



Title	マウス鼻中隔と二次口蓋癒合時の上皮における細胞形態および動態の解析
Author(s)	山本, 沙優里
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72256
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学位論文

マウス鼻中隔と二次口蓋癒合時の上皮における 細胞形態および動態の解析

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）

山本 沙優里

緒言

ヒトの頭部はきわめて複雑な発生過程を呈し、その過程における細胞増殖や組織形成などの異常は多様な顎顔面形成不全を引き起こす。顎顔面形成不全は全ての先天的異常の約 30%に現れることが知られておりその頻度の高さから多くの研究がなされている^{1,2,3}。ヒトの顎顔面領域は胎生 5 週頃に口腔の原基の周囲に 5 つの突起、すなわち前頭鼻突起、1 対の上顎突起、1 対の下顎突起が形成されることにより進行する。前頭鼻突起はその後、内側鼻突起と外側鼻突起を形成する。胎生 6 週頃には左右の内側鼻突起は癒合し、鼻中隔を含む鼻の正中部分、人中、前歯および一次口蓋を形成する。外側鼻突起は鼻翼および鼻翼基部を形成する。胎生 6 週頃には上顎突起は口の発生に伴い前方へ成長し、内側鼻突起に沿う形をとる。そして、上唇、上顎の大部分および二次口蓋を形成する。このように、一次口蓋や鼻中隔と二次口蓋は由来とする突起が異なることが知られている^{4,5}。それぞれの突起の成長、癒合は正常な顎顔面発生には必須であり何らかの原因で癒合不全が起こった場合にはその部位に応じた裂が生じる。その中でも最も頻度が高いのが口唇口蓋裂であり、哺乳障害や嚥下障害、構音障害や咬合異常といった口腔の機能的な問題や、顎顔面の形態異常による審美障害を引き起こすことが知られている^{6,7,8}。このような背景から口唇口蓋裂の発生生物学的な原因については多くの基礎研究結果が存在する^{8,9}。近交系実験マウスを用いた研究では、二次口蓋突起同士あるいは一次口蓋と二次口蓋の癒合時には細胞移動¹⁰、細胞死^{11,12}や上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transformation : EMT)¹³による上皮除去や間葉における適切な細胞増殖¹⁴等が必要であることが証明されている。

二次口蓋においては、口蓋突起の内縁上皮に存在する周囲の口蓋上皮細胞とは区別された medial edge epithelial cell (MEE 細胞) と呼ばれる細胞の消失メカニズムについて、細胞移動や細胞死が関係

しているという説が提唱されている。細胞移動については、上皮細胞が相対する組織の接触を介さずに、口腔側と鼻側の両方向に移動することが報告されており¹⁰、また細胞死については、二次口蓋正中の上皮索と鼻腔側および口腔側の上皮トライアングル領域で TUNEL 陽性細胞が検出されたという報告がある。Cuervo らは、癒合直前の二次口蓋突起の器官培養を行い、MES に TUNEL 陽性細胞を検出し、癒合過程が進むとともに癒合領域の TUNEL 陽性細胞が減少することを報告した¹¹。

EMT については、Jin らは上皮特異的に β ガラクトシダーゼを発現するマウス (K14-Cre ; R26R) の口蓋を培養した後に X-gal 染色を行い、 β ガラクトシダーゼ活性を示す細胞が上皮から間葉へ移動していることを報告した¹³。細胞増殖については、二次口蓋同士の癒合前に間葉の増殖と比較して、MEE 細胞の増殖が減少しアポトーシスが増加することによって細胞除去が生じることが知られている。Cui らは、二次口蓋の癒合不全を伴うことが知られている *Tgf β 3* ノックアウトマウスでは MEE 細胞の増殖が減少しないことから、細胞増殖の減少が上皮除去に重要な役割を果たすことを証明した¹⁴

最近の報告では Kim らが、上皮特異的に GFP を発現するマウス (K14-Cre ; R26RmtmG) を用いてライブイメージングを行うことで、二次口蓋の癒合開始時にアクトミオシンの収縮力により口蓋突起先端の上皮細胞が癒合部に移動し、正中上皮索 (medial epithelial seam : MES) と呼ばれる 1 層の細胞層を形成することや、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 が消失することが示された¹⁵。

さらに、口蓋の発生に重要な役割を担う分子として *Runt-related transcription factor (Runx)* が知られている¹⁶。*Runx1* コンベンショナルノックアウトマウス (*Runx1^{-/-}*) は造血機能の障害と中枢神経系での大量出血が原因となり、鼻中隔と二次口蓋の癒合が未完了である E10.5 から E12.5 の間に死亡し

てしまう¹⁷。転写因子 *GATA1* のプロモーターの下流で *Runx1* の導入遺伝子を発現させることにより造血細胞を除いた細胞にて *Runx1* を欠失させた *Runx1*^{+/Δ} トランスジェニックマウス *Runx1*^{+/Δ}::Tg¹⁸ の二次口蓋の SEM 画像から、一次口蓋と二次口蓋が癒合する際の口蓋上皮の形態変化として *Runx1*^{+/Δ}::Tg マウスでは第一髪領域の二次口蓋の口蓋突起先端には球状の上皮突出が認められるが隣接する口蓋上皮や後方の口蓋突起にはその様な変化は認めないことや、*Runx1*^{+/Δ}::Tg マウスでは球状の上皮突出が認められないことを示している¹⁹。当研究室の過去の報告から、*Runx1*^{+/Δ}::Tg マウスや上皮特異的に *Runx1* の発現を欠失させたホモ欠失マウス *K14-Cre;Runx1*^{fl/fl} は一次口蓋と二次口蓋および鼻中隔と二次口蓋の癒合不全を伴うことが判明している^{19, 20}。このことから、一次口蓋が二次口蓋と癒合する際の上皮動態は二次口蓋同士が癒合する際の上皮動態とは異なることが示唆される。

一方で、二次口蓋と癒合する鼻中隔の発生過程に関しては多くの事が未解明である。Coprav らはラットの鼻中隔軟骨を Trowell-type 器官培養ディッシュを用いて 37℃、5% CO₂ 下で 10 日間培養し、垂直方向に対して前後方向により伸長することを報告した²¹。さらに Wealthall らは、マウスの鼻中隔における石灰化量を部位別に測定し、鼻中隔の前後方向への石灰化の割合が大きいことを示した²²。いずれも、鼻中隔の発育が前後的な顔面の成長に寄与していることを示唆している。実際に、ミニブタに対して組織の伸長に応じてロッドが滑走する coiled core をスクリューを用いて鼻中隔軟骨に固定することにより、鼻中隔軟骨の伸長をリアルタイムでモニタリングした実験では、鼻中隔軟骨が中顔面の前後的な成長を活性化する重要な役割を担っていることが示唆されている²³。さらに臨床的な観点から Shuxin らは、無手術の粘膜下口蓋裂患者の中でも鼻中隔の鋤骨と二次口蓋との癒合が不完全な症例においては上顎骨の前方成長不足に付随した前歯部反対咬合が多く認められることを見出している²⁴。こ

これらのことは鼻中隔の正常な発達を上顎骨の成長に必要不可欠であることを強く示唆する。このように鼻中隔が中顔面の前方への成長に重要な役割を担うことを示唆する文献が見受けられるが、研究報告は少数でありそれらのメカニズムについては未解明な部分が多く存在する。鼻中隔は一次口蓋と同じ突起に由来して発生することから、一次口蓋のように二次口蓋とは細胞動態が異なることが推察される。

そこで本研究では、口蓋突起半側除去器官培養^{19,28}を用いて発生中の鼻中隔の器官培養を行い、走査型電子顕微鏡（SEM）解析を行うことにより鼻中隔の発生過程における鼻中隔上皮の詳細な形態学的観察を行った。また、上皮細胞特異的に **Green Fluorescent Protein (GFP)**を発現するマウス（**K14-GFP mouse**）の鼻中隔のライブイメージングを行うことにより、鼻中隔と二次口蓋の癒合時における鼻中隔上皮の細胞動態を解析した。さらに、一次口蓋と二次口蓋癒合時の上皮動態の制御を行うことが知られている **Runx** シグナルが鼻中隔上皮の動態に関与する可能性についてもマウス遺伝的手法を用いて検証を行った。

