原

著

マウス顔面発生過程における *c-myc*, *N-myc* 遺伝子の発現

山 田 俊 平

東京医科歯科大学歯学部顎口腔総合研究施設顎顔面発生機構研究部門（指導：江藤一洋）

（1989年12月20日 受付）

Expression of *c-myc* and *N-myc* in Mouse Embryos During Craniofacial Development

Shumpei Yamada

Section of Craniofacial Development and Anomalies, Institute of Stomatognathic Science,
Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

(Director : Prof. Kazuhiro Eto)

To analyze the role of *c-* and *N-myc* on the craniofacial development during the midgestation of mouse embryo, the tempospatial expression in the mandible and the tooth germ was examined by *in situ* hybridization.

In the mandible, *c-myc* RNA was strongly expressed in the mesenchymal condensation surrounding the ossification center in which a high-level expression of osteopontin was detected with the basal-level expression of *c-myc* in the corresponding area. In tooth germs, the strong expression of *c-myc* was detected uniformly in the epithelia of bud stage and then gradually localized in the inner enamel epithelia from cap to bell stages. In contrast, the expression of *N-myc* was weakly detected in the undifferentiated mesenchymal cells of the dental papilla but was not detected in the regions where *c-myc* was highly expressed.

To study the correlation of *myc* expression and growth activity, the incorporation of BrdU was examined immunohistochemically. The results revealed that levels of BrdU incorporation were similar between the regions where *c-myc* was highly expressed and the regions where basal-levels of *c-* and *N-myc* expression were detected, suggesting that levels of *myc* expression are not necessarily correlated to the growth activity. These results indicated that *c-* and *N-myc* genes are differentially expressed and further raise the possibility that *c-* and *N-myc* may play a major role in differentiation rather than proliferation in the early stage of these organogenesis.

I. 緒 言

ここ10数年間の分子生物学の進展により、細胞の増殖、分化を制御する機構の解明が進んでいる。RNA 腫瘍ウイルスのもつ発癌遺伝子（viral

oncogene, *v-onc*）はすでに20種以上のものが同定されているが¹⁾、1976年 Stéhelin らの報告²⁾以来、正常細胞のゲノム上には発癌遺伝子と類似の塩基配列を有する遺伝子；癌原遺伝子（cellular oncogene, *c-onc*）が存在することが明らかとなっ

た。さらにこれらの細胞側の癌原遺伝子は脊椎動物に広く分布し、進化の過程できわめてよく保存されていることが分かってきた³⁾。このことから癌原遺伝子は生物にとって基本的な細胞の増殖、分化、維持に重要な役割を果たしていると考えられている^{1,2)}。種々の癌原遺伝子は増殖、分化の活発な胎仔発生過程でも組織特異的、時期特異的に発現されていることが報告されているが^{1,3,4)}、その生理的役割についてはいまだ不明の点が多い。

異なる機能、構造をもつ癌原遺伝子の中で、*c-myc* はその産物が核内に存在し、多くの種類の癌で増幅、レトロウイルスの挿入、染色体転座による活性化が知られている⁵⁾。その発現は数々の増殖因子により上昇し、増殖が停止し分化すると減少する⁶⁻¹⁰⁾ことが報告されていることから、細胞の増殖制御に関与すると考えられている。

同じ *myc* family に属する *N-myc* は神経芽細胞腫細胞株において増幅している、*c-myc* と一部相同な塩基配列をもつ遺伝子としてクローニングされた^{11,12)}。神経芽細胞腫の他、網膜芽細胞腫¹³⁾、肺小細胞癌¹⁴⁾などの癌細胞での増幅、発現の上昇が報告されている。また *N-myc* の高い発現がみられる神経芽細胞腫や Wilm 腫瘍の細胞株では *c-myc* の発現が低いか、あるいは検出されないことが報告されている^{15,16)}。*N-myc* は胎仔発生過程でも発現し、特に発生初期、未分化な細胞でよく発現している¹⁷⁾。*c-myc* と同じく *N-myc* の産物も細胞の増殖に関与する重要な機能をもつと推定されているが、一方で *c-myc* とは異なり別の組織あるいは異なる時期で発現されていることが報告されている¹⁸⁾。

Slamon ら¹⁹⁾は、マウス正常発生過程における *c-myc* の mRNA の発現は、胎齢 7 日目から検出され、その発現量は胎齢 16 日目頃まで大きな変化はないが、胎齢 17~18 日にかけて急増すると報告している。ただしこれは、胎仔全体の *c-myc* の発現量をみたものであり、*in situ* hybridization (ISH) により個々の組織、器官レベルでみた最近の報告によると、内、中胚葉起源のさまざまな組

織で高い発現が時期特異的にみられるという²⁰⁾。

一方 *N-myc* について、Zimmerman ら¹⁸⁾はマウス新生仔の脳、腎臓において高い発現がみられることをノーザンハイブリダイゼーションでみている。また ISH によりマウスの脳、腎臓での *N-myc* の高い発現は、分化の初期段階にある細胞に限局していることが、Mugrauer らの最近の報告により明らかとなった²¹⁾。

以上のことから、*c-myc*、*N-myc* はダイナミックな形態変化のみられる顎顔面形成の場でも、特定の細胞や組織の増殖や分化におおの重要な役割を担っていることが推測される。

顎顔面は骨、軟骨、歯、筋肉、神経、脈管などの組織から構築され、発生過程で上皮、間葉組織の複雑な相互作用を介して形態形成が行われる²²⁻²⁴⁾。この複雑な形成過程を上皮、間葉組織の増殖、分化およびその相互作用という観点でとらえるとき、上記した *c-myc*、*N-myc* の発現がどのように関与しているかを解明することは、その発生機構を理解するうえで重要なことと思われる。

そこで本研究は、組織切片上で特定遺伝子の mRNA の発現を検出できる技術として最近注目されている、ISH 法を用いてマウス顎顔面の発生過程における *c-myc*、*N-myc* の発現を解析した。ISH 法はノーザンハイブリダイゼーションなどのフィルターハイブリダイゼーション法に比較して、必要量の RNA を得るのが困難な場合や、いくつかの細胞種が混在する組織を用いる場合に有効であり、さらに個々の細胞レベルで mRNA の発現状態を検討できる利点がある。よってマウス胎仔の、しかも発生途上にある顎顔面領域という微細な組織に適用するには非常に有効な手段と考えられる。

さらに、*c-myc*、*N-myc* の発現パターンが単に増殖活性を反映しているのか、その他に分化に関与する役割があるのかを抗 BrdU 抗体による免疫組織学的観察により比較検討し、顎顔面形成における *c-myc*、*N-myc* の役割について考察した。

II. 実験方法

1. *In situ* hybridization 法

1) 胎仔の摘出と固定

本研究は遺伝的に顎顔面形成異常のみられない C57BL/6 マウス胎仔を試料として使用した。膣栓確認日を妊娠 0 日として設定し、妊娠 12.5 日目から 17.5 日目にかけての母獣マウスを頸椎脱臼により屠殺した後、開腹して胎仔を摘出、頸部で切断し、頭部を 4% パラホルムアルデヒド (PFA)/PBS (130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄·2H₂O, pH 7.0) にて 4℃ で 4 時間～1 晩浸漬固定した。

