

Title	マウス二次口蓋における口蓋突起癒合時のmedial edge epithelial cellの動態
Author(s)	青山, 剛三
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/70704
rights	This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY).
Note	

### The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

## 学位論文

# マウス二次口蓋における口蓋突起癒合時の medial edge epithelial cell の動態

歯学研究科 口腔科学専攻 口腔分化発育情報学講座 (顎顔面口腔矯正学教室) 青山 剛三

### 緒言

口唇口蓋裂は、ヒトにおける顎顔面形成不全の中でも最も多く認められる先天性疾患の1つであり、統計学的に500~1000人に1人の割合で発症することが報告されている1~3。口唇口蓋裂は言語・咀嚼・嚥下障害や顎顔面の形態異常により、患者の生活の質に大きな影響を与える。その改善には長期にわたる継続的な治療と複数回の手術が必要である。口唇口蓋裂発症のメカニズムは古くから研究されているが、未解明な部分も多く、口唇口蓋裂発症の予防や口蓋裂の診断技術の開発・向上のためにさらなる基礎研究の遂行が必要である。

口蓋は、切歯孔より前方の一次口蓋と、切歯孔より後方の二次口蓋から構成されるも。二次口蓋の形成は、ヒトでは妊娠6週、近交系実験マウスでは胎生11.5日頃に、上顎突起から発生した口蓋突起が伸長することにより開始する5。まず両側の口蓋突起は舌の側方において下方向に成長する。その後、下顎の垂直的な成長により舌の位置は低位になり、それに伴い口蓋突起が持ち上がるように上昇し舌の上方で水平に位置する。両側の口蓋突起は正中で互いに接触し、接触した部位の突起被覆上皮が消失することで口蓋突起は癒合する。口蓋突起の先端には、周囲の口蓋上皮細胞とは区別された medial edge epithelial cell (MEE 細胞)と呼ばれる上皮細胞が認められ、口蓋突起が接触することで形成された多層構造の MEE 細胞層は、正中上皮素(midline edge epithelial seam:MES)と呼ばれる1層の細胞層となる。さらに時間の経過とともに MES が完全に消失することで、口蓋突起の癒合が完了し、二次口蓋が形成される6。これら一連の過程はヒトでは妊娠12週、近交系実験マウスでは胎生16.0日頃に完了する。

口蓋裂は口蓋突起の成長障害や癒合不全など、形成過程に障害が起きることで発生する。さらに、口蓋 の形成は頭蓋顔面領域の成長と同時に起こるので、舌および下顎のような口蓋突起周囲組織の構造異常 により、口蓋突起の正常な形態形成が障害され、口蓋裂が生じることも明らかとなっている 7~9。

上述の口蓋突起の癒合過程における MEE 細胞消失メカニズムについては、これまで広範に研究されており、上皮細胞の移動 <sup>10~12</sup>、アポトーシス <sup>12</sup>、上皮間葉形質転換(epithelial-mesenchymal transformation: EMT) <sup>13,14</sup>などのいくつかの仮説が存在する。

上皮細胞の移動を支持する実験的根拠として、Carette らは、DiI 染色法を用いて蛍光細胞標識した口蓋突起の器官培養を行った結果、癒合完了後に MEE 細胞が、口蓋突起の鼻腔側および口蓋側に移動することを示した <sup>10</sup>。また、Jin らは、全身にて 8-galactosidase(8-gal)を発現するマウス(*Rosa26-LacZ*マウス) <sup>15,16</sup>を使用して、同マウスの口蓋突起と野生型マウスの口蓋突起とを半側ずつ接触させ、器官培養を行った。その結果、*Rosa26-LacZ*マウス由来の MEE 細胞が口腔鼻腔側方向および前後軸方向に移動することを示した <sup>11</sup>。また、Cuervo らは、細胞移動阻害剤である cytochalasin D を培養液中に添加し、二次口蓋の器官培養を行った結果、MEE 細胞の消失が不完全になることを示した <sup>12</sup>。以上のことより、二次口蓋の形成過程における MEE 細胞の消失に、上皮細胞の移動が関与することが示唆されている。

次に、アポトーシスを支持する実験的根拠として、Cuervoらは、マウス胎児の二次口蓋の形成過程におけるアポトーシスを TdT-mediated dUTP biotin nick end labelling 法(TUNEL 染色法)を用いて検出した結果、部分的に消失している MES に TUNEL 陽性細胞が存在することを示した <sup>12</sup>。また、Vaziriらは、上皮特異的に 8-gal を発現するマウス(*K14-Cre;R26R*) <sup>17,18</sup> を使用し免疫染色法を用いた結果、口蓋突起癒合時の MEE 細胞のアポトーシスに必須の Caspase 3 陽性細胞が存在することを示した <sup>19</sup>。さらに、Cuervoらは、Caspase 阻害剤である Z-VAD を培養液中に添加し、二次口蓋の器官培養を行った

結果、MEE 細胞が消失せず、口蓋突起が癒合しないことを示した 12。以上のことより、MEE 細胞の消失にアポトーシスが必要であることが明らかとなった。また、マウスの口蓋突起癒合後の、鼻腔側ならびに口腔側上皮トライアングル領域に核クロマチンの凝集、核濃縮といったアポトーシス様の変化やTUNEL 陽性細胞が検出されたことから、アポトーシスが MEE 細胞の消失の要因の一つであることが示唆されている 12,20。

最後に EMT を支持する実験的根拠として、Shuler らは、口蓋突起の上皮細胞を特異的に 5-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) を用いて蛍光標識し、二次口蓋の器官培養を行った。その結果、口蓋突起癒合完了後の間葉組織中に CFSE 陽性細胞が存在することが確認された 14。また、Jin らによって行われた、K14-Cre;R26R マウスを使用した二次口蓋の器官培養を行った実験においても、X-gal 分解産物により標識された上皮細胞が口蓋突起癒合後の間葉組織中に存在することが確認されている 11,19。以上のことより、二次口蓋の形成過程で MEE 細胞が EMT により間葉細胞に形質転換し、消失することが示唆されている。

最近の報告では Kim らは、上皮特異的に green fluorescent protein(GFP)を発現するマウス(K14-Cre;R26RmtmG)21を用いてライブイメージング観察を行うことで、口蓋突起癒合中の MEE 細胞の挙動を明らかにした22,23。アクトミオシンの収縮力により口蓋突起の上皮細胞が癒合部に移動し、1層の MESを形成することや、その後、MES の細胞がアクチンケーブルを介して口腔側あるいは鼻腔側に押し出されるように移動し MES が消失することが明らかとなった。これらは、MEE 細胞の挙動をリアルタイムで観察した初めての報告であり、二次口蓋の形成過程における今までにない重要な知見である。ただしこの報告では、口蓋突起癒合部を口腔側から共焦点レーザー走査型顕微鏡により観察しているため表層

から約 100 μm の深度での観察が限界であった。突起の辺縁全域における MEE 細胞の挙動の解明には さらなる研究が必要であると考えられる。

一方、過去の報告において、マウス胎仔の口蓋突起の 1 対のうち半側のみを器官培養(口蓋突起半側除去器官培養)した結果、口蓋突起の内側縁上皮が消失し、間葉細胞が表出することを確認している <sup>24,25</sup>。 このことから、口蓋突起半側除去器官培養における MEE 細胞の挙動が *in vivo* の状態を反映していることを強く示唆している。

そこで、本研究では、口蓋突起半側除去器官培養と MEE 細胞を含む上皮細胞特異的に GFP を発現するマウスを組み合わせることにより、発生中の二次口蓋のライブイメージングを行い、MEE 細胞の挙動を詳細に解析することを目的とした。

### 実験方法

#### ① 実験動物

使用実験動物は、本学歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座 宇佐美 悠博士より譲渡された cytokeratin 14 (K14)・GFP 遺伝子改変雄性マウスと、生後 8 週齢の C57BL/6J 系統野生型雌性マウス (日本クレア社)を交配させ、その胎仔を対象とした。K14・GFP マウスは Vaezi.A らの報告 26 に従い、K14 プロモーターの下流にエンハンサーとして β・globin のイントロンを、蛍光物質として EGFP 蛍光タンパクをコードする遺伝子を挿入して作製された(図 1・A)。本研究は、大阪大学動物実験委員会および大阪大学遺伝子組み換え実験委員会の承認を得て行った(動物実験承認番号:動歯・26・017・0、遺伝子組み換え実験承認番号:3310)。

#### ② 妊娠判定

すべての実験動物は 12 時間ずつの明暗期周期にて飼育し、雌性マウスの膣栓を観察し、交配の成立と判定した。妊娠成立の時刻は判定日の午前 0 時を胎齢 0 日 0 時間とした。

