

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11024

研究課題名(和文) マウス舌筋発生における筋前駆細胞から筋サテライト細胞への分化誘導機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of differentiation from myogenic progenitors into satellite cells during myogenic development of mouse tongue

研究代表者

田谷 雄二 (TAYA, YUJI)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：30197587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、胎生期マウス舌筋発生において筋前駆細胞から筋サテライト細胞への分化制御の仕組みを解明する目的で、Pax7 - Nfix - Notchを中心とした制御分子群の発現解析と免疫組織化学的解析を行った。その結果、舌原基でのNfix発現は胎生10.5日から急速に発現上昇し胎生14.5日でピークを示すこと、筋サテライト細胞への分化制御因子候補のPax7, Hesr3, Cxcr4等が舌筋でのNfix発現と呼応して胎生14.5日で発現上昇すること、Nfixを標的としたmicroRNAが特異的に発現すること、Cxcr4 - Cxcl12シグナルが筋サテライト細胞の分化制御に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We focused on the differentiation into muscle satellite cell regulated by Nfix and their related factors during mouse tongue development. Tongue primordia were dissected from ICR mouse embryos at E9.5-18.5. Gene expression analysis was carried out by mRNA/microRNA microarray, qPCR and immunohistochemistry. We confirmed that Nfix expression started at E10.5 and reached its peak level at E14.5. Nfix-positive myogenic cells were detected after E11.5. Satellite cell differentiation-regulatory genes (e.g. Pax7, Hesr3 and Notch1) were up-regulated after E14.5. Multiple microRNAs that target Nfix mRNA involved in regulating myogenic gene expression. Nfix-positive myogenic cells were localized in tongue primordia after E11.5. Their myogenic cells and surrounding vascular endothelial cells were Cxcr4- and its ligand Cxcl12-positive, respectively. Suggesting that Nfix and its related gene/miRNA expression may play a pivotal role in satellite cell differentiation during tongue myogenesis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯学 病理学 マウス胎仔 舌発生 筋サテライト細胞 骨格筋分化誘導 筋組織疾患 microRNA

## 1. 研究開始当初の背景

筋サテライト細胞は骨格筋組織の形成・維持・再生において中心的な役割を担っており、通常、休止状態の単核細胞として筋線維上に存在するが、筋損傷や運動などの刺激により速やかに活性化され、胎生期での筋発生と同様な過程を経て筋線維へと分化する。筋サテライト細胞はその特異的な筋分化能から、筋組織疾患であるサルコペニアや筋ジストロフィーなどに対する細胞療法の最も有力な候補として注目されている (Briggs & Morgan, 2013)。これまで成体における再生過程での筋サテライト細胞から筋線維への分化に関する研究は伸展してきたが、胎生期での筋サテライト細胞の分化の異常に起因していることも示唆されており、これらの筋組織疾患の本質を理解する上でも胎生期における筋サテライト細胞への分化誘導過程を詳細に解析することは重要と考える。

胎生期における骨格筋発生では、筋前駆細胞から筋芽細胞へ分化する系譜と筋サテライト細胞へ分化する系譜に分岐する。筋芽細胞分化の系譜では、体節由来の筋前駆細胞が骨格筋分化のマスター遺伝子 MyoD を発現して筋芽細胞へと分化し、Myogenin の発現により筋芽細胞の融合 (筋管細胞) を経て成熟した筋線維が構築される。この筋芽細胞の分化段階では、まず胚性筋芽細胞が 1st 線維を形成し、その後、胎性筋芽細胞が 2nd 線維を構築する。この胚性筋芽細胞から胎性筋芽細胞へのスイッチングには転写因子 Nfix が基軸として働く。

一方、この筋芽細胞分化の系譜とは別に、MyoD 発現を抑制し Pax7 発現を上昇させることによって筋サテライト細胞に分化するものが現われる (マウス体肢筋では胎生 16.5 日前後から出現)。Pax7 は筋サテライト細胞が筋幹細胞として機能するための中心的な役割を担う (Mourikis ら, 2014)。Nfix は Pax7 の下流に位置しており、筋前駆細胞から筋サ