2) 凍結包埋, 凍結切片作製

PBS で洗浄した後、0.5 M sucrose/PBS に 4℃・24 時間浸漬し、O. C. T. コンパウンド中に試料を沈め、急速に凍結させ包埋した (−80℃ 保存)。適宜クリオスタット (Leiz 社) にて厚さ 6 μm の頭部の凍結切片を作製した。スライドガラスは十分洗浄した後、250℃・4 時間乾熱し、0.25M 酢酸アンモニウムに 30 秒浸漬し、表面を 50 μg/ml ホリ L-リジン溶液でコーティングしたものをを用いた。なお薄切片はただちにドライヤーで乾燥させ、さらにホットプレート上で 50℃・1～3 分間、さらに室温で 1～2 時間ゆっくり乾燥させた。次に以下に示す各溶液に浸漬し、後固定、脱水操作を行った。4% PFA/PBS 20 分, 3×PBS 5 分, 1×PBS 5 分 (2 回), 30, 60, 80, 95, 100% エタノール 各 2 分 (すべて室温)。処理したスライドガラスは風乾した後、シリカゲルを入れた箱に −20℃ で保存した。

3) 切片の前処理

プローブの浸透性の増加およびプローブの非特異的結合の防止を目的として、以下の操作を室温で行った。PBS 5 分 (2 回), 1% Triton X-100/PBS 10 分, PBS 5 分 (2 回), 4% PFA/PBS 20 分, PBS 5 分 (2 回), 2 mg/ml グリシン/PBS 15 分, PBS 3 分, 0.1M トリエタノールアミン (pH 8.0) で 400 倍に希釈した無水酢酸 10 分, PBS 5 分, 30, 80, 95, 100% (2 回) エタノール各

2 分。風乾後すぐにハイブリダイゼーションのステップに供した。

4) プローブの作製

RNA 転写産物作製のため、SP6, T7 RNA ポリメラーゼに対するプロモーターを有する Gemini ベクター (Promega 社) を用いた。おのおのマウスの *c-myc*²⁵⁾ (exon 3 の *Pvu* II-*Hind* III 断片, 500 bp), *N-myc*²⁶⁾ (exon 3 の *Hinc* II-*Sca* I 断片, 412 bp) を pGEM-4 にサブクローンした後、高比活性の antisense および sense (negative control) の RNA プローブを作製するため、ベクターとインサートの間を適当な制限酵素で 1 カ所切断し、直線化した。なお、2ar (osteopontin) は、*Hind* III 断片 (984 bp) を pGEM-1, 2 にサブクローンしたものを野村により分与を受けた²⁷⁾。Hogan ら²⁸⁾, Melton ら²⁹⁾の方法により 0.5～1.0 μg/μl に調製した DNA テンプレート 1 μl に対し、Riboprobe Gemini System (Promega 社), [α -³⁵S] UTP, SP6 および T7 RNA ポリメラーゼを用いて、37～40℃・60 分間反応させ、上記各遺伝子の RNA 転写産物を antisense, sense 双方合成した。次に Cox らの方法³⁰⁾に準じ、プローブ RNA のアルカリ加水分解を行い、50～150 bp の長さに調整した。プローブのサイズをシークエンズゲル (8 M 尿素, 8% アクリルアミド) で分析し、プローブの適否をチェックしてから使用に供した。プローブはさらに最終濃度 50% ホルムアミド, 10 mM dithiothreitol (DTT) に約 10⁶ cpm/μl になるように希釈して、−80℃ で一時的に保存した。

5) ハイブリダイゼーション, 洗浄

プローブ溶液を 80℃・1 分間加温した後すぐ氷冷し、ハイブリダイゼーション溶液 [50% ホルムアミド, 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA, 600 mM NaCl, 10 mM DTT, 1×Denhardt's 溶液 (0.02% 牛血清アルブミン, 0.02% ポリビニールピロリドンおよび 0.02% フィコール), 0.25% SDS, 10% ホリエチレングリコール (PEG) 8000, 200 μg/ml *E. Coli* tRNA] と混合させた。プローブの最終濃度は 2×10⁴ cpm/μl に調整し

た。この混合液を切片上に載せ、シリコンコーティングしたカバーガラスで覆い、50%ホルムアミドで湿潤させたプラスチック製の箱に入れた。この状態で通常50℃・16時間ハイブリダイゼーションさせた。反応後、スライドガラスを50℃に加熱した5×SSC (1×SSC; 150 mM NaCl, 15 mM Na₃ citrate), 10 mM DTT 中に20分間入れ、カバーガラスを除去した。以下、50%ホルムアミド, 2×SSC, 50 mM DTT 50℃・1時間, 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA, 500 mM NaCl (TEN) 37℃・15分, 20 µg/ml RNaseA, 1 µg/ml RNaseT₁/TEN 37℃・1時間, TEN 37℃・15分, 2×SSC 50℃・20分 (2回), 0.1×SSC 50℃・20分 (2回) の順で洗浄を行った。その後300 mM 酢酸アンモニウムを含む30, 60, 80, 95%エタノールで各2分ずつ漬け、最後に100%エタノールに2分漬け脱水し、風乾した。

6) オートラジオグラフィ, 染色

43~45℃で溶解したKodak NTB-2 または NTB-3 エマルジョンを2%グリセリン溶液で1.5倍に希釈し、ディッピング法にてスライドガラスに塗布した。乾燥後シリカゲルを入れた感光暗箱に入れ4℃で露光した。露光期間は目的遺伝子の発現量に依存するが、通常4~21日とした。現像操作は、スライドガラスを室温に戻した後、1%クルタールアルデヒド 1分, 蒸留水 1分, Kodak D19 現像液 2分, 1%酢酸数秒, Konifix 5分, 蒸留水10分の順に浸した。さらに水洗し乾燥後、0.02%トルイジンブルーに2~3分浸して染色した。染色後水洗し、30, 60, 80, 95, 100%エタノールで30秒ずつ脱水後、キシレンに2分2回漬け、カバーガラスを置き封入した後、明視野および暗視野にて顕微鏡観察を行った。

2. 抗 BrdU 抗体による免疫組織学的観察

1) 試料の作製

ISH法で観察した各胎齢期のC57BL/6マウス母獣にthymidineのanalogueであるBromodeoxyuridine (BrdU)を20 mg/kg, 1回腹腔投与した。投与2時間後、胎仔頭部を70%エタノールにて4℃1晩浸漬固定した。通法どおりエタノール

ール系列にて脱水した後、パラフィン包埋を行った。ミクロトーム (Reichert-Jung 社) にて厚さ6 µmの連続切片を作製し、無コーティングのスライドガラスに貼付して、37℃で1晩乾燥させた。

2) 抗 BrdU 抗体染色

酵素抗体法には、avidin-biotin peroxidase complex (ABC) 法を用いた。以下の操作はすべて室温で処理した。切片を脱パラフィン後、0.3% H₂O₂ 加メタノールで30分間処理し、2N-HClに30分間浸漬、ついで0.1 M Na₂B₄O₇で10分間中和した。2%正常馬血清で数分間処理した後、一次抗体として100倍希釈した抗 BrdU モノクローナル抗体 (Becton Dickinson社) を用いて1晩、切片と反応させた。二次抗体には200倍希釈のビオチン化マウス IgG を用い30分間処理し、ついで100倍希釈 avidin-biotin complex (Vector社) で30分間反応させた。各ステップの間は、PBS (pH 7.4) で洗浄した。最後に DAB-H₂O₂ 基質溶液で発色させヘマトキシリンによる後染色を行った。基質溶液は20 mgの3, 3'-diamino-benzidine-4HClを100 mlの0.005% H₂O₂ 含有0.05 M Tris-HCl (pH 7.6) に溶解して調製した。封入後、光学顕微鏡で観察し、100細胞中の陽性細胞数を数えて百分率を算出し、相対的増殖活性を検討した。