#### ③ 口蓋突起半側培養

本研究は口蓋組織の培養により、二次口蓋形成時の MEE 細胞消失過程を経時的に観察する目的から、左右口蓋棚の水平転位が認められ、左右の口蓋突起が接触する以前の胎仔を対象とした(図 2-A 左)。胎生 14.0 日齢(E14.0)の胎仔を摘出後、0.1 M PBS(和光純薬工業株式会社)で洗浄し、BGJb (Life technologies 社)中に浸漬させた。目的の日齢の胎仔についても同様に施行した。

実体顕微鏡 (SZ6045TR-CVT, オリンパス社) 下で口蓋を摘出し、口裂および眼裂の位置で平行な水平切開を加え、脳、舌および下顎を除去後、上顎部分を切り出し、口蓋を摘出した。口蓋突起基部

を前方部から後方部にかけて切除し、左右の口蓋突起を半側ずつ摘出した(図 2-A 中央)。

培養環境として  $100 \, \mu g/ml$  のストレプトマイシン(SIGMA-ALDRICH 社)を添加した BGJb 培地  $500 \, \mu l$  にアガロース(和光純薬工業株式会社)を添加し、0.6%アガロース添加 BGJb 培養液を作成した。ガラスボトムディッシュ(松浪硝子工業株式会社)の底面に、半側の口蓋突起内側縁上皮もしくは口蓋突起口腔側を設置し、37%、 $5\%CO_2$ 下で 20 時間培養を行った(図 2-A 右)。

#### ④ 観察方法

#### 1) 口蓋突起の経時的観察

E14.0、E14.5、E15.0、E15.5の K14-GFP マウスの二次口蓋および口蓋突起内側縁上皮の観察を行った。観察は蛍光顕微鏡(BZ X-700, Keyence 社)を用いて行った。GFP 緑色蛍光発現観察のために、GFP 蛍光フィルタ(透過波長帯域 450-490 nm の励起フィルタ、透過波長帯域 500-550 nm の吸収フィルタ、495 nm 以下の波長帯を反射、495 nm 以上の波長帯を透過するダイクロイックミラー)を用い、DAPI 青色蛍光発現観察のために、DAPI 蛍光フィルタ(透過波長帯域340-380 nm の励起フィルタ、透過波長帯域435-485 nm の吸収フィルタ、400 nm 以下の波長帯を反射、400 nm 以上の波長帯を透過するダイクロイックミラー)を用いた。

#### 2) 培養口蓋突起の経時的観察

E14.0 の K14-GFP マウスの口蓋突起を摘出し、口蓋突起半側培養を行った。培養時間は 12 時間、20 時間に設定した。口蓋突起内側縁上皮もしくは口蓋突起口腔側口蓋上皮の観察は上記の蛍光顕微鏡を使用した。発育が停止し、蛍光性が失われた個体は除外した。対物レンズ 4 倍率 (plan Fluor NA0.13)、前述した GFP 蛍光フィルタを用いて撮影を行った。

#### 3) 培養口蓋突起のライブイメージング観察

E14.0 の K14-GFP マウスの口蓋突起を摘出時から上記の蛍光顕微鏡を使用し、タイムラプス撮影を行った。対物レンズ 10 倍率(plan Apo NA0.45)、10 分間隔で 20 時間、GFP 蛍光フィルタを用いて撮影を行った。表層から 456  $\mu$ m の範囲について、8.0  $\mu$ m の Z-stack ごとに 57 フレームの撮影を行った。KEYENCE BZ-II 画像解析ソフトウェアを用いて、1 回で撮影した 57 枚の Z-stack 画像から全焦点画像を構築し、時間ごとの連続した全焦点画像から AVI 形式動画ファイル(960×320 ピクセル)を作成した。

次に、新たな E14.0 の K14-GFP マウスの口蓋突起半側培養を行った。培養時間の経過とともに MEE 細胞の移動が認められる領域(GFP 消失予定領域)を事前に確認し、その部位に焦点を当てて、培養開始 12 時間後から対物レンズ 20 倍率(plan Apo NA0.75)、10 分間隔で 8 時間(培養開始 12 時間~20 時間まで)タイムラプス撮影を行った。表層から 228 μm の範囲について、6.0 μm の Z-stack ごとに 38 フレームの撮影を行った。同様に KEYENCE BZ-II 画像解析ソフトウェアを用いて、AVI 形式動画ファイル(1920×1440 ピクセル)を作成した。

#### ⑤ 動画解析

実験④ - 3)で得られた対物レンズ 20 倍率で撮影したライブイメージング動画を、Adobe Photoshop Creative Cloud 2017 (アドビシステムズ社)を使用して解析した。AVI 形式動画ファイル (1920×1440 ピクセル) は mp4 ファイルに(1920×1440 ピクセル 48 フレーム)に変換して解析を行った。

#### 1) 細胞数の計測

ライブイメージ観察像から細胞の挙動を詳細に観察するために、MEE 細胞移動後の領域について 200 μm 四方の観察範囲を選択し、分析を行った。このうち観察視野内で GFP の発現が消失する領域から外側に大きく移動する細胞を Type 1 細胞、観察時間内に GFP の発現が消失する細胞を Type 2 細胞、8 時間観察後も GFP の発現を維持しとどまって残っていた細胞を Type 3 細胞として規定し、それぞれのタイプの細胞数を計測した。4 個体について細胞数を計測し、統計学的に解析した。

選択した領域に存在する全体の細胞数を規定するため、別個体の半側培養 12 時間後の口蓋突起を 4%パラホルムアルデヒド (以下 4%PFA) で固定し、DAPI 染色を行った。MEE 細胞移動後の領域と同一部位で、200 μm 四方の領域を選択し、DAPI 染色で陽性反応を示し、かつ GFP を発現する細胞数を算出し、3 個体の細胞数の平均を算出した。

#### 2) 移動距離の計測

Type 1 細胞、Type 2 細胞および Type 3 細胞を無作為に各々30 個選択した。Type 1 細胞は黄丸、Type 2 細胞は赤丸、Type 3 細胞は青丸で示した。ライブイメージング観察を行った開始時の位置と終了時の位置までの直線の移動距離と軌跡の総距離を測定した。軌跡の総距離は、タイムラプス撮影された連続画像すべてで同じ細胞の中心点の移動を計測した。Type 1 細胞の軌跡は黄色、Type 2 細胞の軌跡は赤色、Type 3 細胞の軌跡は青色で示した。Type 2 細胞では、GFP の発現が消失する直前の状態を桃色で示した。直線の移動距離は白点線で示した。

#### ⑥ アポトーシスの検出

アポトーシスの検出は TUNEL 染色法を用いた。Whole mount 染色では、12 時間培養後の口蓋

突起を 4%PFA にて 4℃で 24 時間固定後、In Situ Cell Detection Kit (SIGMA-ALDRICH 社)を用いて TUNEL 染色を行った。ガラスボトムディッシュの底面に半側の口蓋突起内側縁上皮を配置し、0.6%アガロース添加 PBS 液にて組織を固定し、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (TCS SP-8, Leica 社)を用いて観察を行った。

凍結切片の作成用の組織は、培養後の口蓋突起を上記に従い固定後、10%、20%、30%スクロース/0.1 M PBS 溶液(pH7.4)の順で浸漬した。凍結包埋は Tissue-Tek Oct compound(サクラファインテックジャパン社)を用いて行い、実験に使用するまで、-30%で暗所にて保管した。クリオスタット(CM1950, Leica 社)を用いて  $10\,\mu m$  の連続切片を前頭断にて作成した。上記の TUNEL 染色を行い、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察を行った。

#### ⑦ Rho kinase シグナル阻害剤による細胞移動阻害作用の検討

Rho kinase シグナル阻害剤である Y27632 dihydrochloride 50  $\mu$ M (SIGMA-ALDRICH 社)をアガロース添加 BGJb 培養液に添加して、実験③と同様の条件下で器官培養を行い、実験④ - 2)と同様に、口蓋突起内側縁上皮の経時的な観察を行った。次に、実験④ - 3)と同様の条件で対物レンズ 20 倍率にてタイムラプス撮影を行った。表層から 205  $\mu$ m の範囲について、5.0  $\mu$ m の  $\mathbb{Z}$ -stack ごとに 41 フレームの撮影を行った。同様に KEYENCE BZ-II 画像解析ソフトウェアを用いて、AVI 形式動画ファイル(1920×1440 ピクセル)を作成した。。

