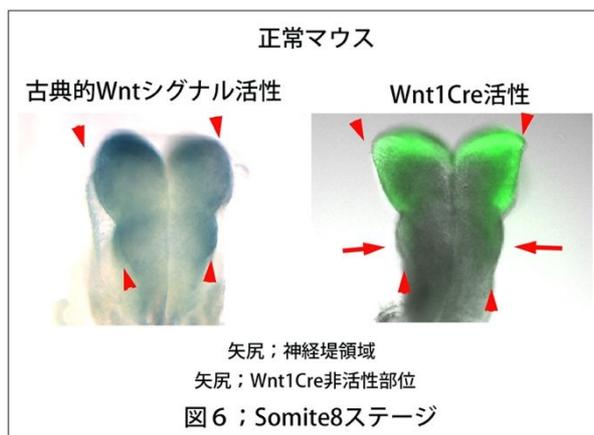
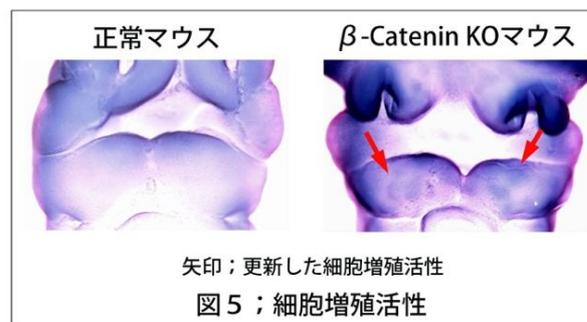
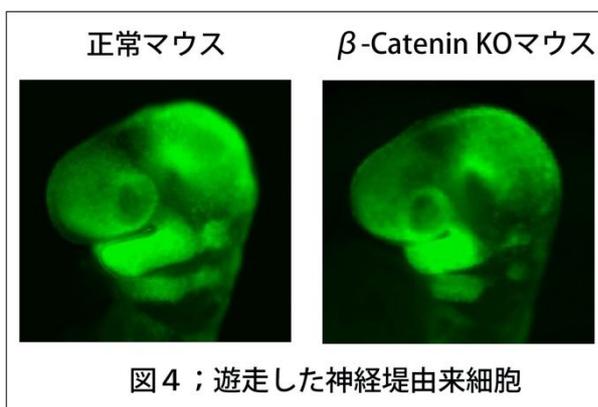
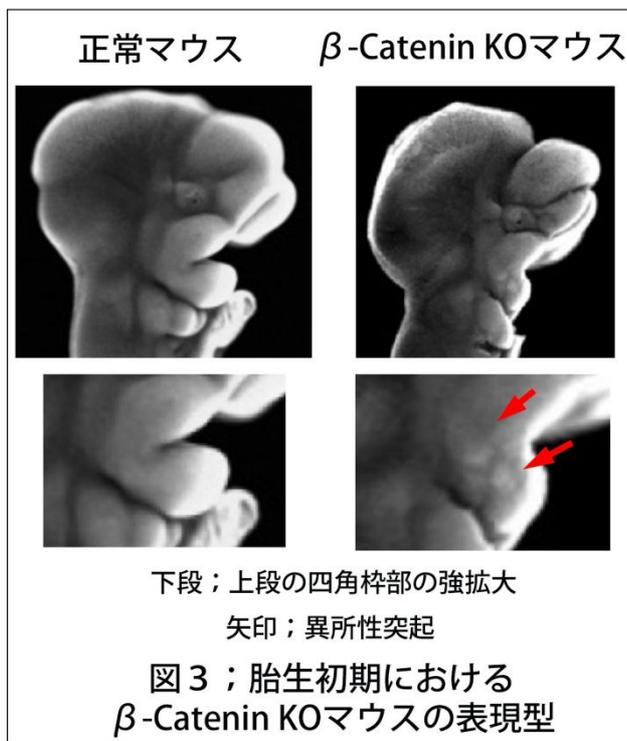
## 4. 研究成果

$\beta$ -Catenin;Wnt1Cre マウスは、出生児に致死となった。一方、その顔面には、無数の突起物が認められた (図 1)。各突起で、軟骨が認められる突起、結合組織のみの突起など、突起によって内容物が異なっており、特定の組織で突起が形成されていないことが示された (図 2)。この異所性の突起がいつから形成されるかを、DAPI 染色を施したのちに、取り込み画像を 3 次元構築する pseudo SEM 法を用いて検索した。胎生 10 日で、わずかな突起の形成が認められた (図 3)。遊走する神経堤由来細胞が増加したために、異所性の突起が形成された可能性がある。この可能性を検索するために、 $\beta$ -Catenin;Wnt1Cre マウスに、YFP が挿入された R26R マウスを交配して、神経堤由来細胞を YFP で可視化できる  $\beta$ -Catenin;Wnt1Cre マウス ( $\beta$ -Catenin;Wnt1Cre;R26RYFP マウス) を作成した。その結果、 $\beta$ -Catenin;Wnt1Cre マウスに、神経堤由来細胞の著しい増加は認められなかった (図 4)。さらに、突起が認められた胎生 10 日の細胞増殖活性を、HistonH4C の whole mount



*in situ* hybridizationで検索したところ、細胞増殖が亢進している部位と、亢進の認められない部位が観察された(図5)。このような2種類の細胞が存在する原因を検索した。Wnt1Creは、神経堤由来細胞が顔面領域に遊走する前に活性化する。神経堤由来細胞が遊走する前の古典的 Wnt シグナルの活性を、そのマーカーである Axin2 の発現が LacZ でトレースできるレポーターマウス(Axin2LacZ マウス)を用いて解析した。somite8 ステージにおいて、古典的 Wnt シグナルは神経堤全体で活性化していた(図6左)。次に、Wnt1Cre の活性を YFP で確認できる Wnt1Cre;R26RYFP マウスを作成し、同じ somite8 ステージでの活性を確認したところ、神経堤の一部に Wnt1Cre が活性化していない部位があった(図6右)。つまり、somite8 ステージでは、Wnt1Cre の活性により古典的 Wnt シグナルが欠如した神経堤細胞と、Wnt1Cre が活性化していないため古典的 Wnt シグナル活性が維持された神経堤細胞の2種類存在していたことを意味する。Somite9 ステージでは、somite8 ステージで Wnt1Cre 活性の欠如していた部位にも、Wnt1Cre は活性化していたため、somite9 ステージ以降は、すべての神経堤細胞で、古典的 Wnt シグナルが欠如していたこととなる。これらのことは、神経堤細胞からの古典的 Wnt シグナルの欠如を Wnt1Cre を使用して行くと、神経堤の中で、古典的 Wnt シグナル欠如に、時間差が存在することを示している。早期に古典的 Wnt シグナルが欠損した神経堤細胞が、遊走後に異常な細胞増殖を引き起こしたのに対し、その時点で古典的 Wnt シグナル活性を有していた神経堤細胞は、遊走後に正常な細胞増殖活性であった可能性が考えられる。

このように、神経堤由来細胞の遊走後の細胞増殖活性は、遊走前の一時点での古典的 Wnt シグナル活性に制御されている可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|