Ⅲ. 実験結果

1. *In situ* hybridization (ISH) 法による*c-myc*, *N-myc* の顎顔面領域における発現の解析

胎齢14.5日のC57BL/6マウス胎仔頭部を図1で示した方向で切った前頭断凍結切片 (図2a) に対し、*c-myc*, *N-myc* をプローブにしてISHを行い暗視野で観察した結果、basal levelのシグナルに対してきわだった*c-myc*のシグナルを示す領域が数カ所存在した (図2b)。すなわち側脳室の壁内側 (線条部), 脳頭蓋骨および上, 下顎骨形成領域, 眼球周囲の筋原基, 歯胚などである。一方*N-myc*は脳, 網膜, 歯胚でシグナルが認められた。これらの領域はコントロール (sense) では検出されないのそれぞれのmRNA

の発現を反映し、さらに *c-myc* と *N-myc* では発現領域が異なることからそれぞれ *c-myc*, *N-myc* 特異的であると考えられた。なお *c-myc* のコントロール (sense) (図 2 c) でも光っている眼球領域は網膜の色素顆粒でありシグナルではない。以下、顎顔面領域の主要構成要素である下顎骨形成領域および歯胚に焦点をあて、発生段階に応じて *c-myc*, *N-myc* の発現パターンを解析した。

1) 下顎骨形成領域での *c-myc* の発現パターン

胎齢12.5日の下顎骨形成領域を観察すると、下顎骨原基と考えられる不定形な間葉細胞の凝集塊が認められる (図 3 a)。 *c-myc* の発現は (図 3 b), 下顎骨原基の間葉細胞の凝集塊に一致して周囲の間葉細胞より強いシグナルが検出された。また間葉凝集塊に取り囲まれてメッケル軟骨の原基が形成されており、その周縁部は細胞間隙が緻密で、中心部は比較的疎な小円形の間葉細胞集団が観察された。そしてこのメッケル軟骨原基の間葉細胞塊においてもコントロール (sense) と明らかな差のある *c-myc* のシグナルが検出された。トリジンブルー染色により、この時期のメッケル軟骨は軟骨基質に特有なメタクロマジー (異調染色) は明瞭ではなく、軟骨への分化がまだ十分でないことが示唆された。

胎齢13~14日にかけての臼歯部付近の下顎骨原基は (図 3 c), 大きさを増しながらメッケル軟骨を取り囲み、間葉細胞の凝集層に隣接する中心側の領域では骨基質の沈着が認められはじめた。胎齢14.5日での *c-myc* のシグナルは胎齢12.5日と同様、下顎骨原基の周縁に分布する未分化な間葉細胞の凝集層に一致して強く検出されたが、骨基質を含む中心部では basal level の範囲内であった (図 3 d)。またメタクロマジーがみられるメッケル軟骨では *c-myc* のシグナルは低下していた。

より発生の進んだ胎齢16.5日では骨基質の合成が一層盛んになり、メッケル軟骨では肥大化した像が観察されてくる (図 3 e)。間葉細胞の凝集層は周縁、数層の幅に局限しており、*c-myc* の強

いシグナルもこの領域に一致して認められた (図 3 f)。

次に、*c-myc* の発現と骨の分化形質の発現との関連を調べるため、骨芽細胞により合成され骨基質中に存在するシアル酸含有の糖蛋白の一つで、胎仔骨組織での mRNA の発現が認められている 2ar (osteopontin)²⁷⁾ をプローブにして下顎骨形成領域での発現を観察した。胎齢13.5日ではシグナルは認められなかったが (図 4 a, b), 胎齢14日目頃から developing bone の中心部にきわめて強いシグナルが検出された (図 4 c, d)。さらに胎齢16.5日になると骨基質の合成部に局限して、胎齢14.5日よりさらに広い範囲で強く認められ (図 4 e, f), 盛んに骨基質を合成していると考えられる骨芽細胞に局在していた。しかし *c-myc* の発現の高い間葉細胞の凝集層では 2ar のシグナルは認められなかった (図 4 c~f)。これらの *c-myc*, 2ar の異なる発現パターンは、下顎骨と同様の膜性骨化を示す脳頭蓋骨の形成領域においても観察された (図 5 a~d)。一方、*N-myc* をプローブにして検討したところ、コントロール (sense) と明瞭な差を認めるシグナルは胎齢12.5~17.5日の下顎骨形成領域においては観察されなかった。

以上の結果から下顎骨の発生過程において、間葉細胞が骨芽細胞へ分化していく過程のまだ分化形質を発現していない細胞に局限して、*c-myc* のシグナルが強いことが明らかとなった。

2) 歯胚での *c-myc*, *N-myc* の発現パターン

マウス臼歯の歯胚は胎齢12日目頃から、はじめ上皮の肥厚として観察され、次第に蕾状期、帽状期、鐘状期と形態的に変化するとともに、胎齢17~18日目頃から内エナメル上皮からエナメル芽細胞、歯乳頭の内エナメル上皮に近接する間葉細胞からは象牙芽細胞への分化がみられ、おのおのエナメル質、象牙質の基質を合成するようになる^{31, 32)}。

臼歯歯胚での *c-myc* のシグナルは、歯堤形成期および蕾状期 (およそ胎齢13.5日) では上皮の肥厚部に一様に強く検出され、連続する外表上皮

層とは明らかな差が認められた (図 6 a, b)。帽状期になると内、外エナメル上皮、エナメル髓、歯乳頭と組織分化が進んでくるが、胎齢14.5日において *c-myc* のシグナルは上皮全体に均一に強く分布していた (図 6 c, d)。ところが鐘状期へと進んでいく間に、上皮全体から内エナメル上皮に高レベルのシグナルが局在していくパターンが観察された (図 6 e, f)。

一方 *N-myc* の発現をみると、胎齢13.5日では basal level と差のあるシグナルは検出されなかったが (図 7 a, b)、胎齢14日頃から *c-myc* とは異なりエナメル器に包み込まれた歯乳頭の間葉細胞凝集塊に弱いながらもコントロール (sense) と差のあるシグナルが認められた (図 7 c ~ f)。しかしながら、将来の象牙芽細胞層である内エナメル上皮に接する部分で特にシグナルが強いということではなく、歯乳頭全体に均一な分布を示した。

2. *c-myc*, *N-myc* の発現部位での増殖活性

次に、以上観察された *c-myc* および *N-myc* の発現パターンが増殖活性と相関するかどうかを検討するために、thymidine の analogue である BrdU を *in vivo* で胎仔に取り込ませた後、抗 BrdU 抗体による免疫組織学的観察を行った。胎齢12.5日の下顎骨形成領域において (図 8 a)、*c-myc* の強いシグナルが観察された間葉細胞の凝集塊での BrdU による標識率は20%程度で (図 10)、*c-myc* のシグナルの弱い周囲の間葉細胞と有意な差は認められなかった。一方胎齢14.5日および16.5日の分化度の進んだ領域と比較すると (図 8 b, c)、*c-myc* のシグナルが強い未分化な間葉細胞の凝集層での BrdU による標識率はそれぞれ20、15%程度であるのに対し、2ar の発現が認められた骨基質の合成部位ではいずれも約10%と1/2~2/3程度に低下していた (図10)。

さらに同様の比較を歯胚について行った。*c-myc* の強いシグナルが観察された胎齢13.5日の上皮肥厚部 (図 9 a)、帽状期の胎齢14.5日の上皮全体 (図 9 b) での BrdU の標識率はそれぞれ15、20%程度であった (図10)。さらに鐘状期になり組織形成が進んでくると、*c-myc* のシグナル