また、実験群の Type 2 細胞(74 細胞)の直線移動距離および軌跡の総距離と実験⑤ - 2)の群における Type 1 細胞、Type 2 細胞および Type 3 細胞(合計 90 細胞)の直線移動距離および軌跡の総距離との比較を行った。

### ⑧ 統計処理

すべての実験は 3 回以上行った。平均値および標準誤差をグラフに示した。 スチューデントの t 検定を用いて 2 つの群の有意差を検討した。 p < 0.05 を有意差ありとした。

### 研究結果

#### 1. K14-GFP マウスロ蓋突起の経時的観察

E14.0 の口蓋では、左右の口蓋突起は接触していなかった(図 1-B)。口蓋の前頭断の切片では左右の口蓋突起が水平に位置していた(図 1-J)。半側切除した口蓋突起内側縁上皮は全域に GFP が発現していた(図 1-F)。

E14.5 の口蓋では、第 2 から第 3 口蓋ヒダにかけて口蓋突起の接触が観察された(図 1-C 赤矢頭)。前頭断組織切片では両側の口蓋突起が接触し、上皮性縫合を形成し、MES が形成されていた(図 1-K 白矢頭)。半側切除した口蓋突起内側縁上皮は白点線で囲まれた領域において、GFP の発現が消失していた(図 1-G)。

E15.0 の口蓋では、口蓋突起が接触している領域は E14.5 の口蓋と比較して、前後方向に拡大していた (図 1-D)。前頭断組織切片では癒合部の MES は部分的に消失していた (図 1-L 黄矢頭)。半側切除した口蓋突起内側縁上皮においても GFP が消失している領域は E14.5 の口蓋と比較し、前後方向に拡大していた (図 1-H)。これらのことより、 $in\ vivo$  における MES の消失と等しく、GFP の消失が観察されたことから、本研究に用いた K14-GFP マウスは MEE 細胞にも GFP を発現していることが示された。

E15.5 の口蓋では、口蓋突起が癒合面全域で接触していた(図 1-E)。前頭断組織切片では MES がさらに消失し、点在する上皮遺残物として存在していた(図 1-M)。また、間葉細胞の合流が認められた。 半側切除した口蓋突起内側縁上皮においても GFP が消失している領域が癒合面全域に拡大していた(図 1-I)。

#### 2. K14-GFP マウス培養口蓋突起の経時的観察

前述の実験で認められた口蓋突起癒合部位における GFP 消失時の MEE 細胞の動態を詳細に解析する ために、E14.0 の K14-GFP マウスの口蓋突起半側培養を 20 時間行った(図 2-A)。口蓋突起の内側縁上 皮および口腔側口蓋上皮の経時的観察を行った。

摘出直後の口蓋突起内側縁上皮および口蓋突起口腔側口蓋上皮は全域に GFP が発現していた (図 2-B,E)

培養開始 12 時間後の口蓋突起内側縁上皮は前方部および後方部にそれぞれ独立した 2 つの GFP 発現消失領域が出現した (図 2-C)。口腔側口蓋上皮は摘出時と比較して差異は認められなかった (図 2-F)。接触側は第 2 から第 3 口蓋ヒダに相当する領域で GFP の発現が消失していた。

培養開始 20 時間後の口蓋突起内側縁上皮では、GFP 消失領域が前後方向に拡大していた(図 2-D)。 過去の結果においても、口蓋突起半側除去培養開始 12 時間後に内側縁上皮が消失する領域が出現し、培養開始 24 時間後では、内側縁上皮が消失する領域が前後方向に拡大し、間葉細胞との明瞭な境界を認めた 24。本結果は過去の研究結果と同様の傾向が認められた。それに対して口腔側口蓋上皮は培養開始 12 時間後においても摘出直後と比較して GFP の発現領域に差異は認められなかった(図 2-G)。接触側では、GFP 消失領域は前後方に拡大していた(図 2-E,F,G)。これらの結果から、培養開始 12 時間後および 20 時間後の内側縁上皮において、E14.5 以降の接触が認められた口蓋突起内側縁上皮(図 1-G,H,I)と相当する部位で同様に GFP の発現が消失し、また時間の経過とともにその領域が前後方向に拡大したことから、本研究で認められた GFP の発現の消失が MEE 細胞の消失と深く関与していることが示唆された。

#### 3. K14-GFP マウス培養口蓋突起の内側縁上皮全域のライブイメージング観察

二次口蓋の形成過程における口蓋突起内側縁上皮の MEE 細胞の動態をリアルタイムで観察するために、蛍光顕微鏡タイムラプス撮影機能を用いてライブイメージング観察を行った。

E14.0 の K14-GFP マウスの口蓋突起半側培養を行い、培養開始時から 20 時間ライブイメージング観察を行った。観察には対物レンズ 10 倍率を用いた。

ライブイメージング観察開始から 8 時間は観察視野内の全域に GFP が発現していた (図 3·A,B,C)。 観察開始 10 時間後から、前方部および後方部にそれぞれが独立した 2 つの GFP 発現消失領域が出現した (図 3·D 赤矢頭)。また、GFP 発現領域と消失領域の境界を取り囲むように GFP の蛍光強度が高い帯状の領域が観察された (図 3·D 白矢頭)。観察開始 14 時間後にかけて、2 つの GFP 消失領域は経時的に前後方向に拡大し拡大した (図 3·D,E,F)。また GFP 消失領域内では島状の細胞集団が観察された (図 3·F 黄矢頭)。観察開始 16 時間後には 2 つの消失領域が 1 つに連続し (図 3·G)、20 時間後には観察視野内の内側縁上皮全域で GFP の発現は消失した (図 3·H)。その間、消失領域周囲にみられた帯状の高 GFP 発現領域は、絶えず放射状に拡大した。この帯状の高 GFP 発現領域が拡大していく過程において、帯状に集積した上皮細胞の連続的な移動が観察された。しかし、帯状の高 GFP 発現領域よりもさらに外層の口腔側および鼻腔側に存在する上皮細胞の連続的な移動は観察されなかった。これらの結果から、GFP 消失領域の拡大には、上皮細胞の移動が関与していることが示唆された。

- 4. K14-GFP マウス培養口蓋突起のライブイメージング観察および動画解析
- 1) ライブイメージング観察像における細胞の動態の解析

E14.0 の K14-GFP マウスの口蓋突起半側培養を 12 時間行った。白点線で示した領域において GFP の発現が消失していた (図 4-A)。GFP 消失領域が拡大する一連の過程における GFP 陽性細胞の挙動を 観察するために、黄点線で示した GFP 消失予定領域に焦点をあて 8 時間ライブイメージング観察を行った。観察には対物レンズ 20 倍率を用いた。

ライブイメージング観察開始時(培養開始 12 時間後)は観察視野内全体に GFP が発現していた(図 4-B)。培養開始 14 時間後から、経時的に GFP 陽性細胞が口腔側と鼻腔側の両方向に移動し、GFP 消失領域が観察された(図 4-C)。培養開始 16 時間後から移動する陽性細胞とは別に視野内中央部に島状の細胞集団を形成する細胞が存在していた(図 4-D)。培養開始 20 時間後では GFP 消失領域は拡大し、その領域内で点在する GFP 陽性細胞が観察された(図 4-E)。

ライブイメージング観察像から、GFP 陽性細胞は異なる挙動を示す 3 種類の細胞に分類できることが分かった。観察視野内で GFP の発現が消失する領域から外側に大きく移動する細胞、観察時間内に GFP の発現が消失する細胞、8 時間観察後も GFP の発現を維持しとどまって残っていた細胞が観察され、それぞれ Type 1 細胞(図 4-B,C,D,E)、Type 2 細胞(図 4-F,G,H,I)、Type 3 細胞(図 4-J,K,L,M)と分類し、定義づけを行った。

30 個の Type 1 細胞を無作為に選択し、追跡を行った(図 4-B,C,D,E)。観察領域内で鼻腔側に存在する細胞は鼻腔側へ、口腔側に存在する細胞は口腔側へ移動した(図 4-C,D)培養開始 20 時間後では、追跡した細胞は移動し続け観察領域から外れる細胞が存在した(図 4-E)。

次に、30個の Type 2 細胞を無作為に選択し、追跡を行った(図 4-F,G,H,I)。追跡した細胞は視野内で移動し、時間の経過により GFP の発現が消失した(図 4-G,H)。培養開始 16時間以降、追跡する細胞のうち GFP の発現が消失する細胞は時間の経過とともに増加した。培養開始 19時間 50分後では、追跡した細胞は 3 個まで減少した(図 4-I)。また、この 3 個の細胞は GFP の発現が消失する直前の細胞(図 4-I)を制度を整合で示した。であり、培養開始 20時間後に GFP の発現は消失した。なお、観察領域から外れる細胞は認められなかった。

