

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

Heterogeneity of Fusion Phenomena in Maxillo-facial Morphogenesis and Epithelial Cell Differentiation during the Fusion of Palatal Shelves

滝川 俊也

Toshiya Takigawa

朝日大学歯学部口腔構造機能発育学講座口腔解剖学分野

要旨 いわゆる‘癒合’は形態学的に‘見かけ上の癒合’と‘真の癒合’という2つの異なるタイプに区別されるが、顎・顔面の形態形成過程で起こる癒合現象の異種性はほとんど知られていない。また、‘真の癒合’として最も研究されてきた口蓋突起の癒合でさえ、上皮が消失するメカニズムに関して論争が続いている。本稿では、癒合における‘見かけ上の癒合’と‘真の癒合’の差異を解説し、マウス胎児の単一口蓋突起培養法で上皮細胞が細胞移動、上皮間葉形質転換、アポトーシスを起こして消失する例を供覧して、‘真の癒合’において上皮はどのようにして消えるのかについて解説する。

キーワード：癒合現象、口蓋突起内側縁上皮細胞、最終分化、器官培養

1. はじめに

ヒトにおける顎・顔面領域の裂奇形発症機構の解明のため、古くより実験動物を用いて顎・顔面形態形成の正常発生および異常発生の研究が行われてきた。それらの研究のなかでも最も焦点を当てて研究が行われてきたのが、裂奇形の発生と密接な関連をもつ顔面突起や口蓋突起の癒合現象である。これまでに、種々の裂奇形の原因が遺伝子レベルで明らかになりつつある一方で、顎・顔面形態形成における癒合現象の異種性はほとんど論じられないまま、遺伝子と癒合が短絡的に結びつけられていく傾向にある。

本稿では、形態学の観点から顎・顔面領域で起こる癒合現象の異種性を解説したうえで、筆者らが開発した単一口蓋突起回転浮遊培養法によって明らかになった口蓋突起内側縁上皮細胞の最終分化と消失について概説する。

2. 顎・顔面形態形成における癒合現象の異種性

顎・顔面は胚子期に口窩を取り囲んで発生する顔面突起、すなわち、前頭鼻隆起から鼻窩を囲んで派生する内側鼻突起と外側鼻突起、第一鰓弓の腹側端が二分して口窩の側方に上顎突起、口窩の下方に下顎突起が生じ、それらが隣接する突起と相互に癒合することにより形成される(図1)。顎・顔面の形態形成に引き続いて、原始口腔内では上顎突起から生

じる左右一对の口蓋突起同士が正中中部で癒合して二次口蓋が形成され、二次口蓋はさらに鼻中隔および内側鼻突起同士の癒合により生じた一次口蓋とも癒合して鼻腔と口腔は互いに隔てられる(図2)。

これら顎・顔面形態形成の過程で起こる顔面突起や口蓋突起のいわゆる癒合現象には、本来、mergingとfusionという全く異なる2つの様式が存在することがPattenにより提唱されている¹⁾(図3)。すなわち、mergingとは元々一続きの構造に2つの隆起が生じた後、隆起間の上皮は消えることなく間葉の移動および増殖によって隆起間から押し出される現象である。一方、fusionとは互いに離れた2つの突起同士が接触し、上皮性縫合を形成した後、上皮が消えて間葉が合流する現象である。しかし、日本ではmergingとfusionはともに癒合または融合と訳されるため、両者の差異を無視して単に‘癒合’として扱われてきた。Pattenが提唱したmergingとfusionという互いに異なる癒合現象の概念を述べた彼の著書Patten's Human Embryologyは絶版となっているが、その概念はTen Cate's Oral Histologyに継承されており、現在、mergingはostensible fusion(‘見かけ上の癒合’)、fusionはactual fusion(‘真の癒合’)と表現されている²⁾。しかし、それぞれの顔面突起の間で起こる癒合が‘見かけ上の癒合’によるのか、あるいは‘真の癒合’によるのかについてはいずれの成書も詳述しておらず、‘真の癒合’が顎・顔面領域の形態形成で起こる唯一の例として、口蓋突起の癒合が挙げられているにすぎない。

