総 説

マウス二次口蓋形成と遺伝子改変マウスに発症する口蓋裂

田 谷 雄 二 添 野 雄 一 島 津 徳 人 青 葉 孝 昭

日本歯科大学歯学部病理学教室（主任：青葉孝昭教授）

Palatogenesis and Cleft Palate Formation in Mice : Related Genes and Molecules

Yuji Taya, Yuuichi Soeno, Yoshihito Shimazu and Takaaki Aoba

*Department of Pathology, School of Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University
1-9-20 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8159, Japan*

はじめに

頭蓋顔面部の形態形成には多数の遺伝子（その転写産物）が関与しており、それらの発現は時間的・空間的に精妙に制御されている。単独あるいは複数の遺伝子変異、あるいは外来性の催奇形因子（環境要因）の影響によって、形態形成の途上でこれら遺伝子の発現ネットワークの調和が破綻すると、表現型の異常（先天性奇形）を引き起こす。頭蓋顔面部の先天性奇形のうちでも口蓋裂は高頻度で発症する病態であり、現状では、その治療と術後の機能回復のために患者（その家族）・医師の側では多大の負担を強いられている。21世紀の歯科医療を展望する際には、口腔顎顔面の形態異常を予防しうることが望まれており、その実現を目指して、口腔顎顔面の器官発生の機構を細胞・分子レベルで解明するとともに、口蓋裂の発症に導く環境因子や遺伝子異常の同定が急務の課題となっている。

二次口蓋の形成 (palatogenesis) は上顎突起から左右1対の口蓋突起の発生を起点として、舌側面に沿った下方伸長、舌上方への挙上から水平方向への伸長、左右突起間での接着、上皮索の消失と間葉組織の合流の段階を経て完了する¹⁾。口蓋突起を被覆する上皮細胞は2層構造を保っているが、突起被覆上皮の中央部に位置する細胞 (medial edge epithelial cells ; MEE 細胞と略す) は運動性に富み、口腔側および鼻腔側の予定被覆上皮とは異なる細胞動態を示す。挙上から水平伸長期にあるマウス二次口蓋を例に挙げると、片側の口蓋突起の前方から後方までに位置する MEE 細胞は 1,000 個内外にすぎな

いが、左右突起間での接着を担っており、いったん MEE 細胞が接合して上皮索を構成すると、後述するような上皮索の分断化・消失のプログラムが起動して、間葉組織の合流へと導いていく。したがって、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 (morphogenesis) を調べるうえで、二次口蓋形成と MEE 細胞の分化・細胞動態は格好の実験モデルを提供している。さらに、外来性の催奇形因子の同定や奇形の成り立ち (teratogenesis) を探求していくうえで、実験動物での口蓋裂の発症モデルや MEE 細胞の接着・癒合・消失過程を再現できる器官培養系は有効な研究手段となっている。

マウス二次口蓋の各形成段階に関与している遺伝子産物と制御因子については、これまでに免疫組織化学、in situ hybridization, RT-PCR を用いて、それらの発現時期と組織内分布、発現順序について検討が進められてきた。近年、遺伝子改変マウスが続々と作出されるなかで、100%の発症率で口蓋裂を生じさせる遺伝子欠損についての報告例も数を増してきている。遺伝子改変マウスにみられる口蓋裂の病態を詳細に比較すると、標的遺伝子の欠落（特記しない場合は、-/-、ホモザイゴートを意味する）によって特定の口蓋発生段階が障害されていることに気づく。今回の総説では、遺伝子改変マウスでの表現型に着目して、特定の遺伝子異常に起因する口蓋裂の発症機序についての最近の知見をまとめ、口蓋形成と催奇形発生のメカニズムについての現状での理解の到達点と今後に残された課題について述べる。

遺伝子改変マウスで発症する口蓋裂

表1では、特定の遺伝子改変に伴う表現型の変化が詳述されている原著論文を検索対象として、高頻度で口蓋裂の発症をきたすマウスモデルをまとめている。これらの遺伝子の過半数は転写因子をコードしており、そのほとんどがホメオボックス遺伝子である。これらの転写因子が欠落すると、転写活性の下流に位置する多数の遺伝子発現が影響されることから、口蓋裂を含む広範囲の頭蓋顔面形態異常や、四肢や心臓・腎臓などの全身諸器官の形態異常を伴うことが多い。なお、報告の記載内容では、口蓋裂が多様な表現型異常のひとつとして列記されているに止まり、口蓋発生の停止時期や障害の成り立ちが特定されていない場合も多い。他方、 $TGF\beta$ スーパーファミリーに属するサイトカインとその受容体の欠落も口蓋裂をもたらすが、 $TGF\beta 3$ 遺伝子ノックアウトマウスでは口蓋裂が主要な病態として現れ、MEE細胞の接着・癒合が特異的に障害される点で特に注目される^{2,3)}。

