

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463130

研究課題名(和文) 咽頭発生における Shh の役割

研究課題名(英文) Shh signaling in pharyngeal development

研究代表者

奥原 滋 (OKUHARA, Shigeru)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：10451973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Shh遺伝子とその発現制御領域MFCS4の複合ヘテロ欠失マウスを口蓋裂モデルとし、MFCS4の制御下でShhが舌筋の腱の発達に貢献することを明らかにした。腱は筋の運動に必須だが、舌の運動不全や不足が口蓋発生における舌の貢献不足に至り、口蓋裂になることを明らかにした。また、舌筋の腱に限らず、鰓弓由来の神経堤細胞が集簇してできる器官である軟口蓋、喉頭蓋、被蓋、甲状軟骨、頭蓋底の一部を形成する骨や軟骨、外耳骨の発生にもShhが必要であることを明らかにした。これにより、遺伝子発現制御領域における多型が口蓋裂に関連する可能性を指摘できた。

研究成果の概要(英文)：Compound deletion heterozygote for Sonic hedgehog gene and its enhancer MFCS4 was utilized as a cleft palate model mouse. In this mouse, development of lingual tendon was impaired, suggesting the lingual motion was insufficient to associate with palate development. We also found that neural crest derived craniofacial organs such as soft palate, epiglottis, arytenoid, thyroid cartilage, part of the bones and cartilages in cranial base, and extympanic bone are hypoplastic, suggesting that Shh signaling is required for neural crest derived mesenchymal cell condensation. Our findings also propose that the variant in enhancer sequence might be related to cleft palate.

研究分野：発生生物学

キーワード：口蓋裂 舌

1. 研究開始当初の背景

口腔および咽頭領域には、口蓋、喉頭蓋、被蓋、舌、甲状軟骨など、多くの器官が存在するが、それらの正常発生と先天異常について、分子生物学的および発生学的な背景はあまりよく知られていない。

Sonic hedgehog (Shh)は、口蓋のみならず、多くの器官の発生に必須の分子で、器官形成における中心的役割から morphogen と分類される他、胚や器官の正中線を規定する役割も報告されている。Shh シグナリングは、口腔内であれば上皮細胞が Shh を分泌し、近傍に存在する間葉細胞が Ptch1 受容体で受容し、細胞質に存在する Gli が核内へ移行して標的遺伝子を転写する順に伝達され、その過程で細胞膜から突出し、Ofd1 タンパクなどから構成される cilium が必要であることが知られている。Shh の発生期の発現は、部位・時期特異的なエンハンサーによって制御されていることが明らかになってきた。口腔・咽頭の発生期のエンハンサーである MFCS4 と Shh を共にヘテロ欠失させたマウス (ShhEGFP; MFCS4del) では、口蓋裂を主体とする表現型が口腔・咽頭領域に 100% の頻度で認められるが、体の他の部位には表現型がない。そこで、この ShhEGFP; MFCS4del マウスを口蓋裂モデルマウスとして用いることにした。Shh や MFCS4 配列はヒトとマウスの間で相同性が高く、口蓋の発生機序や役割もヒト・マウス間で相同であることから、ヒトで口蓋裂と MFCS4 配列の間に関連がある可能性も視野に入れた研究が可能であると目論んだ。

2. 研究の目的

咽頭を構成する器官の発生における Shh や MFCS4 の役割を明らかにする。ヒト MFCS4 の変異がヒト先天疾患に關与する可能性と機序を明らかにする。

3. 研究の方法

ShhEGFP; MFCS4del マウスを、形態学、組織学、実験発生生物学の手法により解析する。評価する器官は、硬口蓋、軟口蓋、喉頭蓋、被蓋、甲状軟骨、頭蓋底を構成する骨と軟骨、外耳骨とした。

形態学的解析においては、体重、外表の表現型、microCT を用いた骨発生の形態と大きさの評価を行った。

組織学的解析においては、組織染色として Hematoxylin-Eosin 染色、Alcian Blue による軟骨染色、Arizarin Red による骨染色、Victoria 青による弾性線維染色を行った。免疫組織化学染色により、1,4 型コラーゲン、ラミニン、リン酸化ヒストン、ヒアルロン酸、デスミン、Synaptophysin を組織切片上に検出した。In situ hybridization により、Shh、Ptch1、Gli1、Sox9、Scleraxis(Scx)、Myf5、Myod1、Myogenin (Myog)、Col2a1 の mRNA を組織切片上に検出した。