最後に、30 個の Type 3 細胞を無作為に選択し、追跡を行った(図 4-J,K,L,M)。培養開始 20 時間後まで、追跡した細胞は視野内で移動し続け、さらに GFP の発現を維持していた(図 4-K,L,M)。また、GFP 消失領域内で点在する細胞と集団を形成する細胞が存在した(図 4-M)。

これらの結果から、口蓋突起内側縁上皮のMEE 細胞は3種類に分類される挙動を示すことが判明し、 それぞれの挙動がMEE 細胞の消失に重要な役割を果たしている可能性があることが示唆された。

#### 2) Type 1 細胞、Type 2 細胞および Type 3 細胞の構成比

定義づけを行った 3 種類の細胞の挙動を評価するために Type 1 細胞、Type 2 細胞および Type 3 細胞 の構成比を算出した。

DAPI 染色像における観察領域に存在する総細胞数を計測した結果は平均 393 個 (N=3) であった。これを基に、ライブイメージング観察を行った 4 個体において、挙動の特徴から 3 種類に分類した Type 2 細胞、Type 3 細胞の細胞数を計測し、残りを Type 1 細胞とした。その結果、各細胞の平均構成比は、Type 1 細胞は 66.5%、Type 2 細胞は 11.9%、Type 3 細胞は 21.6%であった(図 4-N)。

#### 3) Type 1 細胞、Type 2 細胞および Type 3 細胞の移動距離

次に、挙動を評価するために Type 1 細胞、Type 2 細胞および Type 3 細胞の移動距離を計測した。 培養開始 12 時間後の GFP 消失領域内(図 4-B,F,J)から無作為に選択した 30 個の Type 1 細胞、Type 2 細胞、Type 3 細胞を追跡し、細胞の直線移動距離と軌跡の総距離を計測した。直線移動距離は Type 1 細胞が 55.2 μm、Type 2 細胞が 33.1 μm、Type 3 細胞が 36.6 μm であった(表 1)。 Type 1 細胞の直線移動距離が Type 2 細胞および Type 3 細胞と比較して有意に長かったが、Type 2 細胞と Type 3 細胞に有意差は認められなかった。 軌跡の総距離は Type 1 細胞が 89.8 μm、Type 2 細胞が 67.4 μm、Type 3 細胞が 81.2 μm であった(表 1)。 Type 2 細胞の軌跡の総距離が Type 1 細胞および Type 3 細胞と比較して有意に短かったが、Type 1 細胞と比較して有意に短かったが、Type 1 細胞と比較して有意に短かったが、Type 1 細胞と Type 3 細胞に有意差は認められなかった。また、Type 1 細胞、Type 2 細胞および Type 3 細胞の直線移動距離と軌跡の総距離との間の相関係数はそれぞれ 0.742、0.416、・0.182 であった(図 5・D、表 1)。 Type 1 細胞が直線移動距離と軌跡の総距離との間に最も強い相関関係を認め、このことは Type 1 細胞の口腔側および鼻腔側方向への直線的な移動様式を裏付けていた。一方で、Type 2 細胞および Type 3 細胞では、指向性をもった移動様式は観察されなかった。

#### 5. K14-GFP マウスの培養口蓋突起のアポトーシスの検出

口蓋突起半側培養開始 12 時間後の口蓋突起を使用し、口蓋突起内側縁上皮のアポトーシスの有無を調べるために Whole mount および凍結切片を用いた TUNEL 染色法を行った。

細胞移動前の GFP 消失予定領域では TUNEL 陽性反応が検出された(図 6-A,C)。このことから口蓋 突起半側培養法で認められる GFP の消失は細胞移動によるものだけではなく、アポトーシスによって引 き起こされる可能性が示唆された。

細胞移動後の GFP が消失した領域では、点在する GFP 陽性細胞に TUNEL 陽性反応が検出された (図 6・B,D 白矢印)。口蓋突起前頭断の切片も同様に、GFP が消失した領域内で点在する GFP 陽性細胞に TUNEL 陽性反応が検出された (図 6・F 白矢印)。これらの結果から、培養後の口蓋突起内側縁上皮の GFP 消失領域に点在する GFP 陽性細胞はアポトーシスを起こすことが推測される。また、口腔側および鼻腔側の上皮トライアングル領域においても TUNEL 陽性反応が検出された (図 6・B,D 黄矢印,F 黄矢)。この結果は過去の報告における、MES 消失時期の口腔側あるいは鼻腔側の上皮トライアングルのアポトーシスが検出されたものと考えられる。

#### 6. 細胞移動阻害時の MEE 細胞の挙動の評価

Kim らは、 培養液中に Rho kinase シグナル阻害剤である Y27632 10 μM を添加し二次口蓋の器官培養を行った結果、口蓋突起の癒合が生じないことを報告した <sup>19</sup>。また、ライブイメージング観察下では、 Y27632 を添加することで、非筋細胞ミオシン II 活性を阻害し、アクトミオシンの収縮活性を阻害することで、口蓋突起上皮細胞の癒合部への移動が阻害されることを報告した <sup>19</sup>。

本研究では、上記の実験系にて明らかとなった MEE 細胞の挙動における分子メカニズムを解明する 為に細胞移動に関与することが知られている Rho kinase シグナル阻害剤 ( Y27632 ) を添加して器官 培養およびライブイメージング観察を行った。

#### 1) 培養口蓋突起 GFP 消失領域の比較

E14.0 の K14-GFP マウスの口蓋突起半側培養を 20 時間行った。実験群には培養液中に Y27632 50

μM を添加し、口蓋突起内側縁上皮の経時的観察を行った。

摘出時の口蓋突起内側縁上皮は全域に GFP が発現し、対照群、実験群いずれにおいても、差異は認め られなかった (図 7-A,D)。

培養開始 12 時間後では、対照群の口蓋突起内側縁上皮は独立した 2 つの領域で GFP 消失領域が出現した (図 7-B)。実験群の口蓋突起内側縁上皮は GFP 消失領域が部分的に認められた。(図 7-E)。

培養開始 20 時間後では、対照群の口蓋突起内側縁上皮は GFP 消失領域が前後方に拡大していた(図 7-C)。実験群の口蓋突起内側縁上皮では、点在する GFP 消失領域が存在し、対照群と比較し明らかな差異が認められた。(図 7-F)。

#### 2) 口蓋突起内側縁上皮 GFP 陽性細胞の移動距離の比較

細胞移動阻害時の MEE 細胞の挙動について評価するために移動距離を比較した。実験群は培養液中に Y27632 50 μM を添加し、12 時間半側培養後の口蓋突起を対照群と同一の領域において 8 時間ライブイメージング観察を行った。対照群は Type 1 細胞、Type 2 細胞および Type 3 細胞(合計 90 細胞)の直線移動距離と軌跡の総距離を計測した。実験群は無作為に選択した 90 細胞の直線移動距離と軌跡の総距離を計測した。直線移動距離は実験群が 4.0 μm、対照群が 41.3 μm(図 7-G)、軌跡の総距離は実験群が 6.2 μm、対照群が 79.2 μm であった(図 7-H)。直線移動距離と軌跡の総距離ともに実験群が、対照群と比較して有意に短かった(図 7-G,H)。実験群では、細胞の移動はほぼ認められなかった。

### 考察

二次口蓋形成は、胎生期における上皮細胞の増殖・分化・消失を伴う形態形成機構を調べる実験モデルとして古くから利用されてきたが、近年の口蓋裂発症モデルマウスを用いた研究によって、口蓋発生の機序、口蓋裂発症原因の分子レベルでの解明が大きく発展している 27,28。このような基礎的研究は口蓋裂発症の予防や、治療技術向上のために不可欠である。本研究は口蓋突起接触時に認められる MEE 細胞の消失過程に着目し、口蓋突起内側縁上皮における MEE 細胞の挙動をライブイメージングにより詳細に解析することを目的とした。

#### 1. 口蓋突起半側培養法の有用性

従来、口蓋突起の器官培養法は、癒合前の口蓋突起を対にして互いに接触させた状態で、シャーレの中で気層と培養液層の界面において、炭酸ガスインキュベーター内で培養する静置培養法が一般的であった。

