

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 石川 隆一
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第421号
学位授与の日付 平成31年3月25日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Sox genes show spatio-temporal expression during murine tongue and eyelid development
(Sox 遺伝子群は舌と目蓋の発生において、時空的な発現を示す)

論文審査委員 主査 教授 大峽 淳
副査 教授 前田 健康
副査 教授 照沼 美穂

博士論文の要旨

[背景および目的]

咀嚼、発音、味覚などの機能に関与する舌は、上皮、筋肉、結合組織、神経などが複雑に配置された器官である。その舌の発生には外胚葉、中胚葉、神経堤の細胞が関わることは知られているものの、分子メカニズムの多くは未だ明らかでない。Sox ファミリーは、様々な器官の発生に関わる遺伝子群であるが、舌の発生に関与するかどうかは不明である。

そこで、本研究では、各 Sox 遺伝子の舌の発生における発現を検索した。また、同じ顔面で、舌と類似した大きな可動域をも地、舌と同じように上皮、筋肉、結合組織で構成された目蓋における Sox の発現を検索し舌と比較することで、Sox 遺伝子が、そのような期間の発生において画一的な発現をしているかの検討も行った。

[試料および方法]

本研究には、野生型マウスとして CD-1 マウスを使用した。通法に従い組織切片を作成後、35S 標識プローブを使用した *in situ hybridization* による Sox1-14、17、18、21 の舌発生における発現の検索を行った。マウスの舌は、胎生(E) 12日にその外形が確認できるようになり、その後、筋肉の形成が少しずつ組織学的に観察されてくる。一方で、目蓋の形成も舌の発生時期にほぼ類似した時期である。そこで、本研究では、舌の外形が認められる時期から、ほぼ全ての筋肉が組織学的に観察される時期までの各ステージ (E12日、E13日、E14日、E18日) における各 Sox の発現を舌ならびに目蓋で観察した。

[結果]

観察した全てのステージにおいて、Sox2 と Sox 11 は上皮に、Sox4 と Sox 21 は間葉に発現を認めた。筋肉では、全てのステージに発現する Sox は認められなかった。Sox10 は間葉では E18 日以外の全ての

ステージで、筋肉では E11 日以外の全てのステージで観察された。Sox6 は E12 日から E18 日まで、Sox8 は E13 日から E18 日まで、Sox9 は E12 日から E14 日まででのみ発現が確認された。Sox12 の発現は、上皮と筋肉でのみ認められた。Sox1 は E18 日の筋肉にのみ、Sox5 と Sox13 は E12 日の間葉にのみ発現していた。各筋肉で様々な Sox の発現が確認されたが、特定の筋肉にのみ発現する Sox は認められなかった。Sox7、Sox17、Sox18 は、点状の発現が確認された。Sox3 と Sox14 の発現は、舌の発生中に観察されなかった。一方、目蓋発生時における各 Sox の発現は、舌発生時におけるものとは、全く異なっていた。

[考察]

舌の発生では、筋の分化は間葉細胞との相互作用によることが知られている。本研究では、間葉と筋それぞれに Sox の発現を認め、それらが、筋と間葉の相互作用に関与している可能性が示唆された。筋肉線維には、瞬発性に富む fast-twitch 線維と持久性に富む slow-twitch 線維が存在する。四肢の fast-twitch 線維形成に Sox6 が関与することが知られており、我々の研究でも Sox6 が舌の筋肉に発現しており、舌の筋肉が四肢の筋肉と同じ体節由来であることを鑑みれば、Sox の筋肉形成における機能が、四肢の筋肉形成に類似したものである可能性がある。マウスの舌の筋のほとんどが fast-twitch 線維で構成されていることとも合致する。一方で、fast-twitch 線維と slow-twitch 線維の割合が、マウスの舌とヒトの舌で大きく異なることが知られており、Sox の筋肉における機能が、種依存的である可能性もある。Sox7、Sox17、Sox18 は、生後の筋肉のサテライト細胞の機能発現に関わることが報告されている。しかしその機能は、生後に限定されているため、我々が認めたマウス胎児の舌における点状の発現は、Sox7、Sox17、Sox18 が関与するもう一つの機能である、血管形成への関与と考えられた。各 Sox 遺伝子は、様々な時空的発現パターンを示し、舌の発生に関与すると考えられた。一方で、それらは、舌特有の機能と考えられた。

