

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460254

研究課題名(和文) 鼻中隔など顔面正中部骨格の形成過程で働く分子群の解析

研究課題名(英文) Histological and molecular analysis of developmental process of the midline facial skeleton

研究代表者

和田 直之 (Wada, Naoyuki)

東京理科大学・理工学部・教授

研究者番号：50267449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ニワトリ胚の頭蓋底軟骨が発生起源の異なる二つの軟骨(正中部軟骨とその両側軟骨)から構成される可能性を調べ、指標となる分子の実体解明を目指した。神経堤除去実験と細胞標識実験から、PNA-レクチン結合糖鎖(PNA-BM)は頭蓋底正中部領域で強く発現するが、その両側にある軟骨では発現しないことを確認した。PNA-BM陽性細胞ではアクチン繊維の強い凝集が観察されたが、陰性細胞では繊維が観察されず、頭蓋底軟骨組織の不均一性が確認された。PNA-BMの分子実体については、レクチンブロット法により分子量200kDaまたは230kDaの細胞膜タンパク質あるいは細胞間タンパク質と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The developmental process and origin of the anterior part of skull base cartilage has not been unclear. In this project, we analyzed the origin of the cartilage by focusing on the expression of a novel carbohydrate chain, PNA-BM (peanut-agglutinin lectin binding molecule). Two molecules were detected by PNA-lectin blotting analysis. Fate mapping analysis and tissue removal experiment of cranial neural crest cells showed that expression of PNA-BM correlated to the origin of the cartilage. The expression was weak in the cells of paired rod-like cartilage, the trabecular cartilage (TC), whereas strong expression of it was observed in the cells of inter-trabecular cartilage (ITC), which connects the anterior end of TC. In TC cells, actin polymerization was unclear, while in PNA-BM positive ITC cells, the polymerization was apparent. These results suggest that cells in TC and ITC have distinct properties, although both are histologically designated as chondrocytes.

研究分野：発生生物学

キーワード：顎顔面発生 頭蓋底軟骨 鼻中隔 神経堤細胞 発生系譜 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の顔面正中部を構成する鼻中隔やその相同骨格（以下鼻中隔とする）の形態形成過程の解明は、ヒト頭顔面の正常発生過程の理解と、その先天性形態異常の発症機構の解明のため、また様々な脊椎動物の頭顔面形態の多様性を理解する上で重要である。

代表者は、ニワトリ胚やゼブラフィッシュ胚における鼻中隔を含む頭蓋底軟骨原基の発生系譜解析を行い、一对の梁軟骨

(trabecular cartilage, TC) とその間に出来る中隔軟骨 (inter-trabecular cartilage, ITC) は互いに異なる頭部神経堤細胞に由来することを報告した。代表者はまた、ニワトリ胚の鼻中隔軟骨原基の形成過程で、その正中部分では PNA レクチン結合性糖鎖分子

(PNA-BM) が発現するが、側方下部では発現しないことを見出した。以上の二つの結果は、鼻中隔軟骨原基は「PNA-BM 陰性細胞からなる TC」と「PNA-BM 陽性細胞からなる ITC」の2領域から構成されている可能性を示している。また PNA-BM 発現の有無は、TCと ITCは同じ「軟骨組織」ではあるものの、異なる性質を持つことを示唆している。しかし、TCと ITCを区別して、それぞれを構成する軟骨細胞の性質を調べた報告はない。また PNA-BM の分子実体や、発現の差異をもたらす分子機構などについての報告もない。

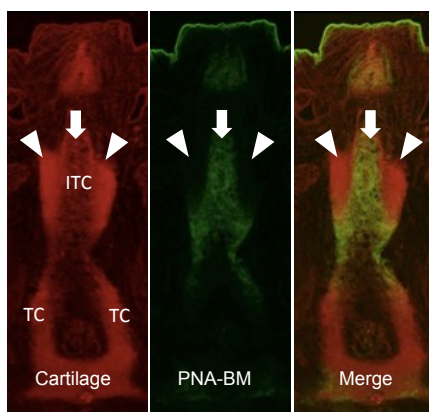


図1. ニワトリ胚鼻中隔軟骨原基の発生過程におけるPNA-BMの発現(緑)。PNA-BMは、軟骨原基(赤)のうち中隔軟骨(ITC)で発現する(矢印)が、梁軟骨(TC)では発現せず(矢先)、軟骨の性質の差異を示している。