Takigawa らは、癒合前の口蓋突起の片側を取り除いた口蓋突起の培養を行う、単一口蓋突起回転浮遊培養法を発表し、口蓋突起内側縁上皮が相対する口蓋突起と接触して上皮性縫合を形成せずとも消失することを報告した 25。当教室の過去の研究においても、単一口蓋突起回転浮遊培養法を試み、内側縁上皮細胞の消失、時間の経過による内側縁上皮細胞消失領域の拡大および内側縁上皮組織と間葉組織との明瞭な境界を観察した 24。

本研究では口蓋突起内側縁の MEE 細胞の挙動を観察する好適な観察方法として、口蓋突起半側を摘出し、口蓋突起内側縁上皮をガラスボトムディッシュの底面に設置する口蓋突起半側培養法を考案した。

培養による組織の移動を最小にするために培養液に 0.6%アガロースを添加することで、培養組織を一定した位置に維持することが可能となった。K14-GFP マウスの口蓋突起半側培養法を用いた口蓋突起内側縁上皮の経時的観察において、培養開始 12 時間後の口蓋突起内側縁上皮の GFP 消失領域 (図 2-C) は、E14.5 の口蓋突起内側縁上皮 (図 1-G) と同様に、GFP の発現の消失が認められた。培養開始 20 時間後の口蓋突起内側縁上皮 (図 2-D) は、E15.0 の口蓋突起内側縁上皮 (図 1-H) と同様に、GFP 消失領域は前後軸方向に拡大した。また、口蓋突起口腔側口蓋上皮では GFP の発現の消失が認められなかったことから、GFP の消失原因として培養環境による組織傷害の可能性は低いと考えられる。以上のことから、本研究が生体内での二次口蓋の癒合過程を再現する実験モデルとなることが示唆された。

しかし、ヒトや実験動物では、口蓋突起同士が接触する前や、口蓋裂で口蓋突起の内側縁上皮が消失している例はないという既知の事実に基づいて、Takigawa らは、羊水は対にした口蓋突起の癒合を妨げないが、上皮性縫合が形成されない単一口蓋突起の場合では内側縁上皮の消失を妨げることを報告した25。 さらに、子宮内で口蓋突起の癒合後破裂が生じた場合でも、羊水の作用によって破裂部位は速やかに上皮化し、その痕跡が消えることを報告しており29、in uteroと in vitro の相違として、今回行った口蓋の培養実験が子宮内で起こる癒合現象を再現しているかどうかについては、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

#### 2. MEE 細胞の挙動

口蓋形成過程において TGF-  $\beta$  シグナルは重要な役割を果たしている  $^{30,31}$ 。 TGF-  $\beta$  1 と TGF-  $\beta$  3 は MEE 細胞に発現し、TGF-  $\beta$  2 は MEE 細胞の下層の間葉細胞に発現することが知られている  $^{32}$ 。過去の

報告では、TGF-β3 ノックアウトマウスでは癒合不全による口蓋裂が 100%の発症率で起こり、フィロ ポディアの欠失が確かめられている 33。また TGF-β3 ノックアウトマウスの口蓋突起と野生型の口蓋突 起を組み合わせて器官培養を行った結果、基底膜の消失や上皮トライアングルの形成が制御されたこと から、TGF- β 3 が MEE 細胞の運動能の制御にかかわっていることが報告された  $^{34,35}$ 。また TGF- β 3 は、 細胞接着分子である E-カドヘリンの発現を阻害することで EMT を誘発することが報告されている 36。 本研究のライブイメージング観察において、異なる特徴を有する3種類の細胞を観察することができ た。Type 1 細胞は口腔側あるいは鼻腔側に規則性をもって直線的に移動する特徴を有していた。つぎに Type 2 細胞は移動方向に規則性を持たずに移動し、観察中にGFPの発現が消失する特徴を有していた。 最後に、Type 3 細胞は移動方向に規則性を持たずに移動し、8 時間観察後も GFP の発現を維持し、GFP 消失領域内でとどまっているという特徴を有していた。口蓋形成過程では MES の消失領域において、E-カドヘリンが消失し間葉細胞が合流することが知られている37。Type 2 細胞、Type 3 細胞の移動様式か ら、E-カドヘリンの消失により、細胞間結合が欠失したことで、不規則な移動に転じたことが推察され る。培養後の口蓋突起内側縁上皮において、点在する GFP 陽性細胞が、TUNEL 陽性反応を示していた ことから、これらの細胞はアポトーシスを引き起こしていた。つまり、Type 2 細胞の少なくとも一部は アポトーシスにより消失することが示唆された。MEE 消失過程におけるアポトーシスの役割については、 カスパーゼ阻害剤を用いたマウス胎児の口蓋培養実験で口蓋突起内側縁上皮細胞のアポトーシスを抑制 しても口蓋突起の癒合が起こることが証明され<sup>20</sup>、また、カスパーゼカスケードの上流で機能する Apaf-1/ックアウトマウスを用いた研究ではカスパーゼの活性化が抑制され、アポトーシスがほとんど生じな いにもかかわらず口蓋突起が癒合することが報告されている 11。さらに Takahara らは、口蓋突起の癒

合にアポトーシスは積極的に関与するものではなく、EMT や細胞移動がみられなかった際の細胞排除に 貢献している程度であると結論づけている  $^{20}$ 。本研究では、アポトーシスによる消失が示唆される Type  $^{2}$  細胞および Type  $^{3}$  細胞よりも、Type  $^{1}$  細胞が最も多く存在していることから、細胞移動が MEE 細胞の除去に極めて重要な役割を果たしていることが示唆された。

つぎに、細胞移動阻害時の MEE 細胞の挙動を評価するため、Ras 類似の低分子量 G タンパク質であ る Rho のエフェクター分子である Rho kinase に着目した。Rho kinase はミオシン脱リン酸化酵素の不 活化およびミオシン軽鎖に対するリン酸化により、ミオシンを活性化し、アクトミオシンの収縮力を亢 進させることが知られている <sup>38,39</sup>。細胞の移動は、フィロポディアの突出とラメリポディアの伸展と先端 部での細胞外基質への接着、これを支点にして、細胞体の牽引と接着の解除が繰り返し行われることで、 進行方向へと移動し、このときの細胞体の牽引はアクトミオシンの収縮力で行われている 40,41。過去の報 告において、Rho kinase シグナル阻害剤である Y27632 を用いた口蓋突起の静的培養の結果、口蓋の癒 合が阻害されることが明らかとされている<sup>22</sup>。本研究のライブイメージング観察結果では、GFP 消失領 域が有意に減少し、Type 1 細胞のような特徴を有する細胞は認められず、Type 2 細胞および Type 3 細 胞が観察された。また、実験群の細胞の直線移動距離と軌跡の総距離は、ともに対照実験群と比較して有 意に短かった。これらの結果から二次口蓋癒合中の MEE 細胞の移動は Rho kinase シグナルにより制御 されていることが示唆された。癒合中の二次口蓋の MEE 細胞は多様な挙動を示すことが判明し、それぞ れの挙動が MEE 細胞の除去に重要な役割を果たしていることが示され、とりわけ、細胞移動が MEE 細 胞の除去に寄与する割合が高いことが示唆された。

次に、本研究で観察された細胞移動が細胞自律的な移動か細胞非自律的な移動かを検討する必要があ

る。TGF-β 受容体の下流の転写因子である Smad2 は、EMT 誘導転写因子である Snail の誘発に必要で ある 42。Snail の発現は TGF-β シグナルによって活性化され 43、Snail は E-カドヘリンの発現を直接抑 制することができる44。正常な口蓋突起癒合過程では口蓋突起の接触時、Smad2は Snail を誘導し、 MEE 細胞の細胞増殖を阻害し、E-カドヘリンの発現量は減少する 45。そして、MES の消失にはアポト ーシスが誘発される  $^{45}$ 。 $\mathbf{TGF}$ -  $\beta$  3 ノックアウトマウスでは MEE 細胞の細胞増殖は増加しているが、間 葉細胞での細胞増殖はコントロールマウスの方が増加している 45。本研究のライブイメージング観察像 から、口蓋突起内側縁上皮の GFP 陽性細胞間に間隙が生じ (図 3-D,E,F 赤矢印)、GFP 消失領域周囲の 帯状の高 GFP 発現領域の上皮細胞のみが前後および口腔鼻腔側方向に拡大している(図 3·D,E,F 白矢 印) 挙動が観察され、間葉細胞の細胞増殖に起因する細胞非自律的な移動が生じていることが推察され る。また、過去の口蓋突起の内側からの SEM 観察結果では、基底膜に近接して間葉細胞が配列しており、 間葉細胞の増殖による圧力が上皮層での位置移動をもたらす原因の一つであることが報告されている46。 けれども、細胞移動に関与する非筋ミオシン ATPase を阻害する Blebbistatin を添加した口蓋突起の器 官培養実験では、口蓋の癒合は阻害されたが、上皮および間葉細胞中の細胞増殖に影響を及ぼさなかっ たことから<sup>22</sup>、MEE 細胞の移動の自律性には議論の余地がある。