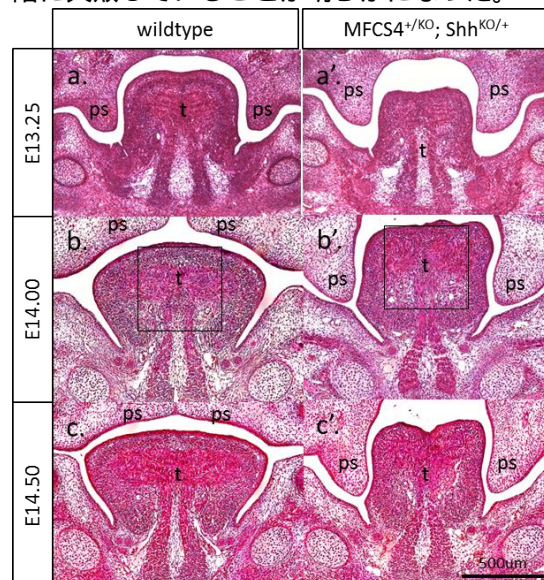
実験発生生物学の手法のうち、器官培養を口蓋と舌について行った。器官培養には、回転、静置の両方の方法を行った。

4. 研究成果

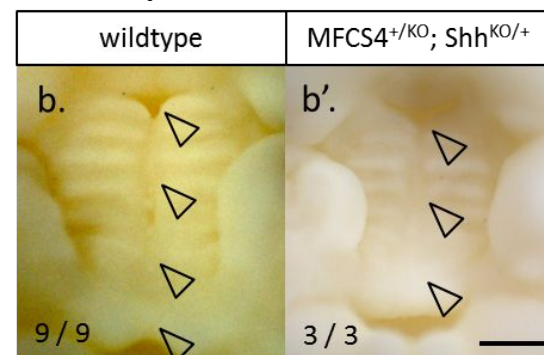
ShhEGFP; MFCS4del マウスの口蓋裂は、舌筋の腱に相当する舌中隔や舌腱膜の発生不全に原因があることを明らかにした。

まず、ShhEGFP; MFCS4del マウスでは、Shh シグナリングが口蓋、舌、咽頭で、想定通り低下していることを、Shh、Ptch1、Gli1 の in situ hybridization を、前頭断および矢状断切片に対して行い確認した。

まず、前頭断切片を作製して形態観察を行ったところ、口蓋原基である口蓋突起の発生段階である伸長、挙上、癒合のうち、挙上の段階に失敗していることが明らかになった。

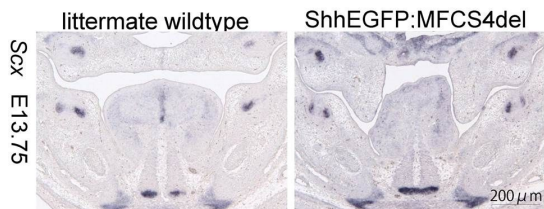


口蓋突起の挙上には、口蓋突起が持つ挙上力、舌がその上に口蓋突起が挙上できる空隙をつくるような協力、口蓋突起と他の口腔組織との間の異所性癒合がないこと、の3点が必要である。どれを欠くか判別するために口蓋突起を含む上顎のみで舌がない状態の器官培養を、回転培養方式で行った。ShhEGFP; MFCS4del マウスの口蓋突起は、野生型同様に挙上し癒合を果たしたことから、口蓋突起の挙上に失敗する原因は舌にあることが明らかになった。



舌の協力は、前述のように舌自身の運動や変形により果たされるので、舌筋の運動に不全があると判断された。舌筋の運動は、筋、腱、

神経が構成要素である。筋は、舌内での配列が異常であったが、個々の筋芽細胞は舌原基内に存在し、分化を遂げていた。舌筋の腱は、舌中隔と舌腱膜からなり、主要転写因子である Scx により神経堤細胞から発生するが、ShhEGFP;MFCs4del マウスでは in situ hybridization により Scx の転写が低減していることが明らかになった。神経については



Synaptophysin に対する免疫組織化学染色により、筋の位置に対応した神経の存在を検出した。これらから、舌筋の腱が正しく発生しておらず、これが、舌筋の整然とした配列を困難にさせ、その結果、舌が正しく運動できず、口蓋突起の挙上時の舌の貢献を失わせていたことが明らかになった。

