

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 13日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792116

研究課題名（和文） マウス初期舌筋形成における筋芽細胞の局在パターンと分化機構

研究課題名（英文） Characterization of myoblast differentiation and localization during early myogenesis in mouse tongue

研究代表者

藤田 和也（FUJITA KAZUYA）

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：70549055

研究成果の概要（和文）：本研究では、舌筋分化を特徴付ける分子制御機構を明らかにする目的で、マウス舌原基における遺伝子およびマイクロ RNA の網羅的発現解析と定量分析および免疫染色によるタンパク局在観察を行った。舌原基では、発生初期（胎生 10.5～11.5 日）において 37 種の筋分化関連遺伝子が一斉に発現上昇することと、筋芽細胞への分化誘導経路を調節するマイクロ RNA が同時に発現していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The present study aimed to characterize the molecular networks that govern tongue myogenesis in mouse embryos. The gene expression profiling by microarray analyses, together with quantitative PCR analysis and immunohistochemical validation, demonstrated that the expression of myogenesis-related genes were strongly up-regulated during early tongue morphogenesis (Embryonic days from 10.5 to 11.5). We also delineated concomitant expression of microRNAs that might interact with transcripts of regulatory genes for myoblast differentiation in tongue primordium.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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、マウス胎仔、舌初期発生、筋芽細胞分化、マイクロアレイ、IPA 解析

## 1. 研究開始当初の背景

舌筋は随意筋のなかでも複雑な舌運動を担っている。その発生起源は他の頭部顔面筋群や体幹・四肢の骨格筋とは異なっており、マウス舌筋前駆細胞では胎生 8.5 日（E8.5）前後の後頭体節に由来する。我々の研究グループでは、マウス胎仔頭部全域を組織立体構築することにより、後頭体節に由来する筋前駆細胞（Desmin 陽性）が下顎突起舌予定領域に

至る移住経路を 3 次元空間で追跡してきた。観察結果として、E10.3 に筋前駆細胞が下顎突起正中溝の直下に達することと、舌原基となる外側舌隆起の成立時期（E10.5→E11.5）に Desmin 陽性細胞集団の内部で MyoD 陽性の筋芽細胞が分化することを明らかにした。舌筋分化の特異性（体幹・四肢骨格筋との相違）に関しては、舌筋形成が顕著に障害される遺伝子変異として、Endothelin-1 (*ET-1*) とそ

の受容体 (ETAR) および下流カスケードの *dHand* の遺伝子欠損が注目されていた。我々は *ET-1* 欠損マウスの表現型を解析し、筋前駆細胞の移住経路や到達時期は野生型と変わらないが、移住後の筋前駆細胞の増殖・分化異常と外側舌隆起の発生抑制 (小舌症) を表現型としており、上皮-間葉相互作用 (下顎突起正中溝上皮からの ET-1 刺激と筋前駆細胞でのシグナル受容) の障害に起因することを確かめた。この表現型検索から、舌筋と他の骨格筋においては細胞分化の分子制御機構が異なることが示唆された。

本研究課題申請当時 (2010 年 10 月) のマウスゲノムインフォマティクス (MGI) データベースでは、270 種を超える筋形成異常をとまなうマウスモデルの登録が確認できた。例として、舌筋を含む広範囲の骨格筋を障害する遺伝子欠損 (*Myogenin*, *Six1* などの単独欠損、*MyoD/Mrf4*, *Mrf4/Myogenin*, *Spotch/Myf5*, *Rb/E2f3* などの多重欠損)、体肢骨格筋の形成不全をきたすが舌筋形成への影響は軽微にとどまるもの (*Prx2*, *Pax3*, *Lbx1* 単独欠損)、舌筋を含む他の骨格筋群は正常に形成されるが四肢筋のみ (*Meox1/Meox2* 欠損) あるいは頭部筋のみ (*Msc/Tcf21* 欠損) の形成異常を表現型とするもの、などが挙げられる。ただし、従来の研究では舌筋芽細胞と体肢骨格筋の筋芽細胞との類似性が強調されるにとどまり、これらの遺伝子欠損マウスで認められる舌筋特異的な表現型について明確な説明は得られておらず、未解決の課題として残されていた。

