

機関番号：3 2 6 6 7

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：2 0 5 9 2 1 5 7

研究課題名(和文)

マウス舌初期発生での上皮-筋前駆細胞間の相互作用に関わる分子制御機構

研究課題名(英文) Molecular regulation governing epithelio-myogenic cell interactions during early 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：3 0 1 9 7 5 8 7

研究成果の概要(和文)：

本研究では、マウス舌初期発生での上皮-筋前駆細胞間の相互作用について検討した。DNA マイクロアレイとパスウェイ解析から、舌の発生初期では Fgf・Shh・Wnt・Tgfb シグナル回路が部位特異的に働くことが示唆された。発現変動の高かった Fgf と Shh のシグナル回路に着目し、*in vivo* と同様な舌発生を再現できる鰓弓培養において各シグナルの機能を検証した。その結果、培地への rhFgf8 添加 (25 ng/mL) によりアポトーシス回避と 48 時間以降の舌膨隆に促進的に働くこと、上皮から産生される Shh の分子阻害 (Jervine 5 μ M 添加) により間葉細胞の増殖抑制に起因する舌の矮小化と筋系譜細胞の組織内局在の異常をきたすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：

We herein aimed to investigate the timing and positional regulation mechanism of myogenic lineage differentiation through epithelial-myogenic precursor interactions during the development of lateral lingual swellings (LLS). Microarray, GO and pathway analyses unveiled that a number of genes, which were assigned mostly to Shh, Fgf, Wnt and Tgfb signaling pathways, were upregulated in a region-specific manner. The organ culture of mouse branchial arches was proved to assimilate satisfactorily the myogenic-lineage differentiation and the morphologic characteristics of the LLS. Administration of rhFgf8 (25 ng/mL) to the culture medium was sufficient to mediate an evasion of cell death in LLS. Also the treatment with Shh inhibitor (Jervine 5 μ M) brought about interference of mesenchymal cell proliferation and aberrant localization of myogenic-lineage cells, resulting in microglossia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 形態系基礎歯科学

キーワード：歯学、病理学、舌発生、上皮間葉相互作用、筋分化、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

舌原基は後頭体節由来の筋系譜細胞、神経

堤・中胚葉由来の間葉細胞、外胚葉・内胚葉由来の上皮細胞で構成されており、舌の形態

形成は後頭体節を起点とする下顎突起への筋前駆細胞の移住、下顎突起背側からの外側舌隆起の発生、その後の第2-4鰓弓由来の組織との複合体形成として特徴づけられる。舌筋の発生過程では、皮筋節から移住を開始した未分化な筋前駆細胞 (myoblast precursor cell) が筋芽細胞 (myoblast) となり、次いで筋芽細胞が細胞融合して多核の筋管細胞 (myotube) へと分化する。研究代表者らはこれまでに、マウス胎仔頭部の組織立体構築法を用いて Desmin 陽性の筋系譜細胞の3次元空間での局在を経時的に追跡することにより、後頭体節の背側側方→体幹間充織→第3, 4鰓弓腹側→第2鰓弓背側を経由して下顎突起背側正中部に到達することを明らかにした (藤武ら, 2005)。同時期の鰓弓間葉織を移住する筋前駆細胞の共焦点顕微鏡観察では、下顎突起に向けた移住先端に Rac1 陽性の葉状仮足を形成しており、細胞集団の顕微切断とリアルタイム RT-PCR では細胞形態と運動能の制御に働く Rho ファミリーのうちで *Rac1* 発現の上昇を確かめている (Taya & Aoba, 2007)。

