

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09530

研究課題名(和文) マウス舌発生と連携した舌下神経軸索の伸長誘導を制御する分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism governing the axon guidance of hypoglossal nerves associated with 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：舌下神経の軸索は後頭神経核から伸長して遠隔の舌原基まで到達する。本研究では、マウス胎仔での舌下神経の軸索伸長について、先行して遊走する舌筋細胞系譜との関連について検討した。その結果、舌筋前駆細胞集団は後頭体節を発して行列を成して遊走し、その先頭集団は胎生10.5日に下顎突起正中部に到達した。舌下神経軸索は胎生10.5日に後頭神経核から伸長し、体幹側方で舌筋前駆細胞集団と合流して胎生11.5日に下顎突起の舌原基直下に到達した。舌下神経軸索の伸長方向を誘導する神経ガイダンス因子の候補として、エフリン・セマフォリン・ネトリン・ケモカインCxcl-Cxcrのシグナル系に属する因子が抽出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

舌がん治療などで舌組織を切除した後に、舌を再建することは舌機能の回復が困難であり、喫緊の課題となっている。これを克服するためには舌再生医療だけでなく、発生の段階、すなわち舌の発生と運動神経との関係を解明することが重要である。本研究の成果として、舌発生と舌筋分化、ならびに舌運動を司る舌下神経軸索との連結の仕組みを明らかにできたことは意義深い。また、全身組織の中でも複雑で特異性の高い口腔顎顔面発生の全容を解明する一環として、本研究で得られた知見はこの分野の研究に貢献できたと確信している。

研究成果の概要(英文)：The hypoglossal neuroaxes were elongated from occipital motor nuclei to the tongue primordium in the mandibular arches during craniofacial development. In this study, we investigated the interaction of hypoglossal neuroaxis with tongue myogenic cells. Consequently, we got the following data. The tongue myogenic cells individually migrated away from occipital somites at E9.5. The leading group of these cell streams arrived at the middle of mandibular arches through the ventral areas of the trunk and branchial arches at 10.5. In parallel, the hypoglossal neuroaxes started to elongate from occipital motor nuclei at E10.5, and reached the tongue primordium of the mandibular arches at E11.5. The migrating route of myogenic cells and hypoglossal neuroaxes overlapped each other. The gene expression and immunohistochemical analyses identified the reliable cues of axon guidance. The hypoglossal neuroaxes might interact with tongue myogenic cells during the initial development of tongue.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯学 病理学 マウス胎仔 顎顔面発生 舌下神経 舌筋発生 ガイダンス因子

## 1. 研究開始当初の背景

舌下神経は舌運動を支配する舌組織唯一の運動神経である。舌運動支配のために舌下神経と舌筋が連結するには、舌下神経軸索が舌組織の決められた正確な部位まで伸長していることが前提となる。胎生期での脳神経の発生では、その多くは各神経節から近傍の標的組織まで軸索を伸ばすのに対して、舌下神経の軸索は後頭神経核から起始して遠隔の舌原基まで長い距離を伸長している。

マウスの舌発生は、下顎突起が正中部で癒合する時期(胎生 11.0~11.5 日)に、下顎突起中央部で舌原基である外側舌隆起が生じ、第 2~4 鰓弓から鰓下隆起が融合する。舌筋系譜は筋前駆細胞から筋芽細胞・筋管細胞を経て筋線維に分化する(胎生 16.5 日以降)。申請者らはマウス胎仔の連続免疫染色切片を用いた組織立体構築法により、舌筋の起源となる筋前駆細胞(舌筋前駆細胞)が後頭体節に由来すること、同細胞は体節軸下先端部から出芽し、細胞集団として体幹間充織を遊走、第 4 2 鰓弓を経て、胎生 10.5 日に下顎突起中央部に達することを明らかにしている。

一方、舌下神経軸索は胎生 10.5 日に後頭体節の近傍にある複数の後頭神経核から起始し、収束後、節間動脈近傍の間充織と第 6 2 鰓弓を経て舌原基までの長距離を決まった経路を辿って伸長し、約 24 時間で(胎生 11.5 日頃)到達することが確かめられた。この舌下神経軸索の伸長経路は先に述べた舌筋前駆細胞の移住経路と近似している。