本研究では、口蓋突起半側培養法を用いることで、口蓋突起内側縁上皮全域における MEE 細胞の挙動を直接経時的に観察し、3 タイプに分類される細胞の移動様式を同定した。MEE 細胞の消失には細胞移動が重要なメカニズムの一つであることが強く示唆された。さらに本実験系を用いて、口蓋突起癒合時の MEE 細胞の詳細な解析が可能であったことから、将来的に、口蓋裂の遺伝的因子や環境因子を解明できる有効な実験系であることが示された。

### 結論

K14-GFP マウスの二次口蓋形成過程における口蓋突起内側縁上皮のライブイメージング観察を行う

ことにより、MEE 細胞の動態について検討した。その結果、以下のことが示された。

- 1. MEE 細胞の消失過程において、3 つの型に分類される細胞の移動様式が示された。
- 2. 細胞移動が MEE 細胞の消失に寄与する割合が高いことが示された。

### 謝辞

本研究を行う機会を与えて頂き、終始ご懇意なるご指導とご鞭撻を賜りました顎顔面口腔矯正学教室 山城 隆 教授に深甚なる感謝の意を表します。本研究を遂行するにあたり、直接のご指導を賜りました 同教室 黒坂 寛 講師に心より感謝し、篤く御礼申し上げます。また、様々なご助言とご高閲を賜りまし た 伊藤 慎将 助教、犬伏 俊博 助教に謹んで感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、K14-GFP マウスを譲渡していただきました顎口腔病因病態制御学講座 宇 佐美 悠 講師に感謝申し上げます。

最後に、本研究を行うに際し、ご理解とご協力を賜りました顎顔面口腔矯正学教室の皆様に篤く御礼 申し上げます。

### 文献

- 1. Vanderas, A. P. (1987). Prevalence of craniomandibular dysfunction in children and adolescents: a review. *Pediatr Dent.* **9**: 312–316.
- 2. Schutte, B. C. (1999). The many faces and factors of orofacial clefts. *Hum Mol Genet.* **8**: 1853–1859.
- Marazita, M. L. (2002). Genetic etiologies of facial clefting. In: Mooney MP, Siegel MI (eds)
   Understanding craniofacial anomalies: the etiopathogenesis of craniosynostoses and facial clefting. John Wiley and Sons, New York, pp 147–162.
- 4. Levi, B., Brugman, S., Wong, V. W., Grova, M., Longaker, M. T, Wan, D. C. (2011). Palatogenesis: engineering, pathways and pathologies. *Organogenesis*. 7: 242–254.
- 5. Ferguson, M. W. (1988). Palate development. *Development.* **103**: 41-60.
- 6. Murray, J. C. and Schutte, B. C. (2004). Cleft palate: players, pathways, and pursuits. *J. Clin. Invest.* **113**: 1676-1678.
- 7. Peters, H., Neubuser, A., Kratochwil, K., Ball-ing, R. (1998). Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnor-malities. *Genes Dev.* **12**: 2735–2747.
- 8. Szeto, D.P., Rodriguez-Esteban, C., Ryan, A.K., O'Connell, S. M., Liu, F., Kioussi, C., Gleiber-man, A. S., Izpisua-Belmonte, J. C., Rosen-feld, M. G. (1999). Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hind limb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev.* **13**: 484

-494.

- 9. Robin, P. (1994). A fall of the base of the tongue considered as a new cause of nasopharyngeal respiratory impairment: Pierre Robin sequence, a translation. *Plast. Reconstr. Surg.* **93**: 1301-1303
- 10. Carette, M. J. and Ferguson, M. W. (1992). The fate of medial edge epithelial cells during palatal fusion in vitro: an analysis by DiI labelling and confocal microscopy. *Development.* **114**: 379-388
- 11. Jin, J-Z, Ding J. (2006). Analysis of cell migration, transdifferentiation and apoptosis during mouse secondary palate fusion. *Development*. **133**:3341–3347
- 12. Cuervo, R. and Covarrubias, L. (2004). Death is the major fate of medial edge epithelial cells and the cause of basal lamina degradation during palatogenesis. *Development.* **131**: 15-24.
- 13. Griffith, C. M. and Hay, E. D. (1992). Epithelial-mesenchymal transformation during palatal fusion: carboxyfluorescein traces cells at light and electron microscopic levels. *Development.* 116: 1087-1099.
- 14. Shuler, C. F., Halpern, D. E., Guo, Y. and Sank, A. C. (1992). Medial edge epithelium fate traced by cell lineage analysis during epithelial-mesenchymal transformation in vivo. *Dev. Biol.* **154**: 318-330.
- 15. Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K. and Behringer, R. (2003). Techniques for visualizing gene products, cells, tissues and organ systems. In Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, pp. 687-691. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- 16. Zambrowicz, B. P., Imamoto, A., Fiering, S., Herzenberg, L. A., Kerr, W. G. and Soriano, P. (1997).
  Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 3789-3794.
- 17. Turksen, K., Kupper, T., Degenstein, L., Williams, I., Fuchs E. (1992). Interleukin 6: insights to its function in skin by overexpression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci.* **89**: 5068–5072.
- 18. Dassule, H., Lewis, P., Bei, M., Maas, R., and McMahon, A. (2000). Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development*. **127**: 4775–4785.
- 19. Vaziri Sani F, Hallberg K, Harfe BD, McMahon AP, Linde A, Gritli-Linde A. (2005). Fate-mapping of the epithelial seam during palatal fusion rules out epithelial—mesenchymal transformation. DevBiol. 285: 490–495
- 20. Takahara, S., Takigawa, T. and Shiota, K. (2004). Programmed cell death is not a necessary prerequisite for fusion of the fetal mouse palate. *Int. J. Dev. Biol.* **48**: 39-46.
- 21. Muzumdar, M.D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., Luo, L. (2007). A global double fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis*. **45**: 593–605.
- 22. Kim S, Lewis AE, Singh V, Ma X, Adelstein R, Bush JO. (2015). Convergence and extrusion are required for normal fusion of the mammalian secondary palate. *PLoS Biol.* **13**(4):e1002122.
- 23. Kim, S., Prochazka, J. and Bush, J. O. (2017). Live imaging of mouse secondary palate fusion. J. Vis. Exp. 125, e56041.

- 24. Charoenchaikorn K., Yokomizo T., Rice D. P., Honjo T., Matsuzaki K., Shintaku Y., Imai Y., Wakamatsu A., Takahashi S., Ito Y., et al. (2009). Runx1 is involved in the fusion of the primary and the secondary palatal shelves. *Dev. Biol.* **326**: 392-402.
- 25. Takigawa, T., & Shiota, K. (2004). Terminal differentiation of palatal medial edge epithelial cells in vitro is not necessarily dependent on palatal shelf contact and midline epithelial seam formation. *International Journal of Developmental Biology*. **48**: 307–317.
- 26. Vaezi, A., Bauer, C., Vasioukhin, V., and Fuchs, E. (2002). Actin cable dynamics and Rho/Rock orchestrate a polarized cytoskeletal architecture in the early steps of assembling a stratified epithelium. *Dev. Cell.* 3: 367–381.
- 27. Meng, L., Bian, Z., Torensma, R., & Von Den Hoff, J. W. (2009). Biological mechanisms in palatogenesis and cleft palate. *Journal of Dental Research* 88: 22-33.
- 28. Dixon, Michael J. Marazita, Mary L. Beaty, Terri H. Murray, J. C. (2011). Cleft lip and palate. Synthesizing genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet.* **12**: 167-178.
- 29. Takigawa, T., and Shiota, K. (2007). Amniotic fluid induces rapid epithelialization in the experimentally ruptured fetal mouse palate Implications for fetal wound healing. *International Journal of Developmental Biology*. **51**: 67–77.
- 30. Oka K, Honda MJ, Tsuruga E, Hatakeyama Y, Isokawa K. (2012). Roles of collagen and periostin expression by cranial neural crest cells during soft palate development. The journal of histochemistry and cytochemistry. *Journal of the Histochemistry Society.* **60**: 57–68.

