

## A study on a role of Sprouty2 in the palatal fusion

松村, 香織  
九州大学大学院歯学府口腔顎顔面病態学講座顎顔面腫瘍制御学分野

<https://doi.org/10.15017/19960>

---

出版情報：九州大学, 2010, 博士（歯学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：

**MAPK 経路抑制因子 Sprouty2 が  
口蓋癒合に与える影響に関する研究**

A study on a role of Sprouty2 in the palatal fusion

**2011 年**

九州大学大学院歯学府歯学専攻  
口腔顎顔面病態学講座 顎顔面腫瘍制御学分野

松村 香織

指導教員

九州大学大学院歯学研究院  
口腔顎顔面病態学講座 顎顔面腫瘍制御学分野

中村 誠司 教授

本研究の一部は以下の学術雑誌に掲載予定である。

**Sprouty2 controls proliferation of palate mesenchymal cell via FGF signaling**

Kaori MATSUMURA, Takaharu TAKETOMI, Keigo YOSHIZAKI,  
Shinsaku ARAI, Terukazu SANUI, Daigo YOSHIGA, Akihiko YOSHIMURA,  
Seiji NAKAMURA

*Biochemical and Biophysical Research Communications (in press)*

2010 年 第 64 回日本口腔科学会総会・学術大会にて  
「マウス口蓋形成における Sprouty2 の役割」  
として本研究の一部を発表し、学会賞優秀発表賞を受賞した。

2010 年 6th Congress of the International Cleft Lip and Palate Foundation にて  
「 Sprouty2 deficient mice exhibit cleft palate 」  
として本研究の一部を発表し、Best paper award を受賞した。

## 略語一覽

**ANOVA**: analysis of variance

**BrdU**: 5-bromo-2'-deoxy-uridine

**cDNA**: complementary deoxyribonucleic acid

**DEPC**: diethyl pyrocarbonate

**DMEM**: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

**E**: embryonic day (胎生)

**EGF**: epidermal growth factor

**ERK**: extracellular regulated kinase

**Etv**: ets variant gene

**FBS**: fetal bovine serum

**FGF**: fibroblast growth factor

**FGFR**: fibroblast growth factor receptor

**FITC**: fluorescein isothiocyanate

**GAPDH**: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

**GDNF**: glial cell line-derived neurotrophic factor

**HE**: hematoxylin-eosin

**Hox**: homeobox

**HRP**: horse radish peroxidase

**KO**: knock out (遺伝子欠損型)

**MAPK**: mitogen activated protein kinase

**mRNA**: messenger ribonucleic acid

**Msx**: homeobox, msh-like 1

**MTHFR**: 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase

**PBS**: phosphate-buffered saline

**PBST**: phosphate-buffered saline with TritonX-100

**PCR:** polymerase chain reaction

**PFA:** paraformaldehyde

**PI:** propidium iodide

**Ptx:** paired-like homeodomain transcription factor

**PVDF:** poly vinylidene difluoride

**RT-PCR:** reverse transcription polymerase chain reaction

**RARA:** retinoic acid receptor  $\alpha$

**SDS-PAGE:** sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gelelectrophoresis

**Shh:** sonic hedgehog

**siRNA:** small interfering ribonucleic acid

**TGF:** transforming growth factor

**TUNEL:** terminal deoxynucleotidyl transferase mediated 2'-Deoxyuridine,  
5'-Triphosphate biotin nick end labeling

**WT:** wild type (野生型)

## 目 次

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 要旨                                    | 6  |
| 緒言                                    | 9  |
| 材料と方法                                 | 12 |
| 結果                                    | 18 |
| 野生型マウスの口蓋癒合時期における Sprouty2 の発現        | 18 |
| Sprouty2 遺伝子欠損マウスにおける口蓋裂              | 20 |
| Sprouty2 遺伝子欠損マウスにおける骨格系の評価           | 23 |
| 口蓋器官培養における Sprouty2 遺伝子発現抑制の効果        | 25 |
| Sprouty2 遺伝子欠損マウス口蓋の細胞増殖とアポトーシスに関する検討 | 27 |
| Sprouty2 遺伝子発現抑制による口蓋間葉細胞増殖の変化        | 29 |
| Sprouty2 による FGF シグナルを介した口蓋間葉細胞増殖制御   | 31 |
| 考察                                    | 33 |
| 参考文献                                  | 37 |
| 謝辞                                    | 42 |