マウス四肢骨格筋における筋芽細胞の分化プロセスでは、E10.5~E12.5 の早期に分化を遂げる胚性筋芽細胞 (Embryonic myoblast; EM) と E14.5~E17.5 に分化する胎性筋芽細胞 (Fetal myoblast; FM) が区別されている。いずれの筋芽細胞も皮筋筋由来

の筋前駆細胞 (*Pax3/Pax7* 陽性) に由来するが、形態的特徴や発現遺伝子 (EM では *Meox1/Meox2*, FM では *Msc* や *Nfix* など) が異なっていることが Biressi ら (2007) により説明されている。特に、Messina ら (2010) の報告により、マウス骨格筋発生において EM から FM への転換を支配する遺伝子として *Nfix* が注目されている。

## 2. 研究の目的

舌筋発生の分子制御機構を解明することは、顎顔面の協調した形態形成機序の理解につながるるとともに、外科臨床において舌筋の複雑な構造・機能の再建を目指すうえでも重要な一歩となると考えられた。本研究では、マウス舌発生過程での遺伝子発現と細胞分化形態について体幹・四肢骨格筋との差異に注目し、舌特異的な筋芽細胞分化に関わる遺伝子発現プロファイルの検証を目指した。本課題申請当時では、筋発生におけるマイクロ RNA (miRNA) の関与が予測されながらも舌組織での解析に至った例は少数にとどまっていた。また、トランスクリプトームにおける Gene-Ontology (GO) 解析のプラットフォームとして Ingenuity® Pathway Analysis (IPA) が登場し、実験による遺伝子発現データと論文情報 (human-curated) に基づいた分子ネットワーク予測の精度が高まりつつあった。こうした状況を踏まえて、申請期間における到達目標として、遺伝子 (mRNA) と miRNA のマイクロアレイ解析を主軸としてマウス舌原基での筋分化シグナルの特徴を明らかにすることを設定した。

## 3. 研究の方法

マウス系統 (ICR) の飼育管理は生物科学実験委員会のガイドラインに従って、日本歯科大学共同利用研究センター生物科学施設 SPF

室内において交配を行った。胎仔試料採取に際しては、妊娠マウスを麻酔下で頸椎脱臼により安楽死させ、子宮を摘出した。実体顕微鏡下で外側舌隆起の形成領域を分割・採取した。胎仔の発育段階は Theiler 分類に基づき確認した。遺伝子発現解析（マイクロアレイ、リアルタイム定量 PCR = qPCR）の目的では、RNA 抽出カラム (RNeasy, QIAGEN) を用いて RNA 精製し-80°Cで保存した。予備検討において、より高純度の RNA 抽出を行うために一部マイクロダイセクション法を採用した。薄膜を貼ったスライドガラスに RNase free 条件下で凍結切片(8 µm 厚)を貼付し、メタノール処理後に 1%トルイジン青で染色、DEPC 処理水で洗浄、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。回収した試料から所定の純度の total RNA (RNA 純度を Agilent® Bioanalyzer と NanoDrop®により確認) が得られ、10<sup>4</sup>オーダーの細胞数から必要 RNA 量を抽出できた。マイクロアレイ解析は (株) セルイノベーター (福岡市) に委託した。解析には Affymetrix 社製 GeneChip® (mRNA)、Agilent 社製 Mouse Ref. 10.0 (miRNA)、データ処理には GeneSpring GX 解析ソフト、分子ネットワーク予測には Ingenuity® Pathway Analysis tool (Ingenuity Systems) を使用した。マイクロアレイデータの検証の目的では、得られた total RNA から cDNA を合成し、定量リアルタイム PCR (qPCR) による発現量解析を行った。組織標本観察に向けては、摘出した胎仔試料を 4%ホルムアルデヒド (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)を作製した。タンパク局在 (発現細胞) を同定する目的では、薄切切片に特異抗体 (Desmin, MyoD, Nfix) と蛍光標識二次抗体を用いた免疫染色を施し、共焦点顕微鏡観察を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) マウス舌発生における筋形成と筋分化マスター遺伝子発現