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、筋前駆細胞は正中溝直下に集結し、筋芽細胞への分化誘導をともない筋系譜細胞集団を構築する。筋系譜細胞集団の周辺に位置する筋前駆細胞は正中溝上皮と基底膜を挟んで接触しており、この上皮・筋前駆細胞の連結は外側舌隆起の形成時期を通して維持されている。ただし、外側舌隆起の構成要素としては、筋系譜細胞は参画しておらず、正中溝周辺の非筋系譜 (Desmin 陰性) の間葉細胞が増殖して組織隆起の成立に関わっている。筋系譜および非筋系譜の細胞集団が正中部/側方で棲み分けており、近接する領域で異なる細胞動態を示す背景として、複数のシグナル中心と領域特異的な

情報伝達回路が作用していることが推定される。

2. 研究の目的

本研究では、舌初期発生における外側舌隆起の正中溝上皮とその直下の筋前駆細胞群との細胞間相互作用に焦点を絞り、下顎突起の癒合→外側舌隆起の形成誘導→舌膨隆の成立における時期・部位特異的な遺伝子発現と分子局在を明らかにすることを目指した。特に、正中溝上皮-筋前駆細胞間の接着・相互作用に関わるシグナル系と外側舌隆起の形成に直接寄与する非筋系譜細胞の増殖シグナル系を同定するとともに、舌初期形態形成に及ぼすシグナル分子の機能的役割について鰓弓器官培養系を用いて検証した。

3. 研究の方法

(1) 下顎突起の試料採取

実験動物として ICR 妊娠マウス (日本チャールズリバー) を使用し、所定の妊娠時期まで日本歯科大学共同利用研究センター生物学施設のガイドラインに従い飼育した。ICR マウスから、下顎突起試料として胎生 10.5 (舌形成直前)、11.5 日 (外側舌隆起の形成時期) の正中部 (中央 1/3) と残りの突起側方部を採取した。鰓弓培養試料では、培養 24~120 時間において *in vivo* 試料採取の方法に準じ、舌形成予定領域、または舌膨隆領域の正中 1/3 と側方 2/3 を分離、採取した。

(2) マウス鰓弓の器官培養モデル

鰓弓培養試料としては、後頭体節由来の筋前駆細胞が癒合前の下顎突起正中部に到達した胎生 10.5-10.7 日の胎仔を使用した。ICR 妊娠マウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、実体顕微鏡下で子宮より胎仔を摘出した。培養実験に使用した胎仔については、微小外科用剪刀を用いて上顎突起と第2鰓弓と離断し、左右側下顎突起を摘出した。得られた下顎突起は Trowell 器官培養システムに則して、1% ペニシリン/1% ストレプトマイシン、アスコルビン酸 (40 μ g/ml) 含有の DMEM/F12

(1: 1) 培地を用いて、37°C・5% CO₂の雰囲気下で培養した。鰓弓培養実験では、0~168時間培養を行い、舌発生の再現性を確認するとともに、rhFgf2・rhFgf8分子、または Shh 阻害剤 (Jervine) の共存下で器官培養を実施し、上皮間葉相互作用、外側舌隆起の形成誘導と筋分化、細胞死を指標として促進・抑制効果を検証した。

(3) 遺伝子発現プロファイルの解析

マイクロアレイ解析には Affymetrix 社製の GeneChip® を使用した。各胎齢時期でプールした組織試料から、RNeasy Micro Kit (QIAGEN, Velenica) を用いて total RNA 約 3 μg を抽出した。マイクロアレイ分析は Mouse Genome 430 2.0 Array (43,101 probes) chip を用いた Affymetrix® 推奨プロトコール (One-Cycle Target Labeling 法) に準じて行った。マイクロアレイデータの比較には、GeneSpring GX7.3.7 (Agilent Tech.) を用いて、部位/時期特異的な発現を示す遺伝子リストを作成した。遺伝子の機能分類は Gene Ontology Consortium (www.geneontology.org) の GO 分類による生物学的機能を推定、KEGG と GenMAPP を併用して遺伝子間の相互位置とハブの機能を果たす遺伝子を探索、Cytoscape (<http://cytoscape.org/index.php>) を使用して遺伝子ネットワークを構築した。