## 要 旨

口唇口蓋裂は顎顔面領域で最も頻度の高い先天奇形のひとつである。その発症要因に関しては遺伝的要因と環境的要因からなる多因子閾説が有力であるが、現在も発症機序については明らかになっていない。Sprouty2 は mitogen activated protein kinase (MAPK) 経路により転写誘導されるネガティブフィードバック制御因子であり、近年口蓋裂発症との関連が示唆されている。本研究では、マウスの口蓋癒合における Sprouty2 の役割を明らかにするために以下の検討を行った。

### 1. 口蓋癒合時期の野生型マウスにおける Sprouty2 の発現に関する検討

野生型 (wild type: WT) マウスの口蓋癒合時期 (口蓋突起挙上前、接合時、癒合時) の頭部前頭断切片において、Sprouty2 は口蓋上皮細胞と口蓋間葉細胞に発現していた。WT マウスの口蓋突起より messenger ribonucleic acid (mRNA) を採取し、リアルタイム polymerase chain reaction (PCR) を行ったところ、時期による mRNA 発現量の変化はなかったが、口蓋癒合時期を通して恒常的に発現していた。

### 2. Sprouty2 遺伝子欠損マウス口蓋の表現型に関する検討

Sprouty2 遺伝子欠損 (knock out: KO) マウス胎仔の 21.9% に口蓋裂を認め、口蓋裂発症胎仔では口蓋突起は挙上しておらず、舌の側方に存在していた。

### 3. 口蓋器官培養における Sprouty2 遺伝子発現抑制の口蓋癒合に対する効果

*Sprouty2* 非存在下での口蓋癒合能について検討するため、WT マウスの口蓋突起を採取し、*Sprouty2* small interfering ribonucleic acid (siRNA) 導入下に口蓋器官培養を行った。*Sprouty2* siRNA 導入群と対照群はいずれも接合部口蓋上皮が消失し、完全に癒合した。

#### 4. *Sprouty2* KO マウスの口蓋間葉におけるアポトーシスおよび細胞増殖に関する検討

*Sprouty2* KO マウスの口蓋におけるアポトーシスについて terminal deoxynucleotidyl transferase mediated 2'-Deoxyuridine, 5'-Triphosphate biotin nick end labeling (TUNEL) 染色を用いて検討したところ、WT マウスとの間に有意な差は認めなかった。次に、Ki-67 免疫組織化学染色にて細胞増殖について検討したところ、*Sprouty2* KO マウスの口蓋間葉には Ki-67 陽性細胞が有意に多かった。また、*Sprouty2* siRNA を導入した WT マウスの口蓋間葉細胞を用いて WST-8 アッセイにて生細胞数を測定したところ、*Sprouty2* siRNA 導入群で有意に細胞増殖が亢進していた。また、5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) 取込試験では *Sprouty2* siRNA 導入群で有意に BrdU 陽性細胞が多かった。

#### 5. *Sprouty2* による口蓋間葉細胞増殖制御に関連するシグナル経路に関する検討

口蓋間葉細胞よりタンパクを抽出してウエスタンブロット法にて解析したところ、*Sprouty2* siRNA 導入群では fibroblast growth factor (FGF) 刺激時に細胞増殖の指標となる extracellular regulated kinase (ERK) のリン酸化が亢進していた。また、FGF シグナルにより誘導される homeobox, msh-like1 (*Msx1*)、paired-like homeodomain transcription factor1 (*Ptx1*)、ets variant gene5 (*Etv5*) の

mRNA 発現を確認したところ、*Sprouty2* KO マウスの口蓋で発現が亢進していた。

以上の結果より、*Sprouty2* は FGF シグナルを介して口蓋間葉の細胞増殖を制御しており、*Sprouty2* KO マウスでは口蓋間葉細胞の増殖異常により口蓋突起の挙上が阻害され、口蓋裂を発症することが示唆された。

## 緒 言

口唇口蓋裂は、顎顔面領域でもっとも頻度の高い先天異常のひとつである [1]。その病因は遺伝的因子と環境的因子が関与する多因子閾説が有力とされているが、同胞での発症率が約 10 倍と遺伝的因子の関与が強いとする報告もある [2]。これまでにヒトのDNAサンプルを用いた関連解析にてレチノイン酸の受容体遺伝子である *retinoic acid receptor  $\alpha$  (RAR $\alpha$ )*、細胞増殖因子の *transforming growth factor- $\beta$ 3 (TGF- $\beta$ 3)*、ホメオティック遺伝子の *homeobox, msh-like1 (MSX1)*、葉酸代謝に関与する *5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)* などの遺伝子内の多型と口唇口蓋裂発症との有意な関連が報告されているが、いまだに口唇口蓋裂発症の分子メカニズムについては不明な点が多い [1, 3]。