実験方法

実験動物

使用実験動物として、大阪大学大学院歯研究科顎口腔病理病態学（口腔病理学）教室 宇佐美 悠博士より譲渡された健康な Cytokeratin 14-GFP(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、東京）を交配させ胎仔を使用した。K14-GFP マウスは、Vaezi.A らの報告に従い²⁶、Cytokeratin 14 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 2-A）。上皮特異的 Runx1 ノックアウトマウスについては *Runx1^{fl/fl}*²⁷ と上皮特異的に *Cre* を発現する *Keratin14(K14)-Cre* トランスジェニックマウス¹⁷を交配し、ヘテロ欠失マウス *K14-Cre;Runx1^{fl/+}* を作製した。さらに、ヘテロ欠失マウス *K14-Cre;Runx1^{fl/+}* と *Runx1^{fl/fl}* を交配し、上皮特異的に *Runx1* の発現を欠失させたホモ欠失マウス *K14-Cre;Runx1^{fl/fl}* を作製した。本研究は、大阪大学動物実験委員会及び大阪大学遺伝子組実験の承認を得て行った（動物実験承認番号：動歯-26-017-0, 動歯-26-004-0 遺伝子組み換え実験承認番号：3745、3654）。

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、膣栓が観察されたことを妊娠の成立と判定した。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。

鼻中隔組織の回転培養

本研究は鼻中隔と単一口蓋突起の培養により、鼻中隔癒合時の上皮の細胞形態変化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直前、あるいは接触した直後の胎仔を対象とした。E14.5の胎仔を摘出後、0.1 MPB（和光純薬工業株式会社、大阪）で洗浄し、BGJb（Life technologies 社, Waltham, USA）中に浸漬させた。E15.0の胎仔についても同様に施行した。

鼻中隔は実体顕微鏡（SZ6045TR-CVT、オリンパス社、東京）下にて胎仔より摘出した。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した後に、上顎部分を切り出し、口蓋組織を剖出した。

口蓋突起半側除去培養においては、眼球を切除した後に右側の口蓋突起基部を前方部から後方部に掛けて切除した（図 1-A）。ガラス製特殊培養瓶（池本理化工業株式会社、神奈川）に鼻中隔組織を設置し、回転式胎仔培養装置（10-0311, 池本理化工業株式会社、神奈川）の回転ドラムに装着した。回転式胎仔培養装置をインキュベーター内に設置し、回転速度を 25~30 rpm として、37℃、50% O₂、5% CO₂、45% N₂下で 12 時間、あるいは 24 時間 BGJb 培地を用いて器官培養を行った。

経時的観察においては、眼球を切除した後に、両側の口蓋突起基部を前方部から後方部に掛けて切除して鼻中隔を剖出し（図 2-B）、BGJb 培地を用いて培養を行った。回転式胎仔培養装置をインキュベーター内に設置し、回転速度を 25~30 rpm として、37℃、50% O₂、5% CO₂、45% N₂下で 24 時間培養を行った。

ライブイメージング観察においては、眼球を切除した後に、両側の口蓋突起基部を前方部から後方部に掛けて切除し、鼻中隔を摘出した（図 2-B）。培養環境として BGJb 培地 500 μ l にアガロース（和光純薬工業株式会社、大阪）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、大阪）の底面に鼻中隔を設置し、蛍光顕微鏡（BZ X-700, Keyence 社、大阪）内にて 24 時間培養を行った。

観察方法

1) 培養鼻中隔組織の形態観察

鼻中隔組織を 2%グルタルアルデヒドと 2%パラホルムアルデヒド/0.1 M PB 溶液（pH7.4）の混合溶液にて 4℃で 6 時間固定後、1%オスミウム水溶液にて 1 時間固定した。エタノールの上昇系列、すなわち 25%、50%、75%、無水 100%の順で各々 15 分間揺り動かしながら脱水した。脱水後の鼻中隔組織を 100%エタノールと t-ブチルアルコールの混合液（1 : 1、3 : 7、0 : 1 の順）に各々 15 分間室温で浸漬し、t-ブチルアルコールへ置換した。鼻中隔組織を凍結乾燥装置（VFD-21S, 真空デバイス社、茨城）内に運び、真空凍結乾燥を行った。乾燥後にオートファインコーター（JFC-1600, 日本電子（JEOL）社、東京）を用いて金属コーティングを行った。鼻中隔組織は走査型電子顕微鏡（SEM）（JSM-6390LV, 日本電子（JEOL）社、東京）を用いて観察した。

2) 培養鼻中隔組織の経時的観察

鼻中隔組織の経時的観察は、ガラスボトムディッシュの底面に鼻中隔を設置し、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。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) を用いた。

3) 鼻中隔組織のライブイメージング観察

E15.0 の K14-GFP マウスの鼻中隔を摘出し、摘出時から上記の蛍光顕微鏡を使用し、ライブイメージング技術を用いてリアルタイムで鼻中隔組織の経時的な観察を行った。対物レンズ 10 倍率 (plan Apo NA0.45) および対物レンズ 20 倍率 (plan Apo NA0.75)、15 分間隔で 24 時間、前述した GFP 蛍光フィルタを用いて撮影を行った。表層から 260 μm の範囲について、10.0 μm の Z-stack ごとに 26 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 26 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。

4) アポトーシスの検出

アポトーシス細胞の検出は TdT-mediated dUTP biotin nick end labelling 法（以下 TUNEL 法）を用いた。Whole mount 染色では、培養後の鼻中隔組織を 4%パラホルムアルデヒド（以下 4%PFA）/0.1 M PB 溶液（pH7.4）にて 4℃で 24 時間固定後、TUNEL 法を行った。TUNEL 法は In Situ Cell Detection Kit（SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, USA）のプロトコールに従い行った。ガラスボトムディッシュの底面に鼻中隔組織を配置し、共焦点レーザー走査型顕微鏡（TCS SP-8, Leica 社, Wetzlar, Germany）を用いて観察を行った。

凍結切片の作成は、培養後の鼻中隔組織を 4%PFA/0.1 M PB 溶液（pH7.4）にて 4℃で 24 時間固定後、10%、20%、30%スクロース/0.1 M PB 溶液（pH7.4）の順で浸漬させた。凍結包埋は Tissue-Tek Oct compound（サクラファインテックジャパン社、東京）を用いて行い、実験に使用するまで、-30℃暗所にて保管した。クリオスタット（CM1950, Leica 社, Wetzlar, Germany）を用いて鼻中隔の 20 μm 連続切片を前頭断にて作成し、TUNEL 法は In Situ Cell Detection Kit のプロトコールに従い行った。共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察した。

研究結果

1. 走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた鼻中隔上皮細胞の形態観察

二次口蓋と癒合直前の時期と考えられる E 14.5-E15.0 の鼻中隔を培養した後、二次口蓋と最初に接する鼻中隔前方部の上皮細胞の形態に着目し SEM を用いて口腔側から観察した^{8, 28}。

E14.5 及び E 15.0 での摘出直後、12 時間培養あるいは 24 時間培養を行った鼻中隔表面は滑沢な表面性を示した (図 1-C, D, E, F, G, H)。興味深いことに E15.0 から 12 時間培養した鼻中隔表面では、上皮細胞の一部が突出する様子が確認された (図 1-J, K)。上皮細胞の突出が生じる領域は鼻中隔の前方部正中に位置していた。

