

平成 22 年 3 月 12 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2006～2008
課題番号：18590166
研究課題名 (和文) 正常口蓋形成機構および口蓋裂発症機序を解明するための口蓋発生研究のシステム開発
研究課題名 (英文) Development of new <i>in vitro</i> analytic systems to clarify the mechanism underlying normal palatogenesis and cleft palate formation
研究代表者
滝川 俊也 (TAKIGAWA TOSHIYA)
朝日大学・歯学部・講師
研究者番号：90263095

研究成果の概要：これまで効果的な研究手法が確立されていなかった正常口蓋形成機構および口蓋裂発症機序を解明するための画期的な器官培養解析方法を当該研究により開発した。この新規解析システムを用いて、口蓋裂発症モデルマウスが示す口蓋裂の重症度と口蓋突起癒合部上皮の細胞分化能力との重要な相関関係が明らかとなり、この新規解析システムの有用性が実証された。当該研究成果はヒト口蓋裂発症機序の解明にも大きく貢献することが予想される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学・口腔解剖学 (含組織学・発生学)

キーワード：口蓋形成、口蓋裂、口蓋突起内側縁上皮細胞、最終分化、上皮-間葉形質転換

1. 研究開始当初の背景

ヒトの先天異常において、口蓋裂は高頻度に現れる奇形である。古くより、ヒト口蓋裂の発症メカニズムの解明を目的としてマウス、ラット等の実験動物を用いた実験で種々の催奇形性物質が明らかにされ、またジェンターゲット法により作成された遺伝子欠損マウスでも口蓋裂表現型を示すミュータントマウスが続々と報告されてきた。そして、正常口蓋形成機構や口蓋裂発症機序を明らかにするために、実験動物胎児の口蓋突起の器官培養法を用いて、子宮内では実施不可能なさまざまな実験が行われてきた。現在、

口蓋裂の発症は、胎児期の口蓋突起の発育障害や癒合過程の障害、および癒合後破裂などさまざまな機序が考えられているが、口蓋発生研究の確立された培養実験方法が今なお確立されていないために、研究者により異なる実験結果が報告されて、多くの混乱を招いている。特に、口蓋裂発症と密接に関係している口蓋突起の癒合について、口蓋突起先端を覆う口蓋突起内側縁上皮細胞 (以下、MEE細胞と略す) は相対する口蓋突起と接触して上皮性縫合を形成した後、どのようにして消失するのかが約 20 年来の論争の焦点となっている。すなわち、癒合部上皮を形成する

MEE 細胞がアポトーシスを起こして死滅する以外に、上皮-間葉形質転換を起こして消失するの否かに関して論争が続いている。これまでに、蛍光物質で MEE 細胞を標識して器官培養する古典的方法からケラチン遺伝子プロモーターにより β -ガラクトシダーゼ遺伝子を恒常的に発現させたコンディショナルノックインマウスの作成などの最新の細胞標識・追跡法までが応用されてきたが、論争を解決するまでに至らなかった経緯があり、MEE 細胞の上皮-間葉形質転換能力の証明は口蓋形成機構を解明するための重要課題となっていた。

2. 研究の目的

上記のような研究背景のもと、研究代表者らは口蓋発生研究のグローバルスタンダードとなりうるような新たな研究手法のシステム開発を目的として、以下の事項に焦点を当てて当該研究に着手した。

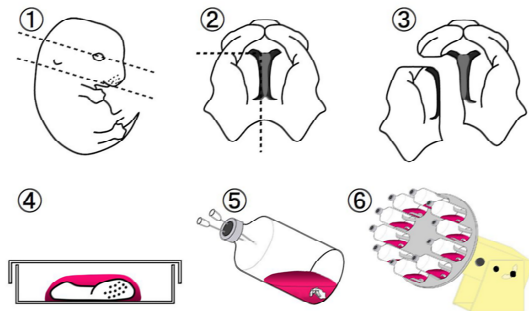
- (1) MEE 細胞の上皮-間葉形質転換能力を診断可能な新規 *in vitro* 解析システムの構築
- (2) 新規 *in vitro* 解析システムを用いた MEE 細胞の上皮-間葉形質転換能力のマウス系統差および種差の検討
- (3) 口蓋裂発症モデルマウスを用いた新規 *in vitro* 解析システムの有用性の検証

