

## 顎顔面形態形成に關与する Wnt ファミリーの発現パターン

山本 康弘, 高田 温行, 森口 隆彦, 和田 直之\*, 本間 隆義\*,  
濃野 勉\*

ニワトリ胚の顎顔面形成過程において, 分泌性タンパク質である Wnt ファミリーの発現パターンを *in situ hybridization* で調べた. 脊椎動物で19個ある Wnt メンバーのうち, Wnt-3a, Wnt-5a, Wnt-10a, Wnt-11 が顎顔面の形態形成で発現していた. Wnt-5a は発生が進むとともに各顔面隆起の遠位側先端に強く発現していた. また, Wnt-11 はそれぞれの顔面隆起間の近接部間充織に強く発現していた. 一方, Wnt-3a と Wnt-10a は上皮でのみ発現していた. これらの時間的, 空間的に特異的な発現パターンから, これらの Wnt ファミリーが顎顔面の骨格や筋分化に至る過程で分化誘導シグナルとして重要な働きをしていると考えられる.

(平成17年9月8日受理)

### Expression Pattern of the Wnt Family During Orofacial Development in the Chicken Embryo

Yasuhiro YAMAMOTO, Haruyuki TAKATA, Takahiko MORIGUCHI,  
Naoyuki WADA\*, Takayoshi HONMA\* and Tsutomu NOHNO\*

The expression pattern of the secretion glycoprotein Wnt family during orofacial development in the chicken embryo was observed by *in situ hybridization*. From among the 19 members of the Wnt family, Wnt-3a, Wnt-5a, Wnt-10a, and Wnt-11 were expressed in the processes during orofacial development in the embryo. Wnt-5a was strongly expressed in the mesenchymal cells in the distal region of the facial processes. Expression of Wnt-11 was restricted to the region where the processes fuse with each other at later stage. Wnt-3a and Wnt-10a were expressed broadly in the surface ectoderm of the processes. These spatio-temporal expression patterns suggest that these Wnt proteins play important roles in skeletal and muscular differentiation. (Accepted on September 8, 2005) *Kawasaki Igakkaishi* 31(1): 97-105, 2005

**Key Words** ① Wnt-5a ② Wnt-11 ③ Chicken embryo  
④ Orofacial development

## はじめに

胚発生における顎顔面の形態形成は第1鰓弓 (first branchial arch) 背方部の上顎隆起 (maxillary prominence), 第1鰓弓腹方部の下顎隆起 (mandibular prominence), および前脳胞腹方部の前頭鼻隆起 (frontonasal prominence) から始まる。顔面の中心部を構成する口窩は, その側縁周囲を構築する一対の上顎隆起, 口窩の下縁を構築する一対の下顎隆起, および口窩の上縁を構築する無対の前頭鼻隆起からなる (Fig. 1)。顎顔面を構成する骨格は顔面隆起内を満たす神経堤細胞に由来する間充織が分化して形成される。上顎隆起の間充織は膜性骨化により顎前骨

(premaxilla), 上顎骨 (maxilla), 頬骨 (zygomatic bone), および側頭骨 (temporal bone) の一部を形成する。一方, 下顎隆起では間充織の膜性骨化により下顎骨 (mandible) が形成される。前頭鼻隆起の両側に鼻板 (nasal placode) とよばれる体表外胚葉の局所的肥厚があり, 発生が進むと鼻板は陥入して卵円形の鼻窩 (nasal pit) となる。この際に鼻窩の周囲に馬蹄形の隆起が生じ, この内側部が内側鼻隆起 (medial nasal prominence), 外側部が外側鼻隆起 (lateral nasal prominence) である。発生が進むとともに, 上顎隆起は外側鼻隆起と癒合し頬と上顎骨を形成する。また, 上顎隆起が前方に増大し内側鼻隆起とも癒合し, 上唇と顎前骨を形成する。一対の下顎隆起は正中線上で癒合し, 下唇と下顎を形成する<sup>1), 2)</sup>。これら顔面隆起の形成や増殖の異常, また隆起間の癒合不全などにより, 口唇裂口蓋裂などの顔面奇形が生ずると考えられている<sup>3)</sup>。