テライト細胞への分化に寄与することが示唆されている。

また、この筋サテライト細胞への分化には Notch が不可欠であり、Pax7 の発現維持と MyoD, Myogenin の発現抑制に働く。Notch 分子では細胞内ドメイン領域が分割・遊離・核内移行して、筋サテライト細胞の分化制御に働く遺伝子を標的として転写誘導する。この過程では Sdc3, Mstn, Cxcr4, Cebpb も Notch と協働して筋芽細胞の分化抑制に働く (Olguin ら, 2014)。Notch の標的遺伝子である Hes3 と同 family に属する Hes1 の二重欠損マウス (単独欠損では不顕) では筋サテライト細胞が休止状態を維持できず筋線維に分化するため、結果として細胞数が減少し筋再生異常が起こる。

これまでの研究では、組織内で集積する筋前駆細胞から筋芽細胞/筋サテライト細胞への方向付けと筋サテライト細胞に至る仕組み、筋線維上に位置するための細胞間相互作用についても不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、胎生期マウス舌筋発生における筋前駆細胞から筋サテライト細胞への分化誘導に働く分子制御機構を明らかにすることである。特に、分化制御の中心的な役割を担う Pax7 Nfix Notch を基軸とした分子ネットワークとその調節に働く microRNA (miRNA) に着目した。この目的に向けて、胎生期舌筋組織での免疫多重染色により、分化過程にある筋サテライト細胞の挙動と表現型の推移を解析するとともに、遺伝子/miRNA の網羅的な定量解析により、分化誘導に働く候補因子を抽出した。

## 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従って、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 ~ 18.5 日の妊娠マウスを麻酔による安楽死後、速やかに胎仔個体を摘出し、体幹部を含む頭部口腔顎顔面部分を採取した（各時期の胎仔約 30 個体を使用）。

マイクロアレイを使った網羅的な解析では、遺伝子発現には Mouse GeneChip アレイ（Mouse Genome 430A 2.0、Agilent）を用いて発現解析・発現パターン解析・遺伝子間の関連性の解析を行った。microRNA 発現には Mouse miRNA アレイ（miR Base ver.12.0、Agilent）を用いて発現解析および mRNA と miRNA 間のデータの統合解析を行った。マイクロアレイデータの処理には、Ingenuity Pathway Analysis（IPA）解析（Ingenuity Systems、USA）を使って遺伝子プロファイリングを実施した。遺伝子相互のパスウェイ解析には IPA のほかに、KEGG パスウェイ（京都大学、www.genome.jp/kegg）を使用した。

DNA マイクロアレイ法で検出された遺伝子発現レベルを検証する目的では、アレイ分析用試料をリアルタイム PCR で定量分析した。遺伝子発現の部位特異性を検証する目的では、免疫組織化学による翻訳産物の局在を確認するとともに、EMAGE/ MGI（mRNA *in situ* hybridization database）データベースの ISH 画像から遺伝子発現部位を確認した。さらに、両突起の微細領域での遺伝子発現を確認する目的で、組織顕微切断とリアルタイム PCR による解析を実施した。

免疫組織学的解析では、胎生 10.5 ~ 18.5 日のマウス胎仔を対象として、舌原基/組織の薄切切片上での骨格筋系譜の細胞マーカーや筋分化制御因子などの特異抗体を用いた免疫多重染色を行い、舌筋の細胞系譜を識別した。筋サテライト細胞への分化誘導に関わる誘導因子候補（Cxcr4 とそのリガンド Cxcl12 等）に対しては組織内局在の検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 舌原基での筋サテライト細胞の分化制御因子 *Nfix* とその関連遺伝子の発現

顎顔面領域での異なる胎齢期の試料間での DNA マイクロアレイデータに基づいた遺伝子発現の網羅的な解析と IPA による遺伝子群の機能・パスウェイなどのアノテーション解析によって、胎生 10.5 日から胎生 11.5 日にかけて筋分化に関連した遺伝子群の発現が有意に上昇することがわかった。胎生 11.5 日から胎生 14.5 日にかけては、*Nfix1* の制御下にある胚性筋芽細胞と胎性筋芽細胞の分化スイッチの指標となる遺伝子群や筋サテライト細胞に関わる遺伝子群と microRNA 群の発現上昇がみられた。

