

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08498

研究課題名(和文) 頭蓋底正中中部骨格原基の初期形成の場として、口窩天井部に注目した解析

研究課題名(英文) Morphogenesis of the primordium of skull base cartilage which formed in the stomodeal roof of vertebrate embryos

研究代表者

和田 直之 (WADA, Naoyuki)

東京理科大学・理工学部応用生物科学科・教授

研究者番号：50267449

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、頭蓋底骨格発生過程の理解を目指し、ニワトリ、ゼブラフィッシュ、マウス胚を材料として、胚の口窩天井部周辺での軟骨形成を調べた。ニワトリ胚の口窩周囲に分布した細胞の発生系譜を調べ、頭蓋底骨格が複数領域に由来することを示した。一方、ニワトリ、ゼブラフィッシュ胚での比較から、口窩天井部での軟骨形成に先行・重複して転写因子のFoxf1が発現することを見出した。過剰発現や機能抑制実験から、Foxf1は頭蓋底形成過程で機能することを確認した。マウス胚口窩天井では、Foxf1の発現は口窩天井近傍の軟骨原基に限定され、遠位の原基では観察されず、軟骨原基の性質が領域によって異なることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭蓋底骨格は頭顔面の形態形成に大きく影響する重要な骨格であるが、この骨格は頭蓋の下方＝脳胞の下方に形成されるため、外部からの観察が難しく、発生過程や細胞系譜に関わる知見は、動物種を問わず少なかった。本研究においては、口窩天井部での軟骨形成に注目して行うことで、従来不十分であった発生過程の詳細や細胞の系譜解析、軟骨形成に関与する遺伝子発現を記載し、機能解析を行うことが出来た点で、学術的意義があるものと考えている。また、他の動物種との相同関係が不明だったマウス頭蓋底骨格について、形態や遺伝子発現の点から口腔近傍の一部が相同である可能性が示され、今後の頭蓋底発生研究に大きく寄与できると考えている。

研究成果の概要(英文)：The developmental process and origin of the anterior part of the skull base cartilage are still unclear. In this project, I analyzed the morphogenesis of the cartilage primordium formed in the stomodeal roof (SR), which has been less focused as a developmental field of the skull base.

Developmental fate of cells distributed in SR was analyzed. I found that cells in the ventral edge of the frontonasal prominence formed medial part of the skull base cartilage, while cells in the maxillary prominence formed lateral part of the cartilage. Next, the expression of Foxf1 was analyzed. Foxf1 was expressed prior to differentiation of skull base cartilage in chick and zebrafish embryos. Disruption of Foxf1 expression in SR caused skeletal defects of skull base in chick and zebrafish, suggesting that Foxf1 is involved in morphogenesis of skull base. During mouse development, the expression of Foxf1 was also observed in SR, but the expression was restricted to the ventral part of the primordium.

研究分野：脊椎動物の頭顔面骨格および四肢骨格の形態形成

キーワード：顎顔面発生 頭蓋底軟骨 Foxf1 神経堤細胞 発生系譜

## 1. 研究開始当初の背景

頭蓋底骨格のうち、下垂体窩より前方（吻側）にある正中部分（マウスやヒトでは蝶形骨の体部や篩骨に相当）は脳を支え、また顔面形態にも影響する構造である。頭蓋底前部は軟骨性骨格として、頭部発生比較的初期から形成されるが、脳胞の下部に形成されるために、動物種を問わず解析は進んでいない。研究代表者は、この軟骨原基は、発生の初期段階に口窩天井部と脳胞の腹側で挟まれた領域に形成されることを見出していた（Wada et al., 2011）ことを背景に、頭蓋底発生解析を進める新奇な視点として、口窩天井部での軟骨形成に注目することを考えた（図1）。胚前端部は発生初期から複雑で、特に口窩天井部は顔面隆起に囲まれた狭小な領域でもあり、この領域に注目して軟骨形成やそれに伴う細胞動態を調べた報告は、研究開始段階から極めて少なかった。その点で、本研究点はオリジナルな視点・発想に立脚したものと考えている。