一方, 顎顔面形成過程には, 多数の分子やそれらの相互作用が関与することが報告されている。特に, 細胞間の情報伝達を担う分泌性タンパク質は, 位置特異的な顔面隆起の発達や間充織細胞の増殖分化, 器官形成に至るまでのさまざまな発生段階と部位で機能することが理解されている。現在のところ, TGF- $\beta$  や SHH, BMP, FGF など, 多くの器官において重要な機能を果たす分子が顎顔面形成にも関与することが報告されている<sup>4)~6)</sup>。その一方で多様な役割が報告されている分泌性糖タンパク質の1つである Wnt ファミリーについては, 初期胚の軸性決定, 胚葉分化, 後脳の形成, 神経管や体節の分化, 四肢や腎臓の形成などにおける役割についてよく調べられている<sup>7)~17)</sup>が, 顎顔面の形成での役割については不明であり, その発現パターンも体系的に調べられていない。そこで私達は, 口唇裂口蓋裂の分子メカニズムを調べる一環として<sup>6), 18), 19)</sup>, 顎顔面形態形成における Wnt の役割を解明するために, ニワトリ胚でその発現パターンを調べた。

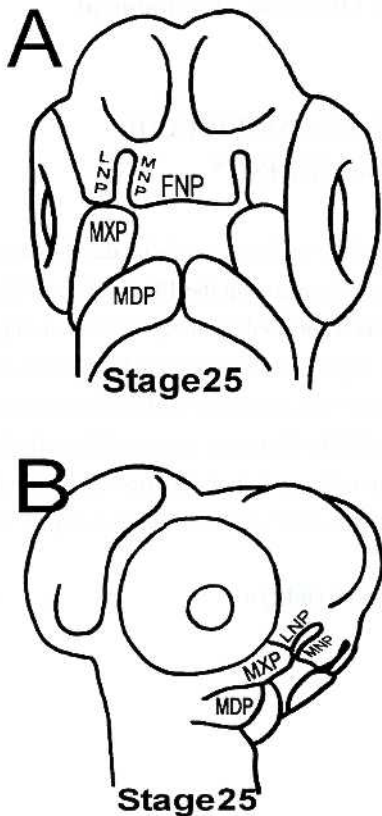


Fig. 1. Facial prominences of the chicken embryo. (A) Frontal view. (B) Side view. Abbreviations: MXP, maxillary prominence; MDP, mandibular prominence; FNP, frontonasal prominence; LNP, lateral nasal prominence; MNP, medial nasal prominence.

## 実験材料と方法

### 1. ニワトリ受精卵

発生 stage は Hamburger and Hamilton (1951) に従った<sup>20)</sup>。発現パターンを調べるために whole-mount in situ hybridization を行った。また、約 5 日胚 (stage 26) の上顎隆起および下顎隆起を含む切片を作成し、切片での in situ hybridization を行った。In situ hybridization のため probe には Wnt-3a, Wnt-4, Wnt-5a, Wnt-7a, Wnt-8c, Wnt-10a, Wnt-11 の cDNA を用いた。In situ hybridization には自動 ISH 装置 (ALOKA AIH-101) を使用した。

### 2. 受精卵の培養

レトロウイルス非感染のニワトリ受精卵は日生研(株)より購入し、38℃の孵卵器 (SANYO INCUBATOR MIR-153) で 4 日 (stage 23 前後)、5 日 (stage 25 前後)、6 日 (stage 28 前後) まで孵卵した。

### 3. 胚の固定と脱水

胚を卵から採りだし、phosphate-buffered saline (PBS) を満たしたシャーレの上で羊膜を剥ぎ、胸腹部臓器を除去した後、4% paraformaldehyde / PBS 溶液に置換し 4℃で一晩固定した。4% paraformaldehyde / PBS 溶液を 0.1% Tween 20 を含む PBS 溶液 (PBT) に置換し、10 分間振盪した。その後、25% ethanol / PBT で 5 分、50% ethanol / PBT で 5 分、75% ethanol / PBT で 5 分、100% ethanol で 5 分それぞれ振盪した。最後に再度 100% ethanol で 10 分間振盪した後、-20℃で保存した。(100% ethanol 以外は全て RNase-free の水を使用した。)

### 4. Whole-Mount in situ hybridization

試料の入っている 100% ethanol を 75% ethanol / PBT に置換し、5 分間振盪し再水合を行った。その後、50% ethanol / PBT で 5 分間、