- 31. Kaartinen, V., Voncken, J. W., Shuler, C., Warburton, D., Bu, D. (1995). Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nature genetics.* 11: 415–421.
- 32. Fitzpatrick, D. R, Denhez, F., Kondaiah, P., Akhurst, R. J. (1990). Differential expression of TGF beta isoforms in murine palatogenesis. *Development*. **109**: 585–595.
- 33. Taya Y, O'Kane S, Ferguson MW (1999). Pathogenesis of cleft palate in TGF-beta3 knockout mice.

  \*Development. 126: 3869–3879.
- 34. Fitzpatrick, D.R., Denhez, F., Kondaiah, P. and Akhurst, R. J. (1990). Differential expression of TGF-8 isoforms in murine palatogenesis. *Development*. **109**: 585-595.
- 35. Proetzel, G., Pawlowski, S.A., Wiles, M.V., Yin, M., Boivin, G.P., Howles, P.N., Ding, J. Ferguson, M.W.J. and Doetschman, T. (1995). Transforming growth factor-63 is required for secondary palate fusion. *Nature Genet.* **11**: 409-414.
- 36. Nawshad A, Medici D, Liu CC, Hay ED (2007). TGFbeta3 inhibits E- cadherin gene expression in palate medial-edge epithelial cells through a Smad2-Smad4-LEF1 transcription complex. *J Cell Sci.* 120:1646-1653.
- 37. Sun, D., Mcalmon, K. R., Davies, J. A., Bernfield, M., & Hay, E. D. (1998). Simultaneous loss of expression of syndecan-1 and E-cadherin in the embryonic palate during epithelial-mesenchymal transformation. *International Journal of Developmental Biology*. **42**: 733–736.
- 38. Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R. S. & Horwitz, A. R. (2009). Non-muscle myosin II

- takes centre stage in cell adhesion and migration. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 10: 778-790.
- 39. Conti, M. A. and Adelstein, R. S. (2008). Nonmuscle myosin II moves in new directions. *J. Cell Sci.*121: 11–18.
- 40. Martin, P. and Parkhurst, S. M. (2004). Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development.* **131**: 3021–3034.
- 41. Jacinto, A., Wood, W., Balayo, T., Turmaine, M., Martinez-Arias, A. and Martin, P. (2000). Dynamic actin-based epithelial adhesion and cell matching during Drosophila dorsal closure. *Curr. Biol.* 10: 1420-1426.
- 42. Cho, H. J., Bae, K. E., Saika, S., Jeong, M. J., Yoo, J. (2007). Snail is required for transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition by activating PI3 kinase/AKT signal pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* **353**: 337–343.
- 43. Yu, W., Ruest, L. B., Svoboda, K. K. (2009). Regulation of epithelial mesenchymal transition in palatal fusion. *Exp Biol Med.* **234**:483–491.
- 44. Beltran M, Puig I, Pena C, Garcia JM, Alvarez AB, Bonilla F, Herreros AG (2008). A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial mesenchymal transition. *Genes Dev.* 22:756–769.
- 45. Cui, X. M., Chai, Y., Chen, J., Yamamoto, T., Ito, Y., Bringas, P., Shuler, C. F. (2003). TGF-beta3-dependent SMAD2 phosphorylation and inhibition of MEE proliferation during palatal fusion.

  \*Dev Dyn. 227:387–394.

46. M. Fujiwara, Y. Taya, T. Aoba (2000). Cellular dynamics and phenotypic modulation of palatal shelf-lining epithelium during mouse secondary palatogenesis. *J. Oral Biol.* **42**: 268-282.

### 図表

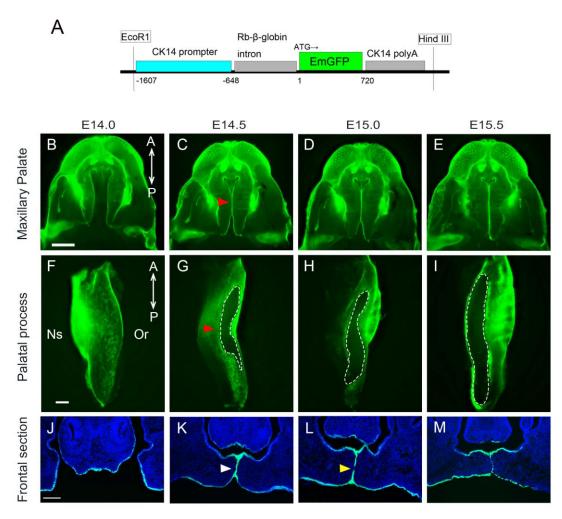
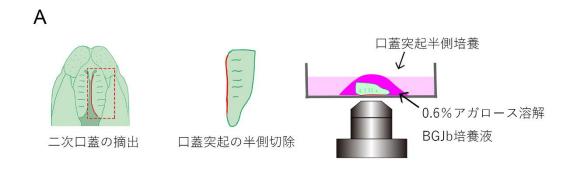


図1 K14-GFP マウスの二次口蓋発生時における口蓋突起の解剖学的・組織学的解析

- A) K14-GFP マウス作製に用いた導入遺伝子の模式図
- B)-E) 二次口蓋口腔側の蛍光顕微鏡像 (bar: 1000 μm)
  - B) 胎生 14.0 日齢、C) 胎生 14.5 日齢、D) 胎生 15.0 日齢、E) 胎生 15.5 日齢
  - ▶二次口蓋の癒合開始領域
- F)-I) 口蓋突起内側縁上皮の蛍光顕微鏡像 (bar: 200 μm)
  - F) 胎生 14.0 日齢、G) 胎生 14.5 日齢、H) 胎生 15.0 日齢、I) 胎生 15.5 日齢 白点線で囲まれた領域は GFP 消失領域である。
  - ▶図 C と同一部位を示す。
- J)-M) 二次口蓋の前頭断凍結切片像 (bar: 200 μm)
  - J) 胎生 14.0 日齢、K) 胎生 14.5 日齢、L) 胎生 15.0 日齢、M) 胎生 15.5 日齢 ▷正中上皮索
  - ▶正中上皮索の消失領域
  - A: 前方、P: 後方、Or: 口腔側、Ns: 鼻腔側を示す。



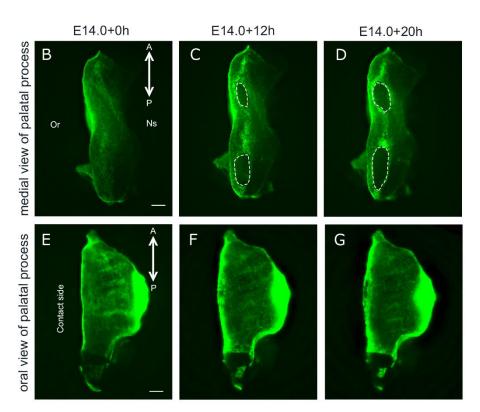


図 2 口蓋突起半側培養法を用いた K14-GFP マウスの口蓋突起内側縁上皮および口蓋突起口腔側口蓋上皮

#### A) 口蓋突起半側培養法

- B)-D) 口蓋突起内側縁上皮の蛍光顕微鏡像 (bar: 200 μm)
  - B) 胎生 14.0 日齢摘出時、C) 培養開始 12 時間後、D) 培養開始 20 時間後
- E)-G) 口腔側口蓋上皮の蛍光顕微鏡像 (bar: 200 μm)
  - E) 胎生 14.0 日齢摘出時、F) 培養開始 12 時間後、G) 培養開始 20 時間後
  - A: 前方、P: 後方、Or: 口腔側、Ns: 鼻腔側、Contact side は口蓋突起接触面を示す。

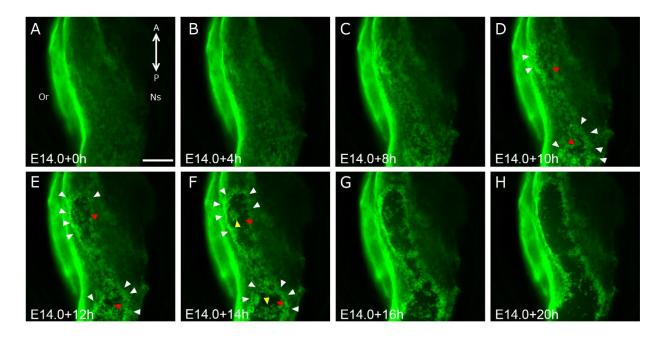
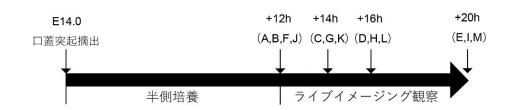


