

## 顎顔面形態形成に関わる FGF-8の解析

山本 康弘

線維芽細胞増殖因子 (FGF) の一つである FGF-8は後脳や四肢の発生過程において重要な役割を演じている。本研究では、発生時の顎顔面の形態形成過程で発現している分泌性タンパク質 FGF-8に注目し、その発現パターンと機能をニワトリ胚で調べた。正常胚において FGF-8は鼻窩辺縁と上顎隆起の下顎隆起側縁に発現していた。また、胚発生の途中の段階で、レトロウイルスベクターを介して FGF-8を片側上顎隆起に過剰持続発現させた。その結果、これらの個体には FGF-8の過剰発現した側へ上顎が湾曲する表現型が生じた。これらの個体では骨組織、特に palatine bone, maxillary bone, jugal の欠損または低形成をきたしていたが、軟骨には欠損や低形成は起こらず、逆に眼窩下方上顎部で異所性の軟骨組織が形成されていた。これらの硬組織の変化に対し、二次口蓋の裂幅は変わらず、FGF-8は軟部組織の形成には影響していなかった。これらの結果から、FGF-8は顎顔面形態形成で重要な機能を持っており、過剰な FGF-8は発生過程の骨形成に対しては抑制的に、軟骨形成に対しては促進的に働くことが判明した。(平成17年10月7日受理)

### Role of FGF-8 in Bone Formation During Orofacial Development of the Chicken Embryo

Yasuhiro YAMAMOTO

FGF-8, a member of the fibroblast growth factor (FGF) family, plays a key role in development of the hindbrain and limbs, and is also expressed in the developing face. The expression pattern of FGF-8 and its function were examined in the chick embryo. FGF-8 is expressed in epithelial cells of the nasal fossa, and of the side edges of the lower and upper jaws in normal embryos. When FGF-8 was misexpressed with the retrovirus vector at stage 20 in the maxillary prominence, the upper jaw curved to the side of misexpression without change in facial width. Loss or hypoplasia of palatine bone, maxillary bone, and jugal was frequently observed. Loss or hypoplasia of cartilage elements was not observed, but ectopic cartilage did form in the upper jaw. FGF-8 has no effect on soft tissue organization. These results suggest that FGF-8 plays a key role in craniofacial morphogenesis, and that excessive FGF-8 expression promotes cartilage differentiation, which in turn, results in suppression of bone formation during orofacial development. (Accepted on October 7, 2005) *Kawasaki Igakkaishi* 31(3):151-159, 2005

**Key Words** ① FGF-8 ② Orofacial development  
③ Misexpression ④ Bone formation







0% (5/5) であった (Fig. 4D, E).