25% ethanol / PBT で 5 分間、PBT で 5 分間それぞれ振盪した後、再度 PBT に置換し 5 分間振盪した。Proteinase K / PBT 溶液 (2  $\mu$ g/ml) に置換し、37℃で 15 分間振盪した。その後、glycine (2 mg/ml) / PBT 溶液に置換後、室温で 5 分間、PBT で 2 回 5 分間振盪した。2% glutaraldehyde + 4% paraformaldehyde / PBT 溶液に置換し、20 分間振盪した。その後、PBT に置換し 5 分間振盪した (2 回繰り返す)。PBT に置換し、68℃で 50 分間振盪した。その後、十分に冷却した PBT に置換し、氷上で 5 分間振盪した。6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / methanol 溶液に置換し、氷上で 1 時間振盪した。その後、PBS で 5 分間、PBT で 5 分間振盪後、68℃の pre-hybridization mix (組成: 50% formamide, 5  $\times$  SSC pH 7.0, 50  $\mu$ g/ml tRNA, 1% SDS, 50  $\mu$ g/ml heparin) に置換し、1 時間振盪した。

Digoxigenin (DIG) - labeled RNA probe (0.5  $\mu$ g) + 希釈用 pre-hybridization mix 溶液に置換し、68℃で一晩 hybridization を行った。Probe は、滅菌蒸留水 (5  $\mu$ l), 10  $\times$  transcription buffer (1  $\mu$ l), 10  $\times$  DIG-RNA labeling mixture (1  $\mu$ l), RNase inhibitor (1  $\mu$ l), Linearized template DNA (1  $\mu$ l), RNA polymerase (1  $\mu$ l) を混合し、37℃で 2 時間反応して合成した。DIG 標識 RNA は必要に応じて限定的アルカリ分解で断片化して用いた。

Hybridization wash solution 1 (組成: 5  $\times$  SSC, 50% formamide, 1% SDS) に置換し、軽く振盪した。再度、新たな hybridization wash solution 1 に置換し、68℃で 30 分間振盪し洗浄を行った。その後、hybridization wash solution 2 (組成: 2  $\times$  SSC, 50% formamide, 0.1% Tween20) で 5 分間、さらに同じ液を用いて 68℃で 30 分間、さらに TBST (組成: 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) で室温 5 分間を 3 回繰り返す、ブロッキング溶液 (組成: 1  $\times$  TBST, 1.5% Blocking reagent) で 60~90 分間、それぞれ振盪した。最後にブロッキング溶液を除き、抗体を加え 4℃で一晩振盪し、抗体反応を行った。

TBSTに置換し5分間振盪を4回行った。次に、新たにTBSTに置換して、30分間振盪を8回、NTMT(組成:0.1M NaCl, 0.1M Tris-HCl pH 9.5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Tween20)に換えて3回、10分間振盪による洗浄を行った。その後、NTMTを発色液(NBT:4-Nitro blue tetrazolium chloride + BCIP:5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate / NTMT)に換え、発色反応を開始した。発色開始から10分後から発色状況を確認し、発色が完了したところでPBTに置換し、5分間振盪を3回行い、発色反応を停止した。次に50% ethanol / PBTに置換し、5分間振盪後100% ethanolに換え1.5~3時間振盪した。その後、50% ethanol / PBTで5分間、PBTで5分間振盪した後、アルミホイルに包み遮光して4℃で保存した。

## 5. 切片作製

取り出した胚を4% paraformaldehyde / PBS溶液で固定し、脱水、再水和後にパラフィン包埋した。上顎隆起と下顎隆起が含まれる様に額面断で、薄切の厚さは7 μmで切片を作製した。

In situ hybridizationは、4. Whole-Mount in situ hybridizationの手法に準じて行った。変更点としては、pre-hybridization mixにはWhole-Mountで使用したpre-hybridization mixに終濃度10% dextran sulfateを加えたものを使用し、発色液はWhole-Mountの場合の1/10の濃度を用いた。発色停止後に0.1% Nuclear fast red / 5% 硫酸アルミニウム水溶液で核を染色した。

## 結 果

ニワトリ胚の約4日胚(stage 23), 約5日胚(stage 25), 約6日胚(stage 28)を用いて、WntファミリーのうちWnt-3a, Wnt-4, Wnt-5a, Wnt-7a, Wnt-8c, Wnt-10a, Wnt-11を調べた。その結果、Wnt-4, Wnt-7a, Wnt-8cについては顔面隆起での発現はほとんどみられなかった。以下、顕著な発現シグナルがみられた

Wntについて記載する。

### 1. Wnt-5a

Stage 23では上顎隆起全体に強く発現している。また下顎隆起全体にも発現しているが、遠位で強く近位では弱く発現している。口窩には発現していない。外側鼻隆起および内側鼻隆起にも強く発現しているが、鼻窩には発現していない(Fig. 2A, B)。

