

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

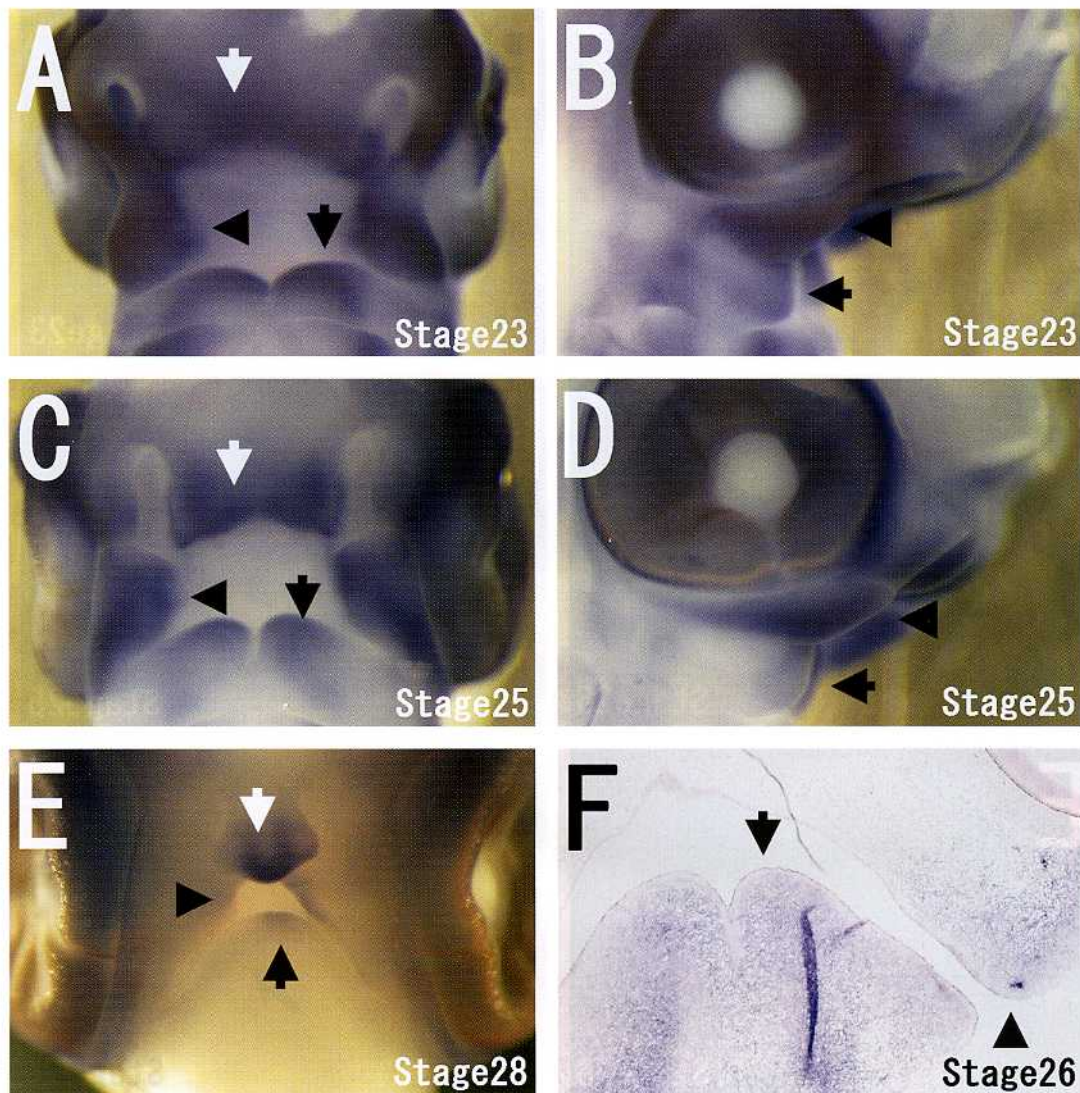


Fig. 2. Expression of the Wnt-5a gene in the facial prominence of the chicken embryo.