これまでに、神経軸索誘導に関する分子制御の仕組みとして、神経細胞培養系での軸索伸長の検証実験や遺伝子改変動物での軸索走行異常の解析を中心に、軸索伸長に関わる誘引/反発作用をもつガイダンス因子(分泌型と細胞接触型がある)が注目されてきた。高度な遊走能・応答能を備えた軸索先端部(成長円錐)が周囲細胞からのガイダンス因子を受容することにより、脇道に逸れずに方向性を保って標的部位に到達することができる。軸索ガイダンス因子/受容体には、Sema/ Nrp、Slit/ Robo、Eph/ Efn、Netrin/ Uncなどが知られている。

## 2. 研究の目的

舌下神経軸索は先行して遊走する舌筋前駆細胞集団とともに遠隔の舌原基まで伸長することが想定される。舌筋前駆細胞は舌下神経の軸索誘導を制御するガイダンス因子を発現し、舌下神経は制御因子を特異的に受容することが推察された。

本研究は「なぜ舌下神経は遠隔の舌原基にまで正確に伸長することができるのか」を命題として、舌運動を担う舌下神経の発生に焦点を絞り、後頭神経核から遠隔の舌原基までの軸索伸長を誘導する分子制御の仕組みを明らかにすることである。

## 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したがって、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 9.5~14.5 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、後頭領域を含む体幹部および頭部顎顔面部を採取した。

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(SurePrint G3 Mouse GE Microarray 8x60K v2, 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(SurePrint G3 Mouse miRNA 8x60K ref21, 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、TargetScan アルゴリズムを活用して遺伝子と miRNA リストを作成したうえで、ROKU 法、Metascape を用いたエンリッチメント解析、ならば

に Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 解析 (Ingenuity Systems, USA) などにより、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](http://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、マイクロ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、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 10.5~14.5 日のマウス胎仔を対象として、舌原基/舌筋前駆細胞/舌下神経軸索の組織内での位置的關係を把握するために、筋細胞 (Desmin) や神経軸索 (Gap43)、血管内皮細胞 (Pecam1・Endomucin)、上皮細胞 (Cytokeratin) などの特異抗体を用いた多重免疫染色を実施した。さらに、Desmin / Gap43 の二重免疫染色を施した頭頸部領域のパラフィン連続切片から組織立体構築し、舌筋前駆細胞と舌下神経軸索を 3 次元空間にマッピングした。さらに、舌下神経軸索のガイダンスに関わる因子候補に対しては組織内局在の検討を行った。

#### 4. 研究成果

今までの研究代表者らの研究から、マウス舌初期発生では、後頭神経核から起始した舌下神経軸索は、先行する舌筋前駆細胞の移住経路を辿って伸長し舌原基にまで到達することが想定された。この仮説を実証するために、まず胎生 9.5~12.5 日の ICR マウスの連続切片を筋系譜 (Desmin) と神経軸索 (Gap43) の特異抗体で二重標識し、後頭領域から舌原基までの舌筋前駆細胞の移住と舌下神経軸索の伸長の過程を追跡した。その結果、舌下神経軸索は胎生 10.5 日に後頭体節の近傍にある複数の後頭神経核から起始し、収束後、節間動脈近傍の間充織と第 6 2 鰓弓を経て舌原基までの長距離を決まった経路を辿って伸長し、約 24 時間で (胎生 11.5 日頃) 到達するという過程を詳細に把握することができた。さらに、舌筋前駆細胞は後頭体節の軸下先端部から出芽し、細胞集団として体幹間充織を遊走、第 4 2 鰓弓を経て、胎生 10.5 日に下顎突起中央部に達することも再確認できた。

神経軸索と筋前駆細胞を標識した 3 次元観察では、後頭神経核から起始した舌下神経軸索は後頭体節近傍の体幹間充織内で先行して遊走する舌筋前駆細胞の集団と合流後、細胞集団のなかを互いに接触しながら伸長し、下顎突起正中部の外側舌隆起直下に到達するのが確かめられた。

移住する舌筋前駆細胞から発することを前提とした舌下神経軸索の伸長方向を誘導する神経ガイダンス因子は DNA マイクロアレイとパイオインフォマティクス、ならびにリアルタイム PCR の解析に基づいて探索を行った。その結果、有力な神経ガイダンス因子の候補として、エフリン系、セマフォリン系、ネトリン系、ケモカイン Cxcl-Cxcr 系に属する因子を各系 1 つずつ同定することができた。顕微切断法とリアルタイム PCR の併用により、これらの候補因子の発現変動を検証するとともに、免疫組織化学により組織内局在の解析を行った。