哺乳類の口蓋は前方の一次口蓋と後方の二次口蓋で構成されており、一次口蓋と鼻中隔は前鼻突起、二次口蓋は上顎突起の両側より発生する [1]。マウスの二次口蓋は胎生 12.5 日 (embryonic day 12.5: E12.5) ごろ形成が開始され、E13.5 から E14.5 の間に両側の上顎突起より口蓋突起が伸長をはじめ舌の上方に挙上する。挙上した口蓋突起は舌の上方で接合後、接合部上皮細胞が消失し、E16.5で口蓋の癒合が完了する。この過程で何らかの障害が起こることで口蓋突起形成不全、挙上障害や接合部口蓋上皮の残存をきたし、口蓋裂を発症すると考えられる [1, 4, 5]。

Mitogen activated protein kinase (MAPK) 経路関連分子は口蓋裂発症に関与するとされている分子のうちのひとつである。MAPK 経路は *fibroblast growth factor (FGF)* や *epidermal growth factor (EGF)* をはじめとした増殖因子

がチロシンキナーゼ型受容体に結合することで活性化され、最終的に核内にシグナルが伝達され細胞増殖や分化をコードする遺伝子が転写される [9, 10]。MAPK 経路関連分子である *Tgf- $\beta$*  遺伝子欠損 (knock out: KO) マウス [6]、epidermal growth factor receptor (*Egfr*) KO [7] マウスは口蓋接合部上皮が消失せず、口蓋裂となることが報告されている。また *Fgf10* KO マウスおよび *Fgf10* のレセプターである fibroblast growth factor receptor2 (*Fgfr2*) KO マウスでは口蓋突起の形成不全により口蓋裂を発症することが知られている [8-10]。Sprouty2 は MAPK 経路抑制因子として知られている分子である。Sprouty2 は MAPK 経路に対し、負のフィードバック機構によって増殖因子からのシグナルを調節している (図 1)。

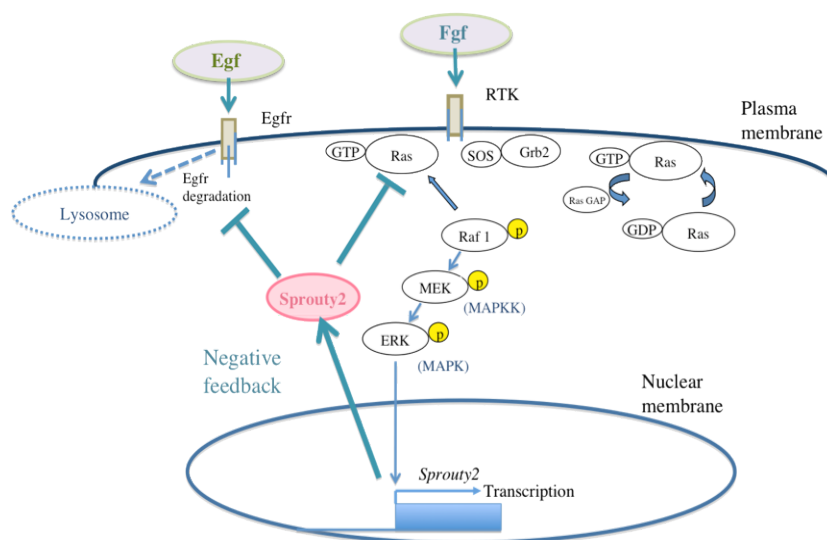


図 1 MAPK 経路

EGF や FGF をはじめとする増殖因子が受容体に結合すると、そのシグナルがアダプター分子である Grb2 から SOS へと伝達され、Ras が GTP 型になることで活性化型 Ras になる。活性化型 Ras は Raf1 を誘導し、その後、Raf1 のリン酸化から次々と下流の分子のリン酸化が引き起こされ、最終的に核内へシグナルが伝達され、細胞増殖または分化をコードする遺伝子が転写される。Sprouty2 は、このシグナル経路に対し、負のフィードバック機構によって増殖因子からのシグナルを調節している。