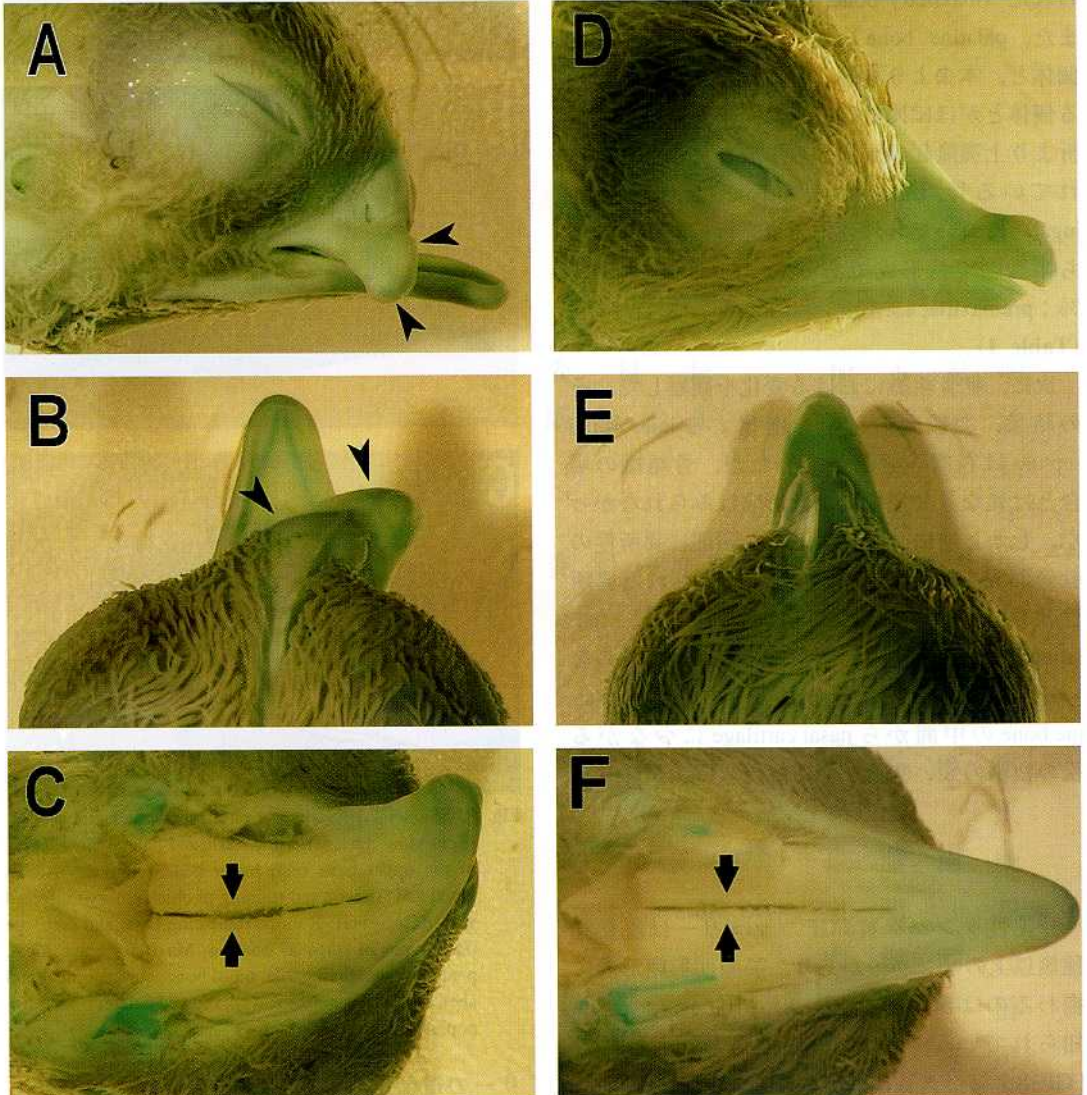
したがって, stage 37における上顎の右方向への湾曲は右上顎隆起全体で異所的に拡大発現させた FGF-8によりもたらされたものと考えられる.

また, 生じた表現型の下顎を切除し二次口蓋

を観察した. 裂幅は対象 (Fig. 4F) と変わらず, 口蓋突起は形成されている (Fig. 4C).

3. FGF-8の過剰発現による骨および軟骨形態の変化

FGF-8を上顎隆起に過剰発現させた胚で stage 37における顎顔面を構成する骨格の形態



**Fig. 4.** The morphological effects of FGF-8 misexpression during chick orofacial development.

(A, B, C) FGF-8-misexpressed embryos fixed at stage 37. Maxilla (upper beak) turned to the right where RCAS-FGF-8 was infected (arrowheads). Lateral palatine process is formed normally (arrows). (A) External view. (B) Superior view. (C) Palatal view of the upper beak with lower beak removal.

(D, E, F) Control embryos fixed at stage 37 after misexpression of RCAS-BPAP instead of RCAS-FGF-8. Embryos showed normal symmetric phenotype without any change in external facial structure. (D) External view. (E) Superior view. (F) Palatal view of the upper beak with lower beak removal.



を調べた (Fig. 5A, B). すでに系譜解析の結果から, 上顎隆起からは maxillary bone や palatine bone, jugal が形成されることが報告されている<sup>19), 20)</sup>. FGF-8の過剰発現により, これらの上顎隆起に由来する骨組織の低形成が高頻度で観察された. 特に maxillary bone や jugal では骨そのものが欠損した個体が多くみられた (maxillary bone, 70.8%; jugal, 54.2%). また, palatine bone については全てを欠損した個体と, 本来よりも短い骨が近位に留まっている個体とがほぼ同数観察された. 一方, 系譜解析より上顎隆起の周辺から形成されると考えられている骨 (nasal bone, premaxilla, quadratojugal) についても, 過剰発現を行った個体のうち半数弱で低形成であった (nasal bone, 37.5%; premaxilla, 45.8%; quadratojugal, 41.7%) (Table 1).