は前述したように内エナメル上皮に局限してくるが、胎齢16.5日 (図 9 c)、17.5日 (図 9 d) での内エナメル上皮の BrdU による標識率はそれぞれ25、40%程度と増加する傾向がみられた (図 10)。また歯乳頭の間葉細胞塊では、*N-myc* の発現のみられなかった胎齢13.5日および発現の認められた胎齢14.5~17.5日にかけて、いずれも30~40%と高い増殖活性が観察された (図 9 a ~ d, 10)。

一方、*c-myc* のシグナルが弱いことが観察された舌領域 (図 2 a, b) で増殖活性を調べてみると、胎齢12.5~16.5日において20%前後であり、同時期に *c-myc* のシグナルが強い下顎骨形成領域の間葉凝集部、歯胚上皮と同程度であった (図10)。また *c-myc* のシグナルが弱い終脳の脳室側の神経上皮に、いずれの時期にも40~50%程度と高い標識率を示す層が観察された (図 8 d, 10)。しかも終脳では胎齢14.5日においても観察されるように、*c-myc* のシグナルの強い領域 (線条部) (図 5 b) では、ほとんど BrdU の取り込みは認められなかった (図 8 d, 10)。

以上、①下顎骨形成領域で *c-myc* のシグナルの強い間葉凝集部での増殖活性は、分化形質が認められる骨基質の合成部、メッケル軟骨よりは高い傾向を示したことが、②しかしながら *c-myc* のシグナルが弱かった周囲の間葉、舌領域でも同程度の増殖活性が認められたことが、③歯胚上皮では、組織形成が進み *c-myc* のシグナルが内エナメル上皮に局限するとともに増殖活性が増加する傾向がみられたが、それ以前にも上皮全体で *c-myc* のシグナルがすでに強かったことが、④他の領域、たとえば胎齢14.5日の終脳の線条体の一部では *c-myc* のシグナルが弱いにもかかわらず増殖活性がほとんど認められず、逆に BrdU の標識率の高い脳の神経上皮層において、*c-myc* のシグナルの弱い部位が認められることなどが明らかとなった。したがって *c-myc* の発現は増殖活性の高い未分化な組織に比べ、分化形質を発現し増殖が低下するとともに低下する傾向にあった。しかしながら未分化な組織における *c-myc*

図10 下顎骨形成領域, 歯胚での増殖活性

各胎齢期で異なる3胎仔における Labeling Index の平均値と実測値の範囲を示す

*: 内エナメル上皮での Labeling Index を示す

のシグナルの強さが増殖活性の高さには必ずしも一致しないと考えられる。

また N-myc の発現がみられた歯乳頭では, 比較的増殖活性は高い傾向を示したが, シグナルが検出されない胎齢13.5日においても高い増殖活性を示したことから, N-myc の発現も単純には増殖活性と一致しないことが示唆された。

IV. 考 察

ISH法が開発された当初は, かなり高度な手技が必要とされていた。しかしこの2, 3年の間に, かなり感度, 再現性などの点で改良されてきている。しかしながら目的とする遺伝子の発現量, 核酸の標識法, プローブ領域の選択などの点から多分にトリッキーな面をあわせもっており,

非特異的吸着をいかに低く抑え、シグナルとのコントラストを強くするかという点で、目的とする遺伝子によって工夫する余地がある。

本実験は RNA プローブを使用した。DNA プローブも用いられているが、以下に述べる点で RNA プローブにはいくつかの利点があり、最近では RNA プローブによる報告例が多い。その利点として、① RNA/RNA ハイブリッドはその結合力が安定で T_m (融解温度) が高く、stringent な洗浄条件が可能であること、②ハイブリダイズしていないプローブ RNA を RNase で除去できるため、非特異的吸着の減少に効果的であること、③ *in vitro* で放射活性の高いプローブの作製が可能であるため、検出感度が高いこと、④コントロールとして sense RNA を用いることができるため、結果の判定に信頼性がおけること、などがあげられる^{29, 30, 33)}。プローブ領域の選択において、GC 含有率60%以上の部分は非特異的吸着の要因となりやすく、また2次構造を形成しやすい。Schmid らによると²⁰⁾、マウスの *c-myc* の exon 1, 2, 3 おのおのをプローブにして検討した結果、検出感度に多少の強弱はあるものの、いずれも同様の発現パターンを示したという。しかしながら exon 1 の場合、sense プローブで非特異的吸着が強かったと報告している。この理由として微量ながら *c-myc* の antisense RNA が発現している可能性³⁴⁾を指摘している。そこで以上の点を考慮して、本実験では GC 含有率60%以下であるマウスの *c-myc*, exon 3 の *Pvu* II-*Hind* III 断片、N-*myc*, exon 3 の *Hinc* II-*Sca* I 断片を用いたが、結果として2arの場合と比較して全体的に *c-myc* は grain の分布密度が高いという傾向を示した。sense プローブとの差からみても、*c-myc* はいずれの組織においても basal level の発現があるのではないかと考えられた。また N-*myc* の発現がみられた領域のシグナルは、*c-myc* の強いシグナルに比べて幾分弱い傾向にあった。

1. 下顎骨発生過程における *c-myc* の役割

下顎骨形成領域において、メッセル軟骨原基も含めて *c-myc* のシグナルは、その発生初期 (胎齢

12.5日) の間葉細胞の凝集塊に一致して強く認められた。骨基質を合成する骨芽細胞層が出現してくる分化途上段階 (胎齢14.5日以降) では、骨原基周囲の間葉細胞の凝集層に強く認められるようになる。一方、2ar のシグナルは骨芽細胞層に局在しており、*c-myc* の発現パターンとは明らかに異なっていた。そこで次に *c-myc* の発現が未分化の間葉細胞で高く、2ar の発現のみられる分化した骨芽細胞では低いという結果は、単に分化すると増殖活性が低下することを反映しているだけなのかどうかという疑問が生じてくる。

このことを検討するために、*c-myc* の高い発現が増殖活性の高さに相関しているのかどうかを、BrdU の取り込みによる相対的増殖活性を指標として免疫組織学的観察によって調べた。その結果 (図10)、下顎骨形成領域において *c-myc* のシグナルが強い間葉細胞の凝集部では、2ar の発現が観察された骨基質の合成領域よりも増殖活性が高い傾向がみられた。またメッセル軟骨においても同様に、分化すると *c-myc* の発現の低下とともに増殖活性も低下する傾向を示した。正常組織で *c-myc* の発現が増殖活性に相関するという例は多く、Pfeifer-Ohlsson らはヒト胎児で増殖活性の高い胎盤の栄養膜細胞層 (cytotrophoblast)³⁵⁾、皮膚、消化管上皮³⁶⁾で *c-myc* の発現が高いことを述べている。また Schmid ら²⁰⁾は、マウス胎仔の消化管において、胎齢14.5日では上皮に均一に高く、リンパ芽球からなる中胚葉層では低いという発現パターンが観察されるが、胎齢16.5日になると、陰窩内側の急速に増殖してくる細胞層に *c-myc* の強いシグナルが局在していると述べている。彼らはこの *c-myc* の発現パターンの変化は、やはり消化管の増殖活性の変化に基づくと考えている。また消化管の他歯胚、胸腺、胎盤、肝臓、腎臓、脾臓、顎下腺などでの高い発現を報告しているが、これらの発現パターンから *c-myc* の最も重要な役割は、分化の決定はされているが、終末分化 (terminal differentiation) に達していない細胞の増殖に関与しているのではないかという仮説を述べている²⁰⁾。