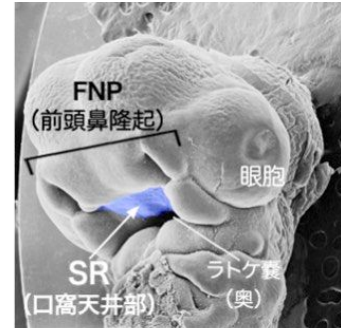


図1. 口窩天井部の場所。一般的には顔面骨格形成の場とされる前頭鼻隆起 (FNP) と、ラトケ嚢に挟まれた部位を口窩天井部とする。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、口窩天井部に分布する神経堤由来間充織細胞の軟骨原基形成過程について、原基形成部位の組織学的解析、発生系譜、領域特異的遺伝子発現、遺伝子機能解析、などの点から調べることを目的とした。実験はニワトリ胚とゼブラフィッシュ胚、マウス胚を併用して行い、高等脊椎動物の頭蓋底発生に共通する機構を見出すことを目指した。一方で、マウス胚での初期頭蓋底発生研究は情報が少ないため、本実験により新たな知見を得ることも目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 材料：ニワトリ胚（白色レグホン）、マウス胚（ICR 系統）、ゼブラフィッシュ胚（AB 系統）について、それぞれ必要とする発生段階の胚を用いた。

(2) in situ hybridization (ISH) および免疫組織化学 (IHC)：ISH と IHC は一般的な方法で行った（Wada et al., 2011）。IHC の一部は複数の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 PNA レクチン染色を併用する操作も行った。

(3) ニワトリ胚口窩天井部の発生系譜解析：蛍光色素 Dil または DiO をガラス微細管で注入することにより、発生段階 13-15 胚の眼胞下部から口陥周辺に分布する間葉細胞を標識した。2-3 日ほど発生させて、外観から蛍光色素の分布を観察し、次いで切片上で蛍光標識部位と軟骨分化領域を比較した。研究期間の後半では、Dil の代わりに Tol2-pCAGGS-EGFP プラスミドとトランスポゼース mRNA、および遺伝子導入試薬 (Lipofectamine 3000, Thermo Fisher) の混合液を注入して、間葉細胞の一部に EGFP 遺伝子を導入し、細胞の分布を調べた。

(4) Foxf1 遺伝子の発現および機能解析：ニワトリ、マウス、ゼブラフィッシュの胚由来 mRNA を鋳型にしてそれぞれから Foxf1 遺伝子の蛋白質コード領域をクローニングした。ISH 法によりそれぞれの胚での発現部位を調べ、軟骨分化領域と比較した。マウス胚については抗 Foxf1 抗体と抗 Spx9 抗

体を用いた IHC でも比較した。機能解析は、ゼブラフィッシュ胚 *foxf1* に注目し、*foxf1*mRNA 注入による過剰発現，および *foxf1* 遺伝子への CRISPR/Cas9 法による発現低下の両面から，機能解析を試みた。

(5) マウス口窩天井部形態変化の組織学的解析：胎性 10.0 日 (E10.0) から 12.5 日 (E12.5) の胚について頭部の冠状断切片を作製し，形態変化を調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) ニワトリ胚の口腔天井周辺に分布する細胞の発生運命・系譜解析

ニワトリ 2 日胚の口窩天井部に分布する細胞の発生運命を，*Dil*/*DiO* による蛍光染色により調べた (図 2 A-F)。前頭鼻隆起の下部に分布し，後に内側鼻隆起 (MNP) の下方に分布する間充織細胞は，48 時間後そのまま口腔天井の正中部に位置していた。正中部軟骨の凝集マーカーの PNA と重複して分布したため，この領域の細胞は頭蓋底正中部を作ることがわかった。