*Sprouty2* KO マウスの表現型についてはこれまでさまざまな報告がある。*Sprouty2* は glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) シグナルを介して消化管における神経叢の増殖や分化に関与しており、*Sprouty2* KO マウスは食道無弛緩症および消化管運動障害をきたす [11]。また *Sprouty2* KO マウスは高度の難聴を呈する。これは FGF8 シグナルが過剰に内耳細胞に作用することが原因であることが明らかになっており、*Fgf8* ヘテロ接合マウスと交配することで聴力は回復する [12]。*Sprouty2* KO マウスの口腔領域の表現型に関しては、臼歯部前方に生じる過剰歯について報告されている [13]。また *Sprouty2* のホモログである *Sprouty4* と *Sprouty2* のダブル KO マウスは頭蓋の著しい形成不全により早期の胎生致死となる [14]。

このように、*Sprouty2* KO マウスは多彩な表現型を呈するが、近年 *Sprouty2* の口蓋裂発症への関与の可能性が報告されている。2005 年に Vieira ら [15] は非症候性の口唇口蓋裂患者の遺伝子変異解析を行い、*SPRY2* がヒトにおける口唇口蓋裂発症の候補遺伝子である可能性を指摘した。また、Welch ら [9] は *Sprouty2* を含む Mb 単位の領域を欠失した *Ednrb*<sup>s-36Pub</sup> deficiency of the piebald deletion complex mice (36Pub 変異マウス) に高頻度に口蓋裂を認め、*Sprouty2* 過剰発現マウスを交配することで口蓋裂の発症が抑制されると報告した。しかし、これまでに *Sprouty2* KO マウスの口蓋の表現型に関する報告はない。

本研究では、*Sprouty2* KO マウスの胎仔を解析し、口蓋癒合における *Sprouty2* の役割について検討を行った。

## 材料と方法

### 1. マウス

*Sprouty2* KO マウスは武富ら [11] が過去に作製したマウスを用いた。相同組換えの確認は次のようなプライマーを用いて polymerase chain reaction (PCR) 法にて行った (WT/KO-F : 5'- AAC ACA CTG CCA AGA CCT GA -3' ; WT-R : 5'- TAG GCA TGC AGA CCC AAA TC -3' ; KO-R : 5'- CGA GAT CAG CAG CCT CTG TT -3') 対照群には *Sprouty2* KO マウス同胞の野生型 (*Sprouty2* wild-type: *Sprouty2* WT) マウスを用いたが、一部の研究には *Sprouty2* KO マウスとバックグラウンドが同じ C57BL/6J マウス (日本エスエルシー *Shizuoka, Japan*) を WT として用いた。マウス妊娠確認はプラグを目視することにより行い、プラグ確認の朝を E0.5 とした。妊娠マウスの頸椎を脱臼させた後、腹部を切開して胎仔を摘出した。摘出した胎仔は雌雄に関係なく実験に用いた。

### 2. マウス頭部前頭断切片の作製

マウス胎仔の頭部を切断し、1× phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄後、4% paraformaldehyde (PFA) で 16 時間浸漬固定し、パラフィン包埋した後、厚さ 5 µm で頭部前頭断切片を作製した。作製した頭部前頭断切片を用いて、hematoxylin-eosin (HE) 染色を行った。

### 3. 免疫組織化学染色

パラフィン切片を脱パラフィン処理した後、内因性ペルオキシダーゼ除去のため 3% 過酸化水素水で 30 分間処理を行った。抗体の非特異的反応を防ぐため Power Block™ (Biogenics 社製 *Napa, CA, USA*) で 7 分間ブロッキ

ング処理後、一次抗体として抗 Sprouty2 ポリクローナル抗体 (ウサギ由来、Protein Tech 社製 *Chicago, IL, USA*)、抗 Ki-67 モノクローナル抗体 (ウサギ由来、Thermo Scientific 社製 *Hialeah, FL, USA*) を室温で 2 時間反応させた。phosphate-buffered saline with TritonX-100 (PBST) で 2 回洗浄後、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ウサギ IgG (ZYMED 社製 *South San Francisco, CA, USA*) を室温で 30 分間反応させた後に PBST で 4 回洗浄し、Vecta Shield (VECTOR LABORATORIES 社製 *Burlingame, CA, USA*) で包埋した。