1. ホメオボックス遺伝子異常と口蓋裂

ホメオボックス遺伝子はその名のとおりの器管発生の調節に関わっているが、頭蓋顔面形成においては神経堤細胞の分化や移動に関与していることが知られている。これらのホメオボックス遺伝子の欠落に起因する口蓋裂の病態の特徴として、口蓋突起の成長不全により、裂隙が大きく離開していることが多い。ホメオボックス遺伝子のなかでもクラスターを構成している Hox 遺伝子群は、脊椎動物の骨格形成に重要な役割を果たす制御因子であり、頭尾軸に沿った領域特異性(位置情報)の決定に関与している。この領域特異的な細胞分化がもたらされる機序として、体軸に沿って配列した Hox 遺伝子群が順序よく重なりあいつながりながら発現していく。この順列のうちから特定の Hox 遺伝子が欠落すると、Hox 遺伝子群での重複発現の組合せにズレが生じ、その結果として、体節位置が頭側寄りに変位していく頭側化現象が知られている。顎顔面形成に関連して、第1鰓弓は中脳領域から、第2鰓弓は菱脳領域から移動してきた神経堤細胞に由来する^{4,5)}。例えば、Hoxa-2 ノックアウトマウスでは耳小骨(ツチ骨、キヌタ骨)の形成障害と重複して口蓋裂が発症してくる。この表現型をもたらす作用機序として、Hoxa-2 遺伝子が菱脳領域に由来する神経堤細胞に影響を及ぼすことから、この遺伝子欠落に伴って第2鰓弓が頭側化して第1鰓弓に重なるようなホメオティック変異をきたしたと考えられている^{6,7)}。Mhox 遺

伝子は骨や筋組織の発生原基での未分化間葉細胞の凝集に関与し、その欠損によって頭蓋顔面の骨をはじめとする全身の骨格形成に異常をきたすことから、Mhox 遺伝子異常に起因する口蓋裂の発症は二次的に生じたものと考えられている⁸⁾。なお、レチノイン酸は顎顔面形成に寄与するモルフォジェン(morphogen)であるとともに、催奇形因子(teratogen)として作用することも知られている。器官形成においては、体幹の長軸に沿った Hox 遺伝子発現とレチノイン酸の濃度勾配との関係が注目されており、頭側に発現する Hox 遺伝子ほどレチノイン酸に対する感受性が高く、レチノイン酸受容体の変異による体節の頭側化も Hox 遺伝子を介していることが示唆されている⁹⁾。

マウス胚での goosecoid 遺伝子は原腸形成に関わるホメオボックス遺伝子として知られ、原始線条の出現前から発現している。さらに、goosecoid は器官形成の時期になると再び発現し、移動してきた神経堤細胞の分化制御に関わっていることも明らかにされている。表には含めていないが、この遺伝子のノックアウトマウスでは、原腸形成や体軸形成は他の分子による代償機能によって異常をきたさないが、神経堤細胞の制御異常により第1鰓弓由来の器官形成の異常が発生しており、臨床的な口蓋裂の発症には至らないが、組織所見では鼻中隔と口蓋との癒合不全が確認されている^{10,11)}。

2. 口蓋形成の障害時期が確定されている遺伝子欠損マウス

ホメオボックスをもつ Msx 1 は上皮と間葉系細胞との相互作用によって形態形成が制御されている諸器官に発現しており、歯胚形成では歯乳頭組織に発現して、間葉細胞の増殖を促す役割を担っている¹²⁾。Msx 1 ノックアウトマウスでは歯胚の形成障害に加えて、口蓋裂が挙上後の障害によってもたらされる。また、Pax 9¹³⁾、Gli 2 や Gli 3¹⁴⁾、 $\delta EF 1$ (ホメオドメインとともに zinc finger 構造をもち、神経管などの形成を制御する転写因子)のノックアウトマウス¹⁵⁾においては、口蓋突起の挙上不全による口蓋裂を生じる。Pax 9 遺伝子は癒合時の上皮索直下の間葉組織に発現し¹⁶⁾、Gli 2 や Gli 3 が制御している sonic hedgehog 遺伝子は口蓋嚢に局限して発現することが知られている¹⁷⁾。 $\delta EF 1$ 遺伝子欠落では口蓋裂が100%の発症率でみられるが、われわれは先に、この動物モデルから採取した左右口蓋突起を器官培養すると、口蓋突起は癒合し、MEE細胞はプログラムに従って消失していくことを報告した¹⁸⁾。これらの所見に基づき、われわれはこの遺伝子異常が口蓋突起自体の形態形成や突起