〒501-0296 岐阜県瑞穂市穂積1851
TEL & FAX: 058-329-1407
E-mail: takigawa@dent.asahi-u.ac.jp
2009年8月31日受付

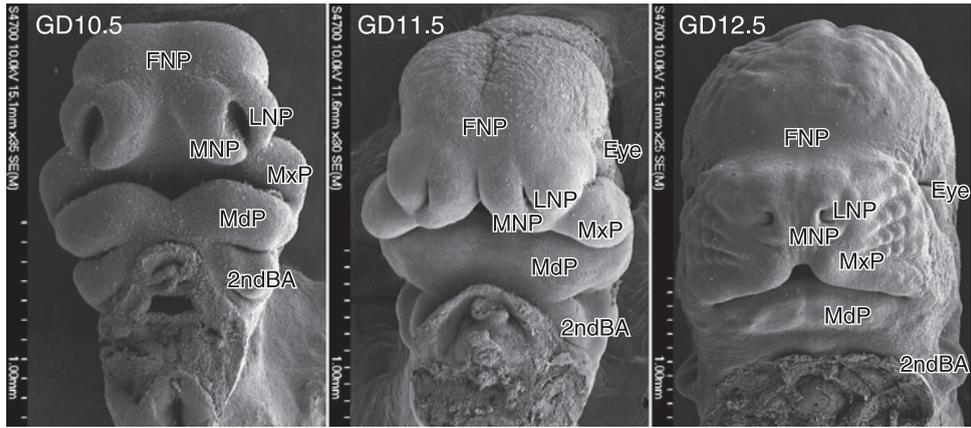


図1 マウス胎児 (ICR) の顎・顔面形態形成。(左図) 妊娠 10.5 日齢. 前頭鼻隆起 (FNP), 内側鼻突起 (MNP), 外側鼻突起 (LNP), 上顎突起 (MxP), 下顎突起 (MdP) の各顔面突起と第二鰓弓 (2ndBA) が大きく膨らむ。(中央図) 妊娠 11.5 日齢. 各顔面突起相互の癒合が進み, 各突起の間の溝がしだいに浅くなっていく。(右図) 妊娠 12.5 日齢. 顔面突起の癒合が完了している。

3. 癒合の際の上皮消失過程で起こるアポトーシスと上皮-間葉形質転換

顎・顔面領域における癒合現象のなかで最も研究されてきたのが‘真の癒合’とされる口蓋突起の癒合である。しかし、口蓋突起の癒合現象でさえ、“癒合の際に上皮はどのようにして消えるのか？”という疑問は未だ完全に解明されていない。口蓋突起の先端を覆う口蓋突起内側縁上皮細胞は上皮性縫合を形成した後、いわゆるプログラム細胞死を起こすことは古くから知られていた（細胞形態学的にはアポトーシスの特徴を示す）。しかし、口蓋突起内側縁上皮の表層細胞（ペ

リダーム）は死ぬけれども、基底細胞の多くは上皮-間葉形質転換（分化転換とも表現される）を起こして間葉細胞として生き残るという‘上皮-間葉形質転換’説^{3,4}、あるいは形質転換することなく上皮のまま移動して近接する鼻腔または口腔側の上皮として生き残るという‘細胞移動’説が相次いで提唱された⁵。筆者らは、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を証明して、アポトーシスは癒合に必要な不可欠な現象ではないことを報告した⁶。ところが、別の研究グループは同じくカス

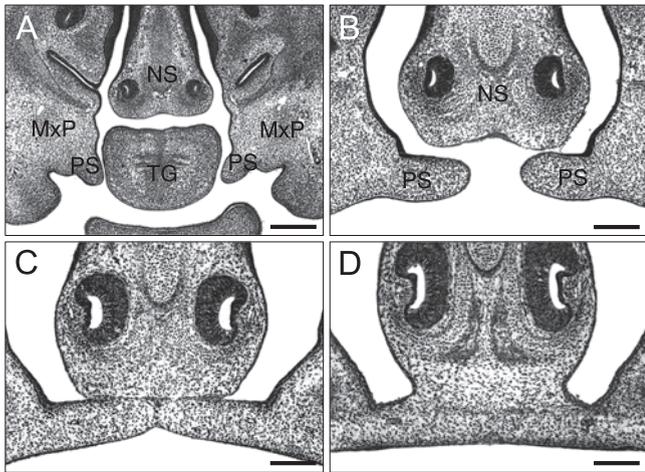


図2 マウス胎児の口蓋形成過程の組織像（前頭断切片）。(A) 妊娠 13.5 日齢, (B) 妊娠 14.0 日齢, (C) 妊娠 14.0 日齢, (D) 妊娠 14.5 日齢. 口蓋突起 (PS) は妊娠 11 日頃に上顎突起 (MxP) から発生し, 13 日頃まで舌 (TG) の両側で下方に向かって成長するが, 14 日の初め頃に舌の上で互いに向き合うようになり, 伸張を続ける. 正中で互いに接触すると, 口蓋突起内側縁上皮は上皮性縫合を形成した後, しだいに消失して, 15 日頃までに口蓋突起同士および鼻中隔 (NS) との癒合が完了する. Bar は 200 μm .

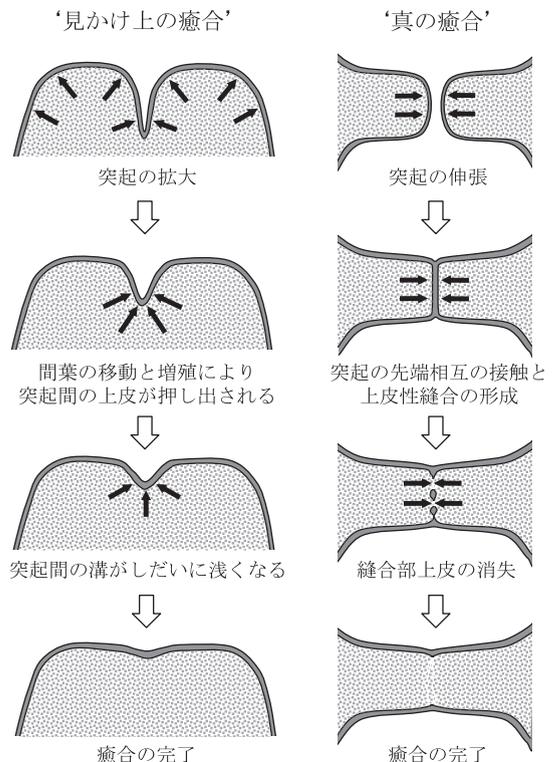


図3 ‘見かけ上の癒合’ と ‘真の癒合’ の差異を表す模式図。

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の癒合が抑制されることを報告し、口蓋突起の癒合の際に上皮細胞はすべてアポトーシスを起こして消えると主張した⁷⁾。その後、カスパーゼカスケードの上流で機能する *Apaf-1* のノ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てアポトーシスがほとんど起こらないにもかかわらず、上皮性縫合の消失は若干遅れるものの口蓋突起は癒合することが報告されている⁸⁾。したがって、筆者らが主張したとおり、アポトーシスが抑制されても上皮一間葉形質転換または細胞移動によって上皮は消失し、癒合するのである。