部位特異的な遺伝子発現を確認する目的では、特定部位の細胞集団を Laser-capture microdissection 装置により顕微切断し、バルク組織試料と同様に遺伝子発現をリアルタイム PCR で調べた。顕微切断に際しては、薄膜を貼ったスライドグラスに凍結切片 (8 μm 厚さ) を貼りつけ、メタノール処理後に 1% トルイジンブルーで染色、検鏡下でレーザービームにより標的細胞集団を切り出した。

(4) タンパク局在の同定

パラフィン組織標本については、摘出した胎仔試料ならびに器官培養試料を 4% PFA (0.1 M PBS) で 24 時間固定、パラフィン包埋後、前頭断ならびに矢状断の連続薄切標本 (4 μm 厚

さ) を作製した。免疫染色は ABC 法、あるいは蛍光標識二次抗体の共焦点顕微鏡観察を行った。筋系譜細胞の細胞増殖活性については、Ki67 抗体、細胞死の判定には ssDNA 抗体を使用した (Desmin あるいは MyoD との二重免疫染色)。なお、Desmin 陽性/MyoD 陰性細胞を筋前駆細胞、Desmin 陽性 / MyoD 陽性の単核細胞を筋芽細胞、Desmin 陰性細胞は非筋系譜の間葉細胞として同定し、筋管細胞は多核化した細胞として識別した。

4. 研究成果

(1) マウス舌初期発生における遺伝子発現の網羅的解析

① 舌予定領域での特異的な遺伝子発現

胎生 10.5 日の下顎突起では、いまだ舌の形態形成は生じていないが、下顎突起正中部では舌の筋前駆細胞が後頭体節より多数移住している。この時期のマウスの下顎突起正中部での遺伝子発現パターンをマイクロアレイを用いて解析した。胎生 10.5 日の正中部遺伝子発現パターンを同時期の下顎突起側方部と比較してみると、下顎突起正中部と側方部の間で有意な発現変動 (≥ 1.5 -fold、 $p < 0.05$) を示す遺伝子 708 個 (正中部で高発現 362 個、側方部で高発現 346 個) を同定した。これらの遺伝子の GO 解析から、正中部では細胞増殖、細胞接着・運動能、上皮分化、Tgfb シグナル、MAPK 活性、側方部では細胞死、骨・筋発生を含む間葉組織の発生と形態形成、パターン形成、Retinol 代謝に関連する遺伝子発現が有意に高まっていると検定できた ($p < 0.05$)。KEGG データベースに基づくパスウェイ解析では、Hh、Fgf、Wnt、Tgfb パスウェイに帰属する遺伝子が正中部で高発現するとともに、Cell cycle、Calcium パスウェイなどとクロストークすることが判明した。

② マウス舌形態形成 (胎生 10.5 日~11.5 日) にもなる遺伝子発現の推移

胎生 10.5 日の下顎突起正中部の舌形成予定領域と胎生 11.5 日の外側舌隆起におけるマ

マイクロアレイ解析を行った。胎生 10.5 日と胎生 11.5 日の間で、5 倍以上の発現変動を示す遺伝子 151 個（発現上昇 106 個、発現低下 45 個）を同定した。GO 解析と MGI 等のデータベースの検索により、発現上昇を示した遺伝子 106 個のうち、骨格筋に関連した遺伝子は半数の 53 個であり、舌筋の発生に向けた遺伝子が作動し始めていることが判明した。これらの遺伝子の中には、筋芽細胞への決定因子 MyoD・Myf5 と筋管細胞への分化誘導因子 Myogenin が含まれていた。胎生 11.5 日の外側舌隆起の筋系譜細胞集団では、筋管細胞分化を示すような筋芽細胞間の融合は全くみられないにもかかわらず Myogenin の発現上昇を示したのが注目された。ただし、筋線維への成熟を誘起させる Myf6 (Myogenin の下流で働く) と想定される) の発現は検出されなかった。さらに、パスウェイ解析から、舌筋における初期の分化過程 (胎生 10.5~11.5 日) では、四肢や体節の骨格筋発生と同様に Pax3→MyoD・Myf5→Myogenin のカスケードが成立しており、これらの筋分化の誘導因子を制御する遺伝子 (5 倍以上の発現変動を示す) として、Mef2c・Meox1・Meox2・Msx1・Msx2 が働いていると考えられた。