表 1 口蓋裂を発症する遺伝子改変マウス

標的分子	主な機能	口蓋裂の 発症時期	口蓋裂の 発症率	口蓋裂以外の形態・形成異常 がみられる器官組織	文 献
Homeobox 遺伝子群に由来する転写調節因子					
Dlx-2	頭部形成	不明	～80%	前頭, 第 1・第 2 鰓弓由来の骨格系	34)
Hoxa-2	体軸形成	不明	記載なし	外耳・中耳	6, 7)
Mhox	骨芽細胞・筋芽細胞の分化	水平伸長	記載なし	頭蓋顔面, 椎骨, 四肢	9)
Msx 1	上皮-間葉相互作用	水平伸長/接着	記載なし	頭蓋顔面の骨, 歯, 歯槽骨	12)
Msx 2	上皮-間葉相互作用	不明	67% ¹⁾ , 100%	下顎	35)
Pitx 2	左右対称性の制御	不明	記載なし	左右対称性の異常, 心臓, 眼 瞼, 上下顎, 歯	36, 37)
δEF 1	骨格形成・免疫細胞の分化	拳上	100%	骨格(全身), 関節, 下顎, 尾, 四肢, 胸腺, メッケル軟骨(過 形成)	16)
Homeobox 遺伝子群以外の転写調節因子					
Gli 2	hedgehog 遺伝子の制御	拳上	64%	短肢, 切歯	15)
Gli 3	hedgehog 遺伝子の制御	拳上	64%	椎骨体・椎間板, 四肢, 胸骨, 歯	15)
Pax 9	器官原基の形成	拳上	記載なし	頭部骨格, 胸腺, 副甲状腺, 後肢, 多指症, 無歯症	14)
Rae 28	hox 遺伝子の制御	不明	71%	眼, 甲状腺, 胸腺, 心臓, 脾 臓	38)
TTF-2	甲状腺形成	不明	記載なし	舌下腺, 甲状腺	39)
増殖成長因子					
アクチビン βA	組織・細胞の分化	不明	29～33% ¹⁾	触毛, 下顎切歯, 睪丸	40)
TGF-β 2	組織・細胞の分化	拳上	23%	椎骨, 胸骨, 四肢の骨, 腎, 眼, 内耳, 心臓	25)
TGF-β 3	組織・細胞の分化	接着・癒合	100%	肺	2, 3, 26)
受容体					
アクチビン受容体 II		不明	記載なし	小顎, 切歯	41)
EGF 受容体		不明	49%	下顎, メッケル軟骨, 眼瞼	42)
レチノイン酸受容体 α/γ		不明	記載なし	発育障害, 椎骨, 前立腺上皮 化生	43, 44)
sek 4/nuk ¹ 複合欠損 ³⁾	神経軸索突起の誘導	拳上-接着	45%	脳・中枢神経系	45)
その他					
Endothelin-1	血管収縮ペプチド	不明	記載なし	下顎, 舌, 中耳・外耳	46)
Follistatin	アクチビン結合蛋白	不明	16%	成長遅延, 皮膚, 触毛, 切歯	47)
Jagged 2	Notch 受容体のリガンド	拳上	記載なし	合指症, 胸腺	20)
p 57 ^{k1p2}	細胞周期制御 (CDK 抑制)	水平伸長/接着	記載なし	胃腸, 四肢, 腎, 軟骨内骨化	48)

1) Msx 2 遺伝子に point mutation を生じさせたマウスでの発症率

2) 系統により口蓋裂の発症率が異なる。

3) sek 4 あるいは nuk の単独欠損マウスでは, 口蓋裂の発症率は低下する。野性型マウスでは, Sek 4 は間葉組織, Nuk は MEE 細胞, 特に癒合した上皮索で発現が認められる。

上皮の MEE 細胞への分化を妨げるのではなく、周囲諸器官（特に、舌組織）との成長発育の不調和をもたらすと考えている。口蓋突起と舌との相互作用に関連して、Jagged 2 ノックアウトマウスでは口蓋突起は下方伸長期にある口蓋突起上皮と舌の被覆上皮とが癒合し、その結果として、その後の口蓋形成が妨げられている¹⁹⁾。文献に示された組織像から判断すると、口蓋突起と舌との接合部の上皮が部分的に消失しており、間葉組織の合流が生じているように見える。この Jagged 2 ノックアウトマウスでは合指症を併発しており、被覆上皮間での癒着や上皮細胞の消失の異常をきたしていることが想定され、口蓋裂発症のメカニズムとしてもこれまでに報告されていない新しいカテゴリーとして興味深い。細胞周期での CDK の抑制に関与する p 57 kip 2 遺伝子の欠損では、水平伸長あるいは接着の時期が障害され、口蓋裂を発症する。CDK の機能として、細胞分裂のほかに、発生過程における筋管細胞などの細胞分化に関与していることが報告されている²⁰⁾。