次に, 軟骨組織における変化を観察した. その結果, 顎顔面の正中を構築する interorbital septum は右側へ湾曲していたが, 骨組織の場合とは異なり欠損を含む低形成はみられなかった. しかし逆に, 右眼窩下方上顎部に異所性の軟骨形成を認めた (66.7%). 形成された異所性軟骨は大きさや形態には均一性がなく, palatine bone の中間に周囲軟骨組織と連絡性のない小豆様の軟骨が認められるものから, palatine bone の中間から nasal cartilage につながる松の枝様の太い軟骨まであった (Fig. 5C).

## 考 察

分泌性タンパク質 FGF ファミリーは現在20種類以上のメンバーがあり, 顎顔面形態形成に携わるのは FGF-2, -3, -8, -10, -17, -18 が知られている<sup>6), 13)</sup>. 上皮性細胞で分泌されて FGF-8 タンパク質は間充織細胞で発現している数種の受容体 FGFR と結合し, MAP kinase 経路などで細胞増殖および分化, 遊走に関与し, 形態形成や器官形成に重要な役割を演じている. 上顎隆起基部において, 上皮組織で発現した FGF-8 は入れ子状の発現をする DLX ファミ

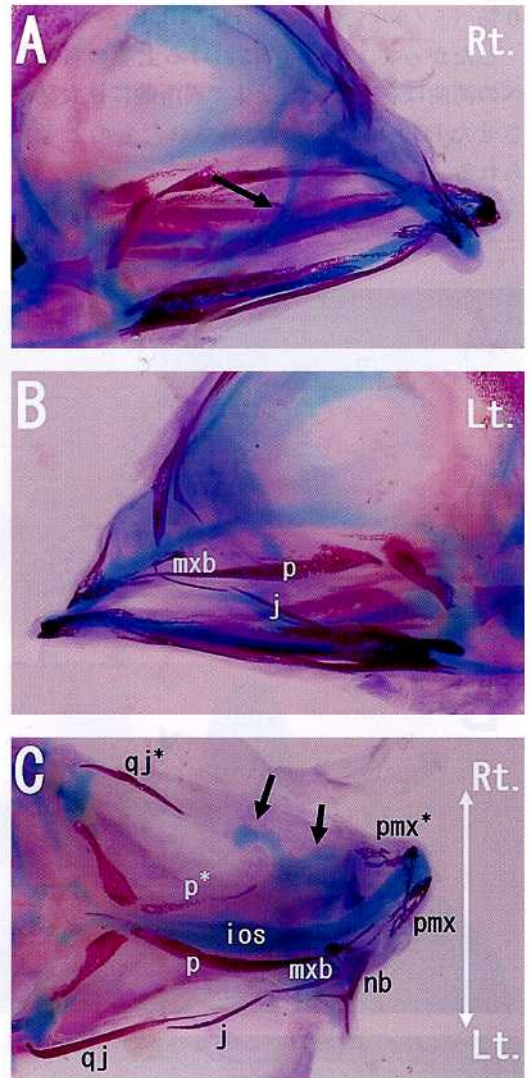


Fig. 5. Skeletal derivatives of malformed chick embryo. Right view (A), left view (B), and palatal view (C) of the upper beak with lower beak removal. Alcian green and Alizarin red staining of chick embryo infected with RCAS-FGF-8 virus, indicating bone and cartilage phenotypes of stage 37 embryo. Maxillary bone, jugal, palatine bone, premaxilla, nasal bone, quadratojugal and aberrant cartilage (arrows) showed defect or hypoplasia after RCAS-FGF-8.

リーの遺伝子のうち DLX-1 の発現を誘導することにより最終的な顎の構造を決定していると考えられている<sup>21), 22)</sup>.