2. 研究の目的

本研究では、鼻中隔軟骨の発生過程を理解

する一端として、ニワトリ胚頭部軟骨における PNA-BM 発現の不均一性を指標にして、TCと ITCを構成する軟骨細胞(組織)の違いを明確にすることを旨とし、次の3点から実験を進めた。(1) 胚操作および組織学的解析により、PNA-BM の発現と鼻中隔軟骨の不均一性の対応関係を明確にすることを目指した。また PNA-BM 発現の有無と軟骨組織の差異を細胞形態や細胞極性、増殖の点から比較検討した。(2) PNA-BM の分子実体を解明するために、PNA-BM が結合する糖鎖を持つ蛋白質の解析を目指した。(3) PNA-BM の発現を指標にして、鼻中隔形成を担う細胞で働く分子機構の理解を進めることを目指した。特に、PNA-BM 陽性細胞と陰性細胞を区別して、それぞれに由来する軟骨細胞の性質と遺伝子発現の差異を比較した。

3. 研究の方法

(1) 材料:ニワトリ胚(白色レグホン)は、37°Cで目的とする発生段階まで孵卵した。

(2) in situ hybridization (ISH) および免疫組織化学 (IHC) : ISH と IHC はニワトリ胚を用いた一般的な方法で行った (Wada et al., 2011)。一部の IHC では異なる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、蛍光ファロイジン染色、あるいは蛍光標識 PNA レクチン染色を併用する操作も行った。

(3) 鼻中隔形成領域に移動する頭部神経堤細胞の除去実験: 発生段階 9 (体節数 7-9) 胚から、過去の我々の実験結果を元に、鼻中隔軟骨形成領域に分布する頭部神経堤細胞が生じる前脳-中脳の一部を除去した。胚は発生させて軟骨原基の形態や PNA-BM の発現部位の形態を調べた。

(4) 鼻中隔形成領域への薬剤投与: 孵卵約 4 日胚 (発生段階 23-24) の内側鼻隆起に、ROCK 阻害剤の Y27632 またはアクチン重合阻害剤のサイトカラシン D を樹脂ビーズに吸着させて移植して発生させ、隆起および骨格の形態変化を調べた。

(5) 細胞培養と薬剤処理、遺伝子抽出: 発生段階 23-24 胚の口腔天井部から、予定 TC

形成部位と ITC 形成部位を区別して単離し、それぞれから間充織細胞を調製して培養した。培地などの培養条件は先行研究に準じた (Wada et al., 2003)。24-72h 培養した後に固定し、免疫染色によって PNA-BM 発現と軟骨分化状態を TC および ITC 由来の培養細胞間で比較した。RNA-Seq 解析にはそれぞれの細胞を 48 時間培養したのち、mRNA を抽出して業者に依頼した。ROCK 阻害剤によるアクチン阻害の効果は、培養開始時に Y27632 を培地に添加して調べた。

4. 研究成果

(1) PNA-BM に注目した、鼻中隔軟骨の不均一性の検証: PNA-BM 陽性軟骨細胞群の発生起源の解析のため、まず鼻中隔軟骨原基の ITC 形成部位に分布し、その形成を担う頭部神経堤細胞群を除去し、頭蓋顔面骨格の形態や PNA-BM 発現の変化を調べた。その結果、除去により前頭鼻隆起 (FNP) およびそれに由来する骨格が大きく欠損した。対になった TC 様の棒状軟骨の形成は確認できたが、その先端は左右に分離したままで、PNA-BM 陽性軟骨は形成されなかった。上記の神経堤細胞群を除去せずに蛍光標識して発生させると、標識された細胞群は正中部の PNA-BM を発現する軟骨の中に観察された。一方、軟骨原基の側方部 (TC) を形成する神経堤細胞群を除去すると、TC のうち後方が特に低形成となる一方で、前方の形成は維持され、PNA-BM の発現も弱いが維持された。(図)。