①②の DNA マイクロアレイ解析を踏まえたリアルタイム PCR 解析から、胎生 10.5-12.5 日の下顎突起正中部 (舌予定領域/舌原基) では、側方部に比べて舌筋分化のマスター遺伝子 MyoD・Myf5・Myogenin が高く、舌発生の進行にともなって発現上昇した (図 1)。Shh シグナルの Shh・Patched1 では正中部で高発現が維持され、Fgf シグナルの Fgf4・Fgfr1・Fgfr4 では発現上昇したのに対して Fgf8 は発現下降を示すことがわかった。

マイクロダイセクションによる微小領域の試料採取と real-time PCR を併用した遺伝子発現の定量解析により、正中部で高発現する遺伝子候補群が同定でき、特に正中領域の上皮細胞では Shh と Pitx2、間葉細胞では Fgfr1 と Fgfr2 の発現が確かめられ、Fgf8 は側方部で高発現した。

(2) マウス鰓弓培養系を用いた舌形態形成に働くシグナル分子の機能解析

①舌形態形成の再現性

マウス鰓弓培養系における舌形態形成と筋系譜細胞の組織内局在・増殖・分化の再現性について検討した。Fgf・Shh 系シグナルの分子、または阻害剤を添加していない対照群において、培養 24 時間以内に左右下顎突起の癒合はほぼ完了し、筋前駆細胞は正中部に細胞集団を形成し、48 時間後には外側舌隆起が識別できるとともに、筋前駆細胞は MyoD 陽性の筋芽細胞に分化、培養 96 時間以内に下顎突起の癒合から舌原基の成立に到達できることを確かめた。Desmin 陽性細胞の局在については、下顎突起背側正中部に集結し、間葉合流から組織膨隆の形成時期を通して正中部上皮 (上皮索を含む) と接触が保たれ

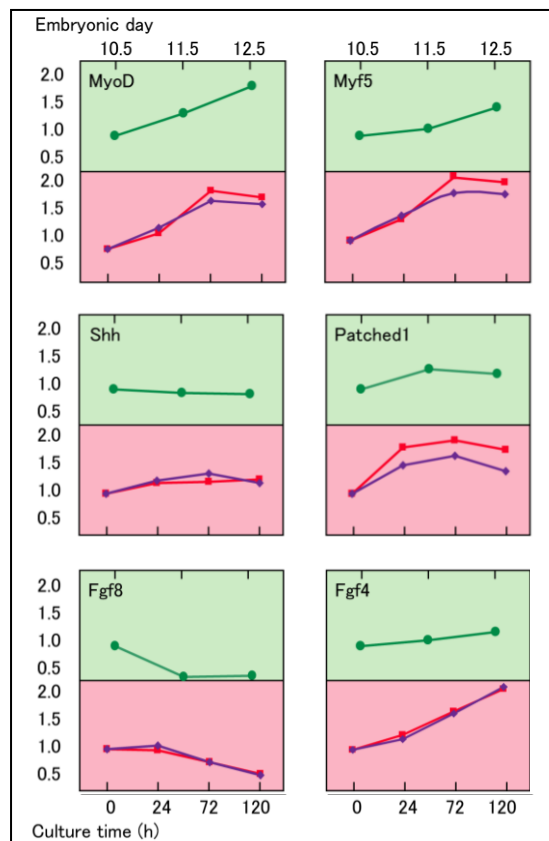


図 1 舌予定領域/舌原基での遺伝子発現の推移。In vivo (緑) ならびに鰓弓培養 (赤) のバルク組織試料でのリアルタイム PCR による遺伝子発現の定量解析の結果を示す。