3. 特異的に口蓋裂をもたらす TGF β 3 遺伝子欠損

TGF β ファミリーに属する制御因子は広範囲の細胞分化・器官形成に働いているが、口蓋形成においては異なった作用をもたらす。マウスの口蓋発生過程における TGF β s の発現を調べた報告では、(a) 最初に、TGF β 3 が下方伸長期にある口蓋突起の MEE 細胞に局限して発現し、(b) 約半日遅れて、水平伸長期の MEE 細胞では TGF β 1 が TGF β 3 と共存するように発現し、同時期の間葉組織に TGF β 2 の発現が局限されて認められる^{21,22)}。これまでに TGF β (1, 2, 3) のノックアウトマウスが作出されているが、それぞれの催奇形性は異なっている。TGF β 1 ノックアウトマウスでは免疫系の異常が主徴であり、口蓋裂は発症しない^{23,24)}。TGF β 2 は上皮間葉間での相互作用を制御しているが、このノックアウトマウスでは内耳や腎などの諸器官の形成異常とともに、約 25% 程度の発症率で口蓋裂がみられる²⁵⁾。この遺伝子欠落による口蓋裂発症は、Msx 1 ノックアウトマウスなどと同様に、頭蓋顔面領域の骨格異常に伴う二次的なものと考えられる。これらと対照的に、TGF β 3 ノックアウトマウスでは 100% の発症率で口蓋裂がみられるが、頭蓋顔面部の形態形成は遅滞なく進行し、全身諸器官についても肺の構造異常以外に目立った形態異常を引き起こさない^{2,26)}。TGF β 1 と TGF β 2 は口蓋突起内に発現してくるにも関わらず、それらのノックアウトマウスで口蓋裂が発症しない、あるいは発症率が低い理由として、TGF β アイソフォーム（アミノ酸配列の相同性は

図 1 (A) MEE 細胞表面に形成された糸状仮足。(B) 左右 MEE 細胞間での接着部位では、糸状仮足同士の接触（矢印）とデスモゾームの形成が観察される。

70%以上) が重複して口蓋形成の誘導能を発揮していることと、特に TGF β 3 が中軸に位置して、TGF β 1 や TGF β 2 (その他の制御因子群) の発現誘導に働いていることが考えられる。

TGF β 3 欠損による口蓋裂の発症機序としては、口蓋形成は挙上から水平伸長まで進行するが、正中での左右突起間の接着と MEE 上皮索の消失が障害される。この特定の発生段階にある MEE 細胞膜の電顕による観察結果から、(a) TGF- β 3 遺伝子が (+/+) あるいは (+/-) の胎児の癒合直前の MEE 細胞表面では糸状仮足 (filopodia) が多数現われてくるのに対して、(b) (-/-) の胎児では糸状仮足が形成されることが確かめられた(図 1)。(-/-) の胎児から採取した下方伸長・挙上・水平伸長期にある二次口蓋突起を器官培養すると、

(c) 口蓋突起間に癒合は起こらないが、(d) この培養液中に TGF- β 3 を添加すると、MEE 細胞表面に糸状仮足が形成され、MEE 細胞間接着から癒合・間葉組織の合流が誘起され、(e) 培養開始後、間もない数時間だけの添加でその効果のあることが確かめられた³⁾。さらに、野生型のマウス胎児から採取された二次口蓋突起の器官培養では、接着・癒合・合流の一連の器官形成が再現されるが、TGF- β 3 の中和抗体を培養液に加えると接着・癒合抑制をきたし、上述した TGF- β 3 添加の場合と同様に、中和抗体による癒合抑制効果も培養開始直後の短時間に作用させた場合に顕著となっている²⁷⁾。以上の *in vivo* と *in vitro* での観察結果に基づき、われわれは MEE 細胞表面での糸状仮足の形成が口蓋突起の接着・癒合を導く重要な形質であり、TGF- β 3 が糸状仮足の形成を制御していると考えている。

二次口蓋をモデルとした形態形成と催奇形のメカニズムの解明に向けて

遺伝子改変マウスで報告されている口蓋裂を概括しただけでも、多岐にわたる因子が口蓋形成の異なる発生段階に作用を及ぼしており、異なる発症機序で二次口蓋の形態異常を誘起していることがわかる。今後も遺伝子改変動物での観察記録が集積されるなかで、口蓋裂の原因遺伝子についての知識が増していくことは疑いもない。ただし、ある原因遺伝子が同定されたことは、ただちに口蓋形成における当該遺伝子（その翻訳産物）の作用機序、あるいは口蓋裂の発症機序の解明に至るものではない。表 1 に示した特定の遺伝子欠落のうちでも、口蓋裂の発症率が数十％に止まる例も示されており、上述したような関連した遺伝子群による重複作用に加えて、動物種の遺伝的背景や環境要因も影響していることも想像される。事実、これまでの実験動物における口蓋裂の発症メカニズムの研究においても、自然発生する口蓋裂の頻度、あるいはコルチゾンなどの催奇形性因子の影響については、動物種や系統によって異なることが知られている²⁸⁾。以下の段落では、今後の研究動向を明確にするためにも、二次口蓋形成の諸過程における未解決の課題についてまとめてみる。

1. 口蓋突起の形成開始

突起形成部位がいかにして決定されるのか；歯胚発生で解明が進められているような、上皮間葉間の相互作用が存在しているか；その際に働く誘導因子は？ これらの疑問に答える実験結果は、現在のところ乏しいといわざるを得ない。

図 2 左右 MEE 細胞間での接着に先立つ MEE 細胞の挙動と糸状仮足の形成。糸状仮足の表面では、プロテオグリカン様の接着因子が発現していると考えられる。

2. 口蓋突起の挙上現象

二次口蓋形成の特徴のひとつとして、突起の成長方向が下方から水平へと転換することが挙げられる。上述したように、遺伝子ノックアウトマウスの複数例において、この挙上時期と関連して口蓋裂が発症している。口蓋突起の挙上をもたらし駆動力として、細胞増殖と細胞外基質（ヒアルロン酸生成および含水量）の急速な変化²⁹⁾が推定されているが、その一連の制御機構については不明確な点が多い。下方伸長期にある口蓋突起は舌表面と弱い接触を保っているが、突起成長方向の変化に対する舌側からの誘導作用の有無、突起表面と舌表面の上皮細胞間の癒合を抑制する分子機構、あるいは Jagged 2 欠損に伴う上皮間癒合の抑制機構の解除について、解明されるべき課題となっている。

3. MEE 細胞の接着・癒合

口蓋形成における TGF- β 3 の作用機序と関連して述べたように、水平伸長してきた左右口蓋突起は、MEE 細胞表面から糸状仮足を伸ばして最初の接触を果たす。この上皮細胞間での接触に先だって、MEE 細胞層の肥厚と周皮細胞の剝離が観察される（図 2）。糸状仮足を足場として接触した MEE 細胞同士は接触面積を拡大していき、一部では細胞間結合も強固なものとするためデスモゾームも発達してくる（図 1 B 参照）。この細胞間の接着現象に関連して、糸状仮足の表面に発現している接着分子種（例えば、プロテオグリカン）やその接着分子と細胞骨格であるアクチンとの結合を制御している分子群（例えば、ERM 分子）、TGF- β 3 の刺激に応応して糸状仮足の発達に至る細胞内情報伝達経路（Rho ファミリー

分子の発現など) について確証を得ることが望まれる。

4. 上皮索の分断・消失と間葉組織の合流

接触前の MEE 細胞(立方形と仮定する)は5つの接触面と一つの自由面をもっているが、接着後ではこの自由面が消失し、細胞間接着の刺激(自由面の消失)は近隣の MEE 細胞に伝達され、上皮索消失へのスイッチが入力されると考えられる。この考えを支持する実験的根拠として、口蓋突起を単独で器官培養した場合に MEE 細胞は消失しないが、一対の口蓋突起を接触させて器官培養すると、MEE 細胞は消失していく。形態学的には、左右の口蓋突起の接触直前あるいは接着した上皮間の接合間隙から、最表層の周皮細胞が口腔側・鼻腔側へと脱離していく。互いに接着した MEE 細胞層では上皮細胞間での位置の置きかえが継続して起こり、接着時に3, 4層からなる MEE 細胞はその幅を減じて、2, 3層から単層構造へと変化する。また、接着前の間葉組織との境界部で平坦であった基底膜が陥凹していき、数個の MEE 細胞が分離されて上皮島の形成をもたらす。間葉組織の合流に導く上皮索の分断・消失の機序としては、細胞のプログラム死の代表的な現象として採り上げられるように、電顕像や TUNEL 法を含む関連分子の免疫組織化学・TEM 観察からアポトーシスが証明されている³⁰⁾。ただし、すべての MEE 細胞の消失がアポトーシスによるとは考えられておらず、最近の蛍光細胞標識法を併用した研究では、上皮索内での細胞移住と口腔側・鼻腔側への脱離する、あるいは基底膜に接する MEE 細胞は基底膜の分解をきたし、間葉組織内へ移住することが示されている³¹⁾。特に、間葉組織内へ移住した MEE 細胞は上皮細胞としての形質を失い、間葉細胞へと形質転換(epithelial-mesenchymal transformation, EMT)する可能性^{32,33)}について注目が集められている(図3)。現在のところ、上皮索を構成する MEE 細胞間でアポトーシスや移住など、それぞれの細胞運命を振り分ける分子機構は不明である。また、MEE 細胞が形質転換を起こしたと仮定して、その細胞が間葉組織内で長期に生存しうるのか、あるいはその後の器官形成に果たす役割については不明である。

まとめにかえて

口蓋形成は複雑な細胞増殖・分化の諸過程を経緯しながら、頭蓋顔面の諸器官の発育とも協調して進行しており、遺伝子改変マウスでみられた口蓋裂の発症機序についても、1. TGF- β 3 遺伝子欠落に代表されるような特

図3 MEE細胞の癒合によって形成された上皮索は、複数の機序によって消失していく(本文参照)。

定の口蓋発生段階が障害される場合と、2. 頭蓋顔面部の形態形成の不調和によって誘発される場合とに大別することができる。

現在までに、口蓋形成あるいは口蓋裂の発症に関与する多数の遺伝子とその転写産物、さらには外来性の催奇形因子が同定されてきているが、関連分子種の総体は判っておらず、その寄与が確定されている分子についても、その特定の分子(あるいは、その欠落)が口蓋裂を誘発するに至る機構について明らかにされている例は少ない。われわれの研究室では、二次口蓋の形成機序と特定の遺伝子変異に基づく催奇形機序の解明に向けて、口蓋裂を伴う遺伝子改変マウスを研究対象として、口蓋形成の障害時期の同定、標的分子(その欠落)に由来する情報伝達経路とその表現型への影響、実験動物より採取された口蓋試料の器官培養や細胞標識法による MEE 細胞動態を調べている。今後、学際的な共同研究の環が広がるなかで、細胞外刺激(催奇形因子を含む)に対する MEE 細胞の応答と細胞内情報伝達の詳細、関連する遺伝子群のネットワークについての理解が深まっていくことが期待される。