#### 4. RNA の抽出および complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) の合成

RNA の抽出にはフェノール・クロロホルム法を用いた。まず、マウス口蓋突起を基部より切断後 Trizol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen 社製 *Carlsbad, CA, USA*) 中に採取し、ホモジナイザーを用いて粉砕した。これらに 0.2 ml のクロロホルムを加えて攪拌後、15 分間氷冷した。4°C、10,000 rpm で 20 分間遠心した後に RNA を含む水層を採取し、これに 0.5 ml の 2-プロパノールを加えて攪拌後、4°C、10,000 rpm で 15 分間遠心し上清を除去後に得られた RNA ペレットを 80% エタノールで洗浄後乾燥させ、50 $\mu$ l の diethyl pyrocarbonate (DEPC) 処理水に溶解した。その後、吸光度計にて RNA の濃度を測定した。RNA 抽出後、reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) にて cDNA を作製した。RT-PCR は、GeneAmp RNA PCR キット (Applied Biosystems 社製 *Hammonton, NJ, USA*) を使用し、42°C: 15 分 (逆転写)、99°C: 5 分 (熱変性)、5°C: 5 分 (冷却) の条件で行った。

#### 5. リアルタイム PCR 法

リアルタイム PCR は Brilliant SYBR<sup>®</sup> Green QPCR Reagents

(STRATAGENE 社製 *La Jolla, CA, USA*) を用いて行った。反応条件は、熱変性は 95℃ で 1 サイクル目が 10 分間、2 サイクル以降は 20 秒間で行った。伸長反応は 72℃ で 20 秒間とし、全て 40 サイクルの増幅を行った。*Sprouty2*、*Msx1*、paired-like homeodomain transcription factor1 (*Ptx1*)、ets variant gene5 (*Etv5*)、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) のプライマー配列は表 1 に示す通りである。定量化には MxPro QPCR Software (STRATAGENE 社製 *La Jolla, CA, USA*) を用いた。各 messenger RNA (mRNA) の発現量は *GAPDH* mRNA の発現量と比較して、相対的発現量を算出した。

表 1 PCR のプライマーと反応条件

| 検出する mRNA       | フラグメントのサイズ (bp) | プライマーの塩基配列 (5'→3') |                             |
|-----------------|-----------------|--------------------|-----------------------------|
| <i>Sprouty2</i> | 178             | センス                | TCG CAG CCT TTG CTG CAG TGT |
|                 |                 | アンチセンス             | TTA GGC TGC ACT CGG ATT ATT |
| <i>Msx1</i>     | 242             | センス                | CTC TCG GCC ATT TCT CAG TC  |
|                 |                 | アンチセンス             | TAC TGC TTC TGG CGG AAC TT  |
| <i>Ptx1</i>     | 188             | センス                | CTC AAC GCT TGC CAG TAC AA  |
|                 |                 | アンチセンス             | GGG TCT GGA AAA AGC AAA CA  |
| <i>Etv5</i>     | 219             | センス                | GGG AGA GAC AAA AAC CAC CA  |
|                 |                 | アンチセンス             | ATG GGT GTG CAG TTT CTT CC  |
| <i>GAPDH</i>    | 106             | センス                | GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG  |
|                 |                 | アンチセンス             | GAC TCA ACG GAT TTG GTC CT  |

## 6. ウェスタンブロット法

溶解溶液 (40 mM Hepes、150 mM 塩化ナトリウム、0.5% ノニテッド P-40、1 mM EDTA、1 mM バナデート、50 mM フッ化ナトリウム、1 mM ジチオスレイトール、100 mM ピロリン酸ナトリウム、10% グリセリン) を用いて細

胞からタンパク質を抽出し、吸光度測定にて濃度定量後、1 レーン当たり総タンパク質量が 75  $\mu$ g になるようにして、sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gelelectrophoresis (SDS-PAGE) を行った (30 mA、3 時間)。その後、タンパク質成分を poly vinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Millipore 社製 *Billerica, MA, USA*) に転写 (200 mA、2 時間) し、抗体の非特異的結合を防ぐために、10% スキムミルク/ PBS 中で室温にて 30 分間ブロッキングを行った。次に、1 次抗体として抗リン酸化 extracellular regulated kinase (ERK) 1/2 モノクローナル抗体および抗 ERK2 ポリクローナル抗体 (Santacruz Biotechnology 社製 *Santa Cruz, CA, USA*) を用いて、4°C にて 16 時間反応させた。次に、PBST で 5 分× 2 回洗浄後、2 次抗体として HRP 標識抗ウサギ IgG (Jackson Immuno-Research Laboratories 社製 *West Grove, PA, USA*) を用い、室温で 30 分間反応させた。その後、PBST で 15 分× 4 回洗浄し、Super signal (PIERCE 社製 *Rockford, IL, USA*) で発色させて X 線フィルム (Fuji Film 社製 *Tokyo, Japan*) 上で検出した。バンドの強度は画像解析ソフト NIH image (National Institutes of Health *Bethesda, MD, USA*) を用いて計測した。