ていた。Ki67 を指標とした細胞増殖活性に関しては、組織膨隆の開始時では非筋系譜細胞で増殖活性が高まり、上皮索に連結した筋系譜細胞集団では相対的に増殖活性は低いことと、組織膨隆が進行して舌縁上皮の陥入が始まる時期では、非筋系譜細胞の増殖活性は低下し、筋系譜細胞の増殖活性が上昇することが確認できた。この培養条件下で、培養 24～120 時間までの遺伝子発現パターンを検討する目的で、培養組織の舌形成予定領域、または舌膨隆部と下顎突起側方部での real-time PCR による定量解析を行った。その結果、舌発生に寄与する *MyoD*, *Myf5*, *Shh*, *Patched*, *Fgf4*, *8*, *Fgfr1*, *4* の発現は *in vivo* での発現と類似したパターンを示しており、遺伝発現においても再現性のあることが明らかとなった (図 1)。ただし、ssDNA 抗体を用いた組織観察においては、胎仔試料 (*in vivo*) と培養試料でのアポトーシスの出現頻度に顕著な相違が認められた。胎生 11.4 日の舌予定領域 (*in vivo* 試料) では、ssDNA 陽性細胞が少数であったのに対し、無血清条件下の培養試料では、培養 24 時間で最も多数の ssDNA 陽性細胞が上皮・間葉組織に広がって検出された。なお、Desmin/ ssDNA の蛍光二重免疫染色により ssDNA 陽性細胞の大部分が非筋系譜細胞として同定できた。

②Fgf シグナルの役割

無血清条件下で下顎突起の癒合、上皮-筋前駆細胞の接着と筋系譜細胞集団の構築、外側舌隆起の形成から舌原基の成立に至る形態形成が再現できたことに続いて、Fgf 添加や血清添加による形態形成への影響について比較した。対照群と FGF 添加群 (rhFGF2 と rhFGF8, 25 ng/mL) を設定した。無血清培地の対照群では、突起癒合と間葉合流は 24 時間前後で完了し、癒合部後方に外側舌隆起が観察された。この隆起部では、*in vivo* での舌原基の初期発生と同様に、Desmin 陰性の非筋系譜細胞が増殖活性を示した。FGF 添加群では、対照群に比べて外側舌隆起の容積増加と左右対称性が明瞭であり、間葉細胞の増

殖活性を高めていた。したがって、下顎突起上皮からの FGF 刺激が外側舌隆起の形成誘導に促進的に働くことが示唆された。

Fgf8 添加群では、培養 24 時間においてアポトーシスの指標である ssDNA 陽性細胞は著しく減少した。ただし、Fgf2 添加群では、培養 24 時間に比較的多数の ssDNA 陽性細胞が検出され、アポトーシスに対する抑制効果は認められなかった。なお、Fgf2 と Fgf4 添加群ともに、培養 48 時間以降、ssDNA 陽性細胞はほとんど検出されなかった。これらのことから、培地への rhFGF8 添加はアポトーシス回避に働くことが判明した。

③Shh シグナルの役割

上皮細胞から由来する Shh シグナルの舌初期発生での機能を検討する目的で、Shh 阻害剤により Shh シグナルを遮断した場合での舌初期発生に及ぼす影響を検討した。ICR マウス胎仔 (E10.5) から下顎突起を摘出し、10%FBS 含有 DMEM 培地を用いた Trowell 法により最長 168 時間まで器官培養を行った。Shh 阻害剤 Jervine (5 μ M, SIGMA) を培地中に添加した。その結果、下顎突起上皮では Shh 発現が高まるが、Shh 阻害の培養条件下でも筋前駆細胞の下顎突起正中部への集積と上皮との接触、さらに筋前駆細胞から筋芽細胞への分