(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

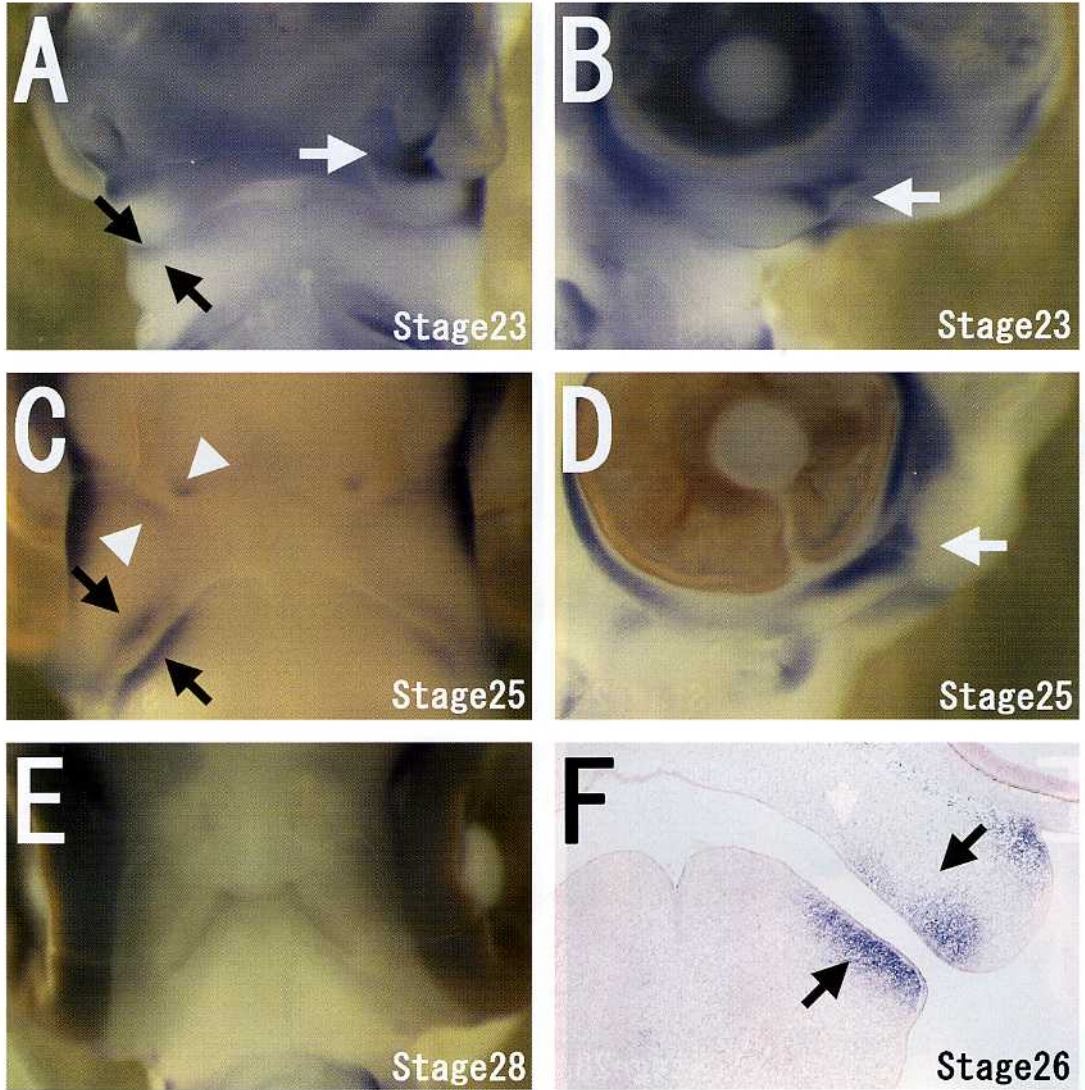


Fig. 3. Expression of the Wnt-11 gene in the facial prominence of the chicken embryo.

(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^{7), 8)}。

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^{21), 22)}。ここで観察された結果からも Wnt

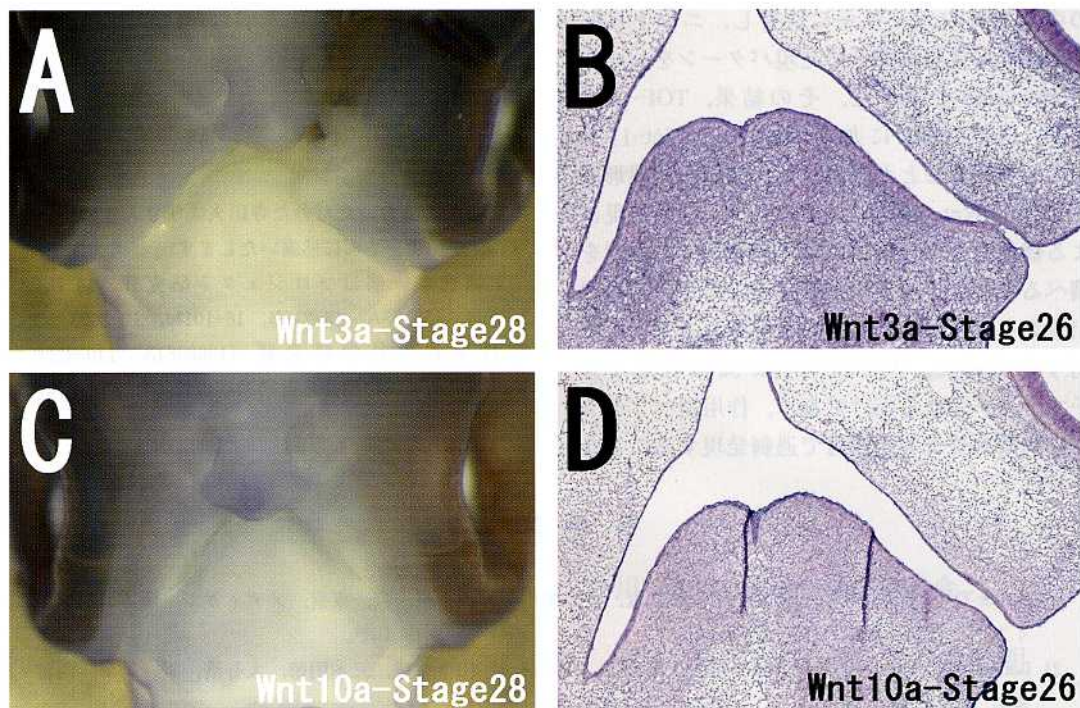


Fig. 4. Expression of Wnt-3a and Wnt-10a in the facial prominence of the chicken embryo.

(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 β カテニン経路の Ca^{2+} 経路を主として作動することが知られており¹²⁾、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^{9), 10), 21)}、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²²⁾。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 β 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^{11), 12)}。また、上顎隆起と内側鼻隆起の癒合には、TGF- β 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¹¹⁾。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- β , 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, β -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