E15.0 から 24 時間培養した鼻中隔においても上皮細胞の突出を認めた (図 1-L, M)。しかし、培養開始 12 時間後の鼻中隔と比較してその領域は狭小化していた。突出した上皮の面積は、培養開始 12 時間後でサンプル 1 が 6349 μm^2 、サンプル 2 が 2315 μm^2 、培養開始 24 時間後でサンプル 1 が 4421 μm^2 、サンプル 2 が 2442 μm^2 であった (2/2)。

このことから、本研究で認められた鼻中隔の上皮細胞の突出は二次口蓋と癒合直前である鼻中隔に時期及び部位特異的に生じる現象であることが示された。

2. 培養鼻中隔の経時的観察

前述の実験で認められた鼻中隔表面で突出した上皮細胞の動態を更に詳細に解析するために、E15.0 の

K14-GFP マウス鼻中隔の器官培養を 24 時間行い、鼻中隔上皮の経時的観察を行った。

摘出時の鼻中隔上皮は全域に GFP が発現していた (図 2-C, D)。培養開始 12 時間後の鼻中隔においては GFP を発現する上皮細胞の鼻中隔前方正中への収束が認められた (図 2-E, F)。培養開始 24 時間後の鼻中隔の上皮細胞は、培養開始 12 時間後と比較して大きな差異は認められなかった (図 2-G, H) (N=10)。 発育が停止し、蛍光性が失われた個体は除外した (4/14)。

3. 鼻中隔上皮細胞のライブイメージングによる細胞移動の検証

前述の実験で認められた鼻中隔の突出した上皮細胞の動態を詳細に解析するために、ライブイメージング技術を用いて同部位の観察を行った。ライブイメージング観察像から、培養開始後 3 時間から 8 時間の間に鼻中隔前方部の上皮細胞がわずかに正中に収束する様子が観察された (図 3-A, B, C, D)。収束する上皮細胞については GFP の発現強度が強く認められた。しかし、その後の上皮には培養 24 時間後まで大きな細胞移動は生じないことが判明した (図 3-E, F, G, H) (N=9)。この結果は二次口蓋癒合時に認められるダイナミックな上皮の細胞移動とは対照的な結果である。発育が停止し、蛍光性が失われた個体は除外した (3/12)。

4. 蛍光染色を用いた鼻中隔上皮細胞のアポトーシスの検証

以上の結果から、鼻中隔と二次口蓋が癒合する際の鼻中隔上皮が除去されるメカニズムは二次口蓋同士

が癒合する際とは完全に一致せず、前述した上皮細胞の正中への収束を示す動態は鼻中隔と二次口蓋が癒合する際に特異的に関連することが示唆された。次に鼻中隔上皮消失の細胞生物学的なメカニズムを解明するために、二次口蓋癒合時の上皮消失メカニズムの一つとして証明されているアポトーシスについて検証した。E15.0 の摘出直後、培養開始 12 時間後および培養開始 24 時間後の鼻中隔に対して whole mount TUNEL 染色を行ったところ、E15.0 摘出直後 (N=4) の鼻中隔と比較して、培養開始 12 時間後 (N=2) および培養開始 24 時間後 (N=2) の鼻中隔前方正中中部でアポトーシス陽性細胞の増加を認めた (図 4-A, B, C)。

このアポトーシス陽性細胞の局在を詳細に観察するために、E15.0 の摘出直後、培養開始 12 時間後および培養開始 24 時間後の鼻中隔に対して組織切片の TUNEL 染色を行ったところ、培養開始 12 時間後および培養開始 24 時間後の鼻中隔においてアポトーシスを伴う細胞の一部が上皮の外側に特異的に出現することが判明した (図 4-D, E, F, G, H, I) (N=3)。鼻中隔上皮の外側に存在する細胞は円形を示し、細胞接着を有する上皮細胞とは異なる細胞形態を示した。上皮の外側でアポトーシスを認めた細胞は実験 1 の SEM 解析において上皮細胞の突出を認めた領域と一致していた。組織切片は実験 2, 3 において上皮細胞がわずかに正中に収束する様子が観察された、切歯孔から約 300 μ m 後方に位置する部位で作成した。

5. SEM 解析を用いた上皮特異的 Runx1 ノックアウトマウスの鼻中隔上皮細胞の形態観察

以上の結果から、鼻中隔と二次口蓋の癒合過程において鼻中隔の上皮細胞の突出が重要であり、その挙

動はアポトーシスと関連していることが示唆された。更に詳細に鼻中隔の上皮細胞の突出が鼻中隔と二次口蓋の癒合に果たす役割を証明するために、鼻中隔と二次口蓋の癒合不全を生じることが知られている *K14-Cre;Runx1^{fl/fl}* マウスの鼻中隔を器官培養し SEM を用いて鼻中隔表面の観察を行った。その結果、対照群（同腹仔、*Runx1^{fl/+}*）と比較して *K14-Cre;Runx1^{fl/fl}* マウス鼻中隔では上皮細胞の突出が減少する傾向が見られた（図 5-A, B）。突出した上皮の面積は、対照群でサンプル 1 が 7704 μm^2 、サンプル 2 が 13937 μm^2 、*K14-Cre;Runx1^{fl/fl}* マウスでサンプル 1 が 4701 μm^2 、サンプル 2 が 1753 μm^2 であった（2/2）。

考察

口唇口蓋裂は顔面領域に発生する先天性疾患の中で高頻度に発症することが知られており、裂の部位により様々なタイプに分けられる。一次口蓋と二次口蓋の癒合不全は唇顎裂、二次口蓋突起同士の癒合不全は口蓋裂を呈する。また、それぞれ鼻中隔の癒合不全を伴う場合もある。二次口蓋突起同士の癒合あるいは一次口蓋と二次口蓋の癒合時の上皮細胞の消失メカニズムについてはこれまで広範に研究が行われている。

一方で鼻中隔と二次口蓋の癒合不全は上顎骨の劣成長を生じ、中顔面の陥凹感や反対咬合を発症する原因となり得ることを示唆する研究結果が存在する。鼻中隔と二次口蓋突起の癒合が顎顔面の発生と関係することを示唆する文献は散見されるが、鼻中隔と二次口蓋が癒合するメカニズムについての研究報告は数少ない。これは口腔側から口蓋を観察した場合に、鼻中隔は二次口蓋の癒合により覆い隠され、その観察が阻まれることがひとつの要因といえる。しかしながら、鼻中隔と二次口蓋の癒合不全は中顔面の陥凹感や反対咬合といった審美的あるいは機能的な問題を生じる原因となる得ることから、鼻中隔と二次口蓋の癒合メカニズムを解明することは臨床的にも重要である。そこで本研究では、二次口蓋と鼻中隔の癒合メカニズムの詳細な解析のために発生中の鼻中隔上皮の癒合予定領域の動態の詳細な解析を行った。

上記の解剖学的な問題を解決するために、今回の研究では Takigawa らによって開発された口蓋突起半側除去培養モデル²⁵を用いて鼻中隔を剖出した状態で器官培養を行うことにより周囲の細胞間の相互作用を体内における発生過程に近づけた状態で培養し、SEM やライブイメージング技術を用いて鼻中隔上皮の癒合予定領域の詳細な解析を行った。SEM 解析の結果から、E15.0 から 12 時間培養後の鼻中

隔に上皮細胞の突出を認めた。鼻中隔と二次口蓋が癒合するためには上皮組織の除去が必要になることから、この上皮細胞の突出が鼻中隔上皮の細胞除去メカニズムと関係することが示唆される。一方、二次口蓋癒合時の口蓋突起先端上皮においても口蓋突起半側除去培養モデルを用いて同様の研究がなされており、培養時間が 12 時間、24 時間、36 時間、60 時間と増加するにつれて、内縁上皮が前方から後方へ剥がれ落ち、間葉組織が露出することが示されている¹⁹。また Lihua らは、二次口蓋癒合時の MEE 細胞についてより高倍率で SEM 解析を行い、口蓋突起の先端の組織表層から細胞が隆起し、円形の細胞が表面から突出する様子を確認している。また、癒合前に上皮細胞の細胞間隙が広がり、細胞間接着が失われることを発見している²⁹。本研究では鼻中隔の上皮細胞の突出を認めたが、その後の上皮細胞の脱落および間葉の露出は認めなかった。これらは二次口蓋上皮と鼻中隔上皮の細胞除去メカニズムには異なる部分が存在することを示唆するものである。