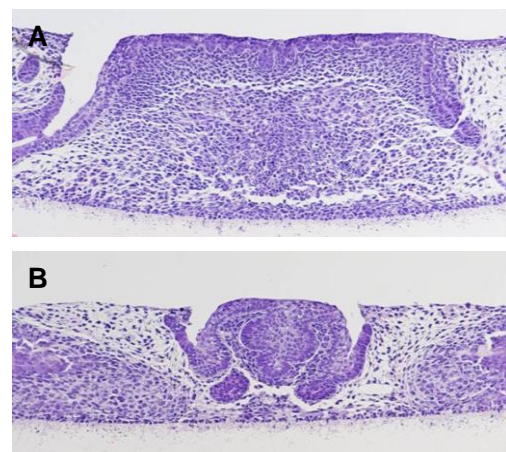


図 2 Shh 阻害による舌の形成異常。(A) 対照群、(B) Shh 阻害剤 Jervine (5 μ M) の添加群。培養 120 時間後、Shh 阻害により舌の矮小化をきたしている。

化も認められた。ただし、72 時間以降では舌上皮の肥厚と筋系譜細胞を含む間葉細胞の増殖抑制、筋前駆細胞の異所性局在をもたらし、舌形態形成に対して抑制的に作用することが確かめられた (図 2)。

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)

[学会発表] (計 6 件)

1. 藤田和也, 田谷雄二, 添野雄一, 佐藤かおり, 青葉孝昭: マウス舌発生段階に依存した舌筋分化制御因子の発現推移, J Oral Biosci 52(Suppl): 94(No. 0-20), 2010, 東京都.
2. Taya Y, Shimazu Y, Fujita K, Soeno Y, Sato K, Aoba T: Three-dimensional visualization and histomorphometry of developing blood vessel and nerve networks in mouse embryos, 第 43 回日本発生生物学会年会 Program and Abstract Book, p. 341 (P-362), 2010. 横浜市.
3. 田谷雄二, 藤田和也, 添野雄一, 佐藤かおり, 青葉孝昭: マウス二次口蓋の発生と口蓋裂発症モデルでの分子機構の解析. 第 34 回日本口蓋裂学会総会・学術集会シンポジウム, 日口蓋誌 33: 97 (SI-4) (招待講演), 2010, 東京都.
4. 藤田和也, 田谷雄二, 添野雄一, 佐藤かおり, 青葉孝昭: マウス下顎突起の正中癒合部に働くシグナルネットワークの解析, J.Oral Biosci., 50(Suppl): 140 (No. P-17), 2008, 東京都.
5. 田谷雄二, 藤田和也, 佐藤かおり, 青葉孝昭: マウス顎顔面発生における突起間癒合の分子ネットワーク, J.Oral Biosci., 50(Suppl): 120 (No. 0-36), 2008, 東京都.

6. 藤田和也, 田谷雄二, 添野雄一, 佐藤かおり, 青葉孝昭: 器官発生・組織形態形成におけるシグナルネットワークの網羅的解析, 第 31 回 日本分子生物学会 (BMB2008) 講演要旨集, (1P-1054), 2008, 横浜市.

[図書] (計 1 件)

1. 田谷雄二, 青葉孝昭: 1 章 口腔・頭蓋・顎顔面領域の発育異常, pp1-14, 賀来亨, 槻木恵一 編集, スタンダード口腔病態病理学 (第 1 版), 学建書院, 東京, 2009 年.

[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: 3 0 1 9 7 5 8 7

(2) 研究分担者

添野 雄一 (SOENO YUUCHI)
日本歯科大学・生命歯学部・講師
研究者番号: 7 0 3 5 0 1 3 9

島津 徳人 (SHIMADZU YOSHIHITO)
日本歯科大学・生命歯学部・講師
研究者番号: 1 0 2 9 7 9 4 7

青葉 孝昭 (AOBA TAKAAKI)
日本歯科大学・生命歯学部・教授
研究者番号: 3 0 0 2 8 8 0 7

(3) 連携研究者

()

研究者番号: