

CL/Fr マウスにおける口唇口蓋裂発症機構に関する 分子病理学的研究

中澤 学

近畿大学医学部臨床医学部門研究室 (形成外科学部門)

抄 録

口唇口蓋裂のモデルマウスとして知られる CL/Fr マウスは胎生期の11.5日 (E11.5) 前後での内側鼻隆起 (MNP) と外側鼻隆起 (LNP)・上顎隆起 (MP) との癒合が完全に起こらないことにより口唇裂を生じる。CL/Fr マウスの口唇裂を有するマウス胎仔 CL(+) と正常マウス胎仔 CL(-) を用いて E11.5 における MNP と LNP・MP との癒合を免疫組織化学的に検索した。一次口蓋形成の過程で CL(-) ではまず MNP と LNP がお互いに接触して上皮縫合 (EpS) を形成する。次にその扁平上皮の一部がアポトーシスを起こし、引き続いて上皮間葉転換 (EMT) により MNP と LNP の間葉細胞の橋渡しが起こる。これに対して CL(+) では EpS の扁平上皮にアポトーシスは見られず、それに引き続いて起こるはずの EMT も起こらなかった。Whole mount in situ ハイブリダイゼーションによる検索では、Claudin6 mRNA の発現亢進が CL(+) の EpS の上皮細胞に局限して見られた。さらに MNP と LNP の癒合部における mRNA 定量の結果、CL(+) では CL(-) に比較して Slug が有意に減少し、Noggin は逆に有意に増加していた。以上の結果から CL/Fr(CL+) マウスでは Noggin 発現増加と関連した Slug 発現低下がアポトーシスを抑制し、また EMT を起こさせないという口唇裂発症メカニズムが考えられた。

Key words: 口唇口蓋裂, CL/Fr マウス, EMT, Claudin6, Slug, Noggin

緒 言

胎生期における顔面の形成過程は非常に複雑でありそれ故顔面に生じる先天奇形として、口唇口蓋裂、顔面裂や耳介の変形といった様々な奇形が発生してくる。なかでも口唇口蓋裂は頭蓋・顔面奇形の中で最も発生頻度が高く、全奇形のなかでも心臓の先天奇形に次いで2番目に多いとされている¹。また人種別にみると白人では0.13~0.16%、黒人では0.06%と低いのにに対して黄色人種である日本人で0.21~0.27%と高頻度に発生する²。さらに口唇裂と口蓋裂の割合については約50%が口唇口蓋裂合併例、残り25%ずつを口唇裂、口蓋裂単独症例が占める割合となっており、性別で見るとほぼ同数かやや女性に多いとされている²。口唇口蓋裂の病因としては遺伝的要因と母体の環境的要因 (年齢、喫煙、ウイルス感染、飲酒、薬剤使用等) とが複雑に絡み合っている多因子しきい説³ が有力視されているが、未だ解明されていない。CL/Fr マウスは口唇口

蓋裂多発系として知られている A/J 系マウスに msl (migratory spot lesion) 因子を有する Morgan の stock を交配したもののから育成され、20%~30% の頻度で口唇口蓋裂がみられ口唇口蓋裂自然発生モデルとして多くの施設で口唇口蓋裂の研究に使われている^{4,5}。CL/Fr マウスにおける口唇裂の発生は胎生11日前後におこる一次口蓋形成の異常によることがわかっている⁶。一次口蓋は内側鼻隆起 (MNP) と外側鼻隆起 (LNP) および上顎隆起 (MP) が癒合することにより形成される。この際 MNP と LNP の上皮が接触して上皮縫合 (Epithelial seam: EpS) が形成された後、上皮細胞が間葉細胞に移行すること (上皮間葉転換 Epithelial Mesenchymal transition: EMT) によって両隆起間の橋渡し (Mesenchymal bridge: MB) が起こると考えられている⁷。この過程の中で EpS を形成する上皮ではアポトーシスを起こしており、Sun ら⁸ は鶏の口唇が形成される際、EpS の外側の上皮のみがアポトーシスに陥ることを提唱している。CL/Fr マウスの一次口蓋形

成時において鶏の口唇形成と同様のことが起こるかどうかを検索すると共に、最近ヒトの遺伝性口唇裂の原因遺伝子として上皮細胞の接着分子である nectin1 をコードする遺伝子 PVRL1 がクローニングされ⁹、また EMT には E-cadherin が重要な役割を果たす¹⁰ ことなどから、CL/Fr マウスにおける口唇裂発症の原因の手がかりとしてまず細胞接着分子に着目した。そこで Pvr11, E-cadherin, および上皮細胞特異的に発現する接着分子としてクローニングされた Claudin6¹¹、さらに EMT において E-cadherin の転写を抑制する転写因子である Snail¹² および Slug¹³、また顔面隆起の成長を制御する BMP 及びそのアンタゴニストである Noggin を中心に、CL/Fr マウス胎仔における MNP と LNP・MP の融合の異常を組織化学的および分子生物学的に解析し、口唇裂発症の pathogenesis に関する考察を行った。

方 法

実験動物および飼育環境

CL/Fr 系マウスは1982年に実験動物中央研究所より入手し、本大学飼育室で兄妹交配にて維持してきたものを使用した。飼育室は室温 $23 \pm 4^\circ\text{C}$ 、照明は12時間毎に点灯、消灯を繰り返した。飼料は日本クレア製の OA-2 固形飼料を、飲料水は水道水を給水瓶にて自由摂取とした。交配は前日の夜、1つのゲージに雄、雌1匹ずつを入れ翌朝膣栓が確認できればその日を妊娠0.5日とした。

実験方法

妊娠を確認したマウスを11.5日目に頸椎脱臼により屠殺し腹部を切開し胎仔 (E11.5) を取り出した。実体顕微鏡下に PBS 中で口唇裂の有無を確認し LNP と MNP が癒合しているもの CL(-) と癒合していないもの CL(+) とに区別した (図1)。

1 TUNEL 法

胎仔顔面の LNP, MNP および MP 部位を切り出し、O.C.T コンパウンド内に包埋し急速冷凍させた後クリオスタットにて $4\mu\text{m}$ に薄切した。次にアセトン固定後十分に風乾させ、5%スキムミルク/PBS でブロッキングした後、1次抗体 (IV型コラーゲン抗体 (rabbit) (Chemicon, CA, USA)) を室温で1時間反応させた。PBS で洗浄後2次抗体 (Cy3 anti-rabbit IgG (sheep) (Sigma Chemical CO, MO, USA)) を30分間反応させた。次に1%パラホルムアルデヒド/PBS, pH 7.4 に10分間室温で固定しエタノール:酢酸が2:1の溶液に5分間、 -20°C でインキュベート後 equilibration buffer $13\mu\text{l}/\text{cm}^2$ を室温で10秒以上インキュベートした。working strength TdT enzyme (reaction buffer:TdT enzyme=77:33) $11\mu\text{l}/\text{cm}^2$ を 37°C で1時間反応させ、working strength stop/wash buffer (stop/wash buffer:蒸留水=1:34) に浸け15秒間振盪後室温で10分間インキュベートして反応を停止させた。次に5%スキムミルク/PBS でブロッキングを行った後、working strength fluorescein antibody solution (blocking solution: anti-digoxigenin conjugate=34:31) $13\mu\text{l}/\text{cm}^2$ を遮光して室温で30分間反応させ最終的に DAPI で封入した。観察は同じくニコン蛍光顕微鏡および画像解析装置を用いた。またコントロールとして DNase 処理した標本を用いて同様の実験を行った。

2 免疫染色

凍結薄切標本をアセトン固定後十分に風乾させ、5%スキムミルク/PBS でブロッキングした後、1次抗体を室温で1時間反応させた。PBS で洗浄後2次抗体を30分間反応させ、洗浄後最終的に VECTA SHIELD mounting medium with DAPI で封入した。1次抗体、2次抗体には以下の組み合わせを使

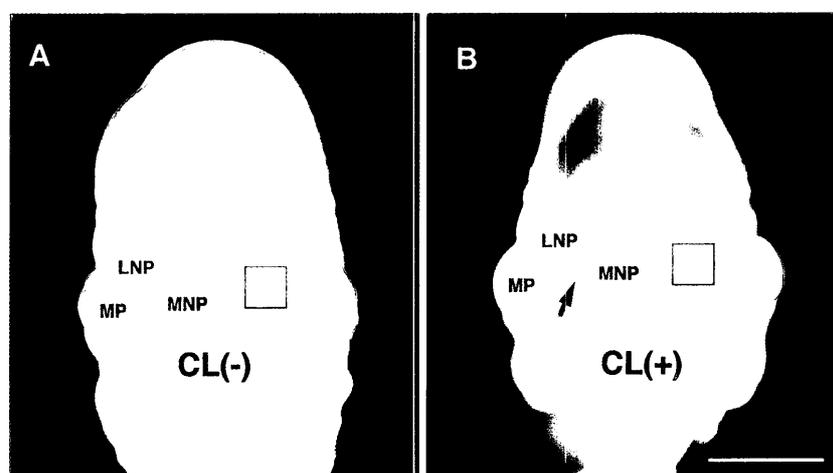


図1 CL/Fr 胎仔 (E11.5) の顔面正面像

口唇裂を有しないマウス (CL(-)) (A) と口唇裂を有するマウス (CL(+)) (B) との顔面正面像を示す。CL(-) では内側鼻隆起 (MNP) が外側鼻隆起 (LNP) に完全に接しているのに対して、CL(+) では外側への成長が障害され口唇裂 (矢印) が生じている。四角形で囲まれた部分はリアルタイム PCR にて mRNA を採取した組織を示す。bar: 1 mm

表 1

	upstream primers	downstream primers
Slug	5'-cagacagatcaaacctgagg-3'	5'-gaagcgacattctggagaag-3'
Snail	5'-ctgatggagtgcctttgtac-3'	5'-agttctatggctcgaagcag-3'
E-cadherin	5'-atcagtggtctttccagctcct-3'	5'-tctaacacagacagctccag-3'
Claudin6	5'-tatcctgtcccagtcceaag-3'	5'-cagggctggagagaagtctg-3'
Bmp4	5'-acatgagggatctttaccgg-3'	5'-aaagcagagctctcactggt-3'
Noggin	5'-tggtgtgtaagccatccaag-3'	5'-agcaggaacacttacactcg-3'

用し二重染色を行った。

IV型コラーゲン+E-cadherin 染色

1 次抗体：IV 型コラーゲン抗体 (rabbit) (Chemicon, CA, USA) + 2 次抗体：Cy3 anti-rabbit IgG (sheep) (Sigma Chemical CO, MO, USA)

1 次抗体：E-cadherin 抗体 (rat) (Sigma Chemical CO, MO, USA) + 2 次抗体：FITC anti-rat IgG (rabbit) (Sigma Chemical CO, MO, USA)

E-cadherin+Vimentin 染色

1 次抗体：E-cadherin 抗体 (rat) (Sigma Chemical CO, MO, USA) + 2 次抗体：FITC anti-rat IgG (rabbit) (Sigma Chemical CO, MO, USA)

2 次抗体：vimentin 抗体 (goat) Santa Cruz Biotechnology CA USA) + 2 次抗体：Cy3 anti-goat IgG (rabbit) (Sigma Chemical CO, MO, USA)

観察はニコン蛍光顕微鏡および画像解析装置を用いた。またコントロールとして 2 次抗体のみ、また正常マウスの血清を用いて同様な実験を行った。

3 Whole-mount in situ hybridization

E11.5 のマウス胎仔を固定液 (4%パラホルムアルデヒド/PBT (0.1% tween20 を含む PBS)) で一晩 4°C で固定しエタノール系列を用いて脱水、再水和を行った。proteinase K で 37°C, 15 分処理した後、0.2% グルタルアルデヒド、4% パラホルムアルデヒド/PBT で再固定し、6% 過酸化水素水/PBT で漂白した。プレハイブリダイゼーション溶液で 70°C 1 時間インキュベートした後、digoxigenin にて標識された Claudin6 のプローブを含んだプレハイブリダイゼーション溶液で一晩インキュベートしてハイブリダイゼーションを行った。次に Solution 1 (50%ホルムアルデヒド, 5×SSC (pH 4.5), 1% SDS), Solution 2 (5×SSC (pH 4.5), 0.1% tween20), Solution 3 (50%ホルムアルデヒド, 2×SSC (pH 4.5), 1% SDS) および TBST (150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1% tween20) にてプローブの洗浄をし、1.5% blocking-reagent (ペーリンガーマンハイム)/PBT でブロッキングした後、抗 digoxigenin 抗体で 4°C 一晩反応させた。TBST

で抗体の洗浄を行った後、室温で NBT/BCIP を含む発色液にて遮光しながら発色させた。発色反応停止後エタノールを用いて脱色しグリセロールで透明化させた。その後 PBT で再水和しパラフィン包埋し薄切切片を作製後、0.02% エオジン溶液で染色して観察した。またコントロールとするために sense probe を用いた標本で同様な実験を行った。

4 リアルタイム PCR 法

E11.5 の胎仔の顔面隆起部 (図 1 の四角形部分 (MNP と LNP・MN との接着部位を含む)) を CL (+) および CL (-) からそれぞれ実体顕微鏡下に切り出し、Rneasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、sensiscript RT Kit (QIAGEN) にて cDNA を作製した。それをテンプレートとして QuantiTect™ SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) を用いることにより ABI GeneAmp 5700 Sequence Detection System で PCR 反応を行った。なおプライマーには Slug, Snail, E-cadherin, Claudin6, BMP4 と Noggin (表 1) を使い PCR によって得られる DNA の長さが 100 から 150 塩基対になる様に設定した。また個体間の mRNA 量の補正は GAPDH を用いて行い、実験固体数 N は 5 匹である。

結 果

一次口蓋形成における MNP と LNP 上皮縫合 (EpS) を形成する上皮のアポトーシス

CL (-) では LNP と MNP の接着部位に生じる EpS 全層に TUNEL 陽性細胞が認められている (図 2 A) のに対して、CL (+) では EpS およびその近傍の上皮細胞に TUNEL 陽性細胞は認められなかった (図 2 B)。またコントロールとして行った DNase 処理した標本では TUNEL 陽性細胞は認められなかった (図は省略)。

EpS における上皮間葉転換 (EMT)

一次口蓋形成時に MNP と LNP が癒合する際、EpS がどのような変化を示すのかをみるために、MNP・LNP 癒合部位の被覆扁平上皮と間質組織を抗 IV 型コラーゲン抗体と抗 E-cadherin 抗体、または抗ビメンチン抗体と抗 E-cadherin 抗体をそれぞれ

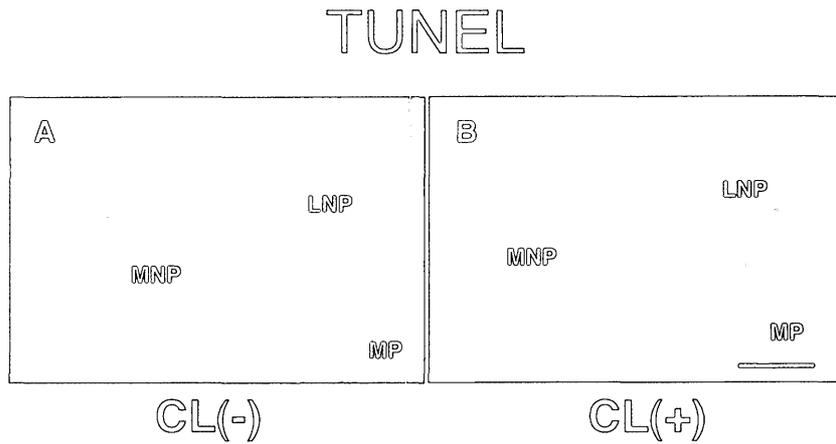


図2 TUNEL染色による上皮縫合内のアポトーシス
 A: CL(-)では基底膜(赤)で囲まれた上皮縫合内にTUNEL陽性細胞(緑色)が多数認められ、アポトーシスに陥った細胞が多数存在することを表す。B: CL(+)では上皮縫合内にTUNEL陽性細胞が全く認められない。MNP: 内側鼻隆起, LNP: 外側鼻隆起, MP: 上顎隆起, 青: DAPI, bar: 100 μm

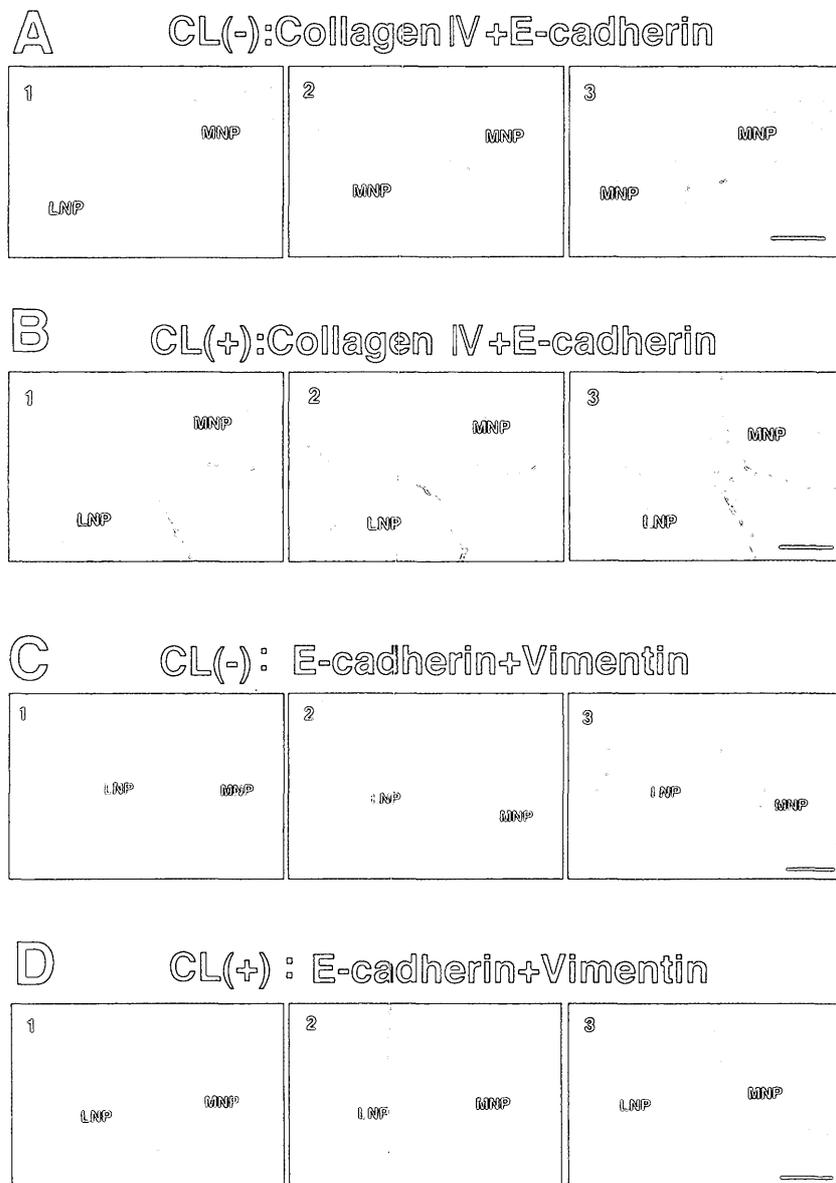


図3 内側鼻隆起(MNP)と外側鼻隆起(LNP)の癒合
 A: CL(-)におけるIV型コラーゲン(赤)とE-cadherin(緑)の二重蛍光染色。EpS形成後(1)、基底膜の断裂が起こり(2)やがてMNPとLNPが交通する(3)。核はDAPI(青)で染色した。Bar: 200 μm
 B: CL(+)におけるIV型コラーゲン(赤)とE-cadherin(緑)の二重蛍光染色。CL(+)では数個のE-cadherin陽性細胞によりEpSが形成されるが(1, 2, 3), EpS内ではMNPとLNPの交通は起こらない。Bar: 200 μm
 C: CL(-)におけるE-cadherin(緑)とVimentin(赤)の二重蛍光染色。EpS内でE-cadherin陽性細胞とVimentin陽性細胞が混在し(2)やがてMNPとLNPの間質が交通する(3)。D: CL(+)におけるE-cadherin(緑)とVimentin(赤)の二重蛍光染色。CL(+)ではEpS内にVimentin陽性細胞が認められない。Bar: 100 μm

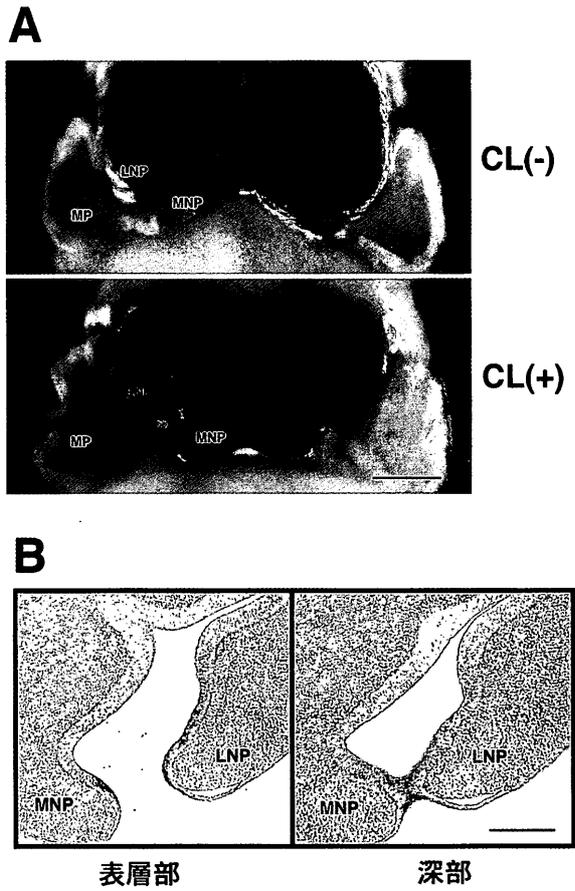


図4 Claudin6 mRNA の鼻隆起における発現
 A : E11.5 CL/Fr 胎仔の claudin6 をプローブとした Whole mount in situ hybridization. CL(-)に比較してCL(+)では、両側鼻隆起の特に本来癒合が起こるべき側面（外側鼻隆起（LNP）の内側面、内側鼻隆起（MNP）の外側面）に強く発現している。bar : 0.5 mm
 B : CL(+)EpS 上皮細胞における Claudin6 の過剰発現. A のCL(+)における Whole mount サンプルの薄切標本. 鼻隆起表層部ではMNP とLNPの解離部を、鼻隆起深部ではEpS 断面を示している. Claudin6 は両鼻隆起の上皮細胞に発現しており特にEpS の上皮細胞に強く発現している. Bar : 100 μ m

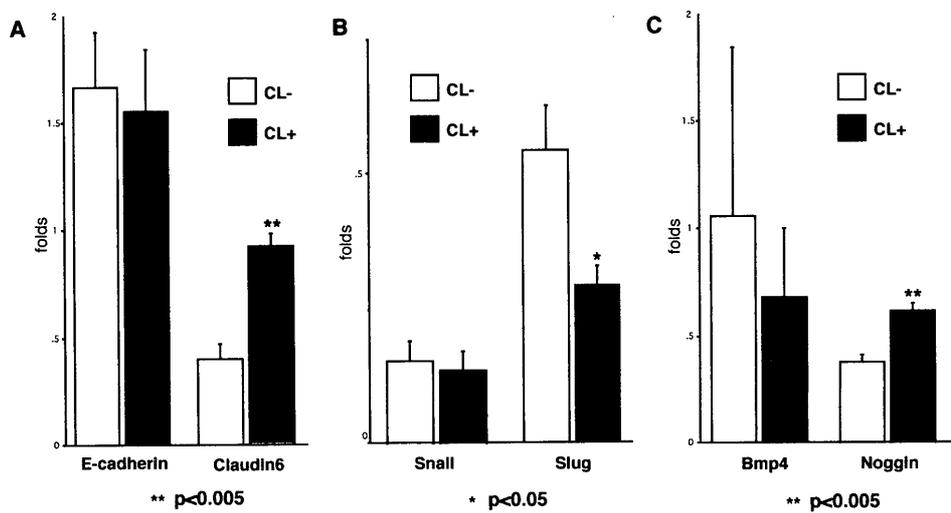


図5 リアルタイムPCRによるE11.5胎仔鼻隆起におけるmRNAの定量
 A : E-cadherin はCL(-)とCL(+)間で差が見られないのに対してClaudin6はCL(+)でCL(-)に比較して有意に高値を示す (p<0.005). B : Slug はCL(+)でCL(-)に比較して有意に低値を示す (p<0.05). C : Noggin ではCL(+)がCL(-)に比較して有意に高値を示す (p<0.005). いずれもGapdh mRNA量との比で表している.

れ用いた免疫蛍光二重染色を行った(図3)。CL(-)ではMNP, LNP共に下方へ成長, 発達し, その後MNPが外側へ成長, 発達することによりMNP・LNP癒合部位の被覆扁平上皮がお互いに接触し, EpSを形成する。EpSの上皮細胞はE-cadherin陽性であるが, 癒合部近傍ではその染色性は低下し, 部分的にビメンチン陽性細胞が認められる(図3C)。このビメンチン陽性細胞は図3Aの結果からMNPとLNP被覆扁平上皮の二つの基底膜で囲まれた細胞であることから上皮細胞から変化した細胞であると考えられる。時間の経過と共に基底膜構造は破壊されこのビメンチン陽性細胞の数は増加して最終的にMNPとLNPの間質が癒合(Mesenchymal bridge: MB)を起こす(図3A, C)。一方CL(+)ではMNP, LNP共に下方への成長, 発達は起こるが, MNPが外側への成長, 発達が遅いためLNPと接触する部分が極めて短いEpSを形成する(図3B, D)。免疫蛍光染色では数個のE-cadherin陽性細胞が見られたが, EpSを形成する上皮細胞にビメンチン陽性細胞は認められなかった(図3D)。またコントロールとして行った2次抗体のみ, また正常マウスの血清を用いた実験では陰性であった(図は省略)。

顔面隆起におけるClaudin6の発現

細胞接着分子であるPvrl1, E-cadherin, Claudin6をプローブとしてWhole-mount in situ hybridizationを行った。その中で特にClaudin6がCL(-)とCL(+)間に顕著な発現の差が見られた(図4A)。CL(+)ではCL(-)に比較してClaudin6の強い発現が見られ, 特にMNPとLNPとが本来癒合すべき側面(LNPの内側面, MNPの外側面)に強く発現している。より詳細に組織学的な検索をするためにパラフィン包埋した標本から薄切切片を作製して観察したところ(図4B), 表層部のMNPとLNPが接していない組織では, 2つの隆起がお互いに面している扁平上皮細胞にClaudin6の発現が見られ, また深部のEpSでは上皮細胞表層に特に強い発現が見られる。またコントロールとしてsense probeを用いた標本では陰性所見であった(図は省略)。

CL(-)とCL(+)の顔面隆起におけるClaudin6, Slug, Nogginの発現量

whole mount in situ hybridizationの結果からCL(+)の顔面隆起におけるClaudin6発現量が増加していることが示されたことより, 実際CL(-)に比較してどの程度のClaudin6 mRNAが増加しているかを知る目的でリアルタイムPCRによるmRNAの定量を行った。図5に示すようにCL(+)

における顔面隆起のClaudin6 mRNA量はCL(-)の約2倍に増加していた(図5A)。E-cadherin等の他の接着分子には有意差は認められなかった。また転写因子であるSnailおよびSlugのmRNA量を定量したところ, Snailには有意な差は見られなかったが, おもしろいことにSlugはCL(+)がCL(-)に比べて有意に減少していた(図5B)。さらに顔面隆起におけるBmp4およびNoggin mRNAの定量を試みた。その結果Bmp4 mRNA量には有意差は見られなかったがNoggin mRNA量はCL(+)でCL(-)に比較して有意な増加を示した(図5C)。