Stage 25ではstage 23と同様にすべての顔面隆起で発現している。Stage 23に比べ、それらの発現は、隆起の遠位側で強くなっている(Fig. 2C, D)。Stage 26胚の上顎隆起および下顎隆起を含む切片より、Wnt-5aの顔面隆起における発現は、間充織のみで上皮(外胚葉)にはみられないことが分かる(Fig. 2F)。

さらに発生が進みstage 28では、突出してきた前頭鼻隆起の先端で強く発現している。一方、上顎隆起と下顎隆起での発現は、より先端辺縁部に弱くに局在している(Fig. 2E)。

### 2. Wnt-11

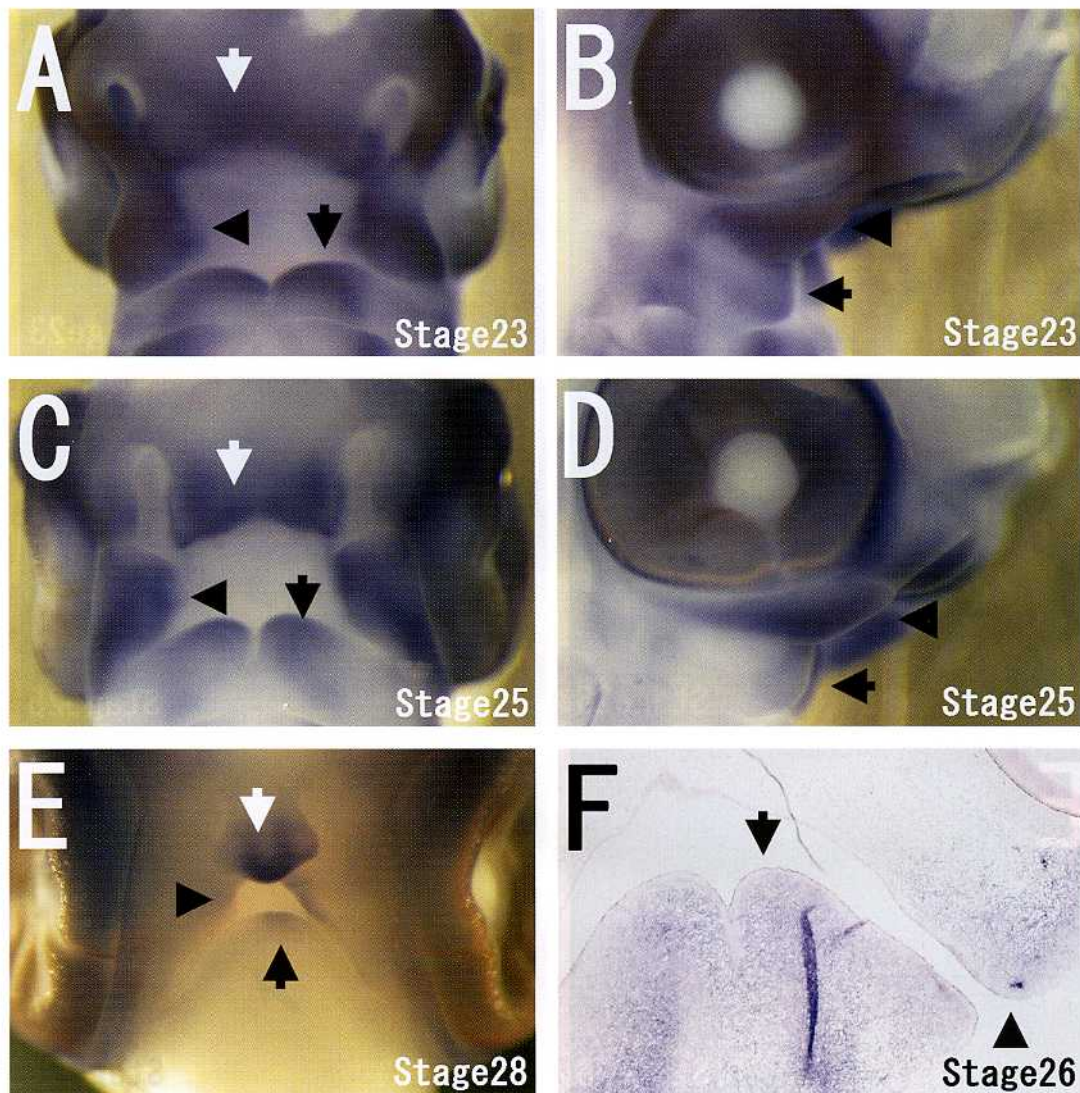
Stage 23では、上顎隆起と下顎隆起の近接部および上顎隆起と外側鼻隆起の近接部で強く発現している。また、眼胞周囲にも強く発現している(Fig. 3A, B)。