また E14.5 から 12 時間あるいは 24 時間培養後の鼻中隔上皮細胞に大きな細胞形態の変化を認めなかったことから、鼻中隔上皮細胞の形態変化は癒合直前にあたる時期特異的に生じることが示された。

次に鼻中隔上皮細胞の動態を詳細に観察するために、口蓋突起半側除去培養モデルと K14-GFP マウスを用いて鼻中隔のライブイメージング観察を行った。その結果、鼻中隔は培養 3 時間後から鼻中隔前方部分の上皮細胞がわずかに正中に移動するのみで、その後も GFP シグナルは存在し続けて上皮の脱落には至らなかった。当研究室の先行研究において、口蓋突起癒合時の MEE 細胞の挙動をライブイメージング観察によって詳細に確認しており、MEE 細胞の消失メカニズムには細胞移動が優位に働いていることが示されている。これと比較すると、鼻中隔の上皮細胞の移動量はわずかであり上皮細胞の除去には細胞移動の他にも何らかのメカニズムが働いていることが強く示唆された。

一方で、上皮細胞の収束については二次口蓋における上皮細胞のロゼッタ形成と類似した現象である可能性が考えられる。上皮細胞のロゼッタ形成とは細胞が花卉のように放射状に配列した状態を指し、MEE 細胞が取り除かれる際に見られる特徴的な現象である³⁰。鼻中隔と二次口蓋の癒合は鼻中隔前方から開始し後方に向かって進むことが知られており、本研究にて鼻中隔後方部と比較して鼻中隔前方部分の上皮細胞が先行して正中へ移動し凝集したことは二次口蓋との癒合直前の鼻中隔の動態を再現できた可能性がある。すなわち、細胞が脱落する前には細胞の凝集が生じるという現象は、癒合前の二次口蓋と鼻中隔の上皮細胞の動態に共通して起こる現象であることが示唆された。二次口蓋上皮におけるロゼッタ形成と鼻中隔上皮における本現象の生物学的な意義の解明には更なる探索が必要である。

本研究において、鼻中隔の上皮が脱落に至らなかった要因の一つとして生体内と器官培養での環境条件の違いが上げられる。そのため、本研究においても培養条件については検討の余地がある。実際、羊水添加培地において二次口蓋の上皮細胞の脱落が阻害されることが知られており³¹、培養環境は上皮細胞の脱落へ少なからず影響を与えることが知られている。口蓋の発生段階として、鼻中隔は二次口蓋同士が癒合した後にさらに下方へ伸長し癒合を開始する。鼻中隔が口腔側から隔離されるという環境変化について鑑みると、鼻中隔と二次口蓋の癒合には、より低酸素状態での培養が必要である可能性がある。過去の報告において、低酸素状態で培養した口蓋は顎裂を形成することが知られている³²。低酸素状態での培養における鼻中隔への影響について詳細は述べられておらず、これらの解析を進めることにより鼻中隔の上皮脱落メカニズムについて二次口蓋との相違点を解明できる可能性が高い。

本研究では実験 1 にて鼻中隔の上皮細胞の突出を認めたが、その後の間葉の露出は認めなかった。前述の通り二次口蓋の MEE 細胞の一部は細胞外に突出して取り除かれることが知られている。突出した

MEE 細胞の形態は球形であり、ビンクリンという細胞膜裏打ちタンパク質が減少していることが報告されている³³。一般に、細胞は細胞間接着が失われると、その形態は球形を示す。実験 1 にて認めた鼻中隔の突出した細胞の形態は MEE 細胞のような球形ではなく、より不定形であった。このことから二次口蓋と鼻中隔で上皮細胞が除去される際の細胞接着状態の変化に関して相違点が存在する可能性がある。二次口蓋の上皮細胞は癒合直前の発生段階で自律的に移動していることと比較すると、鼻中隔の上皮細胞はより非自律的な移動であると考えられる。このことから鼻中隔の上皮細胞除去には内側の間葉の細胞増殖が関与していることが示唆される。あるいは、鼻中隔が二次口蓋と癒合する際に相対する二次口蓋鼻腔側の上皮細胞との細胞間相互作用による影響も考えられる。これらのことも今後の研究において明らかにしていく予定としている。

二次口蓋同士が癒合する際の上皮細胞接着に関して、**matrix metalloproteinase(MMP)**の役割について着目した報告がある^{34, 35, 36}。MMP は二次口蓋の癒合過程において上皮に発現が認められるマトリックスプロテアーゼの一種であり、MEE 細胞の除去に重要な役割を担う。例えば MMP 阻害薬を添加した二次口蓋の器官培養では、二次口蓋の癒合不全が生じることが知られている^{30, 34}。今後、鼻中隔における MMP の関連を検証するために、MMP 阻害剤によりコラーゲンの分解作用を抑制して、鼻中隔の癒合の可否や上皮細胞の形態を観察することが考えられる。

さらに、MMP によって上皮細胞が細胞接着を失い細胞外マトリックスから離れるとアポトーシスが引き起こされることが知られている^{37, 38, 39}。また、二次口蓋と接触した E15.5 の鼻中隔上皮にはアポトーシス陽性細胞の存在が報告されている⁴⁰。これらのことを踏まえて、前述した鼻中隔上皮の突出や消失に関わるメカニズムとアポトーシスとの関係を検証するために発生中の鼻中隔の蛍光 TUNEL 染色を

行った。その結果、鼻中隔上皮の突出を認めた部位近傍に TUNEL 陽性細胞を検出した。このことは本研究結果にて認められた鼻中隔の細胞突出とアポトーシスに関連があることを示唆している。

二次口蓋突起同士の癒合の際の上皮細胞の除去にもアポトーシスに関連していることは報告されている。一方、カスパーゼカスケードの上流で機能しカスパーゼ 3 の活性化を抑制することによりアポトーシスを阻害されたマウス、*Apaf1* ノックアウトマウスにおいて二次口蓋の癒合は行われることが知られている^{13, 41}。このことにより阻害されたアポトーシスとは別のメカニズムが上皮の除去を引き起こすことが推察される。興味深いことに、これとは別に *Apaf1* 遺伝子座に自然突然変異を生じ *Apaf1* の機能が欠失した遺伝子改変マウス、*forebrain overgrowth* マウス (*fog* マウス) を用いた研究では鼻中隔と二次口蓋の癒合不全が生じることが示されている⁴²。しかしながら、口蓋を含む顎顔面領域の詳細な記載はされておらずアポトーシスと鼻中隔上皮動態との関連性は未だ不明な点が多く存在する。今後、前述した遺伝的にアポトーシスを欠失させたマウスやアポトーシスを阻害する薬剤等を用いて探索を進めることによりこれらの現象についてより詳細な関係を解明することが可能であると考えられる。

以上の観察から、鼻中隔と二次口蓋が癒合する際の上皮細胞の形態および動態はこれまでに提唱されている二次口蓋突起同士の癒合時の細胞挙動と完全には一致しないことが示唆された。このことはヒトにおいても二次口蓋の癒合が正常に行われている状態であっても鼻中隔と二次口蓋の癒合不全が起こりうることを意味し、上顎骨の成長の観点から同部位の形態的な観察をする必要性を示唆している。

本研究では、鼻中隔の上皮に関わる分子メカニズムを検証するために、*K14-Cre;Runx1^{fl/fl}* マウスの解析を行った。その結果、対照群マウスと比較して *K14-Cre;Runx1^{fl/fl}* マウスにおいて鼻中隔の上皮細胞の突出が減少したことから、*Runx1* が鼻中隔と二次口蓋の癒合直前に生じる上皮細胞の突出に関連して