考 察

本論文ではヒトの口唇口蓋裂のモデルマウスのひとつであるCL/Frマウスを用いて胎仔期における口唇裂の発生過程を免疫組織学的手法により観察し, 口唇裂発症マウスCL(+)における遺伝子発現異常をwhole mount in situ hybridizationおよびリアルタイムPCRを用いて示した。

正常なCL/FrマウスではE11.5前後にLNPとMPとが一体となって複合体を形成し, MNPが外下方に向かって成長することによってその複合体と癒合する。お互いに癒合した3つの顔面隆起は発育・成長して一次口蓋を形成する。ところがCL(+)ではLNPとMPとの複合体は形成されるもののMNPが外下方に成長しないために複合体とMNPとの癒合不全が生じ, 結果として一次口蓋の形成が障害される¹⁵。この一次口蓋形成異常が後の口唇裂の原因になると考えられる。そして一次口蓋の形成が障害されることにより二次的に二次口蓋が形成されず, 口蓋裂を合併することになる。ではなぜCL/FrマウスではMNPがLNP/MP複合体と癒合しないのが問題となる。TUNEL法および免疫染色によりCL(-)ではLNPとMNPとの接着部位においてそれぞれの上皮によりEpSを形成すると, 上皮細胞の一部の細胞はアポトーシスを起こし, 引き続いて上皮細胞の間葉系細胞への形質転換(EMT), さらには基底膜の断裂をおこし最終的にMBを形成することを示した(図6参照)。これに対して, CL(+)ではEpSを形成するがアポトーシスおよびEMTが起こらず, アポトーシスあるいはEMTに何らかの異常があることが考えられた。この際アポトーシスがEMTに優先して起こるがアポトーシスがEMTを起こすための必須条件であるかどうかは不明である。またCL(-)ではEpSにおけるTUNEL陽性細胞はEpSの全層に分布していた。このことはSunら⁸がChickenでEpSを形成する

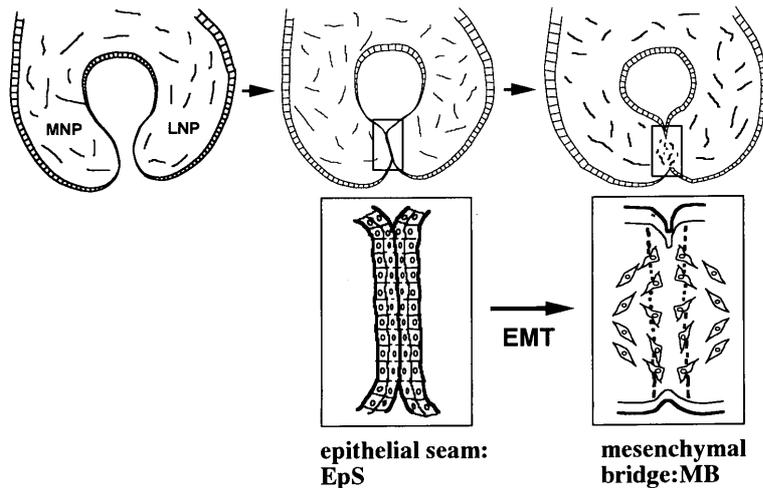


図6 一次口蓋形成の模式図
内側鼻隆起 (MNP) と外側鼻隆起 (LNP) が成長、発達し接着部位にてお互いの扁平上皮細胞が上皮縫合 (Epithelial seam) を形成した後、一部の上皮細胞はアポトーシスを起こし、残りの上皮細胞は EMT を起こして間葉系細胞に転換していく。その結果 2 つの隆起 (MNP/LNP) の間質は交通して (Mesenchymal bridge) 一次口蓋を形成する。

以前 (LNP と MNP が接触する以前) に外側の上皮細胞のみにアポトーシスが生じ、一旦 EpS が形成されると EpS 内ではアポトーシスは起こらずアポトーシスは EMT に無関係であるという報告と一致しない。これはマウスと鶏での種の違いによる違いであると考えられるが詳細は不明である。

また Wang ら⁶ は MNP と LNP が MB を起こす時間的な閾値の概念を提唱しており、CL/Fr マウスでは口唇裂を起こさないマウスよりその閾値に達する時間が遅れるために MB が起こらず口唇裂になるとしている。その遺伝的背景にはどういった遺伝子異常が存在するのか、その問いに対する答えの糸口となるべきものが今回の実験で見つかった。whole mount in situ hybridization により観察した Claudin6 遺伝子発現は CL(+) の EpS の上皮細胞に最も強く見られたことより Claudin6 の過剰発現が EMT と何らかの関係があるだろうと考えた。腎尿管上皮が EMT を起こす際、転写制御因子である Snail の働きにより上皮細胞の接着分子である E-cadherin の発現が抑制され¹⁵、上皮間の接着力が低下するとともに α SMA の発現とアクチンの再構築がおこり基底膜の断裂部から間質へと筋線維芽細胞に変化した細胞が遊走する¹⁷。E-cadherin の転写制御因子としては Snail, Slug, E12/E47, ZEB-1, SIP-1 などがありそれらは E-cadherin のプロモーター領域にある E-box に作用し E-cadherin 遺伝子発現を抑制する¹⁸。さらに Snail は adherens junction の E-cadherin だけでなく、tight junction の Claudin/occludin のプロモーター領域にも同様に存在する E-box に作用しそれらの発現を抑制する¹⁹。このことから考えると Slug も Snail と同様に Claudin 遺伝子に抑制的に働くことが可能である。実際、リアルタイム PCR では Snail と E-cadherin