研究開始にあたり、マウス胎仔舌における筋組織形成過程を組織学的に再検索するとともに、各発生ステージでの筋分化制御因子 (マスター遺伝子 ; *Myf5*, *MyoD*, *Myogenin*, *Mrf4*) の発現パターンを qPCR で検証した。E9.5 から E10.5 にかけて正中中部で癒合したマウス下顎突起では、舌原基領域 (外側舌隆起) を確認でき、上皮下組織では E11.5 に至るまでほぼ多角形状で均一な大きさの細胞が占めていた。E12.5 では、一部で核および細胞質が扁平化した細胞集団が出現した。E13.5 から E14.5 にかけては扁平状細胞がさらに伸張・肥厚して密になり、いわゆる筋管細胞への形態変化を遂げた。E16.5 には連続した筋線維構造・走行が現れ、E18.5 には明瞭な横紋を呈した筋線維となった。この一連の筋形成過程での qPCR 解析では、まず舌原基出現前 (E9.5) では、細胞移住に関わる *Pax3* および筋分化マスター遺伝子発現は検出できず、筋系譜の細胞が未到達であることと一致していた。*Pax3* は E10.5 から検出され、E12.5 をピークとして E18.5 まで発現を維持していた。筋分化マスター遺伝子発現の検索では、*Myf5* と *MyoD* が E10.5 から検出でき、E11.5 にかけて大幅な発現増加を認めた。*Myogenin* は E11.5 以降での発現を確認できた。*MyoD* 発現において E12.5 での明瞭な発現ピークを示したが、他のマスター遺伝子発現では以降 E18.5 までの検索では継続して発現していることがわかった。筋分化後期の制御分子である *Mrf4* は E12.5 から発現が認められ、E18.5 まで持続的に発現増加していた。以上の結果を総合すると、舌原基において四肢・体幹の骨格筋と同様のマスター遺伝子発現パターンが確認できたなかで、特に、細胞形態が維

持されているが舌筋分化を進行させるマスター遺伝子発現が集中する時期として E10.5 から E11.5 の舌発生初期段階が注目された。

## (2) 舌発生期の遺伝子発現プロファイル

### ①筋関連遺伝子の発現変動

マウス胎齢 E10.5~E11.5 は、骨格筋発生に関与する筋芽細胞系譜のうち胚性筋芽細胞 (EM) の分化段階に相当する。体幹・四肢骨格筋ではさらに E14.5 以降で胎性筋芽細胞 (FM) の分化が主体となる。我々の解析で得た舌原基における経時的なマスター遺伝子発現パターンからは、E10.5 から E11.5 にかけて舌筋分化を特徴付ける分子カスケードが作動する可能性が考えられた。この作業仮説を検証するため、舌原基領域としてマウス下顎突起正中部を E10.5、E11.5 および E14.5 の胎仔から摘出し、マイクロアレイ解析を実施した。発現プロファイルを比較解析した結果、初期 (E10.5→E11.5) の舌原基で 5 倍以上の発現変動を示す 102 遺伝子を捉えることができた (上昇 76、減少 26)。アノテーション検索から、発現上昇した 76 遺伝子のうち 37 遺伝子が筋組織の構造や機能に関連しており、残りの大半は血管および神経の発生に関わる遺伝子であった。この発現変動遺伝子群にはマスター遺伝子である *MyoD*, *Myf5*, *Myogenin* のほか、8 個の筋関連転写因子も同定できた。この転写因子には骨格筋の筋芽細胞分化に働く *Meox1*, *Meox2*, *Msc*, *Nfix* が含まれており、Cytoscape®による分子ネットワークの検証によって、これらの転写因子が筋分化マスター遺伝子の上流に働くことも判明した。また、筋芽細胞系譜の分化マーカーとなるミオシン重鎖アイソフォーム *Myh3* (EM), *Myh8* (FM) の発現上昇を伴うこともわかった。一方、E11.5→E14.5 では、975 遺伝子が 5 倍以上の発現変動を示した (上昇 523、