いることが示された。*K14-Cre;Runx1^{fl/fl}* マウスでは一次口蓋と二次口蓋の癒合不全が生じるメカニズムとして *Runx1-Stat3-Tgfb3* シグナル伝達経路が関連していると提唱されている²⁰。なお且つ *Tgfb3* ノックアウトマウスでは鼻中隔の癒合不全が生じることが知られている^{43, 44, 45}。このことから鼻中隔において *Runx1-Stat3-Tgfb3* シグナル伝達経路が関連していることが考えられる。*Stat3* が実際に本現象に関連しているか分子機構を詳細に検証することが今後の課題である。

今日の医療では遺伝子検査による疾患の診断やリスクの検索が行われるようになってきている。本研究は顔面突起癒合不全（顔面裂など）の発症メカニズムを探索し、診断や治療法を開発することに役立つ可能性がある。

結語

本研究より、鼻中隔と二次口蓋の癒合における鼻中隔上皮の細胞動態について以下のことが示された。

- ・ 鼻中隔の上皮細胞は二次口蓋の MEE 細胞とは挙動が異なることが示唆された。
- ・ 鼻中隔の突出した上皮細胞はアポトーシスと関連していることが示唆された。
- ・ **Runx** シグナルが二次口蓋と癒合前の鼻中隔上皮細胞の突出に関与することが示された。

謝辞

本論文を作成するにあたり、本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、ご指導を賜りました、大阪大学大学院歯研究科顎顔面口腔矯正学教室 山城隆教授に深謝いたします。また、本研究の実験 1 で撮影にご尽力戴くとともに有益なご助言を戴いた大阪大学大学院歯研究科顎口腔総合医療学(口腔総合診療部) 三浦治郎先生、ならびに本研究の実験 2, 3 で資料を提供して戴くとともに有益なご助言を戴いた大阪大学大学院歯研究科顎口腔病理病態学(口腔病理学) 教室 宇佐美悠先生に心より御礼申し上げます。また、研究遂行にあたり日頃より有益なご討論ご助言を戴いた大阪大学大学院歯研究科顎顔面口腔矯正学教室 黒坂寛先生、ならびに **Safiye Esra Sarper** 先生に深く感謝いたします。

文献

1. Marengo, L.K., Flood, T.J., Ethen, M.K., Kirby, R.S., Fisher, S., Copeland, G., Meyer, R.E., Dunn, J., Canfield, M.A., Anderson, T., Yazzie, D., Mai, C.T., Network, N.B.D.P., 2018. Study of selected birth defects among American Indian/Alaska Native population: A multi-state population-based retrospective study, 1999-2007. *Birth Defects Res* 110, 1412-1418.
2. Freitas, J.A., das Neves, L.T., de Almeida, A.L., Garib, D.G., Trindade-Suedam, I.K., Yaedú, R.Y., Lauris, R.e.C., Soares, S., Oliveira, T.M., Pinto, J.H., 2012. Rehabilitative treatment of cleft lip and palate: experience of the Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies/USP (HRAC/USP)--Part 1: overall aspects. *J Appl Oral Sci* 20, 9-15.
3. Conley, Z.R., Hague, M., Kurosaka, H., Dixon, J., Dixon, M.J., Trainor, P.A., 2016. A quantitative method for defining high-arched palate using the *Tcof1*(+/-) mutant mouse as a model. *Dev Biol* 415, 296-305.
4. Smarius, B., Loozen, C., Manten, W., Bekker, M., Pistorius, L., Breugem, C., 2017. Accurate diagnosis of prenatal cleft lip/palate by understanding the embryology. *World J Methodol* 7, 93-100.
5. Bush, J.O., Jiang, R., 2012. Palatogenesis: morphogenetic and molecular mechanisms of secondary palate development. *Development* 139, 231-243.
6. Mossey, P.A., Little, J., Munger, R.G., Dixon, M.J., Shaw, W.C., 2009. Cleft lip and palate. *Lancet* 374, 1773-1785.
7. Dixon, M.J., Marazita, M.L., Beaty, T.H., Murray, J.C., 2011. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet* 12, 167-178.
8. Ferguson, M.W., 1988. Palate development. *Development* 103 Suppl, 41-60.
9. Walker, B.E., Fraser, F.C., 1996. Closure of the scndary palate in three strains of mice. *J Embryol Exp Morph* 4, 176-189.
10. Lan, Y., Xu, J., Jiang, R., 2015. Cellular and Molecular Mechanisms of Palatogenesis. *Curr Top Dev Biol* 115, 59-84.
11. Cuervo, R., 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.
12. Cuervo, R., Valencia, C., Chandraratna, R.A., Covarrubias, L., 2002. Programmed cell death is required for palate shelf fusion and is regulated by retinoic acid. *Dev Biol* 245, 145-156.
 13. Jin, J.Z., Ding, J., 2006. Analysis of cell migration, transdifferentiation and apoptosis during mouse secondary palate fusion. *Development* 133, 3341-3347.
 14. Cui, X.M., Chai, Y., Chen, J., Yamamoto, T., Ito, Y., Bringas, P., Shuler, C.F., 2003. TGF- β 3-dependent SMAD2 phosphorylation and inhibition of MEE proliferation during palatal fusion. *Dev Dyn* 227, 387-394.
 15. Kim, S., Prochazka, J., Bush, J.O., 2017. Live Imaging of Mouse Secondary Palate Fusion. *J Vis Exp*.
 16. Ito, Y., 2008. RUNX genes in development and cancer: regulation of viral gene expression and the discovery of RUNX family genes. *Adv Cancer Res* 99, 33-76.
 17. Dassule, H.R., Lewis, P., Bei, M., Maas, R., McMahon, A.P., 2000. Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development* 127, 4775-4785.
 18. Yokomizo, T., Takahashi, S., Mochizuki, N., Kuroha, T., Ema, M., Wakamatsu, A., Shimizu, R., Ohneda, O., Osato, M., Okada, H., Komori, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Ito, Y., Yamamoto, M., 2007. Characterization of GATA-1(+) hemangioblastic cells in the mouse embryo. *EMBO J* 26, 184-196.
 19. Charoenchaikorn, K., Yokomizo, T., Rice, D.P., Honjo, T., Matsuzaki, K., Shintaku, Y., Imai, Y., Wakamatsu, A., Takahashi, S., Ito, Y., Takano-Yamamoto, T., Thesleff, I., Yamamoto, M., Yamashiro, T., 2009. Runx1 is involved in the fusion of the primary and the secondary palatal shelves. *Dev Biol* 326, 392-402.
 20. Sarper, S.E., Kurosaka, H., Inubushi, T., Ono Minagi, H., Kuremoto, K.I., Sakai, T., Taniuchi, I., Yamashiro, T., 2018. Runx1-Stat3-Tgfb3 signaling network regulating the anterior palatal development. *Sci Rep* 8, 11208.
 21. Copray, J.C., 1986. Growth of the nasal septal cartilage of the rat in vitro. *J Anat* 144, 99-111.
 22. Wealhall, R.J., Herring, S.W., 2006. Endochondral ossification of the mouse nasal septum.