本報で引用した実験成果の一部、ならびに本報告をまとめるにあたっては、文部省科学研究費(課題番号 10671723)の

援助を受けた。また、TGF- β 3 欠損マウスに関する研究成果は、著者 (Y. T.) と英国マンチェスター大学のファーガソン教授との共同研究に基づいている。

文 献

- 1) Ferguson, M. W. J. : Palate development. *Development* **103** : (Suppl.) 41—60, 1988.
- 2) 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. : Transforming growth factor- β 3 is required for secondary palate fusion. *Nature genet.* **11** : 409—414, 1995.
- 3) Taya, Y., O' Kane, S. and Ferguson, M. W. J. : Pathogenesis of cleft palate in TGF- β 3 knockout mice. *Development* **126** : 3869—3879, 1999.
- 4) Trainor, P. A. and Tam, P. P. : Cranial paraxial mesoderm and neural crest cells of the mouse embryo : co-distribution in the craniofacial mesenchyme but distinct segregation in branchial arches. *Development* **121** : 2569—2582, 1995.
- 5) Nichols, D. H. : Formation and distribution of neural crest mesenchyme to the first pharyngeal arch region of the mouse embryo. *Am. J. Anat.* **176** : 221—231, 1986.
- 6) Gendron-Maguire, M., Mallo, M., Zhang, M. and Gridley, T. : Hoxa-2 mutant mice exhibit homeotic transformation of skeletal elements derived from cranial neural crest. *Cell* **75** : 1317—1331, 1993.
- 7) Rijli, F. M., Mark, M., Lakkaraju, S., Dierich, A., Dolle, P. and Chambon, P. : A homeotic transformation is generated in the rostral branchial region of the head by disruption of Hoxa-2, which acts as a selector gene. *Cell* **75** : 1333—1349, 1993.
- 8) Martin, J. F., Bradley, A. and Olson, E. N. : The paired-like homeobox gene Mhox is required for early events of skeletogenesis in multiple lineages. *Genes and Dev.* **9** : 1237—1249, 1995.
- 9) Larsen, W. J. : Human Embryology. (Edited by Larsen, W. J.), Second edition, pp. 331, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1997.
- 10) Rivera-Perez, J. A., Mallo, M., Gendron-Maguire, M., Gridley, T. and Behringer, R. R. : Goosecoid is not an essential component of the mouse gastrula organizer but is required for craniofacial and rib development. *Development* **121** : 3005—3012, 1995.
- 11) Yamada, G., Mansouri, A., Torres, M., Stuart, E. T., Blum, M., Schultz, M., De Robertis, E. M. and Gruss, P. : Targeted mutation of the murine goosecoid gene results in craniofacial defects and neonatal death. *Development* **121** : 2917—2922, 1995.
- 12) Satokata, I. and Maas, R. : Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nature Genet.* **6** : 348—355, 1994.
- 13) Peters, H., Neubuser, A., Kratochwil, K. and Balling, R. : Pax 9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev.* **12** : 2735—2747, 1998.
- 14) Mo, R., Freer, A. M., Zinyk, D. L., Crackower, M. A., Michaud, J., Heng, H. H. Q., Chik, K. W., Shi, X. M., Tsui, L. C., Cheng, S. H., Joyner, A. L. and Hui, C. C. : Specific and redundant functions of Gli 2 and Gli 3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development* **124** : 113—123, 1997.
- 15) Takagi, T., Moribe, H., Kondoh, H. and Higashi, Y. : δ EF 1, a zinc finger and homeodomain transcription factor, is required for skeleton patterning in multi lineages. *Development* **125** : 21—31, 1998.
- 16) Peters, H., Neubuser, A. and Balling, R. : Pax genes and organogenesis : Pax 9 meets tooth development. *Eur. J. Oral Sci.* **106**(suppl. 1) : 38—43, 1998.
- 17) Iseki, S., Araga, A., Ohuchi, H., Nohno, T., Yoshioka, H., Hayashi, F. and Noji, S. : Sonic hedgehog is expressed in epithelial cells during development of whisker, hair and tooth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218** : 688—693, 1996.
- 18) 田谷雄二, 添野雄一, 藤原美恵子, 東理頼亮, 佐藤かおり, 青葉孝昭 : 口蓋裂を発症する δ EF 1 欠損マウスにおける口蓋突起の癒合能. *歯基礎誌* **41**(抄) : 405, 1999.
- 19) Jiang, R., Lan, Y., Chapman, H. D., Shawber, C., Norton, C. R., Serreze, D. V., Weinmaster, G. and Gridley, T. : Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged 2 mutant mice. *Genes and Dev.* **12** : 1046—1057, 1998.
- 20) Guo, K., Wang, J., Andres, V., Smith, R. C. and Walsh, K. : Myo-D-induced expression of p 21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. *Mol. Cell Biol.* **15** : 3823—3829, 1995.
- 21) Pelton, R. W., Hogan, B. L. M., Miller, D. A. and Moses, H. L. : Differential expression of genes encoding TGF- β 1, 2 and 3 during murine palate formation. *Dev. Biol.* **141** : 456—460, 1990.
- 22) Fitzpatrick, D. R., Denhez, F., Kondaiah, P. and Akhurst, R. J. : Differential expression of TGF- β