著者は FGF-8 の発現の顎顔面形態形成の顎の構造決定における機能的役割を明らかにするため, RCAS-FGF-8 ウイルスを局所的に感染さ



**Table 1.** Summary of the abnormal orofacial bones in the upper beak formed after FGF-8 misexpression in the right maxillary prominence

骨形態	palatine bone	nasal bone	premaxilla	maxillary bone	jugal	quadratojugal
欠損	37.5% (9/24)	4.2% (1/24)	20.8% (5/24)	70.8% (17/24)	54.2% (13/24)	0% (0/24)
低形成	45.8% (11/24)	33.3% (8/24)	25.0% (6/24)	12.5% (3/24)	20.8% (5/24)	41.7% (10/24)
正常	16.7% (4/24)	62.5% (15/24)	54.2% (13/24)	16.7% (4/24)	25.0% (6/24)	58.3% (14/24)

せる方法により、FGF-8を持続的に過剰発現させその発現パターンを可視化した。この方法で、上顎隆起上皮における特異的発現領域を間充織にまで拡大させることが可能であった。微量注入法は上皮組織における発現に留まらず、正常では発現していない間充織領域にも過剰に発現するので、その遺伝子発現の影響を明らかにするうえで極めて有用であった。

今回の実験結果から、RCAS-FGF-8を上顎隆起に感染させて48時間後では上顎隆起の形態には変化がなく、さらに口蓋突起の形態も正常であった。一方発生が進んだときの上顎隆起に由来する maxillary bone や jugal, palatine bone に不完全な欠損を含む骨の低形成をきたすことが明らかになった。これらの結果は、間充織での FGF-8の過剰発現は上顎隆起の形態には変化をもたらさないが、上顎隆起の細胞分化、主に骨形成に影響し、FGF-8は顎顔面の骨形成において抑制的に働くことを示唆している。

一方、軟骨組織の interorbital septum の基本形態においては特別な変化は認められず、膜性骨の欠損を含む低形成に基づく支持組織欠如の結果、二次的に湾曲したものと考えられる。しかし FGF-8過剰発現側で低形成をきたした palatine bone の中間から nasal cartilage につながる部位で明らかな軟骨組織の形成が認められた。発生学的に形成された軟骨は顎顔面の骨組織は膜性骨化であることから、骨の軟骨化ではなく異所性であるものと考えられる。異所性の軟骨発生母地に関しては stage 20の上顎隆起間充織に拡大発現した FGF-8により形成されたことから、同部位の未分化な間充織細胞に由来するものと考えられる。以上のことから、FGF-8

は胚発生過程では軟骨組織の形成、軟骨分化に対して促進的に働くものと考えられる。

現在までの遺伝的疾患の解析から FGFR の機能変異により骨格系の異常が起こることが報告されている<sup>1),23)</sup>。このうち、FGFR-1もしくは FGFR-2の活性型変異はいくつかの頭蓋縫合早期癒合症の原因となる<sup>23)</sup>。Apert 症候群のモデル動物として作製された FGFR 2の変異マウス (FGFR<sup>+S252W</sup>) では、骨組織の低形成や発育遅滞が観察される一方で、頭部での異所性軟骨の形成が報告されている<sup>24)</sup>。この遺伝子改変マウスは FGFR 2の活性型変異であり、間充織細胞に過剰な FGF シグナルが入った結果、骨や軟骨分化に異常が生じたと考えられている。今回の実験結果は、過剰な FGF-8により骨形成が抑制され、一方で軟骨形成が促進されており、この遺伝子改変マウスの結果とよく一致するといえる。

## おわりに

本研究では、発生時の顎顔面形態形成における FGF-8の役割を解明するために、ニワトリ胚の発生の途中の段階で、FGF-8を上顎隆起で局所的に過剰持続発現させ次の結果を得た。

1. 片側上顎隆起への FGF-8の過剰持続発現は骨組織には欠損または低形成を誘導し同側への上顎湾曲が認められる表現型を生じた。
2. 軟骨分化に対しては片側上顎隆起への FGF-8の過剰持続発現は間充織中に軟骨組織の異所的な発生を誘導した。
3. 軟骨組織に対しては FGF-8の影響を認められなかった。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、始終にわたり御指導を賜りました森口隆彦教授、濃野勉助教授、本間隆義助教授、実験手技について直接ご指導を頂きました和田直之博