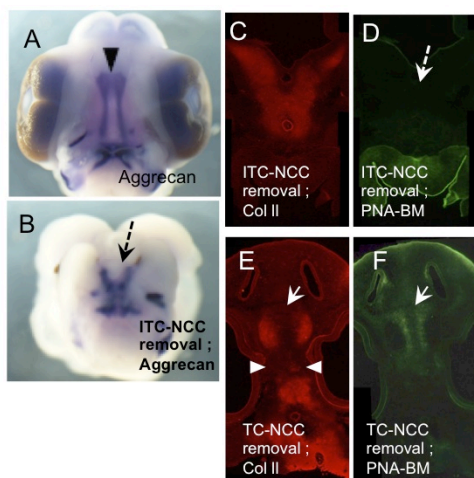


図2. 頭部神経堤細胞除去とPNA-BM発現の関連。A-D, 予定ITC形成細胞の除去。正常胚(A)では正中中部で融合する梁軟骨が、除去胚では分離している(B)。またPNA-BMの発現も観察されない(D, 矢印)。E-F, 予定TC細胞の除去。後方の梁軟骨の形成が低下するが、前方の形成は比較的正常(E)で、PNA-BMの発現も観察される(F)。

以上の結果から、PNA-BM 陽性軟骨細胞群と陰性軟骨細胞群の発生起源は互いに異なり、前者は ITC に相当する軟骨を、後者は TC に相当する軟骨をそれぞれ形成すると結論づけた。

軟骨の違いを組織学・細胞学的に理解するために、PNA-BM 陽性軟骨と陰性軟骨それぞれの細胞極性や増殖、細胞形態について比較・検討した。それぞれの軟骨での細胞極性を調べるために、細胞内での核に対するゴルジ装置の相対的位置を比較したが、PNA-BM 陽性軟骨、陰性軟骨いずれにおいても明瞭な極性は確認できなかった。またそれぞれの軟骨における細胞増殖は独立に変動していて関連性は見られず、2つの軟骨の形態形成は独立に進行していると予想された。一方、細胞形態の比較の一環として、蛍光ファロイジン染色によるアクチン重合状態や繊維の変化を比較した。その結果、PNA-BM 陽性軟骨細胞では明瞭なアクチン繊維が観察されたが、側方にある PNA-BM 陰性細胞における凝集は不明瞭だった(図3)。軟骨前駆細胞を培養した場合も in vivo を反映した PNA-BM 発現とアクチン重合状態が観察された。以上から、アクチン重合状態の差は個々の軟骨細胞の性質に反映され、軟骨形態や PNA-BM 発現に影響する可能性を予想した。

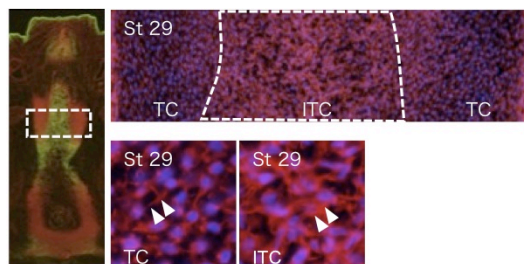


図3. TCとITCにおけるアクチンの分布。アクチン繊維の重合はITCで明瞭だが、TCでは不明瞭である。

そこで、アクチン機能を阻害して軟骨組織に起こる変化を調べた。まず Rho キナーゼ経路においてアクチン制御に関与する ROCK に注目し、軟骨前駆細胞の培養系において ROCK 阻害剤を作用させて、アクチンの機能阻害を試みた。その結果、PNA-BM 陽性軟骨細胞での顕著なアクチン繊維凝集は阻害され、PNA-BM 陰性細胞と同程度になった。一方で、ROCK 阻害剤の添加によっても軟骨分化には変化が確認されず、また PNA-BM の