## 7. small interfering RNA (siRNA) の導入

*Sprouty2* 遺伝子発現抑制は Stealth RNAi<sup>TM</sup> specific for *Sprouty2* (Invitrogen 社製 *Carlsbad, CA, USA*) を用いてリポフェクション法にて行った。対象 DNA 配列は 5'- GCCATCCGAAACACCAATGAGTACA -3' とした。対照群には Negative control siRNA (Invitrogen 社製 *Carlsbad, CA, USA*) を導入した。

## 8. マウス口蓋器官培養

器官培養は Shuler ら [16] の方法に準じて行った。E13.5 の WT マウスよ

り両側の口蓋突起を採取し、Millicell-CM (Millipore 社製 *Billerica, MA, USA*) 上に左右の口蓋突起先端部が相対して接するように置いた。6 ウェル細胞培養用ディッシュに 10% fetal bovine serum (FBS) 含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) /F12 培地 (Sigma-Aldrich 社製 *St.Louis, MO, USA*) 1 ml および siRNA transfection reagent を入れ、その上に Millicell-CM を置いたインサートウェル (BD Falcon 社製 *Franklin Lakes, NJ, USA*) を挿入した。siRNA transfection reagent の組成は 1 ウェルあたり OptiMEM 100  $\mu$ l、Sprouty2 siRNA (Invitrogen 社製 *Carlsbad, CA, USA*) 500nM、Oligofectamine (Invitrogen 社製 *Carlsbad, CA, USA*) 8  $\mu$ l とした。37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 72 時間培養後、メンブレンごと口蓋突起を採取し、4% PFA で固定後パラフィン包埋した。厚さ 5  $\mu$ m のパラフィン切片を作製し、HE 染色を行い口蓋の癒合を判定した。

#### **9. terminal deoxynucleotidyl transferase mediated 2'-Deoxyuridine, 5'-Triphosphate biotin nick end labeling (TUNEL) 染色**

胎生 13.5 日の WT マウス胎仔および *Sprouty2* KO マウス胎仔の頭部前頭断切片にて、*In situ* Cell Death Detection Kit (Roche applied science 社製 *Basel, Swiss*) を用いてアポトーシス細胞を検出した。1 切片より 0.5 mm<sup>2</sup> の範囲を任意に 3 か所選択し、陽性率を算出した。

#### **10. マウス口蓋間葉細胞の初代培養**

E13.5 の WT マウス口蓋突起を採取し、酵素処理を行った。酵素液の組成は、PBS 5 ml 中 Collagenase (Sigma-Aldrich 社製 *St.Louis, MO, USA*) 2.4 U、Dispase (Roche applied science 社製 *Basel, Swiss*) 1.2 U とした。37°C、15 分処

理後、ピペッティングにて細胞を分散した。分散した細胞は PBS にて 1 回洗浄後、10% FBS 含有 DMEM/F12 培地にて培養した。

## 11. 細胞増殖アッセイ

採取後 1 回から 2 回継代したマウス口蓋間葉細胞に *Sprouty2* siRNA 25 nM もしくは Control siRNA を遺伝子導入し、96 ウェルプレートに  $5 \times 10^2$  個/ウェルで播種した。播種後、24 時間毎に WST-8 生細胞数検出キット (ナカライテスク社製 *Kyoto, Japan*) を用いて細胞数測定を行った。

## 12. 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) 標識

マウス口蓋間葉細胞に *Sprouty2* siRNA 導入後 BrdU labeling and detection kit (Roche applied science 社製 *Basel, Swiss*) を用いて BrdU 標識を行った。siRNA transfection reagent の組成は 1 ウェルあたり OptiMEM 100  $\mu$ l、*Sprouty2* siRNA (Invitrogen 社製 *Carlsbad, CA, USA*) 25 nM、Oligofectamine (Invitrogen 社製 *Carlsbad, CA, USA*) 2  $\mu$ l とした。20 分間の BrdU 反応後、抗 BrdU 抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、陽性細胞数を測定した。