一方，眼胞の後方から下部に分布する神経堤細胞は頭蓋底軟骨の側方部に留まった。これらの系譜を考慮すると，頭蓋底軟骨は複数の領域から構成されることがわかった。なお，前頭鼻隆起 (FNP) の上方に分布する細胞や，前頭鼻隆起の側方に分布し，後の外側鼻隆起 (LNP) を形成する細胞は，頭蓋底軟骨内には観察されなかったことから，通説と異なり，前頭鼻隆起を構成する細胞の多くは頭蓋底軟骨形成には参加しないと考えられた。

*Dil*/*DiO* による染色では，発生に伴う蛍光の減衰や染色色素の分散が問題になる。改善のため，リポフェクション法と Tol2-トランスポゾンシステムを組み合わせて EGFP 遺伝子を目的部位に導入し，定常的 GFP 発現細胞を誘導して，発生系譜を調べる系を考案した (図 2 G, H)。2.5 日胚で局所注入すると，導入部位に GFP 蛍光を発する細胞は複数観察され，発現細胞は 5.5 日胚でも確認できた。切片での解析から，導入細胞は口窩天井部に分布して，頭蓋底

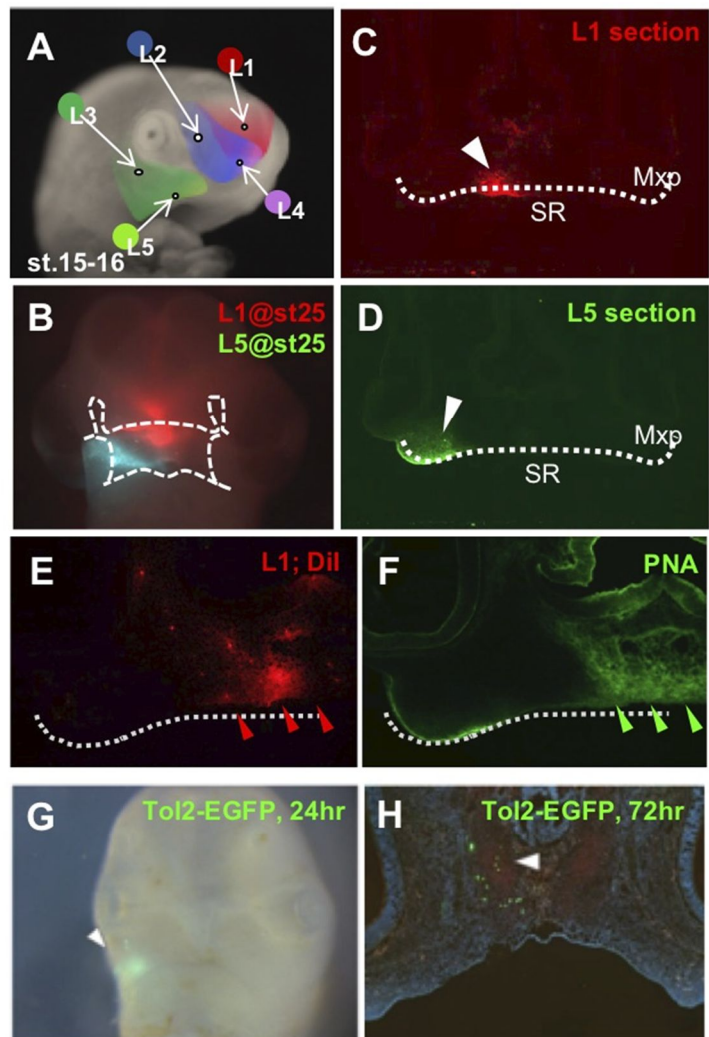


図 2. ニワトリ胚口腔天井周辺に分布する細胞の発生運命・系譜解析。A, 標識部位；B, 48 時間後の分布；C, D, 標識部位に応じた分布位置の違い；E, F, L1 領域の標識細胞は正中部軟骨 (PNA) を形成する。；G, H, Tol2-トランスポゾン系による定常的な細胞標識による系譜解析。