3. 研究の方法

当該研究では、新規に口蓋発生研究方法を開発した。すなわち、以下に述べる研究方法自体が当該研究の成果である。

(1) I 型コラーゲンゲル包埋による単一口蓋突起回転浮遊培養法

胎齢 14 日のマウス胎児から癒合前の口蓋突起を切り出し、片側の口蓋突起を取り除いた単一口蓋突起として、I 型コラーゲンを基材としたゲルマトリックスに包埋し、回転浮遊培養を 48 時間行った。培養には上皮基底膜の分解を阻害するためにマトリックスメタロプロテアーゼ (以下、MMP と略す) 阻害剤である GM6001 を 20 μ M の濃度で添加した無血清培地を用いた。培養前と培養後の口蓋突起を試料として、MEE 細胞の変化を組織学的に解析した。(下図に方法を示す)



[図の説明] ① 胎齢 14 日のマウス胎児から上顎部分を切り出す。(点線は切開線を示す)

② 上顎部分からさらに片側の口蓋突起を切り取る。(点線は切開線を示す) ③ 単一口蓋突起にした状態 ④ I 型コラーゲンゲルで単一口蓋突起を包埋する。(室温で 30 分間静置してゲル化させる) ⑤ 培養用バイアルに試料と培地をいれて混合ガス (95% O₂/5% CO₂) を 2 分間注入する。⑥ ローテーターに装着して 25 回転/分の速度でバイアルを回転させながら 37°C で 48 時間加温する。

(2) マトリゲル™包埋による単一口蓋突起回転浮遊培養法

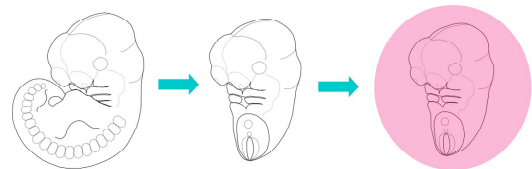
胎齢 14 日マウス胎児から単一口蓋突起を切り出して再構成基底膜であるマトリゲル™に包埋し、MMP 阻害剤添加培地で 48 時間、回転浮遊培養を行った。培養前と培養後の口蓋突起を試料にして MEE 細胞の変化を組織学的に解析した。培養の手順は上記 (1) と同様である。

(3) 改良型口蓋突起回転浮遊培養法

胎齢 14 日のマウス胎児から癒合前の口蓋突起を対にしたままで切り出し、MMP 阻害剤添加培地で 48 時間、回転浮遊培養を行った。培養前と培養後の口蓋突起を試料にして MEE 細胞の変化を組織学的に解析した。

(4) 顔面突起回転浮遊培養法

顔面突起が現れて、それらが相互に癒合する前の胎齢 10 日のマウス胎児から顔面突起を含めた頭部を切り出し、マトリゲル™に包埋して MMP 阻害剤添加培地で 48 時間、回転浮遊培養を行った。培養後の試料を組織学的に解析した。(下図に顔面突起の培養試料作製の概略を示す)

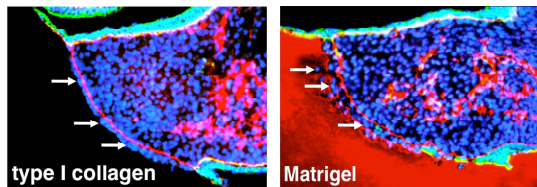


4. 研究成果

研究代表者らが 2004 年に発表した単一口蓋突起回転浮遊培養法 (Takigawa T. and Shiota K., 2004) により、交雑系野生型マウスと近交系野生型マウスとでは MEE 細胞の最終分化能力、特に上皮-間葉形質転換する能力が根本的に異なっていることが示唆されていたが、従来の方法では証明することが不可能であった。しかし、当該研究により新規 *in vitro* 解析システムの開発に成功し、それらを用いて以下の研究成果が得られた。