士、および実験を援助していただきました寺田久美子さん、内田恵美さん、組織電子顕微鏡センターの磯田恵子さんに深謝いたします。また、本研究の一部はプロジェクト研究費(14-101, 14-206, 15-103A, 15-216 B, 16-209T)によって行われた。

## 参 考 文 献

- 1) Ornitz DM, Marie PJ : FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Gene Dev* 16 : 1446-1465, 2002
- 2) 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, 1995 : 18-27
- 3) 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, 1999 : 315-338
- 4) 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, 2001 : 319-353
- 5) 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
- 6) Francis-West P, Ladher R, Barlow A, et al. : Signalling interactions during facial development. *Mech Dev* 75 : 3-28, 1998
- 7) 野地澄晴, 上野直人 : 新 形作りの分子メカニズム. 東京, 羊土社, 1999
- 8) Helms JA, Cordero D, Tapadia MD : New insights into craniofacial morphogenesis. *Development* 132 : 851-861, 2004
- 9) Murray JC, Schutte BC : Cleft palate : players, pathways, and pursuits. *J Clin Invest* 113 : 1676-1678, 2004
- 10) Ohuchi H, Yoshioka H, Tanaka A, et al. : Involvement of androgen-induced growth factor (FGF-8) gene in mouse embryogenesis and morphogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 204 : 882-888, 1994
- 11) Crossley PH, Martin GR : The mouse FGF8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* 121 : 438-451, 1995
- 12) Mahmood R, Bresnick J, Hornbruch A, et al. : A role for FGF-8 in the initiation and maintenance of vertebrate limb bud outgrowth. *Curr Biol* 5 : 797-806, 1995
- 13) Bachler M, Neubuser A : Expression of members of the FGF family and their receptors during midfacial development. *Mech Dev* 100 : 313-316, 2001
- 14) Hu D, Marcucio RS, Helms JA : A zone of frontonasal ectoderm regulates patterning and growth in the face. *Development* 130 : 1749-1758, 2003
- 15) Abzhanov A, Tabin JC : Shh and FGF8 act synergistically to drive cartilage outgrowth during cranial development. *Dev Biol* 73 : 134-148, 2004
- 16) Trumpp A, Depew M, Rubenstein JLR, et al. : Cre-mediated gene inactivation demonstrates that FGF8 is required for cell survival and patterning of the first branchial arch. *Gene Dev* 13 : 3136-3148, 1999
- 17) Hamburger V, Hamilton H : A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morph* 88 : 49-92, 1951
- 18) 山本康弘, 高田温行, 森口隆彦, 他 : 顎顔面形態形成に関与する Wnt ファミリーの発現パターン. 川崎医学会誌, 印刷中, 2005
- 19) McGonnell IM, Clarke JD, Tickle C : Fate map of the chick face : analysis of expansion of facial primordia and es-



- establishment of the primary palate. *Dev Dyn* 212 : 102 – 118, 1998
- 20) Lee SH, Bedard O, Buchtova M, et al. : A new origin for the maxillary jaw. *Dev Biol* 276 : 207 – 222, 2004
  - 21) Depew MJ, Lufkin T, Rubenstein JL : Specification of jaw subdivisions by Dlx genes. *Science* 298 : 381 – 385, 2002
  - 22) Park BK, Sperber SM, Choudhury A, et al. : Intergenic enhancers with distinct activities regulate Dlx gene expression in the mesenchyme of the branchial arches. *Dev Biol* 268 : 532 – 545, 2004
  - 23) Wilkie AOM, Oldridge M, Tang Z, et al. : Craniosynostosis and related limb anomalies. In *The Molecular Basis of Skeletogenesis*. New York, Wiley & Sons Inc. 2001, pp 122 – 143
  - 24) Wang Y, Xiao R, Yang F, et al. : Abnormalities in cartilage and bone development in the Apert syndrome *FGFR<sup>+</sup>/S252W* mouse. *Development* 132 : 3537 – 3548, 2005