軟骨原基の一部に参加しており、細胞分裂像も観察された。

ニワトリ全胚培養系の確立：口窩天井部への注入を容易にするために、全胚培養系の確立を試みた。いくつか条件を検討した結果、より初期胚の全胚培養法であるNew culture法を改変して、最終的に2.5日胚を4.5日胚程度になるまで発生・維持することが可能となった。この系を使って口窩天井部の標識と以降の追跡が可能であることも確認できた。一方で、4.5日胚よりも培養は困難で、今後の改善点である。

## (2) 口窩天井部特殊化と発現する遺伝子の機能解析

RNAseqにより口窩正中付近に分布する細胞で発現する遺伝子をリストアップし、発現が報告されていない遺伝子に注目して、その発現をin situ hybridizationにより調べた。約30個の遺伝子を調べたが、口窩天井部で発現する遺伝子はなかった。この中には口窩天井部を囲む顔面隆起では発現する遺伝子が複数あり、口窩天井部では周辺の顔面隆起とは異なる遺伝子発現制御が行われていると考えられた。

文献や遺伝子発現データベースを調べ直し、顔面での発現が報告されているいくつかのFox転写因子群に注目し、ニワトリでクローニングして口腔天井での発現を調べた。その結果、Foxf1は頭蓋底の基本構造である梁軟骨の形成に先行するように口腔天井で一对の棒状に発現し、その後軟骨が形成される発生段階では減弱した(図3)。一方、Foxd1は軟骨原基形成後に不明瞭だが発現していた。これらの遺伝子についてゼブラフィッシュとマウスでもクローニングを行い、それぞれ発現を調べた。その結果、ゼブラフィッシュFoxf1はニワトリと同様に軟骨形成に先行して軟骨原基形成部位で対になった棒状に発現し、一方、マウスFoxf1は後述するように一部の軟骨に限定して発現した。いずれの動物でもFoxd1の領域は不明瞭だった。また、Foxf1は肢芽での軟骨分化時には発現が観察されなかったことから、Foxf1は頭蓋底軟骨の形成に選択的に関与していると考えた。これらのことから、Foxf1は頭蓋底軟骨形成の鍵分子になると考え、以降の解析を行った。