23. Al Dayeh, A.A., Rafferty, K.L., Egbert, M., Herring, S.W., 2013. Real-time monitoring of the growth of the nasal septal cartilage and the nasofrontal suture. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 143, 773-783.
24. Ren, S., Ma, L., Sun, Z., Qian, J., 2014. Relationship between palate-vomer development and maxillary growth in submucous cleft palate patients. *Cleft Palate Craniofac J* 51, 314-319.
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. *Int J Dev Biol* 48, 307-317.
26. Vaezi, A., Bauer, C., Vasioukhin, V., 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. Taniuchi, I., Osato, M., Egawa, T., Sunshine, M.J., Bae, S.C., Komori, T., Ito, Y., Littman, D.R., 2002. Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell* 111, 621-633.
28. Howard L. Levine, M. Pais Clemente, *Sinus Surgery: Endoscopic and Microscopic*. Thieme 2004: 1-15
29. Hu, L., Liu, J., Li, Z., Ozturk, F., Gurumurthy, C., Romano, R.A., Sinha, S., Nawshad, A., 2015. TGF β 3 regulates periderm removal through Δ Np63 in the developing palate. *J Cell Physiol* 230, 1212-1225.
30. Kim, S., Lewis, A.E., Singh, V., Ma, X., Adelstein, R., Bush, J.O., 2015. Convergence and extrusion are required for normal fusion of the mammalian secondary palate. *PLoS Biol* 13, e1002122.
31. Takigawa, T., Shiota, K., 2007. Amniotic fluid induces rapid epithelialization in the experimentally ruptured fetal mouse palate--implications for fetal wound healing. *Int J Dev Biol* 51, 67-77.
32. Küchler, E.C., Silva, L.A.D., Nelson-Filho, P., Sabóia, T.M., Rentschler, A.M., Granjeiro, J.M., Oliveira, D., Tannure, P.N., Silva, R.A.D., Antunes, L.S., Tsang, M., Vieira, A.R., 2018.

Assessing the association between hypoxia during craniofacial development and oral clefts. *J Appl Oral Sci* 26, e20170234.

33. Martínez-Alvarez, C., Bonelli, R., Tudela, C., Gato, A., Mena, J., O'Kane, S., Ferguson, M.W., 2000. Bulging medial edge epithelial cells and palatal fusion. *Int J Dev Biol* 44, 331-335.
34. Brown, N.L., Yarram, S.J., Mansell, J.P., Sandy, J.R., 2002. Matrix metalloproteinases have a role in palatogenesis. *J Dent Res* 81, 826-830.
35. Morris-Wiman, J., Burch, H., Basco, E., 2000. Temporospatial distribution of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases during murine secondary palate morphogenesis. *Anat Embryol (Berl)* 202, 129-141.
36. Blavier, L., Lazaryev, A., Groffen, J., Heisterkamp, N., DeClerck, Y.A., Kaartinen, V., 2001. TGF-beta3-induced palatogenesis requires matrix metalloproteinases. *Mol Biol Cell* 12, 1457-1466.
37. Ohshiba, T., Miyaura, C., Inada, M., Ito, A., 2003. Role of RANKL-induced osteoclast formation and MMP-dependent matrix degradation in bone destruction by breast cancer metastasis. *Br J Cancer* 88, 1318-1326.
38. Alexander, C.M., Howard, E.W., Bissell, M.J., Werb, Z., 1996. Rescue of mammary epithelial cell apoptosis and entactin degradation by a tissue inhibitor of metalloproteinases-1 transgene. *J Cell Biol* 135, 1669-1677.
39. Smane, L., Pilmane, M., Akota, I., 2013. Apoptosis and MMP-2, TIMP-2 expression in cleft lip and palate. *Stomatologija* 15, 129-134.
40. Vaziri Sani, F., Kaartinen, V., El Shahawy, M., Linde, A., Gritli-Linde, A., 2010. Developmental changes in cellular and extracellular structural macromolecules in the secondary palate and in the nasal cavity of the mouse. *Eur J Oral Sci* 118, 221-236.
41. Yamaguchi, Y., Shinotsuka, N., Nonomura, K., Takemoto, K., Kuida, K., Yosida, H., Miura, M., 2011. Live imaging of apoptosis in a novel transgenic mouse highlights its role in neural tube closure. *J Cell Biol* 195, 1047-1060.
42. Honarpour, N., Gilbert, S.L., Lahn, B.T., Wang, X., Herz, J., 2001. Apaf-1 deficiency and neural tube closure defects are found in fog mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9683-9687.

43. Taya, Y., O'Kane, S., Ferguson, M.W., 1999. Pathogenesis of cleft palate in TGF-beta3 knockout mice. *Development* 126, 3869-3879.
44. Wu, C., Endo, M., Yang, B.H., Radecki, M.A., Davis, P.F., Zoltick, P.W., Spivak, R.M., Flake, A.W., Kirschner, R.E., Nah, H.D., 2013. Intra-amniotic transient transduction of the periderm with a viral vector encoding TGFβ3 prevents cleft palate in Tgfβ3(-/-) mouse embryos. *Mol Ther* 21, 8-17.
45. Lane, J., Yumoto, K., Azhar, M., Ninomiya-Tsuji, J., Inagaki, M., Hu, Y., Deng, C.X., Kim, J., Mishina, Y., Kaartinen, V., 2015. Tak1, Smad4 and Trim33 redundantly mediate TGF-β3 signaling during palate development. *Dev Biol* 398, 231-241.

図表

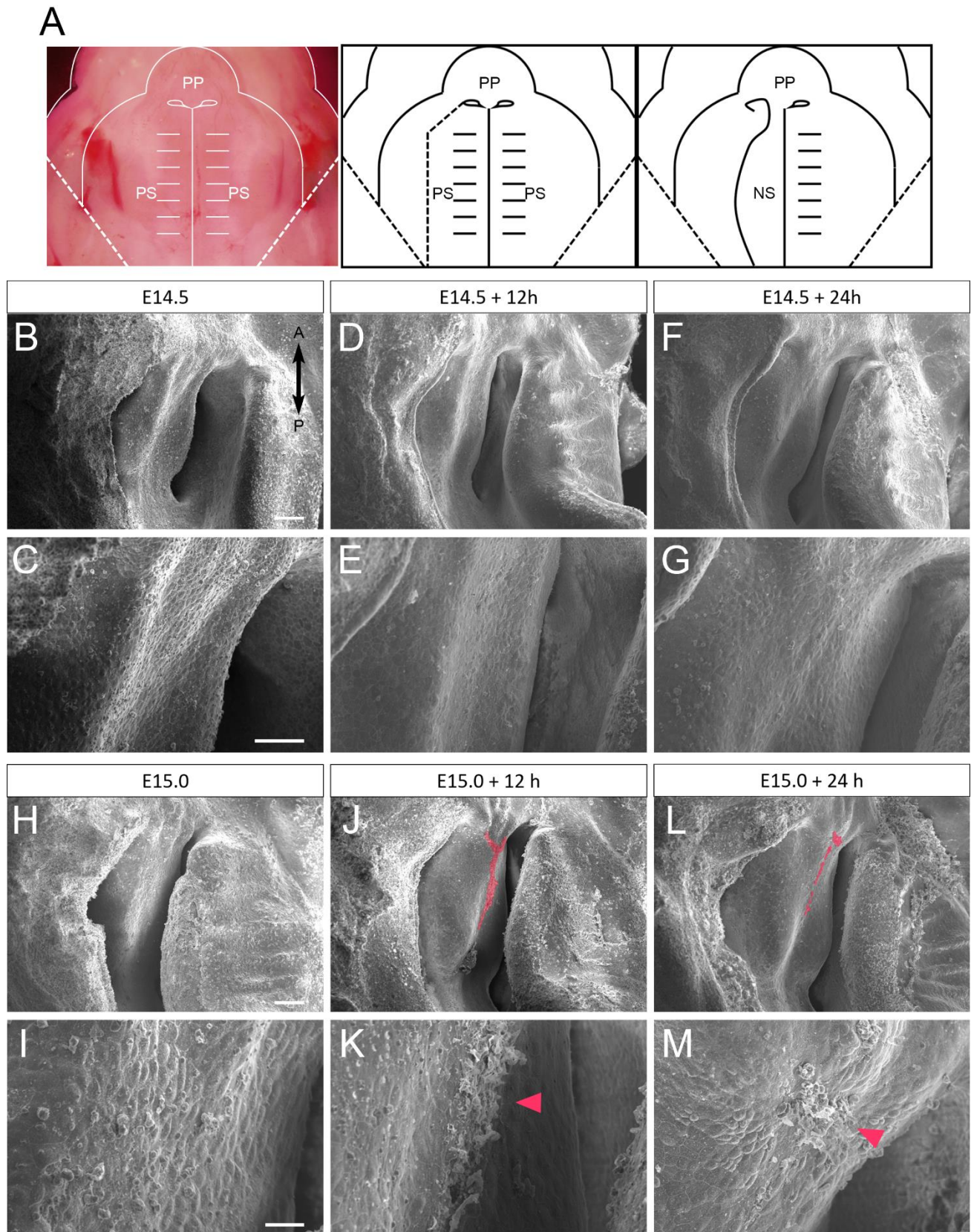


図 1 C57BL/6J 系統野生型マウス鼻中隔の SEM 解析

A) 口蓋突起両側切除の模式図

B-G) 胎生 14.5 日の鼻中隔の蛍光顕微鏡像 (bar: B 100 μ m, C 50 μ m)