(1) MEE 細胞の上皮-間葉形質転換能力の証明

今なお論争が続く MEE 細胞の上皮-間葉形質転換能力の有無に関して、当該研究で開発した新規解析システムによって MEE 細胞が上皮-間葉形質転換能力をもつことを明らかにした。(下図に研究結果の一部を示す)

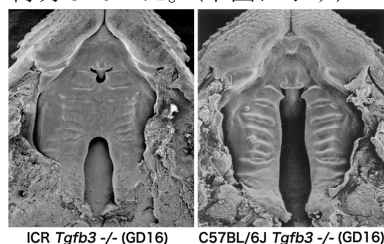


〔図の説明〕左図はI型コラーゲンゲル包埋による単一口蓋突起回転浮遊培養法、右図はマトリゲル™包埋による単一口蓋突起回転浮遊培養法で証明したICRマウス胎児のMEE細胞の上皮-間葉形質転換能力である。図中の緑色蛍光は上皮細胞マーカーのサイトケラチン、赤色蛍光は基底膜マーカーのIV型コラーゲンに対する免疫染色像である。青色蛍光はヘキストによる細胞核の対比染色を示す。矢印で示す細胞が上皮-間葉形質転換したMEE細胞である。

本解析システムではMMP阻害剤を用いてMEE細胞の上皮下基底膜の分解を抑制している。子宮内で起こる口蓋突起癒合過程ではMEE細胞の多くはアポトーシスを起こすことが知られている。しかし、プログラム細胞死の典型例として遺伝学的に死ぬ運命であると信じられてきたMEE細胞のアポトーシスが、実際にはMEE細胞直下の基底膜が分解する際に、偶発的な細胞死であるアノイキス（足場依存性細胞が生存のための足場を失ってアポトーシスを起こす現象）を引き起こしていたこと、およびMEE細胞が真に上皮-間葉形質転換能力をもつことが当該研究により初めて証明された。

(2) 口蓋裂発症モデルマウスであるTGFβ3遺伝子欠損マウスの口蓋裂発症メカニズムの解明

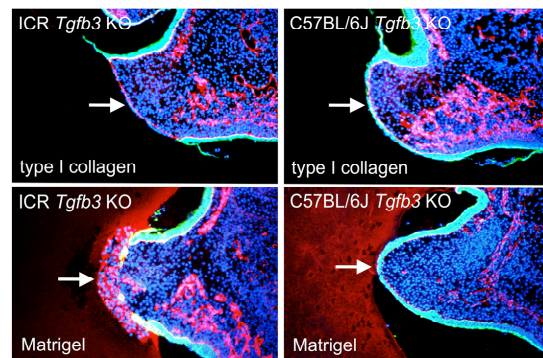
TGFβ3遺伝子欠損マウスのホモ胎児（以下、*Tgfb3* KOと略す）は口蓋裂発症頻度が100%であり、ヒト口蓋裂発症のモデルマウスとして世界中で最も口蓋裂発症研究に使用されてきたが、その口蓋裂表現型にマウス系統差が存在することはほとんど無視されてきた。研究代表者らはこれまでに同マウスをクローズドコロニーのICR系統と近交系のC57BL/6J系統の全く由来が異なる2系統に過去8年にわたって25世代以上戻し交配を行い、それぞれ100匹以上のホモ胎児の口蓋裂表現型を調査した。その結果、同じ遺伝子異常を有するにも関わらず、ICR系統では不完全口蓋裂のみを呈するのに対して、C57BL/6J系統では完全口蓋裂のみを呈することが判明していた。（下図に示す）



ICR *Tgfb3* -/- (GD16) C57BL/6J *Tgfb3* -/- (GD16)

両マウス系統間にみられる*Tgfb3* KOの口蓋裂表現型の差異はその遺伝的背景に隠されている修飾因子との相乗作用に起因することは容易に想像されるものの、実際に両系統間のマウス口蓋組織の発生学的な差異は未解明のままであった。