減少 452)。発現変動遺伝子数は E10.5→E11.5 の 10 倍近いが、その内訳は増殖因子や酵素群の発現上昇とパターン形成に働く転写因子群の発現減少であった。E10.5→E11.5 で発現上昇を示した 37 遺伝子のうち 18 遺伝子が E11.5→E14.5 でも 5 倍以上の発現上昇を来したが、*Myf5*, *MyoD*, *Myogenin* の変動幅は 5 倍以内であった。マスター遺伝子の発現変動パターンは qPCR 結果と合致しており、舌発生過程において骨格筋の基本的な筋分化制御が維持されていることも再確認できた。以上の網羅的発現解析により、舌原基では E10.5→E11.5 の発生初期において血管・神経発生とともに多数の筋分化関連遺伝子が発現を開始していることが明らかとなった。

②胎性筋芽細胞 (FM) マーカー *Nfix* の発現  
E10.5→E11.5 における遺伝子発現変動の興味深い所見として、四肢骨格筋で後期 (E14.5~E17.5) に分化する FM のマーカーである転写因子 *Nfix* の発現上昇を検出した。これから導かれる仮説として、舌筋発生では初期 (E10.5→E11.5) において EM と FM が共存して筋形成を進行させていると想定した。この可能性を検証するため、舌原基での経時的な *Nfix* 発現について qPCR 解析を行った。*Nfix* は E10.5 から E11.5 にかけて急速に発現上昇した後も E14.5 に至るまで発現増加しており、E14.5 以降は減少するが一定の発現量を維持していた。マウス *Nfix* 抗体による免疫組織化学では、E11.5 舌原基において Desmin 陽性の筋系譜細胞のなかに *Nfix* タンパク陽性の細胞の局在を認めた。E14.5 ではさらに多数の *Nfix* 陽性細胞を確認できた。これらの結果から、少なくとも一部の筋芽細胞では舌発生初期から FM 分化のシグナル経路が発動していることが示唆された。

### (3) 舌筋分化制御に関与するマイクロ RNA (miRNA) 分子群の検索

成熟個体における筋系譜細胞の分化制御に関しては、筋再生時の筋サテライト細胞の分化誘導に働く筋特異的 miRNA 分子(myomiRs; miR-1, miR-133a/b, miR-206 など) が知られており、これらの miRNA の標的遺伝子には筋前駆細胞マーカーの *Pax3* や *Pax7* も含まれている。我々は複雑な舌筋形成を実現する仕組みとして miRNA が関与するのではないかと想定し、E10.5 および E11.5 の舌原基試料の miRNA マイクロアレイを実施した。その結果、E10.5→E11.5 において 2 倍以上の発現変動を示す 124 種の miRNA 分子を同定した(上昇 77、減少 47)。これらには、myomiRs をはじめとして、筋分化に関連して報告された miR-34c, miR-181c, miR-188-5p, miR-214, miR-335-3p も含まれていた。miRNA 発現の特徴として、発現上昇を認めた 77 種のうち、68 種が E11.5 で初めて検出 (E10.5 では “absent”) された。したがって、舌原基においては、筋関連遺伝子の急速な発現変動にともなって、それらの機能発現を精妙に調節する miRNA も発現開始すると考えられた。

### (4) 筋分化制御分子ネットワークの予測

mRNA および miRNA のマイクロアレイ解析結果に基づく分子間相互作用の総合的検証を目的として、Ingenuity® Pathway Analysis (IPA) を実施した。E10.5→E11.5 において活性化する “Biological processes” のアノテーション分析では、スコアリング最上位に “Development of muscle” および “Congenital anomaly of musculoskeletal system” が検出された。一方、E11.5→E14.5 では、変動遺伝子数の増加にともない多種類のアノテーションが検出された。上位に現れた筋関連アノテーションは機能・構造に関わ