舌の腱は神経堤細胞に由来する細胞から発生する。一方、四肢の腱は筋から Tgfbeta などのサイトカインによりシグナルを受けて分化することが知られている。そこで、ShhEGFP; MFCs4del マウスにおいて、本来 Shh シグナリングを受け取るはずだった細胞群は神経堤細胞と筋芽細胞のいずれであるかを明らかにするために、2つの実験を行った。1つ目は、神経堤細胞で LacZ を発現させるレポーターマウス Wnt1cre;R26R-LacZ の作成により、神経堤細胞を識別した上で、Shh の受容体である Ptch1 や、Shh シグナリングの細胞内での働きを示す転写因子 Gli1 を、in situ hybridization で検出し、これらの重なりから、Shh シグナリングを神経堤細胞が受容していることを示した。2つ目は、海外の共同研究者の協力により、神経堤細胞が Shh シグナリングを受容できないマウス Wnt1cre; Ofd1flox/flox と、筋芽細胞を含む中胚葉由来の細胞が Shh シグナリングを受容できないマウス Mesp1cre; Ofd1flox/flox を作成し、ShhEGFP; MFCs4del マウス同様の表現型が現れるか調べる方法で、Wnt1cre; Ofd1flox/flox でのみ ShhEGFP; MFCs4del マウスと同様舌筋の腱が発生異常を示し舌筋の配列が不整になった。これらから、Shh シグナリングを受容する細胞群は、舌内では神経堤細胞であることが明らかになった。

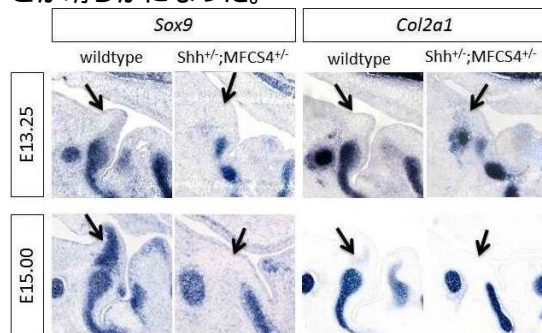
これらを総合すると、舌上皮細胞からの Shh は、舌内の神経堤細胞に受容され、舌内の神経堤細胞は腱に分化し、同時期に分化した筋を整然と配列させることで、舌の運動を可能にする。舌の運動により口蓋突起は挙上を達成できる。

これら舌の腱における発見は、口蓋・咽頭の諸器官にも応用できると予想した。すなわち、軟口蓋軟骨、喉頭蓋軟骨、甲状軟骨、頭蓋底を構成する骨のうち前蝶形骨と蝶形骨の体

部と後頭骨の前方部分、頭蓋底を構成する骨の間に介在する蝶形骨間軟骨結合と蝶形後頭軟骨結合は、いずれも神経堤細胞に由来しており、時期は異なるものの、神経堤細胞が凝集し、支持組織へと分化する点や、近傍の上皮細胞が Shh を分泌している点で一致している。また、神経堤細胞から腱、靭帯、骨、軟骨などへの分化過程では、転写因子 Sox9 の発現に端を発した凝集と増殖の過程が共通で、その後各々へ分化することが知られている。すなわち、口蓋・咽頭の上記器官においても、Shh シグナリングに依存して発生すると予想した。

まず、ShhEGFP; MFCs4del マウスの上記諸器官における表現型を、骨軟骨染色によって形態学的に調査したところ、いずれの器官においても、正常野生型に比べて低形成であることが判った。

各器官の発生段階を示すマーカーとして、初期共通段階の Sox9、軟骨への分化を示す Col2a1 の in situ hybridization を、軟骨染色と並行して組織切片上で行った。特に喉頭蓋軟骨は弾性線維を多く含むことが知られているので、弾性線維染色も行った。すると、いずれの器官においても、初期分化マーカー Sox9 の発現は1-2日ほど遅く、しかも発現が示す細胞の凝集が小さいことが明らかになった。更に、軟骨への分化を示す Col2a1 の発現も著しく低下していた。すなわち、Shh シグナリングは、これらの器官の発生において、初期段階を達成するために必要であることが明らかになった。



総合すると、咽頭諸器官の発生において、Shh シグナリングは、神経堤細胞の凝集段階に貢献することが明らかになった。また、舌においては舌中隔や舌腱膜が舌筋の配列を達成させること、胎生期の舌に口蓋突起挙上への協力という作用があり、これを欠くことにより口蓋裂が発生すること、が明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計10件)

Prasitsak T., Nandar M., Okuhara S., Ichinose S., Ota M.S., Iseki S., Foxc1 is required for early stage telencephalic vascular development., Developmental Dynamics、査読有り、

Vol.244, No.5, 2015, pp.703-711, doi: 10.1002/dvdy.24269  
Yoshida M., Hata K., Takashima R., Ono K., Nakamura Y., Murakami T., Iseki S., Takano-Yamamoto T., Nishimura R., Yoneda T., The transcription factor Foxc1 is necessary for Ihh-Gli2-regulated endochondral ossification., Nature Communications, 査読有り, Vol.6, No.6653, 2015, doi: 10.1038/ncomms7653  
Abe S., Yamaguchi S., Sato Y., Harada K., Sphere-derived multipotent progenitor cells obtained from human oral mucosa are enriched in neural crest cells., Stem Cells, 査読有り, Vol.5, No.1, 2015, pp.117-128, doi: 10.5966/sctm.2015-0111  
Katsumura S., Ezura Y., Izu Y., Shirakawa J., Miyawaki A., Harada K., Noda M., Beta adrenergic receptor stimulation suppresses cell migration in association with suppression of cell cycle in osteoblast based on live imaging (FUCCI) analysis., Journal of Cellular Physiology, 査読有り, Vol.231, No.2, 2015, pp.496-504, doi: 10.1002/jcp.25096  
Machida A., Okuhara S., Harada K., Iseki S., Difference in apical and basal growth of the frontal bone primordium in Foxc1ch/ch mice., Congenital Anomalies, 査読有り, Vol.54, No.3, 2014, pp.172-177, doi: 10.1111/cga.12053  
Sato Y., Mishimagi T., Katsuki Y., Harada K., Maxillary distraction osteogenesis for treatment of cleft lip and palate in a patient with X-linked agammaglobulinemia., Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 査読有り, Vol.72, No.7, 2014, pp.1396e1-7, doi: 10.1016/j.joms.2013.12.034  
Hashida Y., Nakahama K., Shimizu K., Akiyama M., Harada K., Morita I., Communication-dependent mineralization of osteoblasts via gap junctions., Bone, 査読有り, Vol.61, No.4, 2014, pp.19-26, doi: 10.1016/j.bone.2013.12.031.  
Nagayama T., Okuhara S., Ota M.S., Tachikawa N., Kasugai S., Iseki S., FGF18 accelerates osteoblast differentiation by upregulating Bmp2 expression., Congenital Anomalies, 査読有り, Vol.53, No.2, 2013, pp.83-88, doi: 10.1111/cga.12012  
Kameda Y., Saitoh T., Nemoto N., Katoh T., Iseki S., Fujimura T., Hes1 is

required for the development of pharyngeal organs and survival of neural crest-derived mesenchymal cells in pharyngeal arches., Cell and Tissue Research, 査読有り, Vol.353, No.1, 2013, pp.9-25, doi: 10.1007/s00441-013-1649-z  
Matsushita Y., Sakamoto K., Tamamura Y., Shibata Y., Minamizato T., Kihara T., Ito M., Katsube K., Hiraoka S., Koseki H., Harada K., Yamaguchi A., CCN3 protein participates in bone regeneration as an inhibitory factor., The Journal of Biological Chemistry, 査読有り, Vol.288, No.27, 2013, pp.19973-85, doi: 10.1074/jbc.M113.454652

〔学会発表〕(計3件)

奥原 滋, MFCS4 は Shh と Sox9 を介して咽頭諸器官の発生を制御する, 第38回日本分子生物学会年会第88回日本生化学会大会合同大会, 2015年12月2日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)  
奥原 滋, 舌発生における SHH の役割, 第56回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2014年9月25-27日, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)  
井関 祥子, FGF18 と FGF2 はマウス頭蓋冠骨形成過程に相反する効果を示す, 第55回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2013年9月20-22日, 岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥原 滋 (OKUHARA, Shigeru)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師  
研究者番号: 10451973

(2) 研究分担者

佐藤 豊 (SATO Yutaka)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教  
研究者番号: 90361716

井関 祥子 (ISEKI Sachiko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号: 80251544

原田 清 (HARADA Kiyoshi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号: 30228639