そこで、研究代表者らは当該研究により開発した新規*in vitro*解析システムを用いて*Tgfb3* KOの口蓋裂表現型のマウス系統差とMEE細胞の上皮-間葉形質転換能力との関係を調査した。その結果、ICR系統*Tgfb3* KOでは子宮内で口蓋突起が部分的に癒合する部位に限定してMEE細胞は上皮-間葉形質転換を起こすことが明らかとなった。一方、C57BL/6J系統*Tgfb3* KOのMEE細胞はいかなる部位でも上皮-間葉形質転換する能力をもっていないことが判明し、それぞれの*Tgfb3* KOが子宮内で示す口蓋裂表現型の差異と密接に相関していた。したがって、口蓋突起の癒合にMEE細胞の上皮-間葉形質転換能力が必要不可欠であることが証明された。（下図に研究結果の一部を示す）



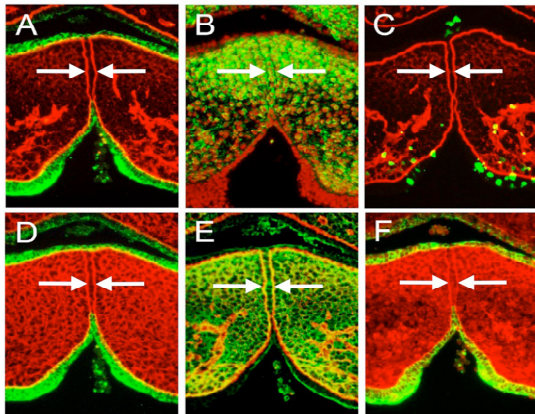
〔図の説明〕図はゲル包埋してMMP阻害剤添加培地で48時間培養後の*Tgfb3* KOの単一口蓋突起の組織像である。左列はICR系統、右列はC57BL/6J系統の*Tgfb3* KOの単一口蓋突起組織像を示す。上段はI型コラーゲンゲル、下段はマトリゲルに包埋して培養したものである。図中の緑色蛍光は上皮細胞マーカーのサイトケラチン、赤色蛍光は基底膜マーカーのIV型コラーゲンに対する免疫染色像である。青色蛍光はヘキストによる細胞核の対比染色を示す。矢印で示すMEE細胞は、ICR系統ではI型コラーゲンゲル包埋とマトリゲル包埋の両群で上皮-間葉形質転換しており、特にマトリゲル包埋群では形質転換したMEE細胞のマトリゲル内への浸潤が認められる。一方、C57BL/6J系統ではI型コラーゲンゲル包埋、マトリゲル包埋ともにMEE細胞の上皮-間葉形質転換は認められない。

以上の研究成果から、当該研究により開発した新規*in vitro*解析システムが正常口蓋形成機構および口蓋裂発症機序の解明にきわめて有用であることが実証された。

(3) 改良型口蓋突起回転浮遊培養法による

口蓋突起癒合における MEE 細胞の上皮性縫合形成の意義の解明

当該研究で開発した新規 *in vitro* 解析システムの研究結果から、口蓋突起の MEE 細胞は相対する口蓋突起と接触して上皮性縫合を形成しなくても上皮-間葉形質転換することができることが判明した。しかし、子宮内で起こる口蓋突起癒合過程では上皮性縫合が形成されない場合は決して MEE 細胞の消失が起こらないことも既知の事実である。研究代表者らは、その理由として上皮性縫合が形成されない場合は、子宮内環境因子である羊水が MEE 細胞の最終分化を抑制していることを報告している (Takigawa T. and Shiota K., 2006)。当該研究で得た知見に基づいて、さらに上皮性縫合形成の意義を調査した。その結果、上皮-間葉形質転換し始めた MEE 細胞は間葉特異的細胞外マトリックスである I 型コラーゲン、フィブロネクチン、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンなどを産生し、それらが上皮性縫合内に蓄積することによって上皮性縫合内の細胞外環境を間葉タイプに変化させて MEE 細胞自身の上皮-間葉形質転換を促進していることが判明した。(下図に研究結果の一部を示す)