さらに、舌下神経軸索の伸長に特異的な遺伝子発現 (mRNA) を制御する microRNA を探索するために、microRNA マイクロアレイを実施し網羅的に解析した。注目された microRNA については、顕微切断法とリアルタイム PCR の併用により、microRNA 発現量の推移と制御する遺伝子発現パターンとの対比に基づき検証を行った。その結果、舌下神経軸索の伸長方向を誘導する神経ガイダンスの候補因子の発現制御を担う microRNA についても探し出すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Taya Y, Sato K, Shirako Y, Soeno Y	4. 巻 62
2. 論文標題 Migration of lymphatic endothelial cells and lymphatic vascular development in the craniofacial region of embryonic mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Dev Biol	6. 最初と最後の頁 293-301
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1387/ijdb.170218yt	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 Wu Y-H, Taya Y, Kuraji R, Ito H, Soeno Y, Numabe Y	4. 巻 108
2. 論文標題 Dynamic microstructural changes in alveolar bone in ligature induced experimental periodontitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 339-349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s1026 6-019-00471-1	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 Wu Y-H, Kuraji R, Taya Y, Ito H, Numabe Y	4. 巻 53
2. 論文標題 Effects of theaflavins on tissue inflammation and bone resorption on experimental periodontitis in rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Periodont Res	6. 最初と最後の頁 1009-1019
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jre.12600	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

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yuji Taya, Kaori Sato, Youichi Shirako, Yuuichi Soeno
2. 発表標題 Craniofacial lymphatic vessels are formed by endothelial cells migrated from truncal cardinal veins
3. 学会等名 Society for Developmental Biology 78th Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Taya, Yasunori Sasaki, Tetsuro Horie, Kaori Sato, Yuuichi Soeno
2. 発表標題 Interaction of hypoglossal neuroaxis with tongue myogenic cells in mouse craniofacial development
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Taya, Yasunori Sasaki, Tetsuro Horie, Kaori Sato, Yuuichi Soeno
2. 発表標題 How can the hypoglossal neuroaxis elongate to tongue muscle in mice?
3. 学会等名 令和元年度日本歯科大学歯学会第6回ウィンターミーティング
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Taya, Kaori Sato, Youichi Shirako, Yuuichi Soeno
2. 発表標題 How are lymphatic vessels formed in the oral region of embryos?
3. 学会等名 令和元年度日本歯科大学歯学会大会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taya Y, Sasaki Y, Sato K, Soeno Y
2. 発表標題 Molecular switches of differentiation from myogenic progenitors into myoblasts and satellite cells in the mouse developing tongue
3. 学会等名 Society for Developmental Biology 77th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taya Y, Sato K, Shirako Y, Soeno Y
2. 発表標題 Lymphatic vascular development in the craniofacial region of embryonic mice    Migration of lymphatic endothelial cells from cardinal veins into mandibular arches
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of 51st JSDB and 70th JSCB
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taya Y, Sato K, Shirako Y, Soeno Y
2. 発表標題 Migration of lymphatic endothelial cells and lymphatic vascular development in the craniofacial region of embryonic mice
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田谷雄二
2. 発表標題 発生から顎再生を考える    口蓋の発生と口蓋裂の発症機構
3. 学会等名 第2回イモリ型の臓器再生フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田谷雄二
2. 発表標題 顎再生をめざして
3. 学会等名 第4回イモリ型の臓器再生フォーラム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐藤かおり, 田谷雄二, 白子要一, 添野雄一	4. 発行年 2018年
2. 出版社 キタメディア	5. 総ページ数 115
3. 書名 ポイントレビュー病理学・口腔病理学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>日本歯科大学病理学講座ホームページ:  <a href="http://www.ndu.ac.jp/-pathhome/">http://www.ndu.ac.jp/-pathhome/</a></p>
--

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
研究分担者	添野 雄一  (SOENO YUUCHI)  (70350139)	日本歯科大学・生命歯学部・教授   (32667)	
研究分担者	白子 要一  (SHIRAKO YOUICHI)  (50756377)	日本歯科大学・生命歯学部・助教   (32667)	削除：2019年3月8日
研究分担者	堀江 哲郎  (HORIE TETSURO)  (10508675)	日本歯科大学・生命歯学部・講師   (32667)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	佐藤 かおり  (SATO KAORI)  (90287772)	日本歯科大学・生命歯学部・講師    (32667)	
研究分担者	佐々木 康成  (SASAKI YASUNORI)  (70332848)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター（臨床研究所）・臨床研究所・部長    (82729)	

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