[結論]

本研究結果から、舌発生において Sox の発現が重要であることが示された。本研究成果は、舌発生の特殊性と他の組織との共通性という新たな知見を呈示した点において重要な知見であると考えられる。

審査結果の要旨

舌は味覚を司る感覚器であることに加え、発音や咀嚼においては運動器としても働く非常に特殊な器官である。このような特殊性を持つ器官の発生過程は非常に複雑と考えられるものの、その多くは明らかにされていない。そのため、分子レベルでの舌発生に関する知見は、非常に重要な意味を持つ。特に本研究のように、Sox という多くの分野で注目されている非常にメジャーな分子のファミリーの発現を、網羅的に解析することの意義は極めて大きい。Sox は様々な器官の発生に関わることが知られており、Sox の舌発生における発現を他の組織と比較することが可能となり、舌発生の特殊性を紐解くことにもつながると考えられる。

舌の発生は数時間で大きな変化を示すため、同じステージ間での比較が非常に重要となるが、数時間での変化は同じ状態のサンプルを獲得することが困難であることも意味する。同じステージでの発現の比較を可能にするために、同腹仔をサンプルとして利用したこと、同腹仔数の多い CD-1 マウスを使用したこと、さらには1つの胎仔を複数のスライドに分け、1つに HE 染色を施すことにより形態を確かめた上で実験へ使用したことなどは、データの信用性を高める上で、非常に重要なポイントである。

舌発生における Sox の発現を、他器官における発現と比較することは、Sox の持つ基本的な機能と、特定の器官における機能を区別することが可能となるため、重要な意味を持つ。様々な器官の中で、本研究では、その大きな可動域、外胚葉由来細胞、中胚葉由来細胞、神経堤由来細胞により発生すること、上皮間葉相互作用で制御されることなど、舌との共通性が非常に多い目蓋に着目し、舌における Sox の発現と比較したことは特筆すべき事項である。目蓋と舌は共通性が多いものの、筋肉の由来は、舌が体節で、目蓋が体節分節と全く異なる。このことが発生学的にどのような意味を持つかは、全く不明であるため、本研究で行う目蓋と舌の2つの器官における Sox 発現の比較は、この体節由来筋肉と体節分節由来筋肉の間に存在する様々な疑問にも一石を投じる可能性がある。事実、本研究では、舌と目蓋発生における Sox 発現に非常に多くの相違点を確認しており、今後、様々な分野での有用な情報となると考えられる。

舌における筋肉の走行は、非常に複雑であり、発生の際にどのような経路で複雑な走行が決定されていくかは、未だ不明である。それら筋細胞へ分化する中胚葉由来細胞に加えて、神経堤由来細胞の存在が、舌の発生のメカニズムの把握をより複雑なものにしている。そのため、単純に Sox の発現だけを観察したのでは、得られる情報は極めて限定的となる。しかし本研究では、Myf5 を使用することで筋前駆細胞の部位を特定し、Sox を発現する細胞の種類を同定しており、非常に評価できる。また、現在まで舌の筋前駆細胞のマーカー分子は同定されていないが、予備実験で Myf5 が舌発生初期から発現する分子として利用可能であることを確認したことも、本研究の科学的なレベルを引き上げている。

舌は口腔領域でもっとも頻度の高い癌の発症部位であり、その対応のほとんどは外科的な切除となる。様々な機能を有する舌の切除は、その後の quality of life を著しく低下させる。外科切除後の再建手術は存在するものの、機能的な面で、再生からは程遠い。そのため、歯科界における再生療法確立の中でも、外科切除後の舌の完全再生に対する要望は大きい。Sox ファミリーメンバーの中には、iPS 細胞の作成のために使用されるものもあり、本研究結果の再生療法への貢献も期待できる。また、目蓋は火傷や怪我などで消失するケースがあるものの、解剖学的・機能的な複雑さから再建手術すら確立していない。そのため、本研究での目蓋における解析結果は目蓋再生にもつながる可能性を有しており、眼科領域への貢献も大きいものと予想される。このように本研究は、生物学的、臨床的に重要な知見を与えたと考えられる。

本研究によって得られた舌発生における Sox ファミリーメンバーの発現解析は、顔面発生研究にとっても、Sox の機能解析にとっても、再生研究にとっても非常に意義のある研究といえ、学位論文としての十分な価値が認められる。