B, C) 胎生 14.5 日齢摘出時

D, E) 培養 12 時間後

F, G) 培養 24 時間後

H-M) 胎生 15.0 日の鼻中隔の蛍光顕微鏡像 (bar: H 100 μ m, I 20 μ m)

H, I) 胎生 15.0 日齢摘出時

J, K) 培養 12 時間後

L, M) 培養 24 時間後

(A: 前方、P: 後方、PP: 一次口蓋、PS: 二次口蓋、NS: 鼻中隔を示す。)

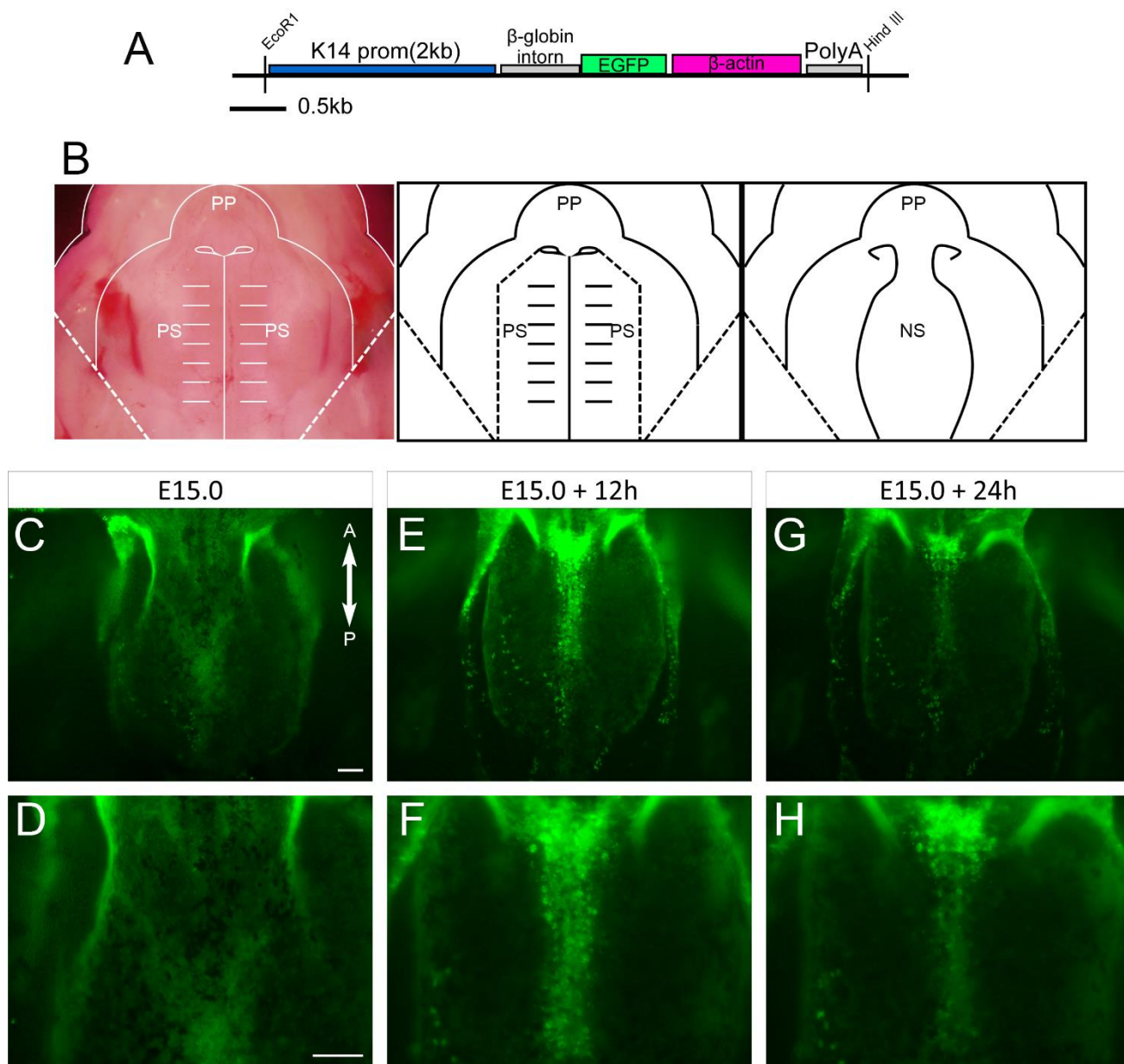


図2 K14-GFP マウスの鼻中隔癒合直前における鼻中隔の解剖学的・組織学的解析

A) K14-GFP マウスを製作に用いた導入遺伝子の模式図

B) 口蓋突起両側切除の模式図

C-H) 鼻中隔の蛍光顕微鏡像（口腔側面観）（bar: 100μm）

C, D) 胎生 15.0 日齢摘出時

E, F) 培養 12 時間後

G, H) 培養 24 時間後

(A: 前方、P: 後方、PP: 一次口蓋、PS: 二次口蓋、NS: 鼻中隔を示す。)

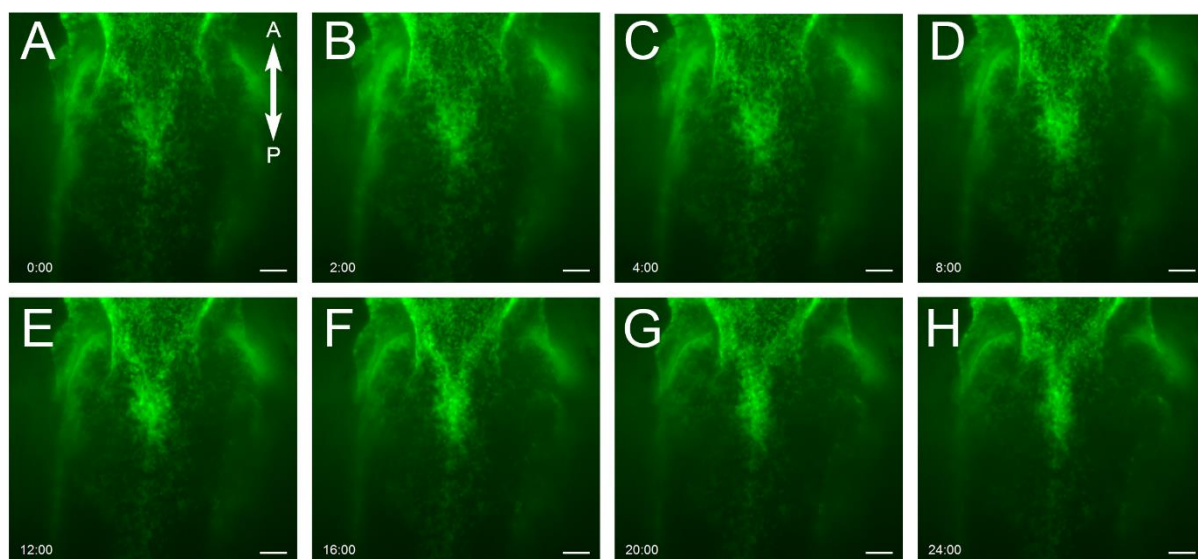


図3 K14-GFP マウス鼻中隔のライブイメージング像（口腔側面観）

A-H) ライブイメージング観察 24 時間における GFP 陽性細胞の動態 (bar: 100 μ m)