Stage 25ではstage 23と同様に、上顎隆起と下顎隆起の近接部および上顎隆起と外側鼻隆起の近接部で、より局在化して発現している。また、上顎隆起と内側鼻隆起の近接部にも発現している(Fig. 3C, D)。Stage 26胚の上顎隆起および下顎隆起を含む切片より、Wnt-11は、上顎隆起と下顎隆起の近接部の間充織に強く発現している。一方、上皮(外胚葉)での発現は、みられない(Fig. 3F)。

さらに発生が進行しstage 28になると、顔面隆起での発現は、消失している(Fig. E)。

### 3. Wnt-3a および Wnt-10a

両者とも、顎顔面形態形成過程を通して上皮(外胚葉)で発現がみられるが、各々の顔面隆



**Fig. 2.** Expression of the Wnt-5a gene in the facial prominence of the chicken embryo.

(A, B) Frontal view (A) and side view (B) of a day 4 (stage 23) embryo. (C, D) Frontal view (C) and side view (D) of a day 5 (stage 25) embryo. (E) Frontal view of a day 6 (stage 28) embryo. (F) Frontal section of a day 5 (stage 26) embryo after Nuclear fast red staining. ( $\times 20$ ). (A-D) Wnt-5a is expressed in the frontonasal prominences (white arrows), the maxillary prominences (black arrows) and the mandibular prominences (black arrowheads) of embryos at stages 23 to 25. (E) Wnt-5a expression decreases in the distal region of the maxillary and mandibular prominences at stage 28 embryo, while strong expression continues at the tip of the frontonasal prominence. (F) Wnt-5a is expressed in mesenchymal cells of the maxillary and mandibular prominences, but not in the surface ectoderm.