発現にも変化は見られなかった (図 4)。

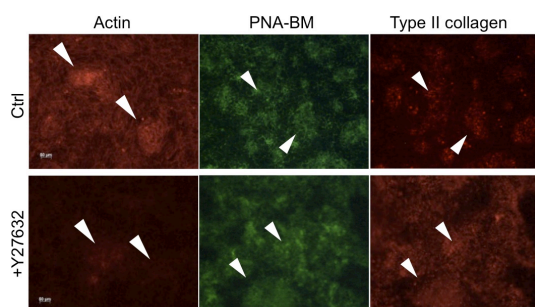


図4. PNA-BM陽性軟骨細胞をROCK阻害剤 (Y27632) 処理したときの变化。アクチン繊維凝集は阻害されたが (左列), PNA-BM発現 (中央) や軟骨分化 (右列) は変化しなかった。

これとは別に、アクチンの重合阻害剤であるサイトカラシン D を *in vivo* で局所投与したが、形態変化や PNA-BM の発現に顕著な変化は確認されなかった。そのため现阶段では、アクチン重合状態は軟骨の差異を示す指標にはなるが、PNA-BM 発現や軟骨形態とは直接関連していないと考えられる。今後、糖鎖の切断酵素の局所投与などを行ってアクチン分布の変化や形態への変化を検討する。

(2) PNA-BM の生化学的解析：次に

PNA-BM の分子実体を生化学的に解析した。ニワトリ 6 日胚頭部正中部の細胞を破碎し、細胞膜等が含まれる画分を可溶化してレクチンプロットを行い、PNA が結合する分子の分子量などを解析した。その結果、分子量約 200 kDa と約 230 kDa の位置に PNA が結合する分子のバンドが確認され、少なくとも 2 種類の糖タンパク質の一方、あるいは両方が PNA-BM であると考えられた。

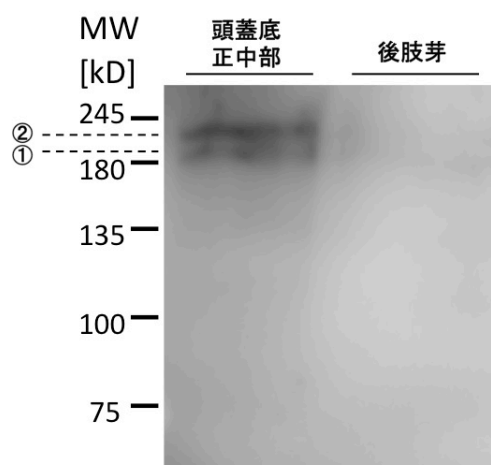


図5. PNA-レクチンを用いたレクチンプロットの結果。頭蓋底正中部の試料では、約200kD (①) と230kD (②) のバンドが確認できる。一方、後肢芽由来の試料ではPNAの結合は確認できない。

軟骨 ECM のコア蛋白質への構グリコサミノグリカン鎖の付加阻害剤 (p-Nitrophenyl- β -D-Xylopyranoside, PNPX) を滴下した結果、TC のうち下垂体に近い近位側は低形成となったが、TC の遠位 (前側) と ITC は形成された。この時 PNA-BM は弱い前側正中部に発現したことから、PNA-BM はグリコサミノグリカン鎖ではないと考えられた。

(3) PNA-BM 陽性細胞と陰性細胞で発現する遺伝子の比較検討：PNA-BM 陽性細胞と陰性細胞それぞれの性質の差異を遺伝子レベルで解析するために、それぞれで発現する mRNA を抽出し、次世代シーケンサーによる発現解析と比較を行った。これにより、PNA-BM 陽性細胞で発現上昇する遺伝子 (群) や発現低下する遺伝子のリストが得られた。今後、それぞれのリストの上位にある遺伝子についてクローニングと発現解析を行い、PNA-BM 発現との対応を検討する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Yasumoto Y, Wada N, Oishi K. et al. (2016) Short-term feeding at the wrong time is sufficient to desynchronize peripheral clocks and induce obesity with hyperphagia, physical inactivity and metabolic disorders in mice. *Metabolism*, 65 (5), 714-727. <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2016.02.003>
2. Yasuda S, Wada N, Nakamura T. et al. (2016). Mon1-Ccz1 activates Rab7 only on late endosomes and dissociates from the lysosome in mammalian cells. *J Cell Sci.* 129, 329-340. doi: 10.1242/jcs.178095.
3. Akiyama, R., Wada, N., Kawakami, Y. et al. (2014). Distinct populations within Isl1 lineages contribute to appendicular and facial skeletogenesis through the β -catenin pathway. *Dev. Biol.* 387, 37-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.01.001>
4. Fujita A, Wada N, Nakamura T. et al. (2013). GTP Hydrolysis of TC10 Promotes Neurite Outgrowth through Exocytic Fusion of Rab11- and L1-Containing Vesicles by Releasing Exocyst Component Exo70. *PLoS*

One. 8, e79689. doi:
10.1371/journal.pone.0079689.