- isoforms in murine palatogenesis. *Development* **109** : 585—595, 1990.
- 23) Kulkarni, A. B. and Karlsson, S. : Transforming growth factor- β 1 knockout mice. *Am. J. of Pathol.* **143** : 3—8, 1993.
 - 24) Shull, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., Diebold, R. J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., Annunziata, N. and Doetschman, T. : Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* **359** : 693—699, 1992.
 - 25) Sanford, L. P., Ormsby, I., Groot, A. C. G., Sarinola, H., Friedman, R., Boivin, G. P., Cardell, E. L. and Doetschman, T. : TGF- β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGF- β knockout phenotype. *Development* **124** : 2659—2670, 1997.
 - 26) Kaartinen, V., Volcken, J. W., Shuler, C., Warburton, D., Bu, D., Heisterkamp, N. and Groffen, J. : Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF- β 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nature Genet.* **11** : 415—421, 1995.
 - 27) Brunet, C. L., Sharpe, P. M. and Ferguson, M. W. J. : Inhibition of TGF- β 3 (but not TGF- β 1 or TGF- β 2) activity prevents normal mouse embryonic palate fusion. *Int. J. Dev. Biol.* **39** : 345—355, 1995.
 - 28) Slavkin, H. C. : *Developmental Craniofacial Biology*. (Edited by Slavkin, H. C.), pp. 36—39, Lea and Febiger, Philadelphia, 1979.
 - 29) Brinkley, L. and Vickerman, M. : The effects of chlorcyclizine-induced alterations of glycosaminoglycans on mouse palatal shelf elevation in vivo and in vitro. *J. E. E. M.* **69** : 193—213, 1982.
 - 30) Mori, C. : Significance of programmed cell death (apoptosis) in mammalian limb and palate development. *Acta. Anat. Nippon* **70** : 305—308, 1995.
 - 31) Carette, M. J. M. and Ferguson, M. W. J. : The fate of medial edge epithelial cells during palatal fusion in vitro : an analysis by DiI labelling and confocal microscopy. *Development* **114** : 379—388, 1992.
 - 32) Fitchett, J. E. and Hay, E. D. : Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse. *Dev. Biol.* **131** : 455—474, 1989.
 - 33) Griffith, C. M. and Hay, E. D. : Epithelial-mesenchymal transformation during palatal fusion : carboxyfluorescein traces cells at light and electron microscopic levels. *Development* **116** : 1087—1099, 1992.
 - 34) Qiu, M., Bulfone, A., Martinez, S., Meneses, J. J., Shimamura, K., Pedersen, R. A. and Rubenstein, J. L. : Null mutation of *Dlx-2* results in abnormal morphogenesis of proximal first and second branchial arch derivatives and abnormal differentiation in the forebrain. *Genes Dev.* **9** : 2523—2538, 1995.
 - 35) Winograd, J., Reilly, M. P., Roe, R., Lutz, J., Laughner, E., Xu, X., Hu, L., Asakura, T., Kolk, C. V., Strandberg, J. D. and Semenza, G. L. : Perinatal lethality and multiple craniofacial malformations in *MSX 2* transgenic mice. *Human Mol. Genet.* **6** : 369—379, 1997.
 - 36) Lu, M., F., Pressman, C., Dyer, R., Johnson, R. L. and Martin, J. F. : Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development. *Nature* **401** : 276—278, 1999.
 - 37) Lin, C. R., Kioussi, C., O'connell, S., Briata, P., Szeto, D., Liu, F., Izpisua-Belmonte, J. C. and Rosenfeld, M. G. : *Pitx 2* regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature* **401** : 279—282, 1999.
 - 38) Takiyama, Y., Tomotsune, D., Shirai, M., Kato-Fukui, Y., Nishii, K., Motaleb, M. A., Nomura, M., Tsuchiya, R., Fujita, Y., Shibata, Y., Higashinaka-gawa, T. and Shimada, K. : Targeted disruption of the mouse homologue of the *Drosophila* polyhomeotic gene leads to altered anteroposterior patterning and neural crest defects. *Development* **124** : 3673—3682, 1997.
 - 39) Felice, M. D., Ovitt, C., Biffali, E., Rodriguez-Mallon, A., Arra, C., Anastassiadis, K., Macchia, P. E., Mattei, M. G., Mariano, A., Scholer, H., Macchia, V. and Lauro, R. D. : A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nature genet.* **19** : 395—398, 1998.
 - 40) Matzuk, M. M., Kumar, T. R., Vassalli, A., Bickenbach, J. R., Roop, D. R., Jaenisch, R. and Bradley, A. : Functional analysis of activins during mammalian development. *Nature* **374** : 354—356, 1995.
 - 41) Matzuk, M. M., Kumar, T. R. and Bradley, A. : Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type 2. *Nature* **374** : 356—360, 1995.
 - 42) Miettinen, P. J., Chin, J. R., Shum, L., Slavkin, H. C., Shuler, C. F., Derynck, R. and Werb, Z. : Epidermal growth factor receptor function is necessary for normal craniofacial development and palate clo-

- sure. *Nature genet.* **22** : 69—73, 1999.
- 43) Lohnes, D., Mark, M., Mendelsohn, C., Dolle, P., Dierich, A., Gorry, P., Gansmuller, A. and Chambon, P. : Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I) Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* **120** : 2723—2748, 1994.
- 44) Mendelsohn, C., Lohnes, D., Decimo, D., Lufkin, T., LeMeur, M., Chambon, P. and Mark, M. : Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II) Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* **120** : 2749—2771, 1994.
- 45) Orioli, D., Henkemeyer, M., Lemke, G., Klein, R. and Pawson, T. : Sek 4 and Nuk receptors cooperate in guidance of commissural axons and in palate formation. *EMBO J.* **15** : 6035—6049, 1996.
- 46) Kurihara, Y., Kurihara, H., Suzuki, H., Kodama, T., Maemura, K., Nagai, R., Oda, H., Kuwaki, T., Cao, W.H., Kamada, N., Jishage, K., Ouchi, Y., Azuma, S., Toyoda, Y., Ishikawa, T., Kumada, M. and Yazaki, Y. : Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* **368** : 703—710, 1994.
- 47) Matzuk, M. M., Lu, N., Vogel, H., Sellheyer, K., Roop, D. R. and Bradley, A. : Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature* **374** : 360—363, 1995.
- 48) Zhang, P., Liegeois, N. J., Wong, C., Finegold, M., Hou, H., Thompson, J. C., Silverman, A., Harper, J. W., DePinho, R. A. and Elledge, S. J. : Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57^{KIP2} indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* **387** : 151—158, 1997.