の発現量に CL(+) と CL(-) で変化を認めなかったが、Slug の発現量が CL(+) で有意に低値を示し、Claudin6 は有意に高値を示す結果が得られた。このことは Slug が Claudin6 の転写を調節しており、Slug が低値であるために Claudin6 の発現を抑制することができず、その結果 Claudin6 の発現が上昇したと考えられる。以上のことから顔面隆起の被覆扁平上皮により形成される EpS における EMT では Slug が Claudin6 発現を抑制することによって起こり、CL(+) マウスでは Slug 発現低下が原因となり Claudin6 発現を抑制できないために EMT が起こらないという可能性が考えられた。

また胎児期顔面特に上口唇および一次口蓋の形成に Bmp シグナルが非常に重要であることが報告されている²⁰ ことよりリアルタイム PCR にて Bmp4 とそのアンタゴニストである Noggin²¹ の mRNA 量をそれぞれ測定した。CL(+) において Bmp4 は有意な変動は見られなかったものの Noggin は有意な高値を示した。これは Bmp シグナルが低下している状態であり、CL(+) では顔面隆起の成長が乏しい⁶ ことを考えると Bmp4 が顔面間葉細胞の増殖を亢進させる^{22,23} という報告と合致する。また CL(+) の EpS ではアポトーシスを起こした細胞が検出されず、これも Noggin の過剰発現によりアポトーシスが抑制されるという Sharov ら²⁴ の報告に一致している。以上のことより CL(+) 顔面隆起部においては根本的に Noggin 発現量が増加することによって Bmp シグナルが低下した状態になっており、その結果として顔面隆起の発育が悪く、隆起癒合面での上皮細胞のアポトーシスが起らないというメカニズムが考えられる。さらに Bmp シグナルが低下すると Snail や Slug の発現が抑制され²⁵、その結果として上皮細胞に特異的な E-cadherin や Claudin6

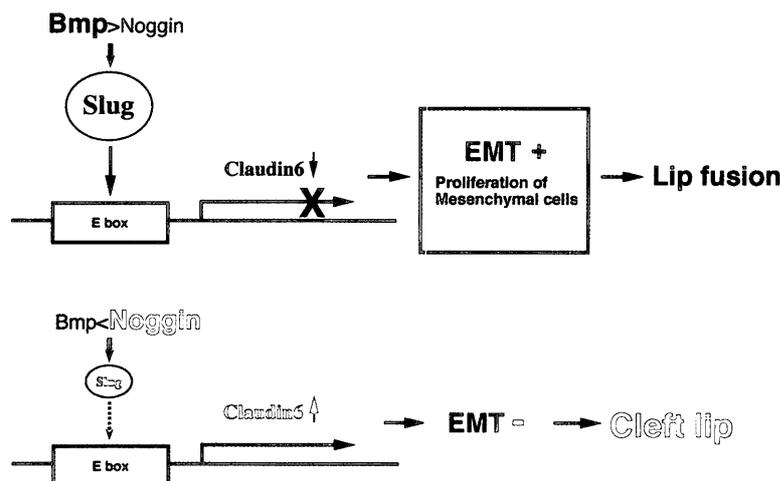


図7 CL/Fr マウスにおける口唇裂発生の分子メカニズム仮説
CL(-)ではBMPシグナルが亢進することにより発現亢進した転写制御因子 Slug が接着分子 Claudin6 のプロモーター領域 E box に作用し、その発現が抑制されることで EMT が起こり口唇形成が起こる。これに対して、CL(+)では Noggin の発現が亢進することにより相対的に Bmp シグナルが低下し、Slug の発現亢進が起こらないため、Claudin6 の発現を抑制することができない結果、EMT が起こらず口唇裂を生じる。

などの細胞接着分子の発現が抑制されず上皮細胞の性質を失わないために EMT が起こらないことが推察された。つまりアポトーシスの抑制および EMT の不履行が CL/Fr マウスの MB を遅らせる原因となっていることが示唆されたわけである。

また CL/Fr マウスでは口唇口蓋裂のほかにも心房中隔欠損や動脈管開存といった心奇形の存在が報告されている²⁶⁻²⁹。Fraser 等は A/J マウス、CL/Fr マウスの CL(+) の新生児のほとんどがチアノーゼを呈し生後間もなく死亡することに着目し、そのような新生児に心房中隔欠損や動脈管開存がみられたと報告しており、口唇と心房中隔の形成に必要な因子を遅らせる共通の因子が存在するのではないかと考察している²⁹。EMT は胎生期の心臓の房室管 (AV canal) に生じる心内膜隆起 (endocardial cushion) の癒合の過程でも起こっており、この癒合が生じないと心房中隔欠損症や心室中隔欠損症などの先天性心疾患を起こすこととなる。Romano と Runyan^{25,30} は房室管で Slug が発現しており、この部位の EMT において中心的な役割を果たしているのは Slug であると報告している。本実験において CL(+) で Slug mRNA 量が低値を示し顔面隆起癒合部上皮の EMT が障害されていることから推察すると、先に述べた Fraser 等が考察している口唇と心房中隔の形成に必要な共通の因子²⁹ とは Slug である可能性が高い。そしてその Slug 遺伝子の発現を調節しているものが Bmp シグナルで Bmp とそのアンタゴニストである Noggin の量的バランスにより Bmp シグナルの強さが決定されると考えられる。図7はそれらの関係をまとめて図式化したものである。Juriloff ら³¹ は口唇裂のマウスモデルである“A”系統マウスの遺伝子変異部位を2カ所同定している。そのローカスの中に Bmp シグナルに影響を与える

遺伝子があるかどうかは現在のところ不明であるが、直接あるいは間接的に本論文で示した顔面隆起の癒合に関係する遺伝子変異が必ず存在するはずである。CL/Fr マウスにおける口唇裂の原因を遺伝子レベルにおいて解明することが今後の研究の課題である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導頂きました近畿大学医学部形成外科学教室の上石 弘教授、磯貝典孝助教授に深甚なる謝意を表します。また本研究の全般に渡り直接ご指導賜りました和歌山県立医科大学第一病理学教室の大島 章教授、村垣泰光助教授に心から感謝申し上げます。