それでは、実際に、癒合の際に口蓋突起内側縁上皮細胞は上皮一間葉形質転換を起こすのであろうか？ この上皮一間葉形質転換が起こるのか、起こらないのかに関して、20年近く論争が続いている。古くはマウス胎児の癒合前の口蓋突起を切り出し、蛍光色素で内側縁上皮細胞を標識した後、器官培養により口蓋突起を癒合させて、標識された細胞の挙動を調べる *in vitro* 細胞標識・追跡方法が行われたが、この実験手法が上述の‘上皮一間葉形質転換’説と‘細胞移動’説という、互いに相反する説が提唱される発端となっている^{4,5)}。最近では、Cre-loxP システムを用いて、個体レベルで *Keratin14*-プロモーター下流で β -ガラクトシダーゼを恒常的に発現させ、その酵素活性を利用して口蓋突起内側縁上皮細胞の運命を調べる、コンディショナルノックインマウスを用いた *in vivo* 細胞標識・追跡法による研究が相次いで報告された^{8,9)}。しかし、そのような最新のテクノロジーを駆使しても、研究グループにより実験結果は異なっていた。すなわち、先行したグループは、癒合した口蓋間葉中に標識された細胞がみられなかったことから、上皮一間葉形質転換は起こらないと結論づけた⁹⁾。しかし、別のグループは癒合し

た口蓋間葉中に標識された細胞を見いだして、上皮一間葉形質転換が起こると主張している⁸⁾。その後、これら相反する結果が生ずる原因を解明した研究報告はなく、この論争に終止符は打たれないままである。

4. 単一口蓋突起回転浮遊培養法による口蓋突起内側縁上皮細胞の最終分化

これまでに提唱されたプログラム細胞死（アポトーシス）、上皮一間葉形質転換、細胞移動のいずれも、癒合の後に口蓋突起内側縁上皮細胞は消えてなくなることから、これらは細胞の最終分化と考えられる。筆者らは、過去の蛍光色素による細胞標識・追跡法による研究結果の相違は、実験に使用した口蓋突起の器官培養法に起因すると考え、口蓋突起内側縁上皮細胞の最終分化を効率的に起こすことができる口蓋突起の器官培養法の開発を研究していた。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置いて、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。Shiota ら¹⁰⁾ は全胚培養系で用いられていた回転浮遊培養法を応用して、無血清培地で口蓋突起を癒合させる方法を発表していたが、世の主流は静置培養法のままであった。静置培養法でも回転浮遊培養法でも口蓋突起の癒合が起こることから、通常の細胞培養と同様に炭酸ガスインキュベーターで培養する方法に対して誰も疑問を持たなかったためと考えられる。しかし、筆者らは、まず、静置培養法と回転浮遊培養法、培養液、微量元素やアルブミン等のサプリメント、培養に用いる混合ガス等について、様々な条件を試し、口蓋突起の器官培養に至適な培養方法と培養条件を模索した。そして、その効果を口蓋突起の伸張を指標として判定するため、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

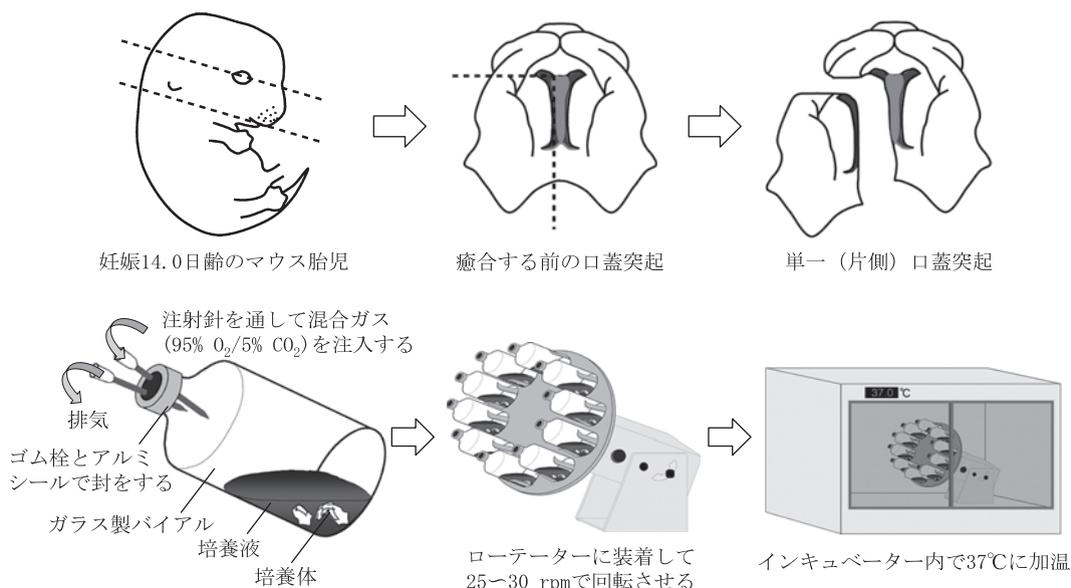


図4 マウス胎児の口蓋突起の切り出し法(上段)と単一口蓋突起回転浮遊培養法(下段)の概略図。上段の図中、点線は切断線の位置を表す。

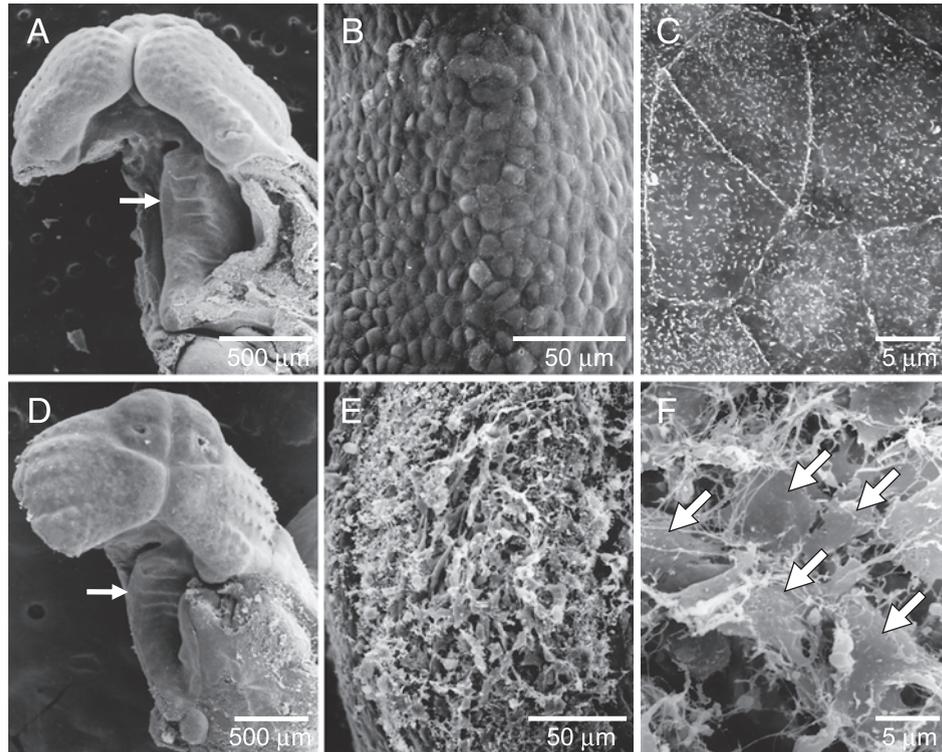


図5 単一口蓋突起の培養前と培養後の口蓋突起内側縁の走査電子顕微鏡像。(A, B, C) 培養開始前, (D, E, F) 36時間培養後。口腔側から観た培養前と培養後の単一口蓋突起の全体像 (A, D) で、矢印で示す部分が口蓋突起内側縁である。矢印方向から観た内側縁の部分 (B, E) を覆う細胞の形態を拡大像 (C, F) で示す。培養前の口蓋突起内側縁は周囲の細胞と相互に密着した典型的な上皮細胞 (C) で覆われているが、培養後の内側縁は矢印 (F) で示すように、細胞間隙が広く、多数の突起を伸ばして相互に接する線維芽細胞様の間葉細胞で占められている。