In vitro で *c-myc* の発現は、 G_0 期の細胞を血清や種々の増殖因子で刺激すると、一過性に上昇し、分化を誘導すると減少することが知られている^{6~10)}。このような事実から *c-myc* の高い発現が細胞の増殖に、さらにその低下が分化誘導に必須であるということが示唆されている。

したがって、下顎骨発生過程で、未分化で増殖している間葉細胞の凝集部で *c-myc* の発現が高く、分化して増殖が低下すると発現が低くなるという結果は、たしかに *c-myc* の発現の上昇が増殖に関連していることを反映すると考えられる。

しかしながら *c-myc* のシグナルが強い間葉の凝集部と basal level の周囲の間葉細胞、および舌領域とを比較すると、胎齡12.5~16.5日を通じて BrdU の取り込みに特に差は認められなかった(図10)。このことは同程度の増殖活性を示す未分化な組織でも、*c-myc* の発現が高いところとそうでないところがあることを意味する。このような例は、Pfeifer-Ohlsson からも観察しており、ヒト胎児肢芽、頭部の増殖している間葉、軟骨組織で *c-myc* の発現は低いと述べている³⁶⁾。これは一つには、他の *myc* 様の遺伝子が代替している可能性も考えられるが、逆に終脳の線条部のように、*c-myc* のシグナルが強いにもかかわらず、BrdU の取り込みがほとんど認められない領域が存在することは、*c-myc* が単純に増殖のマーカーだとは考えにくいことを示唆している。また Ruppert ら³⁷⁾は、小脳の成長過程において、増殖活性の高い外顆粒層とともに、DNA 合成を終了して分化形質を発現しつつあるプルキンエ細胞でも *c-myc* の発現が高いことを認めている。一方 *in vitro* でもマウス初代角質細胞 (keratinocyte) をカルシウムで分化誘導すると *c-myc* の発現は高いまま維持されており³⁸⁾、また分裂を停止したアフリカツメガエルの卵母細胞において *c-myc* の発現が高い³⁹⁾など、*c-myc* の発現制御が増殖に直接関連していない例が知られている。このようなことから、*c-myc* には増殖に加えて組織の特異的分化にかかわる機能をもっている可能性が示唆される。

骨細胞の起源は中胚葉由来の未分化間葉系細胞で、前駆骨芽細胞を経て骨芽細胞に分化するといわれている⁴⁰⁾。したがって下顎骨形成領域においてその発生の最初のステップとして間葉細胞が凝集することには、単に組織の増大に関与しているだけではなく、そこで次の骨芽細胞へ分化していくという決定が行われつつあるのではないかと推定される。そしてその決定に、高い *c-myc* の発現が関与している可能性が考えられる。

ただしここで問題になるのが、下顎骨原基の凝集間葉細胞が骨芽細胞に分化するという直接の証拠はないということである。下顎骨の一部のように膜内骨化が起こる場所は血管発達のよい間葉組織であり、血管周囲には多くの多能性未分化間葉細胞が付随している⁴¹⁾ことから、2ar を発現している骨芽細胞がすべて血管由来の間葉細胞ではないにしろ、一部由来する可能性もあると思われるので、発生段階をさらに詳細に検討する必要がある。

一方、骨組織発生過程における他の癌原遺伝子の発現をみると、*c-fos* は軟骨成長期の増殖活性の高い軟骨膜⁴²⁾、長管骨の成長板 (growth plate)⁴³⁾ に時期特異的に発現されていることが知られており、さらに Caubet ら⁴⁴⁾は膜性骨、軟骨性骨のいずれの骨組織でも骨芽細胞に *c-fos* の発現が高いと報告している。*c-fos* は *c-myc* と同じくその産物が核内に存在し、増殖期に発現が上昇するが、*c-myc* とは別に増殖、分化の制御に関与していることが示唆されている^{45, 46)}。このようなことから下顎骨発生過程においても *c-fos* の関与が考えられるが、*c-myc* がその初期分化に関与するのに対し、*c-fos* はより後期で骨の分化に寄与しているのかもしれない。

2. 歯胚発生過程における *c-myc*, *N-myc* の役割

c-myc, *N-myc* が同時に強いシグナルを示す領域は認められず、歯胚では *c-myc* は上皮に、*N-myc* は間葉と、異なる発現パターンが観察された。歯胚における *c-myc* の強いシグナルは上皮に局限して観察された。すなわち口腔粘膜上皮の肥厚に始まり、それが増大し中央部が陥入した

帽状期にかけては、上皮全体に一様に *c-myc* のシグナルが強く認められた。しかし内、外エナメル上皮、エナメル髓と組織分化の進んだ鐘状期への移行過程では、*c-myc* の強いシグナルは次第に内エナメル上皮に局限していくパターンが観察された。一方、*N-myc* は帽状期から鐘状期にかけての歯乳頭に、周囲の間葉より強いシグナルが観察された。

マウス歯胚のエナメル器での *c-myc* の発現は Schmid らも記載しているが²⁰⁾、Pfeifer-Ohlsson ら³⁶⁾はヒト胎児では口腔上皮に比較して低レベルであったと報告している。この相違は種差、あるいは実験系の違いによる検出感度の差によるものかは明確ではない。

本実験の結果、歯胚の発生過程での *c-myc*、*N-myc* の発現はやはり未分化な細胞で認められたが、その発現は増殖活性を反映したものなのかどうか？ 過去の報告から、組織分化の進みつつある鐘状期においては増殖活性は旺盛で、ことに前駆象牙芽細胞 (preodontoblast)、前駆エナメル芽細胞 (preameloblast) で際だっているが、逆に外エナメル上皮では低い傾向にあることが知られており⁴⁷⁻⁴⁹⁾、BrdU の取り込みでみた本実験の観察と一致した。増殖活性と *c-myc* の発現を比較すると、*c-myc* の強いシグナルは帽状期から鐘状期にいたる間に、増殖活性の高い内エナメル上皮で優勢になってくるが、より増殖活性の低い蕾状期から上皮全体に均一に強いシグナルが認められることから、内エナメル上皮での発現の上昇が増殖活性の増加を反映しているとは考えにくい。

歯胚においても骨芽細胞への分化の過程と同様、未分化な上皮から、内エナメル上皮、エナメル芽細胞へ分化していく間に細胞の特殊化の決定が行われていると思われる。したがって *c-myc* の高い発現は、未分化な上皮から基質を合成するエナメル芽細胞へ分化していく初期過程に密接に関与している可能性が考えられる。ただし終末分化し、基質を合成しているエナメル芽細胞で *c-myc* の発現が低下するかどうかは、今後検討する必要がある。

また歯乳頭の間葉細胞の凝集塊では、蕾状期から鐘状期を通じて比較的高い増殖活性を示すが (図10)、*N-myc* のシグナルは帽状期から認められたことから、歯乳頭での *N-myc* の発現と増殖活性についても必ずしも相関があるとはいえない。

歯乳頭は神経堤細胞由来の外胚葉性間葉細胞の凝集塊よりなり、帽状期から鐘状期にかけて内エナメル上皮との相互作用により上皮に隣接する細胞から象牙芽細胞へ分化するといわれている^{32,50)}。*N-myc* の発現は胎齢13.5日の歯胚上皮周囲の間葉細胞ではコントロール (sense) と差がないことから、上皮に包み込まれるようになり、上皮との活発な相互作用が生じ分化への決定が行われつつある段階に、*N-myc* の発現が関与していることが推察される。Olive らはこのような分化途上段階の上皮、間葉の differential mitotic activity が形態形成に関与し歯冠の形作りが行われてくると述べており⁴⁸⁾、増殖と分化の過程が、構成細胞間で有機的に関連することによって形態形成が進んでいくと思われる。