筋サテライト細胞の分化に関わる遺伝子群として、舌原基における *Nfix* の発現は、胎生 10.5 日から胎生 11.5 日にかけて急速に上昇して胎生 14.5 日でピークとなり、その後、一定の発現量を維持していた。興味深いことに、この解析結果は体肢骨格筋では胎生 14.5 日以降（胎生 16.5 日で発現ピーク）で発現することと異なっており、舌筋の特異性が反映していると考えられた。*Nfix* の関連遺伝子としては、*Pax7* は胎生 11.5 日で急上昇し、胎生 13.5 日で発現ピークを示した。そのほか、*Hesr1, 2, 3, Notch1, Dll1, Jag2, Sdc3, Cxcr4, Cxcl12, Cebpb* の発現パターンも確かめられた。これらの筋サテライト細胞の分化に関わる遺伝子のなかで、*Cxcr4* と *Cxcl12* が注目された。

microRNA についての検討では、*Nfix* を標的とする *miR-10, -92a, -103, -124, -130, -152, -378, -483* と *Pax7* を標的とする *miR-145, Let-7* が舌筋のサテライト細胞の分化に寄与していることが示唆された。このなかで、*miR-152* と *miR-378* は *Nfix* の発現パターンと極めて類似しており、これらの間の関連性が特に注目された。

## (2) 舌原基での筋細胞系譜の Nfix の発現と関連因子の局在

舌初期発生の形態学的な指標となる外側舌隆起は、癒合直前（胎生 11.0 日）の下顎突起背側で左右同調性を保って組織隆起として誘導され、下顎突起の癒合完了（胎生 11.4 日）により正中溝を挟んで左右対称の 2 峰性の隆起として識別できる。外側舌隆起の形成時期においては、筋前駆細胞（Desmin 陽性）は正中溝直下に集結し、筋系譜の細胞集団を構築する。筋系譜の細胞集団の中央部付近では、MyoD を発現した筋芽細胞が、辺縁部では筋前駆細胞がそれぞれ位置していた。辺縁部の筋前駆細胞から筋サテライト細胞へ分化することが考えられた。なお、外側舌隆起の組織隆起の成立には、筋系譜細胞は参画しておらず、筋系譜の細胞集団周囲の非筋系譜（Desmin 陰性）の間葉細胞の増殖によることが判明した。

筋前駆細胞から筋サテライト細胞へ分化に関して、舌原基内では、筋系譜の Nfix 陽性細胞は胎生 11.5 日に出現し、胎生 14.5 日では散在性の局在が多数確認できた。さらに、これらの舌筋系譜の細胞のなかに Cxcr4 共陽性細胞の存在が確認された。Cxcr4 のリガンドである Cxcl12 は舌筋原基の内外に位置する血管あるいはリンパ管の内皮細胞に局在していたことから、脈管内皮細胞から発した Cxcl12 シグナルは舌筋原基内の Cxcr4 を有する特定の筋系譜の細胞に結合・受容されると考えられる。したがって、筋サテライト細胞の分化制御には、脈管内皮細胞と舌筋細胞系譜との間で Cxcr4 - Cxcl12 シグナル系が重要な働きをしているものと推察できる。

## (3) まとめ

本研究では、胎生期での舌筋発生において、筋前駆細胞から筋サテライト細胞への分化に働く重要な分子として転写因子 Nfix とその関連因子の発現と局在を明らかにした。舌

原基内では、胎生 11.5 日から胎生 14.5 日にかけて筋系譜の一部の細胞は Nfix を発現していることが確かめられた。筋サテライト細胞への分化では、舌筋系譜の細胞と近傍の脈管内皮細胞との間で Cxcr4 - Cxcl12 シグナル系を介して相互作用していることが示唆された。本研究から、舌筋細胞系譜での筋サテライト細胞の分化には、Nfix を中心とした特異な分子制御機構が精妙に働いていると推察された。

## 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 2 件)

Torii D, Soeno Y, Fujita K, Sato K, Aoba T, Taya Y, Embryonic tongue morphogenesis in an organ culture model of mouse mandibular arches: blocking Sonic hedgehog signaling leads to microglossia. *In Vitro Cell Dev. Biol. Animal* (査読有), 2015; 52: 89-99, doi: 10.1007/s11626-015-9951-6.