A) 胎生 15.0 日齢摘出時、B) 培養 2 時間後、C) 培養 4 時間後、D) 培養 8 時間後、

E) 培養 12 時間後、F) 培養 16 時間後、G) 培養 20 時間後、H) 培養 24 時間後

(A: 前方、P: 後方を示す。)

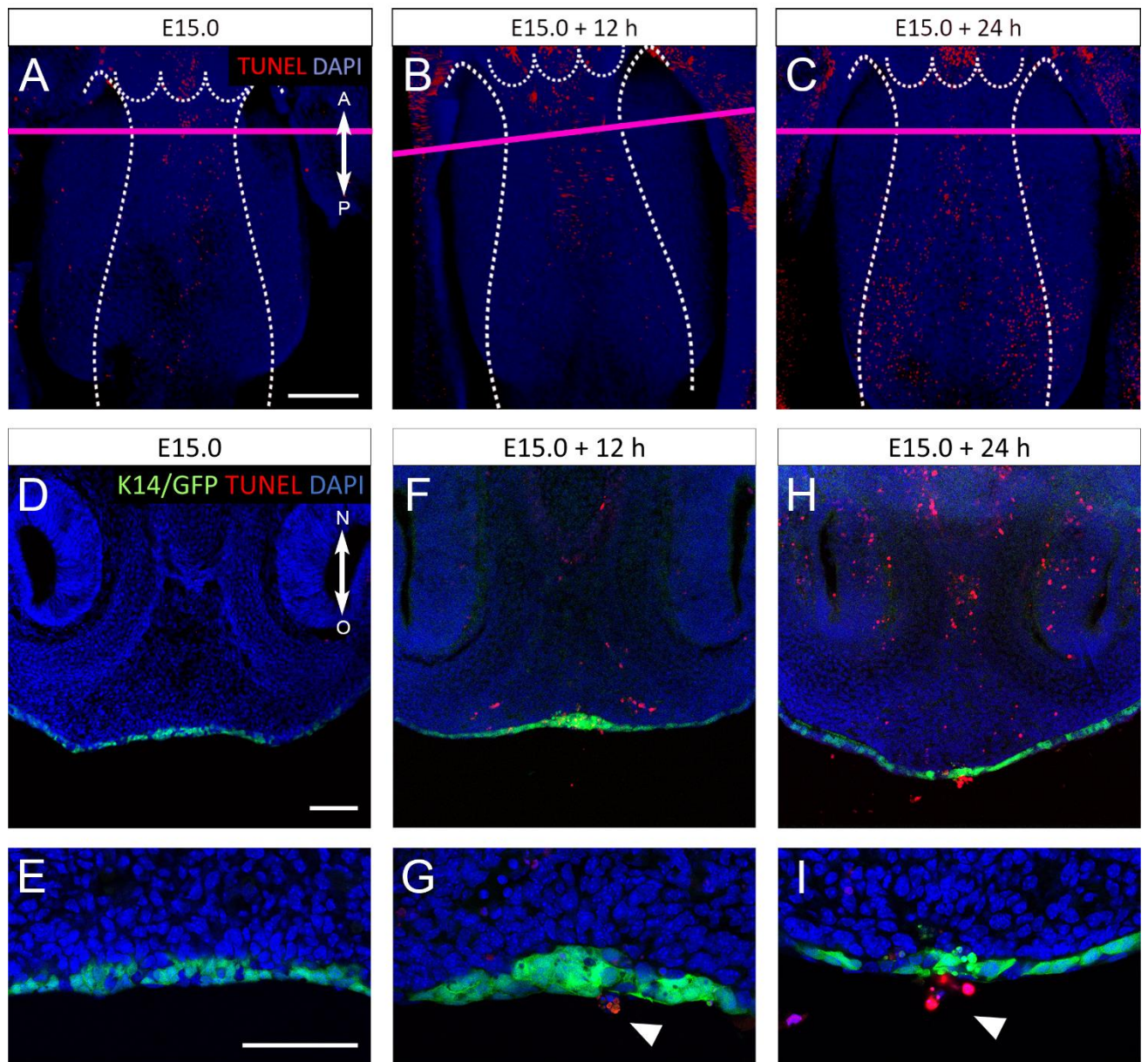


図4 培養後の鼻中隔の TUNEL 陽性細胞の検出

A-C) Whole mount 染色を用いた TUNEL 陽性細胞の検出（口腔側面観）（bar: 200 μ m）

A) 胎生 15.0 日齢摘出時

B) 培養 12 時間後

C) 培養 24 時間後

（A: 前方、P: 後方、赤線は組織切片作成部位（前頭断）を示す。）

D-I) 凍結切片を用いた TUNEL 陽性細胞の検出（前頭断）（bar: 100 μ m）

D, E) 胎生 15.0 日齢摘出時

F, G) 培養 12 時間後

H, I) 培養 24 時間後

（O: 鼻腔側、N: 口腔側を示す。）

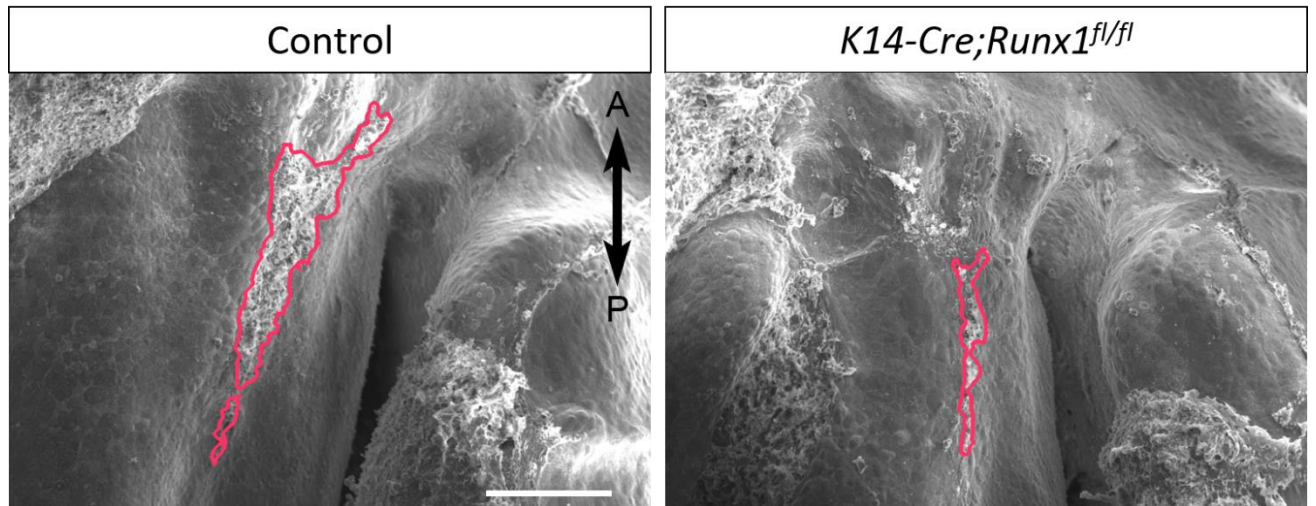


図 5 *K14-Cre;Runx1^{fl/fl}* マウス鼻中隔の SEM 解析

培養 12 時間後の胎生 15.0 日齢対照群マウスと *K14-Cre;Runx1^{fl/fl}* マウス鼻中隔の比較
(A: 前方、P: 後方を示す。)