起において強い局所的な発現はない。両者を比較すると、Wnt-3a に比べ Wnt10a の方がやや強い発現シグナルがみられた (Fig. 4A-D)。

## 考 察

Wnt ファミリーは分子量約 4 万の糖タンパク質であり、ショウジョウバエのセグメントポラリティ遺伝子群の 1 つ wingless と、マウス

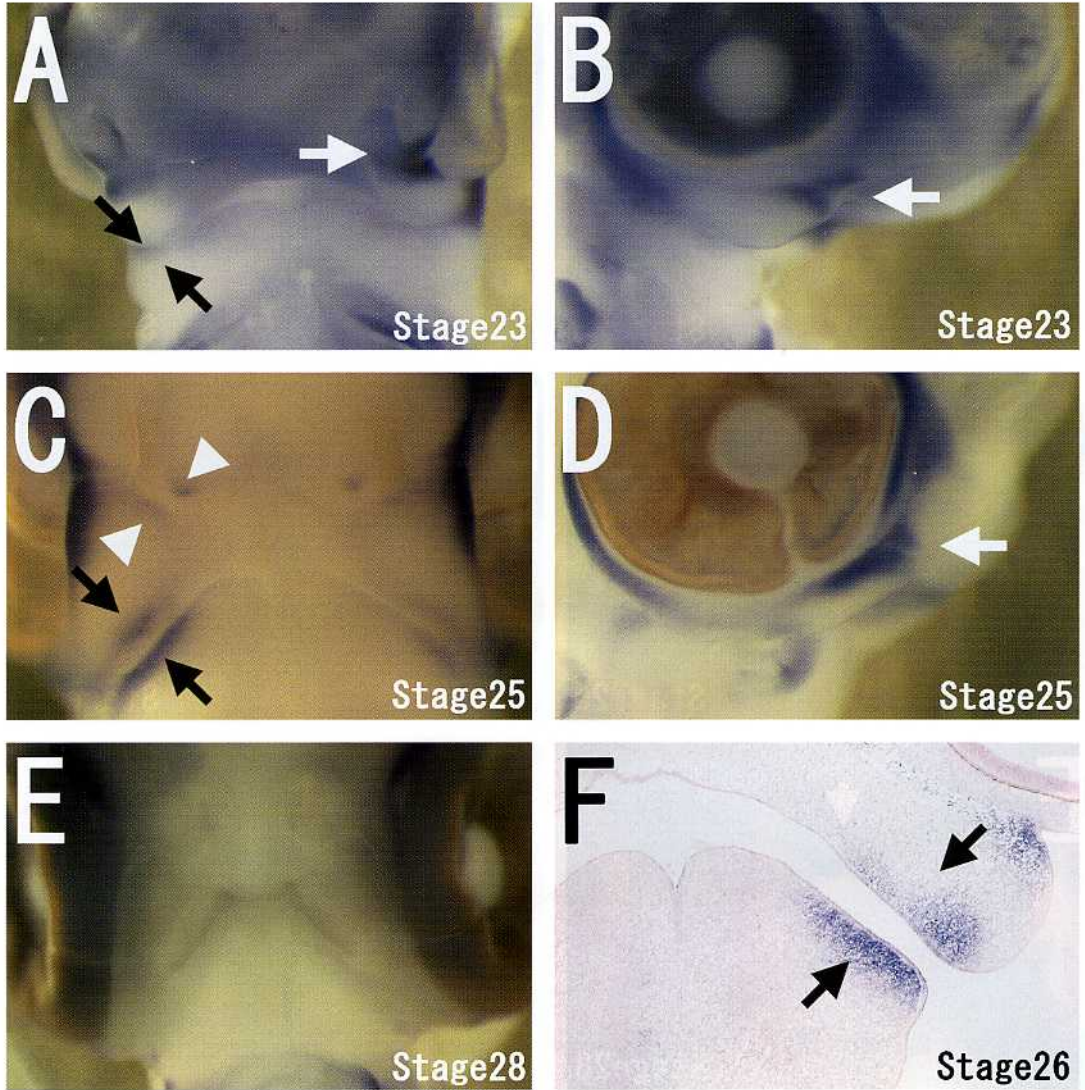


Fig. 3. Expression of the Wnt-11 gene in the facial prominence of the chicken embryo.

(A, B) Frontal view (A) and side view (B) of a day 4 (stage 23) embryo. (C, D) Frontal view (C) and side view (D) of a day 5 (stage 25) embryo. (E) Frontal view of a day 6 (stage 28) embryo. (F) Frontal section of a day 5 (stage 26) embryo after Nuclear fast red staining. ( $\times 20$ ). (A-D) Wnt-11 is expressed at stages 23 to 25 in the restricted region where the maxillary prominence and the mandibular prominence become contacted (black arrows), in the region where the maxillary prominence and the lateral nasal prominence become contacted (white arrows), and in the region where the maxillary prominence and the medial nasal prominence become contacted (white arrowheads). Wnt-11 is expressed in the mesenchymal region surrounding the optic vesicle. (E) Expression becomes faint during orofacial development. (F) Expression of Wnt-11 is observed in the mesenchymal region where the maxillary and mandibular prominences become contacted (black arrows).

乳癌で同定された癌遺伝子 *int-1* との構造が類似していたことに基づいて、総称して Wnt と呼ばれるようになった。現在、脊椎動物では 19 種のメンバーが知られており、さまざまな局面で時間的、位置的に特異的な発現を示し、形態

形成の誘導因子、細胞の極性決定因子、増殖分化の調節因子として機能している<sup>7), 8)</sup>。

Wnt-5a は四肢が成長していく際、肢芽先端の間充織の増殖と伸長に関与すると考えられている<sup>21), 22)</sup>。ここで観察された結果からも Wnt