5. Nakamura T, Yasuda S, Wada N., et al. (2013). Longest neurite-specific activation of Rap1B in hippocampal neurons contributes to polarity formation through RalA and Nore1A in addition to PI3-kinase. *Genes Cells*. 18, 1020-1031. doi: 10.1111/gtc.12097.
6. Kuratani, S., Adachi, N., Wada, N., et al. (2013). Developmental and evolutionary significance of the mandibular arch and prechordal/premandibular cranium in vertebrates: revising the heterotopy scenario of gnathostome jaw evolution. *J. Anat.* 222, 41-55.

[学会発表] (計 10 件)

1. 和田直之, 植本俊明: ゼブラフィッシュヒレ再生の方向性. 日本動物学会第 86 回大会, 要旨集 p6. 2015 年 9 月 17 日, 朱鷺メッセ(新潟).
2. 小林俊祐, 和田直之: 梁軟骨とそれに挟まれた軟骨の不連続性の検討. 第 5 回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting, 2015 年 8 月 11 日, 東京慈恵会医科大学(東京).
3. 高橋昂平, 和田直之: マウス頭蓋底軟骨原基の初期形成過程の観察. 第 4 回筑波大学・東京理科大学生命医科学研究所, 合同リトリート. 2016 年 3 月 19 日, オークラフロンティアホテル(つくば).
4. 大西雅子, 和田直之: レクチン染色によるゼブラフィッシュ初期軟骨組織の検出. 日本動物学会第 85 回大会, 予稿集 p145. 2014 年 9 月 13 日, 東北大学(仙台).
5. 渡邊知明, 和田直之: ニワトリ胚頭顔面形成時に内側鼻隆起で発現する遺伝子の解析. 日本動物学会第 85 回大会, 予稿集 p145. 2014 年 9 月 13 日, 東北大学(仙台).
6. 和田直之, 佐々木孝太, 齊藤嘉之, 飯田小百合: ニワトリ胚の頭蓋底正中中部で発現する PNA 結合分子の発現変動. 第 119 回日本解剖学会総会, 予稿集 p149, 2014 年 3 月 28 日, 自治医科大学(栃木).
7. 佐々木孝太, 飯田小百合, 齊藤嘉之, 和田

直之: ニワトリ胚頭部軟骨発生過程で部位特異的に発現する PNA レクチン結合分子. 日本動物学会第 84 回大会, 予稿集 p119. 2013 年 9 月 26 日, 岡山大学(岡山).

8. 一ノ瀬穂, 前田美香, 東海林互, 和田直之: ゼブラフィッシュ下顎の再生能. 日本動物学会第 84 回大会, 予稿集 p178. 2013 年 9 月 28 日, 岡山大学(岡山).
9. 藤田明音, 鯉沼真吾, 安田さや香, 永井寛之, 上口裕之, 和田直之, 中村岳史: Rho ファミリー G 蛋白質のひとつである TC10 の GTP 加水分解は Rab11 と L1 を含む小胞のエキソサイトーシスを介して神経突起伸展を促進する. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3 日, 神戸ポートアイランド(神戸).
10. 安田さや香, 大西悠希, 藤田明音, 川崎司人, 和田直之, 和栗聡, Schiavo Giampietro, 福田光則, 中村岳史: エンドソーム成熟とオートファジーに関わる Rab7 の活性可視化. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 4 日, 神戸ポートアイランド(神戸).

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 直之 (Wada Naoyuki)

東京理科大学・理工学部・教授

研究者番号: 50267449

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし