

平成 22 年 6 月 12 日現在

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2007～2009

課題番号：19570213

研究課題名（和文）二次口蓋の初期形成過程における *Tbx22* の機能解析研究課題名（英文）Roles of *Tbx22* during early stage of secondary palate development.

研究代表者

和田 直之 (Wada Naoyuki)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：50267449

研究成果の概要（和文）：本研究では、口蓋裂と舌小体短縮症の原因遺伝子である *Tbx22* に注目し、口腔構造形成過程での *Tbx22* の発現やその調節、また働きについてニワトリ胚を用いて調べた。*Tbx22* は口蓋原基の先端部で強く発現し、舌原基では原基の下部で強く発現するなど、上記疾患との対応が示唆された。この発現は BMP による負の制御を受けていた。機能解析の結果、*Tbx22* は顔面隆起の増大やそでの軟骨・骨分化を抑制したため、*Tbx22* は細胞増殖や分化の抑制を通して口腔構造の形成に関与すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In this project, we focused on the developmental process of the secondary palate and tongue in chick embryo, and analyzed the expression and function of *Tbx22*, which is involved in X-linked cleft palate and ankyloglossia in human. Expression of *Tbx22* is observed in the oral side of the maxillary process where the palatal shelf is emerged later, and in the bottom region of the tongue. The expression is regulated by BMP signaling. Misexpression of *Tbx22* suppressed proliferation of cells in the facial processes, and inhibited osteogenesis of the cells, suggesting the suppressive role of *Tbx22* on the formation of the secondary palate and tongue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学，発生生物学

キーワード：顎顔面形成，二次口蓋，舌，*Tbx22*，BMP

1. 研究開始当初の目的

我々ヒトの口腔天井にある二次口蓋は、口腔両側に形成される上顎隆起の一部が口腔側

に伸長し、正中で融合したものである。本研究の当初目的として、二次口蓋原基である口蓋板の初期形成過程の解明に焦点をあてた。

ヒト X 染色体連鎖型口蓋裂の原因遺伝子の一つである T-box 型転写因子の *Tbx22* に注目し、口蓋板における *Tbx22* の発現とその制御機構を調べ、一方で機能の解明を目指した。また材料としてニワトリ胚を用い、知見が豊富に得られているマウス胚との結果を比較することで、口蓋板形成とそこに関わる分子の役割を、発生生物学的かつ進化学的側面から理解したいと考えた。

2. 研究の目的

二次口蓋の形成は、口蓋板の形成→口蓋板の伸長→正中部での融合の順で進行する。本研究では、口蓋板の形成と伸長に関わる分子として、ヒト X 染色体連鎖型口蓋裂の原因遺伝子の一つである *Tbx22* に注目し、ニワトリ胚の口蓋板形成過程における *Tbx22* の発現とその制御、および機能を調べた。また *Tbx22* は舌の疾患とも関連するため、舌形成過程における発現やその制御についても調べた。

3. 研究の方法

(1) 動物：ニワトリ胚として白色レグホンをを用いた。(2) *in situ* hybridization (WISH)：WISH はニワトリ胚を用いた常法に則って行った (Wada et al. *Dev. Biol.* 264, 550-563, 2003)。(3) 器官培養：孵卵 5 日目の胚から下顎原基を単離し、カルチャーインサート (Nunc) 上に静置し、24-48 時間培養した。培地は DMEM+F12(1:1), 10%FBS を用いた。(4) 蛋白質の局所投与：CM-affigel blue bead (BioRad) を、BMP-7 (200 μ g/ml) または Noggin (1mg/ml) 溶液中に 1 時間浸し、次いでニワトリ胚の顔面隆起に移植した。操作胚は一定時間後に固定し、以降の実験に用いた。(5) トリレトロウイルス (RCAS) による遺伝子の異所的発現：*Tbx22* を組み込んだ RCAS 遺伝子の精製とウイルスの作製、ニワトリ胚への微細注入は、常法に則って行った (Wada et al., 2003)。