[図の説明] A から E はすべて ICR 系統 *Tgfb3* KO の癒合前の口蓋突起を対のまま、MMP 阻害剤添加培地で 48 時間培養し、連続切片で組織学的に解析を行った結果である。口蓋突起の上皮性縫合を矢印で示す。A は上皮細胞のサイトケラチン (緑色) と基底膜の IV 型コラーゲン (赤色) の 2 重免疫染色を示す。B は間葉細胞マーカーであるビメンチン (緑色) と細胞核の対比染色 (赤色) を示す。C は TUNEL 法によるアポトーシスを起こした細胞 (緑色) と基底膜の IV 型コラーゲン (赤色) の 2 重染色を示す。D はサイトケラチン (緑色) と I 型コラーゲン (赤色) の 2 重染色を示す。E はコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (緑色) と基底膜のラミニン (赤色) を示す。F はサイトケラチン (緑色) とフィブロネクチン (赤色) を示す。

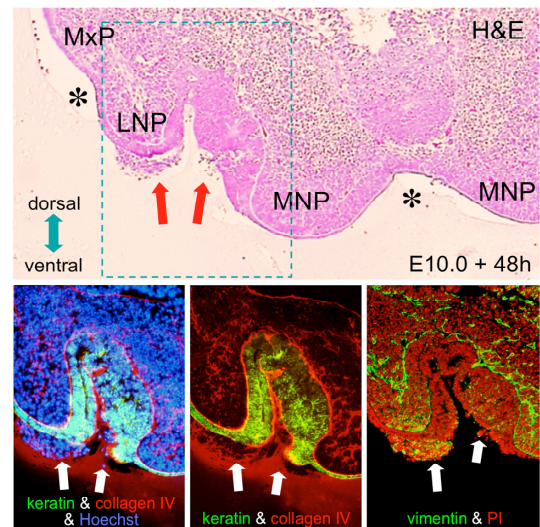
上図のように、MMP 阻害剤により基底膜の分解を抑制した上皮性縫合の内部で、MEE

細胞はアノイキスをほとんど起こすことなく、効率的に上皮-間葉形質転換している。そして上皮性縫合内に間葉系細胞外マトリックスである I 型コラーゲン、フィブロネクチン、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンが蓄積している所見は、単一口蓋突起の MEE 細胞が I 型コラーゲンゲルやマトリゲルに接している場合に上皮-間葉形質転換することができるという上述の研究結果と合わせて、間葉特異的細胞外マトリックスが MEE 細胞の上皮-間葉形質転換を促進していることを実証している。

以上に示したとおり、当該研究で開発した新規 *in vitro* 解析システムが癒合部上皮の上皮-間葉形質転換を起こす能力を明瞭に診断できるきわめて有用な手法であることが判明したため、研究代表者らはこの新規解析システムをさらに発展させることによって、以下の研究成果も得ることができた。

(3) 顔面形態形成における顔面突起癒合メカニズムの解明

顎・顔面の形態形成過程で顔面突起の癒合が起こることは知られているが、各顔面突起の間で起こる癒合現象の異種性はほとんど解明されていない領域であった。当該研究により開発した新規解析システムは、口蓋突起の癒合の他にも、顔面形態形成における顔面突起の癒合現象の異種性を解明するためにきわめて効果的な研究手法であることを見いだした。顔面突起の癒合の場合、これまで‘真の癒合 (actual fusion)’と‘見かけ上の癒合 (ostensible fusion)’との差異が明確に区別されてこなかったが、癒合前の顔面突起をマトリゲル™に包埋して 48 時間、回転浮遊培養することにより、‘真の癒合 (actual fusion)’を起こす顔面突起の癒合予定域の上皮細胞は上皮-間葉形質転換能力をもつが、見かけ上の癒合 (ostensible fusion)’を起こす顔面突起の癒合部上皮細胞には上皮-間葉形質転換する能力がないことが判明した。(下図に研究結果の一部を示す)



〔図の説明〕上段は培養後のマウス胚子の頭部水平断切片のヘマトキシリン・エオジン染色像である。下段は上段の隣接切片で、内側鼻突起(MNP)と外側鼻突起(LNP)との癒合部の拡大像である。下段の左図はサイトケラチン(緑)、IV型コラーゲン(赤)、細胞核のヘキスト染色(青)を3重染色像で示す。中図は隣接切片のサイトケラチン(緑)とIV型コラーゲン(赤)の2重染色像である。右図は間葉系細胞マーカーであるビメンチン(緑)と核の対比染色(赤)の2重染色像である。矢印で内側鼻突起と外側鼻突起との癒合部の上皮-間葉形質転換した細胞を示す。アスタリスクで示すように、外側鼻突起と上顎突起(MxP)との癒合部上皮、および左右の内側鼻突起同士の癒合部上皮では上皮-間葉形質転換した細胞が認められない。