ニワトリ胚を用いた解析から、口腔天井でのFoxf1の発現は、口窩天井部と脳胞で発現して頭蓋底形成に関わるSonic Hedgehog

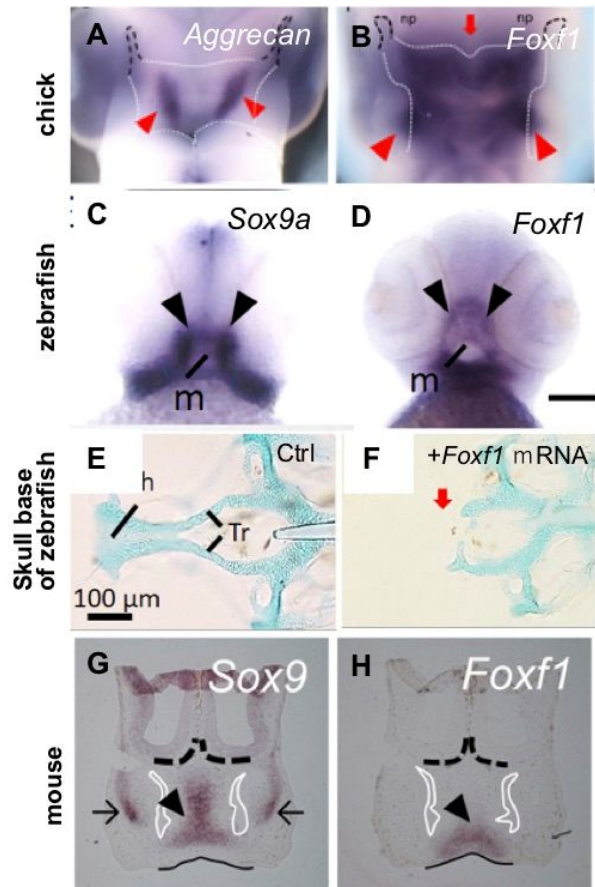


図3. 口窩天井部での軟骨形成とFoxf1の発現。A, B, ニワトリ胚での発現；C, D, ゼブラフィッシュ胚での発現。Foxf1は軟骨形成部位で発現する。E, F, Foxf1過剰発現させたゼブラフィッシュの頭蓋底軟骨。G, H, マウス胚での発現。Foxf1は軟骨の一部でしか発現しない(矢じり)。

(Shh) により制御されることがわかった。次いで、ニワトリ胚とゼブラフィッシュ胚を用いてFoxf1の機能解析を行った。ニワトリ胚に対しては、in vivo エレクトロポレーション法で過剰発現させた結果、頭部骨格の変形や低形成が観察された。一方、ゼブラフィッシュ胚に対しては、受精卵にmRNAを導入して過剰発現の効果を検討した結果、頭蓋底軟骨の正中部である篩骨の低形成や融合不全などが観察された。一方、CRISPR/CAS9法で、foxf1とそのオーソログであるfoxf2a, foxf2bを同時にノックダウンした結果、篩骨を支える梁軟骨の形成に影響が出た。以上の結果から、Foxf1はFoxf2と協調して頭蓋底軟骨形成の制御に関わると考えられた。

### (3) マウス胚での口窩天井の形態変化

マウス胚での口窩天井部に注目し、そこでの軟骨発生の開始時期をSox9の発現を指標に調べた。その結果、E10.5の段階で既に発現が観察され、以降、口腔天井の前端から咽頭に伸びるように発現していたことから、頭蓋底軟骨は従来考えられていたよりも早い段階から形成されていると考え、E10.5～E12.5胚での口窩天井部の形態変化と軟骨原基の形成過程を再検討した。

E10.5では口窩天井部と脳胞底部の間は1-2層の間葉細胞が分布するだけだったが、E11.5胚では口窩天井前部では背腹方向に厚みを増し、これが鼻中隔形成の場となる正中部の膨らみとなった。一方で、口腔天井の後方（咽頭側）では組織の肥厚は観察されず、増殖の不均一性が示唆された。Sox9を指標とした軟骨分化は、口腔天井部の近傍に分布する細胞で開始したが、E11.5胚でのSox9の発現は、従来から報告されている鼻中隔軟骨となる正中部の無対性の発現に加え、その下部に一对の棒状の構造を示す発現も観察された。これは従来のType II collagenやAlcian blue染色からは報告されていない。ニワトリ胚やゼブラフィッシュ胚で発現していたFoxf1は、上記の一对の棒状軟骨では発現したが、より上方で口腔天井上皮から離れた軟骨では発現していなかった。このように、マウス頭蓋底軟骨となる軟骨原基については、不均一性が示唆された。