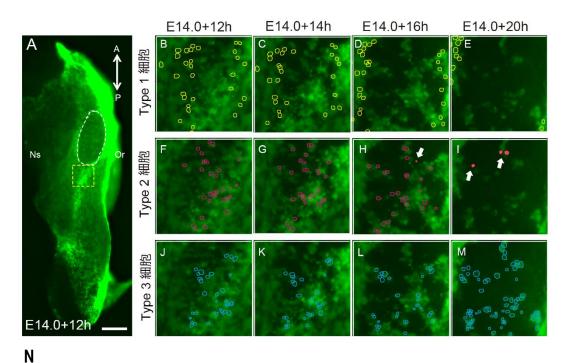
図3 K14-GFP マウスロ蓋突起内側縁上皮の低倍率ライブイメージング像

A)-H) ライブイメージング観察 20 時間における GFP 陽性細胞の動態 (bar: 200 μm)

- A) 胎生 14.0 日齢摘出時、B) 観察開始 4 時間後、C) 観察開始 8 時間後、D) 観察開始 10 時間後
- E) 観察開始 12 時間後、F) 観察開始 14 時間後、G) 観察開始 16 時間後、H) 観察開始 20 時間後
  - ▶ GFP 消失領域の出現
  - ▷GFP 消失領域の周囲に存在する蛍光強度が強くなった領域
  - ▶ GFP 消失領域内に存在する島状の細胞集団

A: 前方、P: 後方、Or: 口腔側、Ns: 鼻腔側を示す。





		平均個数	構成比 (%)
Type 1	大きく移動する上皮細胞	261.5	66.5
Type 2	GFPの発現が消失する細胞	46.75	11.9
Type 3	8時間GFPの発現を維持していた細胞	84.75	21.6

### 図 4 K14-GFP マウスロ蓋突起内側縁上皮の高倍率ライブイメージング像

- A) 培養開始 12 時間後の口蓋突起内側縁上皮の蛍光顕微鏡像 (bar: 200 μm) 黄点線で囲まれた領域は 8 時間ライブイメージング観察を行った領域 (200 μm 四方) である。 B)-M) ライブイメージング像における GFP 陽性細胞の動態
  - B),F),J) 培養開始 12 時間後、C),G),K) 培養開始 14 時間後、D),H),L) 培養開始 16 時間後 E),I),M) 培養開始 20 時間後
  - B)-E) 30 個の Type 1 細胞を無作為に選択し、追跡した位置を示す(黄丸)。
  - F)-I) 30 個の Type 2 細胞を無作為に選択し、追跡した位置を示す(赤丸)。
  - ☆ 消失する直前の細胞(桃色)を示す。
  - J)-M) 30 個の Type 3 細胞を無作為に選択し、追跡した位置を示す (青丸)。
- N) Type1細胞、Type2細胞、Type3細胞の構成比

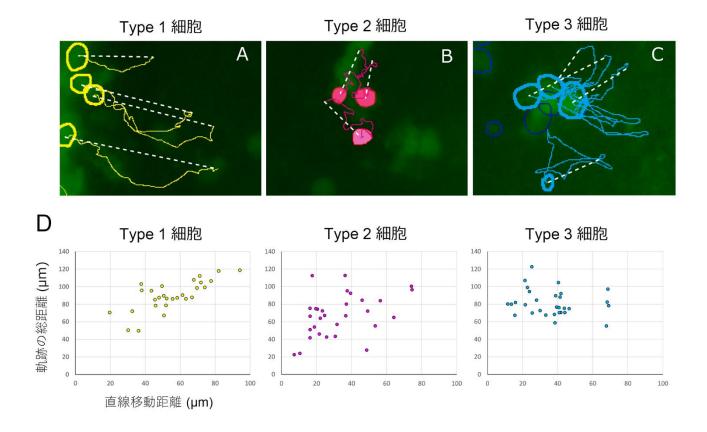


図5 Type 1 細胞、Type 2 細胞、Type 3 細胞の直線移動距離と軌跡の総距離

A)-C) Type 1 細胞、Type 2 細胞、Type 3 細胞の軌跡

黄色線: Type 1 細胞の 8 時間移動後の軌跡を示す。

赤色線: Type 2 細胞の消失する直前までの軌跡を示す。

青色線: Type 3 細胞の 8 時間移動後の軌跡を示す。

白点線:直線移動距離を示す。

D) 各細胞の直線移動距離と軌跡の総距離との相関関係

表 1 細胞の直線移動距離と軌跡の総距離との相関関係

細胞	直線距離(µm)	軌跡 (µm)	相関係数
Type 1	55.2	89.8	0.742
Type 2	33.1	67.4	0.416
Type 3	36.6	81.2	-0.182

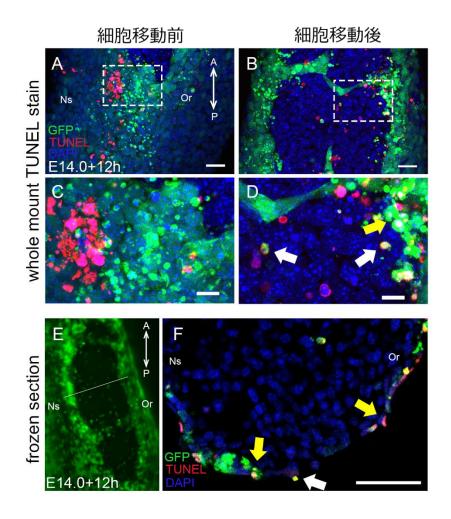


図 6 口蓋突起半側培養後の K14-GFP マウスロ蓋突起内側縁上皮の TUNEL 陽性細胞の 検出

- A)-D) 培養開始 12 時間後の GFP 消失予定領域と GFP 消失領域における Whole mount TUNEL 染色法を用いた TUNEL 陽性細胞の検出
  - A) GFP 消失予定領域 (bar: 25 μm)、B) GFP 消失領域 (bar: 25 μm)
  - C) A の拡大像 (bar: 10 μm)、D) B の拡大像 (bar: 10 μm)
  - ⇒ GFP 消失領域内で検出された GFP 陽性かつ TUNEL 陽性細胞
  - ▶ 上皮トライアングル領域で検出された TUNEL 陽性細胞
- E),F) 凍結切片を用いた TUNEL 陽性細胞の検出
  - E) 半側培養開始 12 時間後の口蓋突起内側縁上皮の蛍光顕微鏡像
  - F) E)の点線部での口蓋突起前頭断像 (bar: 50 μm)
  - ⇒ GFP 消失領域内で検出された GFP 陽性かつ TUNEL 陽性細胞
  - ⇒ 上皮トライアングル領域で検出された TUNEL 陽性細胞
  - A: 前方、P: 後方、Or: 口腔側、Ns: 鼻腔側を示す。

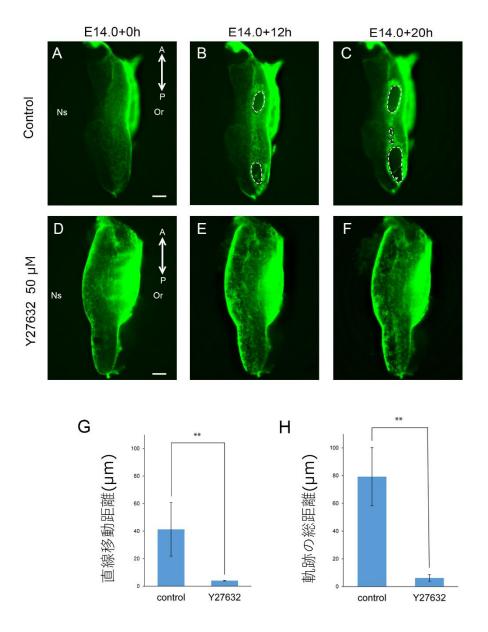


図 7 Rho kinase シグナル阻害剤 Y27632 50 μM を添加し、口蓋突起半側培養法を用いた口蓋突起内側縁上皮

- A)-C) 口蓋突起内側縁上皮の蛍光顕微鏡像 (bar: 200 μm)
  - A) 胎生 14.0 日齢摘出時、B) 培養開始 12 時間後、C) 培養開始 20 時間後
- D)-F) Y27632 50µM 添加実験群の口蓋突起内側縁上皮の蛍光顕微鏡像 (bar: 200 µm)
  - D) 胎生 14.0 日齢摘出時、E) 培養開始 12 時間後、F) 培養開始 20 時間後
- G),H) ライブイメージング観察像における Y27632  $50\mu M$  添加群と対照群との移動距離の比較
  - G) 直線移動距離 2 群間に有意差が認められた (\*\*p<0.01、スチューデントの t検定)。
  - H) 軌跡の総距離 2 群間に有意差が認められた(\*\*p<0.01、スチューデントの t検定)。