本論文の一部は第91回日本病理学会総会(横浜, 2002年3月26-28日), 第26回日本口蓋裂学会総会(岡山, 2002年5月30-31日), 第42回先天異常学会学術集会(浜松, 2002年7月12日), 第11回日中形成外科学術交流会(南京, 2002年7月26日), 第92回日本病理学会総会(博多, 2003年4月24日), 第12回日本形成外科学会基礎学術集会(東京, 2003年10月9日)で発表した。

文 献

1. 杉本修一(1989)母体貧血が口唇、口蓋裂発生に及ぼす影響に関する実験的研究。日口蓋誌 14: 343-357
2. 香月 武(1979)口腔奇形(口蓋裂), 川俣順一, 松下 宏編。疾患モデル動物ハンドブック。東京: 医歯薬出版株式会社, 528-533
3. 佐藤和則(1988)口唇裂および口蓋裂の遺伝的研究, とくに多因子遺伝を中心として, 日口蓋誌 13: 157-181
4. Davidson JG, Fraser FC, Schlager G (1969) A maternal effect on the frequency of spontaneous cleft lip in the A-J mouse. *Teratology* 2: 371-376
5. Bornstein S, Trasler DG, Fraser FC (1970) Effect of the uterine environment on the frequency of spontaneous cleft lip in CL/FR mice. *Teratology* 3: 295-298
6. Wang KY, Juriloff DM, Diewert VM (1995) Deficient and delayed primary palatal fusion and mesenchymal

- bridge formation in cleft lip-labile strains of mice. *J Craniofac Genet Dev Biol* 15: 99-116
7. Fitchett JE, Hay ED (1989) Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse. *Dev Biol* 131: 455-474
 8. Sun D, Baur S, Hay ED (2000) Epithelial-mesenchymal transformation is the mechanism for fusion of the craniofacial primordia involved in morphogenesis of the chicken lip. *Dev Biol* 228: 337-349
 9. Suzuki K, Hu D, Bustos T, Zlotogora J, Richieri-Costa A, Helms JA, Spritz RA (2000) Mutations of PVRL1, encoding a cell-cell adhesion molecule/herpesvirus receptor, in cleft lip/palate-ectodermal dysplasia. *Nat Genet* 25: 427-430
 10. Yang J, Liu Y (2001) Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 159: 1465-1475
 11. Turksen K, Troy TC (2001) Claudin-6: a novel tight junction molecule is developmentally regulated in mouse embryonic epithelium. *Dev Dyn* 222: 292-300
 12. Nieto MA (2002) The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 155-166
 13. Savagner P, Yamada KM, Thiery JP (1997) The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 137: 1403-1419
 14. Ashique AM, Fu K, Richman JM (2002) Endogenous bone morphogenetic proteins regulate outgrowth and epithelial survival during avian lip fusion. *Development* 129: 4647-4660
 15. Millicovsky G, Ambrose LJ, Johnston MC (1982) Developmental alterations associated with spontaneous cleft lip and palate in CL/Fr mice. *Am J Anat* 164: 29-44
 16. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2: 76-83
 17. Hay ED (1995) An overview of epithelial-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 154: 8-20
 18. Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A (2003) The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* 116: 499-511
 19. Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S (2003) Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci* 116: 1959-1967
 20. Francis-West PH, Tatla T, Brickell PM (1994) Expression patterns of the bone morphogenetic protein genes Bmp-4 and Bmp-2 in the developing chick face suggest a role in outgrowth of the primordia. *Dev Dyn* 201: 168-178
 21. Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM (1996) The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86: 599-606
 22. Barlow AJ, Francis-West PH (1997) Ectopic application of recombinant BMP-2 and BMP-4 can change patterning of developing chick facial primordia. *Development* 124: 391-398
 23. Mina M, Wang YH, Ivanisevic AM, Upholt WB, Rodgers B (2002) Region- and stage-specific effects of FGFs and BMPs in chick mandibular morphogenesis. *Dev Dyn* 223: 333-352
 24. Sharov AA, Weiner L, Sharova TY, Siebenhaar F, Atoyian R, Reginato AM, McNamara CA, Funa K, Gilchrist BA, Brissette JL, Botchkarev VA (2003) Noggin overexpression inhibits eyelid opening by altering epidermal apoptosis and differentiation. *EMBO J* 22: 2992-3003
 25. Romano LA, Runyan RB (2000) Slug is an essential target of TGFbeta2 signaling in the developing chicken heart. *Dev Biol* 223: 91-102
 26. Anjos R, Menezes I, Martins FM (1999) The percutaneous closure of the ductus arteriosus in adults. *Rev Port Cardiol* 18: 255-259
 27. Kadowaki S, Sakamoto M, Kamiishi H, Tanimura T (1998) Atrial septal defect in cyanotic CL/Fr mice. *Cleft Palate Craniofac J* 35: 58-64
 28. Kadowaki S, Sakamoto M, Kamiishi H, Tanimura T (1997) Embryologic features of term fetuses and newborns in CL/Fr mice with special reference to cyanosis. *Cleft Palate Craniofac J* 34: 211-217
 29. Fraser FC, Rosen J (1975) Association of cleft lip and atrial septal defect in mice: a preliminary report. *Teratology* 11: 321-324
 30. Romano LA, Runyan RB (1999) Slug is a mediator of epithelial-mesenchymal cell transformation in the developing chicken heart. *Dev Biol* 212: 243-254
 31. Juriloff DM, Harris MJ, Brown CJ (2001) Unravelling the complex genetics of cleft lip in the mouse model. *Mamm Genome* 12: 426-435