従来の頭部発生研究では、マウスなど哺乳類の頭蓋底発生においては、他の動物種で観察される「ラトケ囊の前方に出来る対になった軟骨（梁軟骨）」に相当する軟骨が観察されていない。哺乳類では、正中部に形成される1本の軟骨がTrabecular plateと命名され、これが他動物の梁軟骨に対応する構造とされる。今回、研究代表者は、マウス頭部軟骨形成の初期段階で、Sox9陽性かつFoxf1陽性の一对の軟骨構造を見出している。他の動物種では、Foxf1は口腔天井部で一对の棒状構造として発現し、この領域は直後に軟骨分化して梁軟骨となる。マウス口腔天井部で発現するFoxf1も梁軟骨で発現することが予想されることから、マウスの中篩骨腹側に形成される対になった軟骨は、従来から存在が予想されているが、確認されていない梁軟骨の残存構造ではないかと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Morishita S, Wada N, Fukuda M, Nakamura T.	4. 巻 593
2. 論文標題 Rab5 activation on macropinosomes requires ALS2, and subsequent Rab5 inactivation through ALS2 detachment requires active Rab7.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Letter	6. 最初と最後の頁 230-241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.13306.	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 -
1. 著者名 Kawakami H, Johnson A, Fujita Y, Swearer A, Wada N, Kawakami	4. 巻 247
2. 論文標題 Characterization of cis-regulatory elements for Fgf10 expression in the chick embryo.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 1253-1263
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dvdy.24682.	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 該当する
1. 著者名 Koinuma, S., Takeuchi, K., Wada, N., Nakamura, T.	4. 巻 22
2. 論文標題 cAMP-induced activation of protein kinase A and p190B RhoGAP mediates down-regulation of plasmalemmal TC10 GTPase activity and neurite outgrowth.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 953-967
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1111/gtc.12538	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 -
1. 著者名 Nakao, R., Okauchi, H., Hashimoto, C., Wada, N., Oishi, K.	4. 巻 121
2. 論文標題 Determination of reference genes that are independent of feeding rhythms for circadian studies of mouse metabolic tissues.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism.	6. 最初と最後の頁 190-197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.ymgme.2017.04.001.	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 -

1. 著者名 Ohgo, S, Ichinose, S., Yokota, S., Sato Maeda, M., Shoji, W., Wada, N.	4. 巻 61
2. 論文標題 Tissue regeneration during lower jaw restoration in zebrafish shows some features of epimorphic regeneration.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development, Growth Differentiation	6. 最初と最後の頁 419-430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1111/dgd.12625">https://doi.org/10.1111/dgd.12625</a>	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 -

1. 著者名 Okauchi H, Higo-Yamamoto S, Sowa T, Oike H, Yamamoto S, Wada N, Sakamoto K, Oishi K.	4. 巻 524
2. 論文標題 Chronically skipping breakfast impairs hippocampal memory-related gene expression and memory function accompanied by reduced wakefulness and body temperature in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 129-134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.077.	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25件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 和田直之, 長嶋遼, 加藤英祐
2. 発表標題 口窩天井部に注目した, マウス胚前部頭蓋底軟骨の初期発生
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤英祐, 内藤唯衣, 大湖史朗, 和田直之
2. 発表標題 頭蓋底骨格形成の場におけるFox遺伝子の発現とその制御機構
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 室田光希, 大湖史朗, 和田直之
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ頭部骨格原基形成におけるfoxf1の発現と機能解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長嶋遼, 加藤英祐, 大湖史朗, 和田直之
2. 発表標題 マウス胚における頭蓋底軟骨原基の初期形成過程
3. 学会等名 日本動物学会関東支部会71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田優, 大湖史朗, 和田直之
2. 発表標題 顔面の初期形成過程におけるレチノイン酸シグナル経路の機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田匠海, 和田直之
2. 発表標題 頭顔面骨格の初期形成の場となる口腔周辺部の領域特異化と形態形成
3. 学会等名 日本動物学会関東支部会第72回大会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 畑田真実、藤條月乃、和田直之
2. 発表標題 ニワトリ胚頭部顔面骨格形成を担う細胞系譜解析のための実験系の改善
3. 学会等名 日本動物学会関東支部会第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田優、大湖史朗、和田直之
2. 発表標題 顔面の初期形成過程におけるレチノイン酸シグナル役割の解析
3. 学会等名 日本動物学会関東支部会第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高津誠秀、吉元雅人、大湖史朗、和田直之
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ foxf 遺伝子群の機能変異体における頭蓋底骨格形態異常の解析
3. 学会等名 日本動物学会関東支部会第72回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------------------------	-----------------------	----