る “Contractility of muscles” や “Degeneration of muscle” であった。次にこれらの生物学的機能の特徴付ける発現変動遺伝子・miRNA 分子間ネットワークに着目すると、E10.5→E11.5 の舌原基ではマスター遺伝子を含む分子ネットワークが最上位に算出された。この解析結果から予測上位 3 ネットワークを統合して、舌初期発生 (E10.5→E11.5) で想定される筋分化制御ネットワークとしてまとめた。概要として、マスター遺伝子 (*Myf5*, *MyoD*, *Myogenin*) が作動しており、下流での構造タンパク遺伝子 (*Actin*, *Myosin* など) では一部発現誘導されていた。経路には EM マーカーとして知られる転写因子 *Meox1/Meox2* とともに、FM マーカー *Nfix* も関与しており、いずれも発現上昇を示していた。ただし、これらの分子を標的とする miRNA も発現上昇しており、機能発現が調節されていると推察された。一方、E11.5→E14.5 では増殖因子や酵素群の発現増加により組織・器官発生に働く分子ネットワークが上位を占めた。以上のネットワーク解析により、E10.5→E11.5 の舌原基では筋形成に向けた遺伝子発現ネットワークが主軸として活性化していることがわかった。本解析で得られた舌筋分化のネットワークについて投稿を予定している。

### まとめ

本研究では、舌発生過程における舌筋分化の分子制御機序を明らかにする目的でマウス舌原基の遺伝子・miRNA の網羅的発現解析を実施し、舌筋特異的な分子ネットワークについて検証した。遺伝子の発現プロファイルおよび IPA プラットフォームを用いたネットワーク予測結果を総合すると、マウス舌発生初期 (E10.5~E11.5) においては、特徴的な筋分化関連遺伝子の一斉発現上昇が起こり、

miRNAによる精妙なEM、FM筋芽細胞分化シグナル調節のサポートを得て、舌筋群の複雑な線維配列形成を進行させると考えられた。部位・時期特異的な筋芽細胞への分化誘導に関連して、舌原基における筋芽細胞群の空間的な棲み分けについては今後検討すべき課題として捉えている。

## 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1件)

- ① Fujita K, Taya Y, Shimazu Y, Aoba T, and Soeno Y: Molecular signaling at the fusion stage of the mouse mandibular arch: involvement of insulin-like growth factor family. *Int. J. Dev. Biol.* (査読有) (in press), 2013. doi:10.1387/ijdb.120110ys

[学会発表] (計7件)

- ① 田谷雄二, 島津徳人, 佐藤かおり, 藤田和也, 添野雄一, 青葉孝昭: マウス舌発生における舌筋前駆細胞の移住は舌下神経の軸索誘導に働く, 第54回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 福島県, 2012年9月16日.
- ② Taya Y, Shimazu Y, Fujita K, Soeno Y, Sato K, Aoba T: Embryonic morphogenesis and organization of vascular and nervous networks in mouse craniofacial region, Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, 兵庫県, 2012年5月29日.

- ③ Fujita K, Soeno Y, Taya Y, Shimazu Y, Sato K, and Aoba T: Myoblast-differentiation and mRNA/miRNA expression in developmental mouse tongue, 41st Annual meeting & exhibition of the American Association for Dental Research, Tampa, Florida, USA, 2012年3月22日.

- ④ 藤田和也, 添野雄一, 田谷雄二, 島津徳人, 佐藤かおり, 青葉孝昭: マウス舌初期発生と筋芽細胞分化の分子制御: miRNA・タンパク質の発現局在, 第34回日本分子生物学会年会, 神奈川県, 2011年12月13日.

- ⑤ 藤田和也, 田谷雄二, 佐藤かおり, 島津徳人, 添野雄一, 青葉孝昭: マウス舌初期発生における筋芽細胞分化のタイミングと遺伝子発現制御, 第53回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 岐阜県, 2011年10月2日.

[その他]

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 和也 (FUJITA KAZUYA)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号: 70549055