4. 研究成果

(1) ニワトリ胚口腔発生時の *Tbx22* の発現

まずニワトリ胚での口蓋板形成過程を調べた。口蓋板は 7 日胚から観察された (図 1)。この突起は、マウス胚のように板状構造とはな

らないが、正中部に向けて増殖、膨大する様子が観察された。

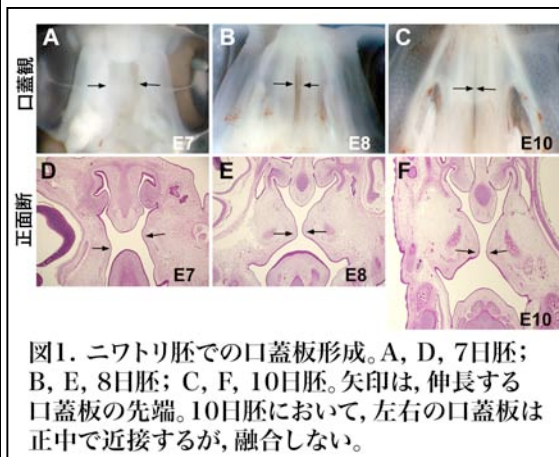


図1. ニワトリ胚での口蓋板形成。A, D, 7日胚; B, E, 8日胚; C, F, 10日胚。矢印は、伸長する口蓋板の先端。10日胚において、左右の口蓋板は正中で近接するが、融合しない。

次いで *Tbx22* の発現を調べた。*Tbx22* は、口蓋板形成よりもかなり以前から顔面隆起で発現していた (図 2A-F)。口蓋板が形成される上顎隆起では、まず口腔側全体での発現が観察され、発生の進行とともに口蓋板形成部に限定された (図 2A-E)。口蓋板が組織学的に確認できる発生段階になると、*Tbx22* の発現は低下した (図 2F)。一方、*Tbx22* は舌原基の形成時にも発現していた (図 2G-L)。舌原基は下顎隆起咽頭側の正中部が隆起し、その先

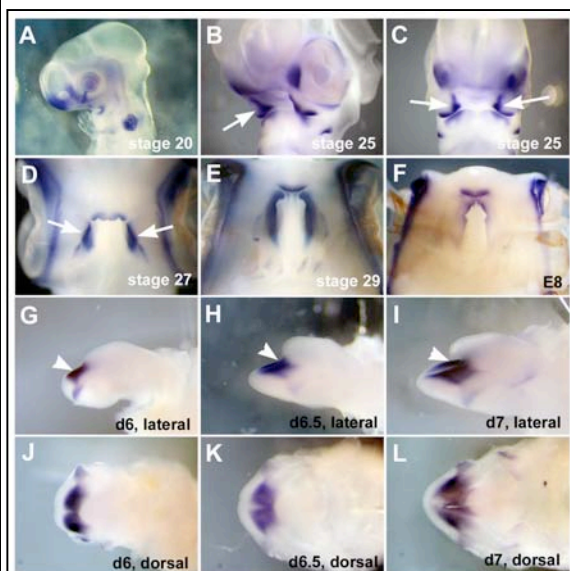
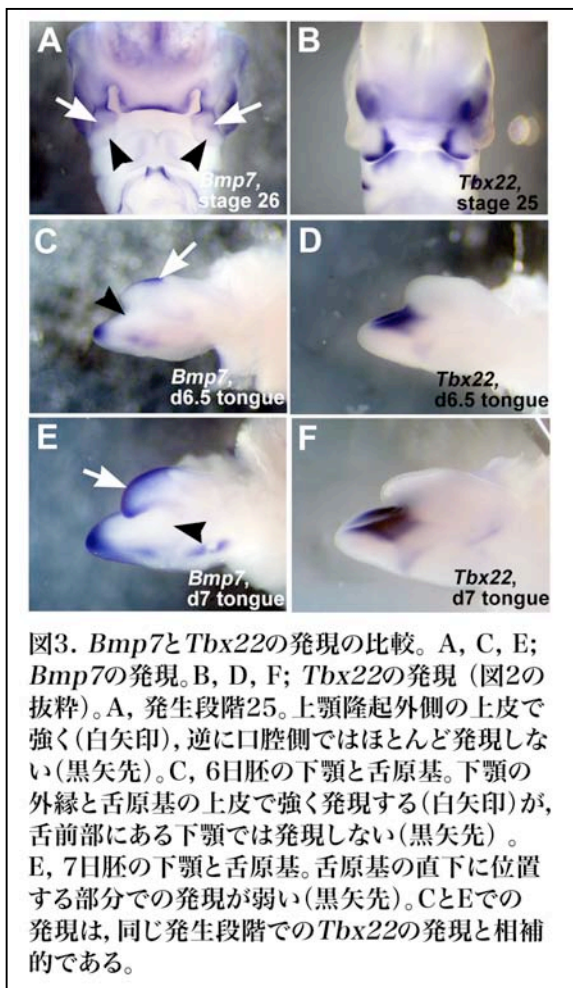


図2. ニワトリ胚顔面における *Tbx22* の発現。A, 発生段階 20。B-C, 発生段階 25 (同一胚)。白矢印は上顎隆起での発現を示す。D, 発生段階 27 (下顎を除去したもの)。E, 発生段階 29 (下顎を除去した胚の腹側観)。F, 8日胚における発現。G-L, 下顎隆起における発現。いずれも、舌原基の下部前方に位置する下顎間葉で発現する (白矢先)。

端が下顎隆起から独立して伸長する。*Tbx22*は、下顎隆起正中部の舌原基としては隆起しない領域で発現しており(図2G-I)、舌原基形成との関係が予想された。

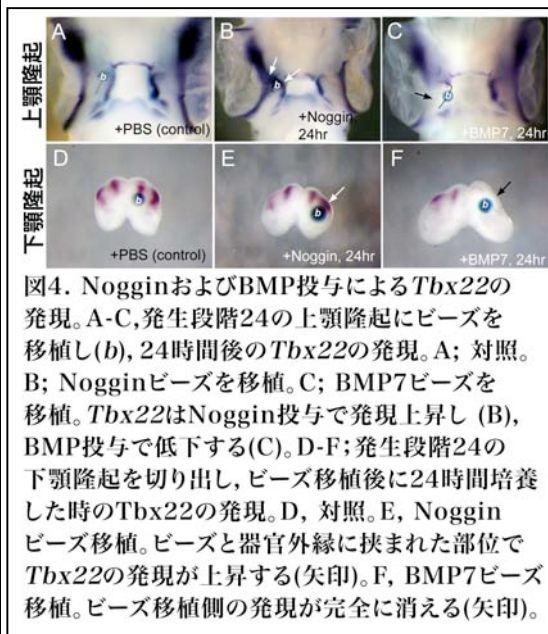
(2) BMPシグナルによる*Tbx22*の発現制御
*Tbx22*の発現制御に関わる候補分子探索のため、様々なシグナル分子の発現を調べた。その結果、*Bmp7*が上顎隆起および下顎隆起で*Tbx22*と相補的に発現していた(図3)。発生段階25では、*Bmp7*は上顎隆起上皮で発現し、特に隆起外側部で強く発現していた。一方、*Tbx22*が発現している口腔側では弱かった(図3A, B)。下顎隆起では、*Bmp7*は舌原基の上皮と隆起の外縁部で強く発現する一方で、*Tbx22*が発現している下顎中央の舌底部での発現はほとんど見られなかった(図3C-F)。



発現パターンから*Tbx22*の発現とBMPシグナルとの関連を予想し、これを検討した。まずBMPの関与を調べるため、口蓋形成部や下顎など*Tbx22*の強い発現が観察される部位に、

BMP阻害因子のNoggin蛋白質を局所投与して、24時間後の*Tbx22*の発現を調べた。その結果、*Tbx22*の発現領域は拡大し、上顎隆起の外側部でも発現が観察された(図4B)。一方、BMP7を投与すると、*Tbx22*の発現が顕著に低下した(図4C)。同様の発現変動は、下顎隆起にNogginまたはBMP7を投与した場合にも確認された(図4D-F)。他のシグナル蛋白質(Shh, FGF)やそれらの阻害剤では*Tbx22*の発現に変化は見られなかった。

以上から、*Tbx22*の発現はBMP-7などのBMPシグナルにより制御されると考えられた。



(3) *Tbx22*の異所的過剰発現の効果

顔面隆起で発現する*Tbx22*の機能を調べる目的で、本来は*Tbx22*を発現しない上顎隆起や下顎隆起の外側部で、RCASにより*Tbx22*を異所的に過剰発現させた(図5A)。*Tbx22*の過剰発現により、口腔形成に関与する別の遺伝子・*Msx1*の発現が低下した(図5B)。*Tbx22*を発現させた隆起の形成は対照に比べて小さく、それぞれから出来る上下顎は過剰発現側に大きく歪んだ(図5C, D)。骨格を調べたところ、過剰発現側で骨および軟骨分化が著しく抑制されていた(図5E)。