い、組織学的に解析していた。その過程で、偶然、口蓋突起内側縁上皮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消失する能力を持つことを見だし、口蓋突起内側縁上皮細胞の最終分化能力を解析するための単一口蓋突起回転浮遊培養法として発表した¹¹⁾ (図4)。この器官培養系では、図5および図6に示すとおり、培養を開始して36時間以内に口蓋突起内側縁上皮のみが完全に消失し、その再現性も100%であるため、‘癒合の際に上皮はどのようにして消えるのか’という研究に好適な器官培養法であった。そして、培養開始から6時間ごとに培養体を固定して、走査電子顕微鏡による細胞形態の変化および組織学的解析を詳細に行った結果、口蓋突起内側縁上皮は単に剥がれ落ちて消えるのではなく、内側縁上皮の表層細胞は培養を開始して約18時間後までに、サイトケラチン陽性のまま間葉細胞様の形態に変化して鼻腔または口腔側上皮側に移動することが判明した。一方、基底細胞は、ほぼ同じ頃にサイトケラチン陰性となって上皮間葉形質転換を起こした後、直下の間葉側へ移動し始め、上皮直下の基底膜が分解される際にその多くがアポトーシスを起こすことが明らかとなった¹¹⁾。すなわち、これまで論争の焦点であった‘癒合の際に上皮はどのようにして消えるのか?’という命題に対して、細胞移動、上皮間葉形質転換、アポトーシスのいずれもが口蓋突起内側縁上皮の消失過程で起こっていることを初めて証明したのである。

5. 羊水が口蓋突起内側縁上皮細胞の最終分化に及ぼす影響

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、‘上皮性縫合が形成されないと口蓋突起内側縁上皮は決して消失しない’という定説が存在していた。したがって、筆者らは、自身らが開発した単一口蓋突起回転浮遊培養法による研究結果によって、さらに‘何故、子宮内では上皮性縫合が形成されなければ上皮は消失しないのか?’という、新たな命題を解決しなければならなくなったのである。そして考え抜いた末に、子宮内環境因子である羊水に着目し、培地に羊水を加えて口蓋突起を培養した結果、図7に示すように、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見だした¹¹⁾。すなわち、上皮性縫合の形成には、羊水の影響を取り除いて口蓋突起内側縁上皮の最終分化による消失を促す役割があることが強く示唆された。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実験的に証明した¹²⁾。これまで、口蓋の培養実験は子宮内で起こる癒合現象を忠実に再現していると広く信じられてきたが、*in utero* と *in vitro* の相違として、羊水の口蓋突起内側縁上皮細胞の最

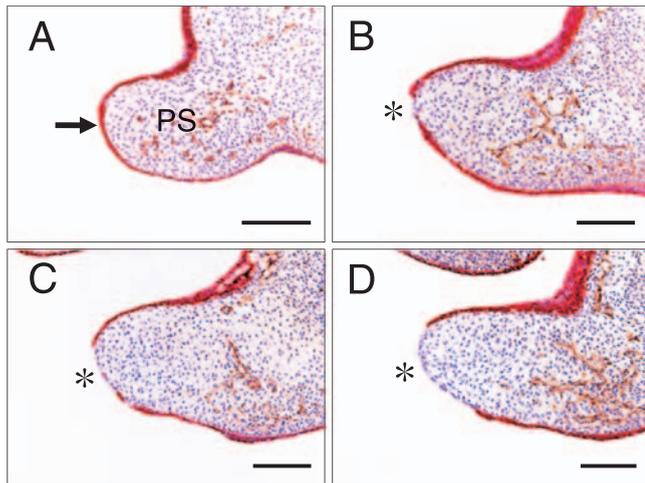


図6 単一口蓋突起回転浮遊培養による口蓋突起内側縁上皮細胞の消失過程の組織像。抗サイトケラチン抗体と抗IV型コラーゲン抗体を用いた二重免疫染色により、上皮を赤色 (VECTOR RED)、基底膜を茶色 (DAB) で示す。(A) 培養開始前、(B) 18 時間培養後、(C) 24 時間培養後、(D) 36 時間培養後。培養開始前の口蓋突起 (PS) の先端を覆っている内側縁上皮 (図 A の矢印) は、培養を開始して 18 時間頃より消失し始め、36 時間後では内側縁上皮とその基底膜は完全に消失している (図 B, C, D のアステリスク)。Bar は 50 μm 。