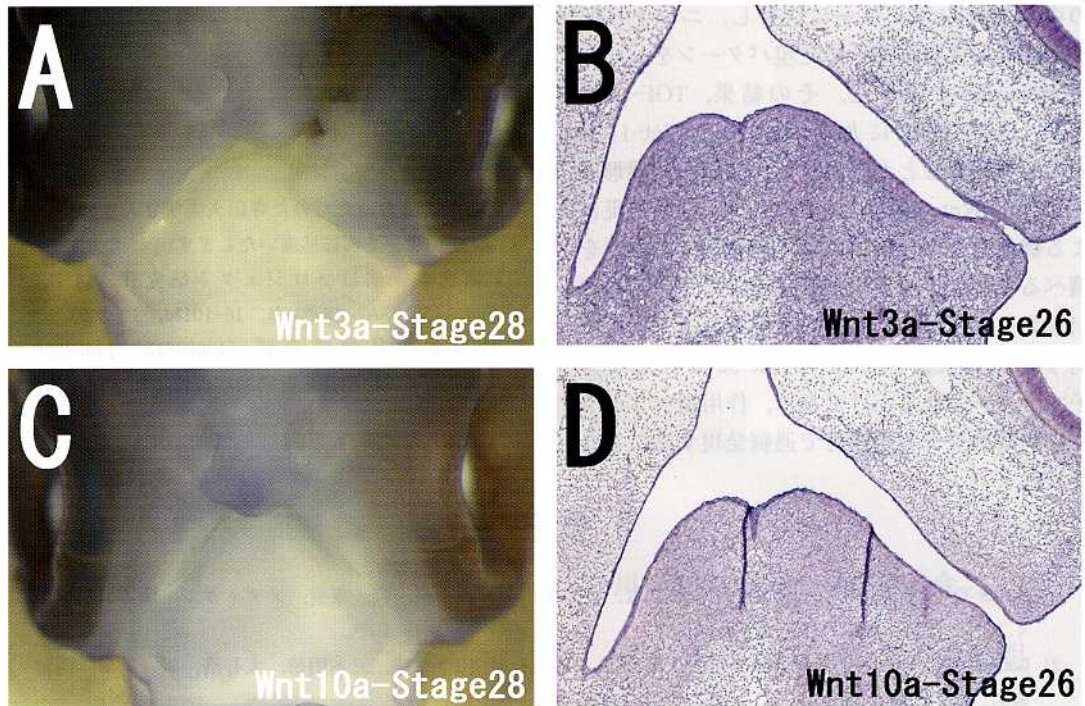


Fig. 4. Expression of Wnt-3a and Wnt-10a in the facial prominence of the chicken embryo.

(A, B) Wnt-3a. (C, D) Wnt-10a. (A) Frontal view of a day 6 (stage 28) embryo. (B) Frontal section of a day 5 (stage 26) embryo after Nuclear fast red staining. ( $\times 20$ ). (C) Frontal view of a day 6 (stage 28) embryo. (D) Frontal section of a day 5 (stage 26) embryo after Nuclear fast red staining. ( $\times 20$ ). (A, C) Wnt-3a and Wnt-10a are weakly expressed in the ectoderm of the maxillary and frontonasal prominence. (B, D) Expression of Wnt-3a and Wnt-10a are detected in the ectoderm of the mandibular prominence.

-5a は stage が進むとともに、顔面隆起の遠位側で強い発現があり、同部位の間充織における増殖と伸長に関与すると考えられる。しかし、Wnt-5a は非  $\beta$  カテニン経路の  $\text{Ca}^{2+}$  経路を主として作動することが知られており<sup>12)</sup>、細胞分化には関与するが直接の細胞増殖シグナルとは考えられていない。四肢の形成において、Wnt-5a は軟骨分化、筋肉分化に関与していることが調べられており<sup>9), 10), 21)</sup>、また Wnt-5a のノックアウトマウスでは四肢の先端部への伸長が阻害されることが知られている<sup>22)</sup>。従って、Wnt-5a の顎顔面の形成過程での発現パターンから、ここでも四肢の場合と同様に、顎の軟骨分化や筋肉分化に関与している可能性が考えられる。

Wnt-11 は初期胚において非  $\beta$  カテニン経路の 1 つである JNK 経路を介して平面内細胞極性の決定や細胞分化に関与していることが知ら

れている<sup>11), 12)</sup>。また、上顎隆起と内側鼻隆起の癒合には、TGF- $\beta$  や SHH, FGF, BMP のシグナルが関与し、これらの因子は JNK 経路とのシグナルクロストークが知られている<sup>11)</sup>。ここで得られた結果では Wnt-11 が上顎隆起と下顎隆起の近接部および上顎隆起と外側鼻隆起の近接部で強く発現していた。従って、癒合に関与する上記シグナルに加え、Wnt-11 も上顎隆起下顎隆起間と上顎隆起外側鼻隆起間など、それぞれの顔面隆起の癒合に関与し、単なる隆起の伸長から顔面の形態形成に至る過程に関与する因子の一つであると考えられる。

#### おわりに

口唇裂口蓋裂の分子メカニズムを調べる一環として、形態形成に関わる分泌性タンパク質

の中で Wnt ファミリーに注目し、ニワトリ胚の顎顔面形成過程でその発現パターンを *in situ* hybridization で調べた。その結果、TGF- $\beta$ 、SHH、FGF、BMP に加え Wnt-5a や Wnt-11 も関与していることが判明した。顎顔面形態形成における Wnt の役割については、過剰発現による機能亢進や欠損型による機能低下の影響を調べるなど、更なる解析が必要である。口唇裂口蓋裂をはじめ、顔面裂の分子メカニズムを解明するために、Wnt-11 や Wnt-5a は有効な分子マーカーとなるだけでなく、作用型ペプチドや抑制型ペプチドを鰓弓で過剰発現することな