以上の結果から、*Tbx22*が隆起の細胞増殖を抑制していることを考え、*Tbx22*の細胞増殖への影響をBrdUの取り込みによって調べた。内在性*Tbx22*が発現する部位においては過剰な*Tbx22*は増殖に影響しなかったが、内

在性 *Tbx22* が発現していない部位においては、増殖は抑制された(図 5G, H, 囲み)。

Tbx22 は抑制型転写因子であるので、以上の結果は *Tbx22* が遺伝子発現の抑制、細胞増殖の抑制、細胞分化の抑制などの作用を持ち、その結果として操作側への強い変形が観察されたと考えられる。実際、*Tbx22* の DNA 結合ドメインと *Engrailed* 転写抑制ドメインとの融合型 *Tbx22* は、より強力に分化や増殖を抑制した(代表者データ)。

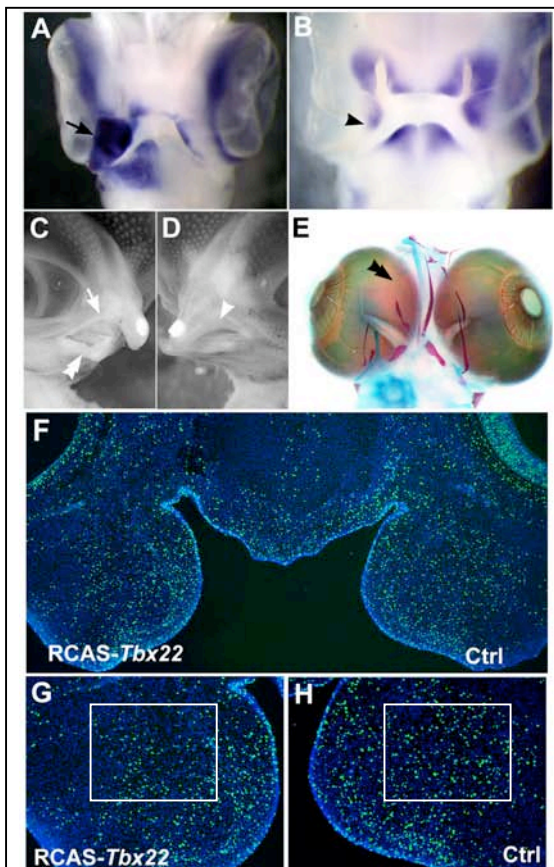
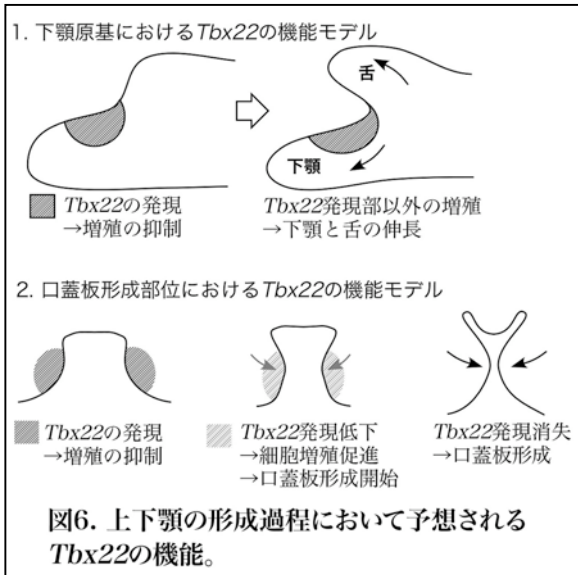


図5. *Tbx22* の過剰発現の効果。トリレトロウイルスベクター(RCAS)を用いて、*Tbx22* を顔面隆起で異所的に発現させて効果を調べた。A, 異所的な *Tbx22* の発現(矢印)。B, 異所的発現により、顔面隆起で発現する *Msx-1* 遺伝子の発現は低下した。C, *Tbx22* の発現により、上顎の低形成(矢印)と下顎の変形(二重矢先)が認められた。Dは対照。E, Cの骨格。実験側の骨分化が抑制された(黒い二重矢先)。F-H, 上顎隆起の細胞増殖への効果。BrdU陽性細胞(緑)の数は、RCAS-*Tbx22* 発現側で少なくなる。G, HはFの拡大。囲みは、内在性 *Tbx22* が発現しない部位。*Tbx22* 発現側で BrdU陽性細胞の数が少ない。