N-myc は分化能を有し、ある場合には発生的全能性をもつ未分化な胚性癌腫細胞やマウス胎仔で発現が高く、マウスでは成長すると低下することが報告されている¹⁷⁾。さらに組織レベルでは、*N-myc* の発現は胎生期の腎臓、脳、心臓、肺、毛根などで認められることが知られている^{18,21)}。Mugrauer ら²¹⁾は腎臓発生経過において、新しい上皮に分化しつつある皮質の間葉細胞の凝集塊に *N-myc* の陽性所見が認められ、発現が分化の初期段階にある領域に局限されることを述べている。また脳においても増殖活性の高い小脳の外顆粒層以外に、大脳新皮質の皮質層 (cortical plate) でも *N-myc* の発現が高くみられ、分裂を終え、しかもまだ終末分化に達していない細胞に局限されていると述べている。これらのことから、*N-myc* についても胎仔発生過程の未分化な組織において単に増殖活性を反映しているだけでなく、分化の初期の制御にかかわっている可能性が考えられる。

しかしながら *c-myc*, *N-myc* の発現している組織の分布, 発生時期は異なっている^{18, 20, 21, 36)}。Zimmerman ら¹⁸⁾は B 細胞の分化過程で *N-myc* は *c-myc* とともに前駆 B 細胞で basal level の発現がみられ, B 細胞, 形質細胞と分化していくにしたがって, *c-myc* 一方のみの発現が認められるようになると報告している。したがって *N-myc* には, 分化の初期過程において *c-myc* と異なる役割があることが推察される。

本実験で歯胚における *c-myc*, *N-myc* の発現パターンが異なる結果から, *c-myc*, *N-myc* はそれぞれ異なった細胞において, 増殖のみならず歯胚発生過程の分化に関与していると考えられる。すなわち *c-myc* は内エナメル上皮からエナメル芽細胞, *N-myc* は歯乳頭の間葉細胞から象牙芽細胞あるいは歯髄へと特異的に分化していく初期過程に重要な役割をしていることが推察される。なお本実験では胎齢 16.5 日頃までの *N-myc* の発現が確認されたが, さらに後期になり分化に伴って発現が低くなるのかどうか, *c-myc* とともに詳細に検討する必要がある。

歯胚発生過程における他の癌原遺伝子の関与について, Caubet らは骨組織とともに, 成熟段階にある象牙芽細胞で *c-fos* の強いシグナルが認められたと述べており⁴⁴⁾, 下顎骨の発生過程と同様に *c-fos* はより後期の過程で歯牙の細胞への特殊化に関与しているのかもしれない。また FGF 関連遺伝子の *int-2* が本実験でみられた *N-myc* と同様に, マウス歯胚の歯乳頭の間葉細胞凝集塊で発現されていることが報告されており⁵¹⁾, 両者とも神経組織でよく発現されていることと考えあわせ, 両者になんらかの相関があることが推察される。

以上より, 下顎骨, 歯胚の発生過程において, ① *c-myc* の発現が高い領域と *N-myc* の発現領域とでは分布が異なること, ②いずれも未分化な組織に発現が局在していること, ③さらに両者の発現が必ずしも増殖活性を反映していないこと, の 3 点が明らかとなった。したがって, これらの発生過程において *c-myc*, *N-myc* は組織特異的な細

胞へ分化していく過程の初期段階に重要な役割を果たしているのではないかと考えられる。

ISH 法は今後, 組織形態学分野においてその有用性はますます増加すると思われる。ただし本研究にもいえることだが, mRNA の発現レベルが蛋白の発現と相関するかどうかは検討する必要があると思われる。

謝 辞

稿を終えるにあたり, ご指導とご校閲を賜りました江藤一洋教授に深甚なる謝意を表します。また, 終始ご懇切なご教示, ご指導をいただきました本学歯学部口腔細菌学教室土田信夫教授, 池田正明博士に心より感謝の意を表します。さらに ISH 法について多大なるご助言, ご指導, ならびにプローブに使用した 2ar (osteopontin) の提供を賜りました東京大学応用微生物学研究所野村慎太郎博士, オートラジオグラフィ法などについて貴重な技術的ご指導を賜りました北里大学衛生学部二重作豊教授のお二方に心より感謝致します。最後に本研究に際しご援助, ご協力をいただきました北里大学衛生学部二重作研究室の方々, 本学写真室高田正雄氏, 口腔細菌学教室, ならびに山下(大隅)典子博士はじめ顎研発生部門の方々に厚くお礼申しあげます。

本研究の要旨の一部は, 第22回日本発生生物学会, 第12回日本分子生物学会年会にて発表した。

文 献

- 1) Kahn, P. and Graf, T. : Oncogenes and growth control. Berlin, Heidelberg, 1986, Springer-Verlag.
- 2) Stéhelin, D., Varmus, H. E., Bishop, J. M. and Vogt, P. K. : DNA related to the transforming genes of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. Nature 260 : 170-173, 1976.
- 3) Spector, D. H., Varmus, H. E. and Bishop, J. M. : Nucleotide sequences related to the transforming gene of avian sarcoma virus are present in the DNA of uninfected vertebrates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 : 4102-4106, 1978.
- 4) Adamson, E. D. : Oncogenes in development. Development 99 : 449-471, 1987.
- 5) Klein, G. and Klein, E. : Evolution of tumours and the impact of molecular oncology. Nature 315 : 190-195, 1985.