これらの各顔面突起間で癒合部上皮の上皮-間葉形質転換能力が根本的に異なっている解析結果は、ヒトのさまざまな顔面の裂奇形の発症頻度が顔面突起の癒合部位により大きく異なる事実と密接に関連しており、上皮-間葉形質転換能力を必要とする‘真の癒合(actual fusion)’を起こす部位で裂奇形が発症しやすいことが初めて実証された。

これら当該研究により開発された新規 *in vitro* 解析システムは実験動物の系統差、個体差によらず、口蓋形成機構および顔面形態形成機構を解明するためのきわめて有力な研究手法に発展すると予想される。さらに当該研究成果は口蓋突起癒合部や顔面突起癒合部の上皮細胞が起こす上皮-間葉形質転換の重要性の理解を深めて、今後のヒト口蓋裂や顔面裂の発症メカニズムの解明にも大きく貢献する波及効果が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

① 顎・顔面形態形成における癒合現象の異種性と口蓋突起の癒合における上皮細胞の分化. 滝川俊也, 顕微鏡. 第4巻4号:275-279. (2009). 査読有り.

② Cleft palate caused by perfluorooctane sulfonate is caused mainly by extrinsic factors. Era S., Harada KH., Toyoshima M., Inoue K., Minata M., Saito N., Takigawa T., Shiota K., Koizumi A. Toxicology. Vol.256:42-47. (2009). 査読有り.

〔学会発表〕(計7件)

① ヒト胎児標本を用いた口蓋縫合部上皮真珠の発生および発育に関する組織学的研究: ヒト口蓋突起内側縁上皮細胞の上皮-間

葉形質転換と間葉-上皮形質転換について. 滝川俊也 (代表), 明坂年隆, 塩田浩平. 第114回日本解剖学会全国学術集会. 2009年3月28日. 岡山市.

② ヒト胎児標本を用いたエプスタイン上皮真珠の発生に関する組織学的研究 ヒト口蓋突起内側縁上皮細胞の上皮-間葉形質転換と間葉-上皮形質転換について. 滝川俊也 (代表), 明坂年隆, 塩田浩平. 日本解剖学会中部地方会. 2008年10月11日. 名古屋市.

③ マウス胚仔の顎顔面形態形成: 特に顔面突起の fusion と merging の差異について. 滝川俊也 (代表), 塩田浩平. 第113回日本解剖学会全国学術集会. 2008年3月28日. 大分県由布市.

④ TGF β 3 遺伝子欠損マウスの口蓋裂表現型の系統差は *in vitro* における各系統マウスの口蓋突起内側縁上皮細胞の最終分化能力と相関する. 滝川俊也 (代表). 第49回歯科基礎医学会. 2007年8月29日. 札幌市.

⑤ 器官形成期早期のエタノール暴露により誘発される全前脳胞症マウス胚の解析. 東山太輔, 才津浩智, 滝川俊也, 石橋誠, 塩田浩平. 第112回日本解剖学会全国学術集会. 2007年3月28日. 大阪市.

⑥ 新規 *in vitro* 解析システムを用いた正常口蓋形成機構および口蓋裂発症機序解明への新たな挑戦. 滝川俊也 (代表). 第112回日本解剖学会全国学術集会. 2007年3月27日. 大阪市.

⑦ 羊水はマウス胎児の実験的破裂口蓋における創傷治癒を促進する. 滝川俊也. 第48回歯科基礎医学会. 2006年9月21日. 横浜市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

滝川 俊也・朝日大学・歯学部・講師
研究者番号 90263095

(2) 研究分担者

塩田 浩平・京都大学・医学研究科・教授
研究者番号 80109529

(平成18年度~平成20年度7月まで)

※研究代表者の所属研究機関の移動に伴い、平成20年8月より研究分担者を辞退する。

(3) 連携研究者

なし