(4) 研究結果のまとめとモデル

以上の結果を基に、上顎および下顎における *Tbx22* の機能を予想した(図 6)。下顎においては、舌と下顎隆起の境界付近で発現する *Tbx22* がこの部位の増殖を抑制し、その結果舌と下顎が独立に伸長すると予想される(図 6上)。一方、上顎では増殖組織である口蓋板の形成部位で発現しているので、その役割は推定しにくい。一つの可能性としては、*Tbx22* の発現が低下する発生段階と口蓋板形成が始まる段階が近いので、*Tbx22* は適切な発生段階まで口蓋板の形成や伸長、あるいは骨分化を抑制するように、「負の制御因子」として関与している可能性がある(図 6下)。BMPシグナルは、いずれの系においても *Tbx22* の発現範囲を限定するのに作用していると考えられる。



(5) 本研究分野における位置づけと展望

Tbx22 はヒト口蓋裂および舌小帯短縮症の原因遺伝子として報告されたが、発生時における機能は不明であった。今回の解析から、*Tbx22* は口蓋や舌原基の増殖に対し抑制的に機能すると考えられた。口蓋や舌は最初に口腔内突起として出現し、それが伸長して形成されるため、従来これらの形成は「細胞増殖の促進」という視点から議論されてきた。しかし本研究での結果は、口腔発生においては「原基の細胞増殖を負に制御する機構」が必要で、*Tbx22* がその機構に関与することを示唆している。

増殖抑制の重要性については、これまでの口蓋や口腔形成の研究ではあまり議論されず、今後、当該研究分野において検討していく余地があると考えられる。特に、舌や下顎原基の発生において発現が報告された分子は、いずれも原基の先端部で発現しており、原基の伸長を促すと考えられている。これに対し、*Tbx22* は原基間の境界付近で発現しているため、この部位での増殖抑制の必要性を示唆している。今後、薬剤を用いた解析などにより、口蓋板や舌形成過程における細胞増殖抑制の重要性を検討していく必要がある。

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 3 件)

1. Satoh, A., Makanae, A., Wada, N. (2010). The apical ectodermal ridge (AER) can be re-induced by wounding, *wnt-2b*, and *fgf-10* in the chicken limb bud. *Dev Biol.* 342, 157-168.
2. Suzuki, D., Yamada, A., Amano, T., Yasuhara, R., Kimura, A., Sakahara, M., Tsumaki, N., Takeda, S., Tamura, M., Nakamura, M., Wada, N., Nohno, T., Shiroishi, T., Aiba, A., Kamijo, R. (2009). Essential mesenchymal role of small GTPase *Rac1* in interdigital programmed cell death during limb development. *Dev. Biol.* 335, 396-406.
3. Fushimi, S., Wada, N., Nohno, T., Tomita, M., Saijoh, K., Sunami, S., Katsuyama, H. (2009). 17β -estradiol inhibits chondrogenesis in the skull development of zebrafish embryos. *Aqua. Toxicol.* 95, 292-298.

[学会発表] (計 6 件)

1. 和田直之, 濃野勉, 倉谷滋: 索前軟骨頭蓋は、異なる神経堤細胞群に由来する二つの構造から構成される。第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会、予稿集 p132.
2. 和田直之, 西松伸一郎, 濃野勉: Expression of *Tbx22* in the mouth primordium during *Xenopus* development. 第 32 回日本分子生物学会年会、年会プログラム p396.
3. 和田直之, 西松伸一郎, 濃野勉: ニワトリ

胚口腔形成過程における *Tbx22* の発現とその調節。日本動物学会第 80 回大会、予稿集 p90.

4. 和田直之, 倉谷滋, 濃野勉: Morphogenesis and origin of the cartilaginous elements of the anterior neurocranium during chick development. 日本発生生物学会第 41 回大会、発表要旨集 p215.
5. 和田直之, 倉谷滋, 濃野勉: ニワトリ胚の頭部軟骨骨格の形成と発生系譜。日本動物学会第 79 回大会、予稿集 p59.
6. 和田直之, 西松伸一郎, 濃野勉: ニワトリ胚口蓋板形成過程での *Tbx22* の発現調節とその機能。第 31 回日本分子生物学会年会、予稿集 p288.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田直之 (Wada Naoyuki)
川崎医科大学・医学部・助教
研究者番号: 50267449

(2) 研究分担者

濃野勉 (Nohno Tsutomu)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号: 20098619

西松伸一郎 (Nishimatsu Shin-ichiro)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号: 20222185

(3) 連携研究者

なし