- 6) Greenberg, M. E. and Ziff, E. B. : Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the *c-fos* proto-oncogene. *Nature* 311 : 433-438, 1984.
- 7) Greenberg, M. E., Green, L. A. and Ziff, E. B. : Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 260 : 14101-14111, 1985.
- 8) Grosso, L. E. and Pitot, H. C. : Transcriptional regulation of *c-myc* during chemically induced differentiation. *Cancer Res.* 45 : 847-850, 1985.
- 9) Lachman, H. M., Hatton, K. M., Skoultchi, A. I. and Schildkraut, C. L. : *c-myc* mRNA levels in the cell cycle change in mouse erythroleukemia cells following inducer treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 5323-5327, 1985.
- 10) Prochownik, E. V. and Kukowska, J. : Dereglated expression of *c-myc* by murine erythroleukaemia cells prevents differentiation. *Nature* 322 : 848-850, 1986.
- 11) Schwab, M., Alitalo, K., Klempnauer, L., Var-mus, H. E. and Bishop, J. M. : Amplified DNA with limited homology to *myc* cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumor. *Nature* 305 : 245-248, 1983.
- 12) Kohl, N. E., Kanda, R., Shreck, G., Bruns, G., Latt, S., Gilbert, F. and Alt, F. W. : Transposi-tion and amplification of oncogene related se-quence in human neuroblastoma. *Cell* 35 : 359-367, 1983.
- 13) Lee, W.-H., Murphree, A. L. and Benedict, W. F. : Expression and amplification of the *N-myc* gene in primary retinoblastoma. *Nature* 309 : 458-460, 1984.
- 14) Nau, M. M., Brooks, Jr. B. J., Carney, D. N., Grazdar, A. F., Battey, J. F., Sausville, E. A. and Minna, J. D. : Human small-cell lung can-cers show amplification and expression of the *N-myc* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 1092-1096, 1986.
- 15) Nisen, P. D., Zimmerman, K. A., Cotter, S. V., Gilbert, F. and Alt, F. W. : Enhanced expres-sion of the *N-myc* gene in Wilm's tumors. *Cancer Res.* 46 : 6217-6222, 1986.
- 16) Alt, F. W., Depinho, R., Zimmerman, K., Legouy, E., Hatton, K., Ferrier, P., Tesfaye, A., Yancopoulos, G. and Nisen, P. : The human *myc* gene family. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51 : 931-941, 1986.
- 17) Jakobovits, A., Schwab, M., Bishop, J. M. and Martin, G. R. : Expression of *N-myc* in terato-carcinoma stem cells and mouse embryos. *Nature* 318 : 188-191, 1985.
- 18) Zimmerman, K. A., Yancopoulos, G. D., Collum, R. G., Smith, R. K., Kohl, N. E., Dennis, K. A., Nau, M. M., Witte, O. N., Toran-Allerand, D., Gee, C. E., Minna, J. D. and Alt, F. W. : Dif-ferential expression of *myc* family genes during murine development. *Nature* 319 : 780-783, 1986.
- 19) Slamon, D. J. and Cline, M. J. : Expression of cellular oncogenes during embryonic and fetal development of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 7141-7145, 1984.
- 20) Schmid, P., Schulz, W. A. and Hameister, H. : Dynamic expression pattern of the *myc* proto-oncogene in midgestation mouse embryos. *Science* 243 : 226-228, 1989.
- 21) Mugrauer, G., Alt, F. W. and Ekblom, P. : *N-myc* proto-oncogene expression during organo-genesis in the developing mouse as revealed by *in situ* hybridization. *J. Cell Biol.* 107 : 1325-1335, 1988.
- 22) Weston, J. A. : The migration and differentia-tion of neural crest cells. *Advances Morph.* 8 : 41-114, 1970.
- 23) 江藤一洋 : 一次口蓋の発生. *口病誌* 47 : 203-212, 1980.
- 24) Johnston, M. C. and Listgarten, M. A. : Obser-vations on the migration, interaction, and early differentiation of orofacial tissues. In Slavkin, H. C. and Bavetta, L. A. (eds.) : *Developmental aspects of oral biology*. New York and London, 1972, Academic Press, 53-80.
- 25) Stanton, L. W., Watt, R. and Marceau, K. B. : Translocation, breakage and truncated trans-cripts of *c-myc* oncogene in murine plasmacy-tomas. *Nature* 303 : 401-406, 1983.
- 26) Taya, Y., Mizusawa, S. and Nishimura, S. : Nucleotide sequence of the coding region of the mouse *N-myc* gene. *EMBO J.* 5 : 1215-1219, 1986.
- 27) Nomura, S., Wills, A. J., Edwards, D. R., Heath, J. K. and Hogan, B. L. M. : Developmental ex-pression of *Zar* (osteopontin) and *SPARC* (osteo-nectin) RNA as revealed by *in situ* hybridi-zation. *J. Cell Biol.* 106 : 441-450, 1988.
- 28) Hogan, B., Constantini, F. and Lacy, E. : *Mani-pulating the mouse embryo*, a laboratory ma-nual. New York, 1986, Cold Spring Harbor Laboratory, 228-242.
- 29) Melton, D. A., Krieg, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K. and Green, M. R. : Effi-cient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plas-

- mids containing a bacteriophage SP6 promotor. Nucl. Acids Res. 12 : 7035-7056, 1984.
- 30) Cox, K. H., DeLeon, D. V., Angerer, L. M. and Angerer, R. C. : Detection of mRNA in sea urchin embryos by *in situ* hybridization using asymmetric RNA probes. Dev. Biol. 101 : 485-502, 1984.
 - 31) Ruch, R. : The mouse, its reproduction and development. Minneapolis, 1968, Burgess Publishing Co., 227-237.
 - 32) Kollar, E. J. : Histogenetic aspects of dermal-epidermal interactions. In Slavkin, H. C. and Bavetta, L. A.(eds.) : Developmental aspects of oral biology. New York and London, 1972, Academic Press, 125-149.
 - 33) 野村慎太郎 : *in situ* ハイブリダイゼーション. 実験医学 Vol. 7, 東京, 1989, 羊土社, 839-845.
 - 34) Kindy, M. S., McCormack, J. E., Buckler, A. J., Levine, R. A. and Sonenshein, G. E. : Independent regulation of transcription of the two strands of the *c-myc* gene. Mol. Cell. Biol. 7 : 2857-2862, 1987.
 - 35) Pfeifer-Ohlsson, S., Goustin, A. S., Rydnert, J., Wahlström, T., Bjersing, L., Stehelin, D. and Ohlsson, R. : Spatial and temporal pattern of cellular *myc* oncogene expression in developing human placenta : Implications for embryonic cell proliferation. Cell 38 : 585-596, 1984.
 - 36) Pfeifer-Ohlsson, S., Rydnert, J., Goustin, A. S., Larsson, E., Betsholtz, C. and Ohlsson, R. : Cell-type-specific pattern of *myc* protooncogene expression in developing human embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 5050-5054, 1985.
 - 37) Ruppert, C., Goldowitz, D. and Wille, W. : Proto-oncogene *c-myc* is expressed in cerebellar neurons at different developmental stages. EMBO J. 5 : 1897-1901, 1986.
 - 38) Dotto, G. P., Gilman, M. Z., Maruyama, M. and Weinberg, R. A. : *c-myc* and *c-fos* expression in differentiating mouse primary keratinocytes. EMBO J. 5 : 2853-2857, 1986.
 - 39) Godeau, F., Persson, H., Gray, H. E. and Pardee, A. B. : *c-myc* expression is dissociated from DNA synthesis and cell division in *Xenopus* oocyte and early embryonic development. EMBO J. 5 : 3571-3577, 1986.
 - 40) 小澤英浩 : 骨形成と骨芽細胞系一形態学的観察. 実験医学 Vol. 7, 東京, 1989, 羊土社, 1253-1260.
 - 41) 小澤英浩 : 骨の組織発生と成長. 須田立雄, 小澤英浩, 高橋栄明 (著) : 骨の科学. 東京, 1985, 医歯薬出版, 65-75.
 - 42) Dony, C. and Gruss, P. : Proto-oncogene *c-fos* expression in growth regions of fetal bone and mesodermal web tissue. Nature 328 : 711-714, 1987.
 - 43) Sandberg, M., Vuorio, T., Hirvonen, H., Alitalo, K. and Vuorio, E. : Enhanced expression of TGF- β and *c-fos* mRNAs in the growth plates of developing human long bones. Development 102 : 461-470, 1988.
 - 44) Caubet, J.-F. and Bernaudin, J.-F. : Expression of the *c-fos* proto-oncogene in bone, cartilage and tooth forming tissues during mouse development. Biol. Cell 64 : 101-104, 1988.
 - 45) Verma, I. M., Deschamps, J., Van Beveren, C. and Sassone-Corsi, P. : Human *fos* gene. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51 : 949-958, 1986.
 - 46) Müller, R. : Cellular and viral *fos* genes : Structure, regulation of expression and biological properties of their encoded products. Biochim. Biophys. Acta 823 : 207-225, 1986.
 - 47) Chiba, M. : Cellular proliferation in the tooth germ of the rat incisor. Arch. Oral Biol. 10 : 707-718, 1965.
 - 48) Olive, M. and Ruch, J.-V. : Does the basement membrane control the mitotic activity of the innerdental epithelium of the embryonic mouse first lower molar. Dev. Biol. 93 : 301-307, 1982.
 - 49) Partanen, A.-M., Ekblom, P. and Thesleff, I. : Epidermal growth factor inhibits morphogenesis and cell differentiation in cultured mouse embryonic teeth. Dev. Biol. 111 : 84-94, 1985.
 - 50) Bhussry, B. R. : 歯の発生と成長. Bhaskar, S. N. (編), 尾持昌次 (訳) : Orban 口腔組織・発生学. 東京, 1981, 医歯薬出版, 21-40.
 - 51) Wilkinson, D. G., Bhatt, S. and McMahon, A. P. : Expression pattern of the FGF-related proto-oncogene *int-2* suggests multiple roles in fetal development. Development 105 : 131-136, 1989.