終分化に与える影響や創傷治癒促進作用が初めて明らかになったのである。

6. おわりに

一見、単純な現象とみなされがちな癒合にも、実に多彩な細胞の分化や挙動、環境との相互作用が起こっている。それ故、‘見かけ上の癒合’と‘真の癒合’という癒合現象の差異は顎・顔面の正常形態形成および種々の裂奇形発症のメカニズムや発生頻度の差異が生じる原因、あるいは顔裂性嚢胞の嚢胞壁上皮の由来などをより正しく理解するうえできわめて重要な事項であると考えられる。また、顎・顔面領域の形態形成だけでなく、個体発生の過程で全身の各所で起こる癒合現象にも多様性が存在するはずである。しかし、残念なことに、現在も改訂が続けられているラングマン人体発生学 (メディカル・サイエンス・インターナショナル社)、ムーア人体発生学 (医歯薬出版)、ラーセン最新人体発生学 (西村書店)

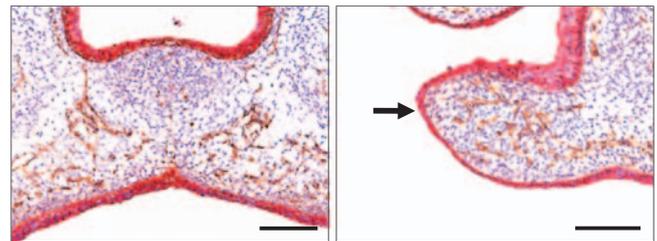


図7 マウス羊水添加培地で 36 時間培養した後の口蓋突起の組織像。図6と同様に、上皮を赤色 (VECTOR RED)、基底膜を茶色 (DAB) で示す。(左図) 対のまままで培養した口蓋突起、(右図) 片側のみ培養した口蓋突起。羊水の存在下では、対にした口蓋突起では内側縁上皮が上皮性縫合を形成した後に消えて癒合が起こるが、上皮性縫合が形成されない単一口蓋突起では口蓋突起内側縁上皮の消失が妨げられている。Bar は 50 μm 。

などの成書では、動物実験の成果に基づいた発生に関連する遺伝子等が続々と書き加えられる一方で、癒合現象の異種性、多様性に関する記述は皆無のままである。今後、発生における癒合現象に関して、まさに分子と形態を‘見かけ上の癒合’ではなく、‘真の癒合’に発展させていくことが望まれる。

文 献

- 1) Patten, B.M.: in Corliss, C.E. (Ed.), *Patten's Human Embryology*, McGraw-Hill Book Company, 257–268 (1968)
- 2) Ten Cate, A.R.: in Nanci, A. (Ed.), *Ten Cate's Oral Histology*, Mosby Elsevier, 38–46 (2008)
- 3) Fichett, J.E. and Hay, E.D.: *Dev. Biol.*, 131, 455–474 (1989)
- 4) Griffith, C.M. and Hay, E.D.: *Development*, 116, 1087–1099 (1992)
- 5) Currence, M.J. and Ferguson, M.W.: *Development*, 114, 379–388 (1992)
- 6) Takahara, S., Takigawa, T. and Shiota, K.: *Int. J. Dev. Biol.*, 48, 39–46 (2004)
- 7) Cuervo, R. and Covarrubias, L.: *Development*, 131, 15–24 (2004)
- 8) Jin, J.-Z. and Ding, J.: *Development*, 133, 3341–3347 (2006)
- 9) Vaziri, S.F., Hallberg, K., Harfe, B.D., McMahon, A.P., Linde, A. and Gritli-Linde, A.: *Dev. Biol.*, 285, 490–495 (2005)
- 10) Shiota, K., Kosazuma, T., Klug, S. and Neubert, D.: *Acta Anat. (Basel)*, 137, 59–64 (1990)
- 11) Takigawa, T. and Shiota, K.: *Int. J. Dev. Biol.*, 48, 307–317 (2004)
- 12) Takigawa, T. and Shiota, K.: *Int. J. Dev. Biol.*, 51, 67–77 (2007)