Sugimoto T, Taya Y, Shimazu Y, Soeno Y, Sato K, Aoba T: Three-dimensional visualization of developing neurovascular architecture in the craniofacial region of embryonic mice. *Anat. Rec.* (査読有), 298, 1824-1835, 2015. doi: 10.1002/ar.23179.

〔学会発表〕(計 7 件)

Taya Y, Sasaki Y, Sato K, Soeno Y: Molecular switches of differentiation from myogenic progenitors into myoblasts and satellite cells in the mouse developing tongue, Society for Developmental Biology 77th Annual Meeting (SDB), 2018 年 7 月 20~24 日, Marriott Waterfront (Portland, Oregon, USA).

Taya Y, Sasaki Y, Shirako Y, Sato K, Soeno Y: Tongue morphogenesis through epithelial-mesenchymal interaction in mouse embryos, 18th International Congress of Developmental Biology (ISDB 2017), 2017年6月18~22日, University Cultural Centre, National University of Singapore (Kent Ridge Crescent, Singapore).

Taya Y, Sasaki Y, Sato K, Soeno Y: Tongue myogenic cell differentiation regulated by Nfix and its related factors in embryonic mice, 第59回歯科基礎医学会学術大会, 2017年9月16~18日, 松本歯科大学 (長野県・松本市).

Taya Y, Sato K, Shirako Y, Soeno Y: Regulatory switches of commitment from myogenic progenitors into myoblasts or satellite cells in the development of mouse tongue, 平成29年度日本歯科大学歯学会第4回ウィンターミーティング, 2017年12月9日, 日本歯科大学生命歯学部 (東京都・千代田区).

Taya Y, Shirako Y, Sato K, Soeno Y: Lymphangiogenesis in the craniofacial region of embryonic mice, SDB (Society for Developmental Biology) 75th Annual Meeting - ISD (International Society of Differentiation) 19th International Conference, 2016年8月4~8日, Marriott Copley Place (Boston, Massachusetts, USA).

田谷雄二, 添野雄一, 白子要一, 佐藤かおり: 胎生期マウスの顎顔面領域におけるリンパ管初期発生, 平成27年度日本歯科大学歯

学会第2回ウィンターミーティング, 2015年12月5日, 日本歯科大学生命歯学部 (東京都・千代田区).

田谷雄二, 添野雄一, 白子要一, 青葉孝昭, 佐藤かおり: マウス顎顔面発生における静脈からのリンパ管内皮細胞の分化, 第57回歯科基礎医学会学術大会, 2015年9月11~13日, 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター (新潟県・新潟市).

〔図書〕(計2件)

田谷雄二, 添野雄一 (分担執筆): 6章 口腔・顎顔面領域の先天異常, 新スタンダード口腔病理学 (槻木恵一, 岡田康男編集), pp 100-103, 学建書院, 東京, 2017年. ISBN番号: ISBN978-4-7624-0703-1

田谷雄二 (分担執筆): 改訂 最新口腔病理学の整理 (日本歯科大学 病理学講座編, 添野雄一 監修, 佐藤かおり 編集), キタ・メディア, 東京, 2017年. ISBN: 978-4-907832-20-9.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ndu.ac.jp/~pathhome/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田谷 雄二 (TAYA, Yuji)  
日本歯科大学・生命歯学部・准教授  
研究者番号: 30197587

### (2) 研究分担者

添野 雄一 (SOENO, Yuuichi)  
日本歯科大学・生命歯学部・教授  
研究者番号: 70350139

佐藤 かおり (SATO, Kaori)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：90287772

佐々木 康成 (SASAKI, Yasunori)

神奈川県立こども医療センター・臨床研究  
所・部長

研究者番号：70332848