どで影響を調べ、機能を明らかにすることが今後の課題となる。

## 謝 辞

実験にご協力いただいた寺田久美子さん、内田恵美さん、磯田恵子さんに感謝いたします。

本研究の一部はプロジェクト研究費 (14-101, 14-206, 15-103A, 15-216B, 16-101M, 16-209T)、文部科学省の科学研究費 (13680813, 14034260, 16027251)、両備禮園記念財団助成金によって行われた。

## 参 考 文 献

- 1) Sadler TW: ラングマン人体発生学. 第8版. 安田峯生, 野沢十蔵, 訳. 東京, メディカル・サイエンス・インターナショナル, 319-353, 2001
- 2) Larsen WJ: ラーセン最新人体発生学. 第2版. 相川英三, 山下和雄, 三木明德, 大谷浩, 訳. 新潟, 西村書店, 315-338, 1999
- 3) 森口隆彦, 中川皓文, 森 寿子: 口唇裂口蓋裂の総合治療—成長に応じた諸問題の解決—. 東京, 克誠堂出版, 18-27, 1995
- 4) Francis-West P, Ladhur R, Barlow A, Graveson A: Signalling interactions during facial development. *Mech Dev* 75: 3-28, 1998
- 5) Lee SH, Bedard O, Buchtova M, Fu K, Richman JM: A new origin for the maxillary jaw. *Dev Biol* 276: 207-224, 2004
- 6) Stanier P, Moore GE: Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic cleft. *Hum Mol Genet* 13: R73-R81, 2004
- 7) 濃野 勉: Wnt ファミリーと形態形成. *現代医療* 32: 1912-1921, 2000
- 8) 濃野 勉: 骨形成にかかわる Wnt シグナリング. *実験医学* 20: 2469-2476, 2002
- 9) Church V, Nohno T, Linker C, Marcelle C, Francis-West P: Wnt regulation of chondrocyte differentiation. *J Cell Sci* 115: 4809-4818, 2002
- 10) Anakwe K, Robson L, Hadley J, Buxton P, Church V, Allen S, Hartmann C, Harfe B, Nohno T, Brown AM, Evans DJ, Francis-West P: Wnt signalling regulates myogenic differentiation in the developing avian wing. *Development* 130: 3503-3514, 2003
- 11) 笹岡俊輔, 宇田川潔, 濃野 勉: Wnt シグナリング. *生体の科学* 55: 464-465, 2004
- 12) 中村 勉, 秋山 徹: Wnt シグナルネットワークの多彩な生理機能. *生化学* 77: 5-19, 2005
- 13) Narita T, Sasaoka S, Udagawa K, Ohyama T, Wada, N, Nishimatsu S, Takada S, Nohno T: Wnt10a is involved in AER formation during chick limb development. *Dev Dyn* 233: 282-287, 2005
- 14) Kengaku M, Capdevila J, Rodriguez-Esteban C, De La Pena J, Johnson RL, Izpisua-Belmonte J-C, Tabin CJ: Distinct WNT pathways regulating AER formation and dorsoventral polarity in the chick limb bud. *Science* 280: 1274-1277, 1998
- 15) Tanda N, Ohuchi H, Yoshioka H, Noji S, Nohno T: A chicken Wnt gene, Wnt-11, is involved in dermal development. *Biochem Biophys Res Commun* 211: 123-129, 1995



- 16) Logan CY, Nusse R : The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20 : 781 – 810, 2004
- 17) Nelson WJ, Nusse R : Convergence of Wnt,  $\beta$ -catenin, and Cadherin pathways. *Science* 305 : 1483 – 1487, 2004
- 18) MacDonald ME, Abbott UK, Richman JM : Upper beak truncation in chicken embryos with the cleft primary palate mutation is due to an epithelial defect in the frontonasal mass. *Dev Dyn* 230 : 335 – 349, 2004
- 19) McGonnell IM, Clarke JD, Tickle C : Fate map of the developing chick face : analysis of expansion of facial primordia and establishment of the primary palate. *Dev Dyn* 212 : 102 – 118, 1998
- 20) Hamburger V, Hamilton H : A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morph* 88 : 49 – 92, 1951
- 21) Kawakami Y, Wada N, Nishimatsu S, Ishikawa T, Noji S, Nohno T : Involvement of Wnt-5a in chondrogenic pattern formation in the chick limb bud. *Dev Growth Differ* 41 : 29 – 40, 1999
- 22) Yamaguchi TP, Bradley A, McMahon AP, Jones S : A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development* 126 : 1211 – 1223, 1999