付 図 説 明

- 図1 本実験におけるマウス胎仔の切片作製方向
実線で示すように頭部を頭頂部に対し垂直な方向で切った
- 図2 *In situ* hybridization (ISH) によるマウス頭蓋顔面部（胎齢14.5日）での *c-myc* の発現パターン。トルイジンブルー染色
a : antisense RNA をプローブにしたものの明視野像。b : 同暗視野像。c : コントロール (sense RNA) をプローブにしたものの暗視野像。c と比較して b では終脳の線条部、脳頭蓋骨および上、下顎骨形成領域、眼球周囲の筋原基、歯胚に *c-myc* のシグナルが強く認められる。なお c でも光っている眼球領域は網膜の色素顆粒でありシグナルではない
Co : 線条部, E : 眼, m : 筋原基, U : 上顎骨形成領域, T : 歯胚, M : 下顎骨形成領域, To : 舌 (a ~ c : いずれも $\times 18$)
- 図3 ISH (antisense RNA プローブ使用) によるマウス下顎骨形成領域での *c-myc* の発現パターン。トルイジンブルー染色
a, b : 胎齢12.5日。メッセル軟骨原基およびそれを取り囲む下顎骨原基の間葉凝集塊に強いシグナルがみられる。c, d : 胎齢14.5日。下顎骨原基の周縁に分布する未分化の間葉細胞の凝集層に一致して強いシグナルが検出される。骨基質部、軟骨化しているメッセル軟骨ではシグナルは弱い。e, f : 胎齢16.5日。胎齢14.5日と同様の所見が観察される
a, c, e : 明視野像。b, d, f : 暗視野像。M : メッセル軟骨, m : 間葉凝集部, B : 骨基質部 (a, b : $\times 130$, c, d : $\times 85$, e, f : $\times 170$)
- 図4 ISH (antisense RNA プローブ使用) によるマウス下顎骨形成領域での 2ar (Osteopontin) の発現パターン。トルイジンブルー染色
a, b : 胎齢13.5日。骨基質の合成はまた明瞭でなく、2ar の発現も認められない。c, d : 胎齢14.5日。developing bone の中心部に 2ar の発現が観察され、骨基質を合成していると考えられる芽芽細胞に grain の集積が認められる。e, f : 胎齢16.5日。骨基質部でのシグナルは d よりさらに広い範囲で強く観察される
a, c, e : 明視野像。b, d, f : 暗視野像。M : メッセル軟骨, m : 間葉凝集部, B : 骨基質部 (a, b : $\times 110$, c ~ f : $\times 85$)
- 図5 ISH (antisense RNA プローブ使用) によるマウス終脳の線条部（胎齢14.5日）での *c-myc* と 2ar の発現。トルイジンブルー染色
a, b : *c-myc* をプローブにしたもの。c, d : 2ar をプローブにしたもの。脳頭蓋骨形成領域の間葉凝集部に *c-myc* の強いシグナルが、骨基質部に 2ar のシグナルが認められる。また *c-myc* では線条体の終脳核になるとされる領域にも強いシグナルが観察される
a, c : 明視野像。b, d : 暗視野像。m : 間葉凝集部, B : 骨基質部, Co : 線条部, E : 眼 (a ~ d : いずれも $\times 67$)
- 図6 ISH (antisense RNA プローブ使用) によるマウス臼歯歯胚での *c-myc* の発現パターン。トルイジンブルー染色
a, b : 胎齢13.5日。上皮の肥厚部に一様にシグナルが強くみられる。c, d : 胎齢14.5日。帽状期の歯胚上皮でも均一に grain の集積が検出される。e, f : 胎齢17.5日。鐘状期になると高レベルのシグナルが内エナメル上皮に局在していくパターンが観察される
a, c, e : 明視野像。b, d, f : 暗視野像。E : 歯胚上皮, IE : 内エナメル上皮, DM : 歯胚間葉凝集部, P : 歯乳頭, U : 上顎骨形成領域の間葉凝集層 (a ~ f : いずれも $\times 130$)
- 図7 ISH によるマウス臼歯歯胚での N-*myc*, *c-myc* の発現パターン。トルイジンブルー染色
a, b : 胎齢13.5日において antisense N-*myc* RNA をプローブにしたもの。明瞭なシグナルは認められない。c, d : 胎齢15.5日において antisense N-*myc* RNA をプローブにしたもの。e : c と同一部位の切片において sense N-*myc* RNA をプローブにしたもの。f : 同じく antisense *c-myc* RNA をプローブにしたもの。e と比較して d では歯乳頭の間葉細胞凝集塊に N-*myc* の grain の集積が認められ、*c-myc* (f) とは明らかに発現パターンが異なっている
a, c : 明視野像, b, d ~ f : 暗視野像。E : 歯胚上皮, IE : 内エナメル上皮, P : 歯乳頭 (a ~ f : いずれも $\times 170$)

図8 マウス下顎骨形成領域、終脳の線条体領域での抗 BrdU 抗体染色像。ヘマトキシリン染色。濃染している核が陽性

a : 胎齢12.5日下顎骨形成領域。メッケル軟骨原基とそれを取り囲む下顎骨原基での *c-myc* のシグナルが強い間葉凝集塊および弱い周囲の間葉とで陽性細胞数に有意な差は認められない。b : 胎齢14.5日の下顎骨形成領域。骨基質部での陽性細胞数は *c-myc* のシグナルが強い間葉細胞の凝集層の半分程度である。またメッケル軟骨では陽性細胞はほとんど認められない。c : 胎齢16.5日の下顎骨形成領域。bに比べて骨基質部、メッケル軟骨での所見はほぼ同様だが、*c-myc* のシグナルが強い間葉細胞の凝集層では陽性細胞数が若干減少している。e : 胎齢14.5日の終脳の線条部。*c-myc* のシグナルが弱い脳室側の神経上皮に陽性細胞がきわめて多い層が認められる。それに対し *c-myc* の発現が高レベルの終脳核になると思われる部位(*)では陽性細胞はほとんど認められない

M : メッケル軟骨, m : 間葉凝集部, B : 骨基質部, Co : 線条部, NE : 神経上皮層 (a : $\times 130$, b ~ d : $\times 110$)

図9 マウス臼歯歯胚での抗 BrdU 抗体染色像。ヘマトキシリン染色。濃染している核が陽性

a : 胎齢13.5日。b : 胎齢14.5日。c : 胎齢16.5日。d : 胎齢17.5日。a, b で *c-myc* のシグナルが強い歯胚上皮では陽性細胞は散在して認められる程度だが, c, d と鐘状期になるにしたがい内エナメル上皮で陽性細胞が増加する傾向が認められる。歯胚間葉部(歯乳頭)ではいずれの時期も比較的高いレベルがみられる

E : 歯胚上皮, IE : 内エナメル上皮, DM : 歯胚間葉凝集部, P : 歯乳頭 (a : $\times 210$, b ~ d : $\times 110$)