## 13. 統計学的処理

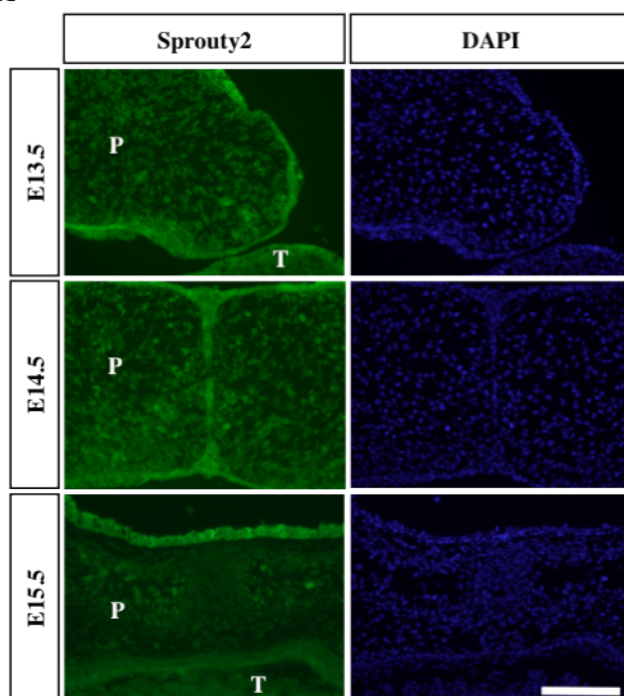
統計学的解析は JMP (SAS institute 社製 *Cary, NC, USA*) を用い、Mann-Whitney *U* 検定および analysis of variance (ANOVA) を行った。 $P < 0.05$  の場合を有意差ありとした。統計学的処理を行った結果は、平均 $\pm$ 標準偏差で示した。

## 結 果

### 1. 野生型マウスの口蓋癒合時期における *Sprouty2* の発現

WT マウスの口蓋における *Sprouty2* の発現を確認した。今回、口蓋癒合時期 (E13.5 から E15.5) の C57BL/6J マウス頭部前頭断切片を作製し、免疫組織化学染色を行ったところ、口蓋上皮および間葉に *Sprouty2* の発現を認めた。*Sprouty2* は口蓋突起挙上および癒合の過程で恒常的に口蓋上皮および間葉に発現していた。口蓋癒合時期による局在の変化は認めなかった (図 2A)。また、口蓋癒合時期の発現量の変化を確認するため、リアルタイム PCR 法で *Sprouty2* mRNA 発現量を定量した。基部より切断し採取した口蓋突起より mRNA を抽出し、cDNA 合成後にリアルタイム PCR を行った。いずれの時期においても *Sprouty2* は口蓋に発現していたが、時期による発現量の変化は認めなかった (図 2B)。

A



B

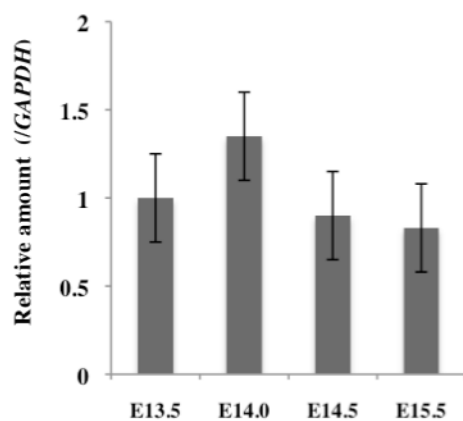


図 2 口蓋癒合時期の WT マウス口蓋における *Sprouty2* の発現と局在

(A)頭部前頭断切片による免疫組織化学染色。口蓋間葉、口蓋上皮に *Sprouty2* の発現を認める。P: palate (口蓋)、T: tongue (舌)、スケール : 100  $\mu$ m

(B) 定量的リアルタイム PCR を行い、相対的な *Sprouty2* の mRNA 発現量を算出した。検定は ANOVA にて行った ( $P > 0.05$ )。

## 2. *Sprouty2* 遺伝子欠損マウスにおける口蓋裂

E18.5 の *Sprouty2* WT マウス、*Sprouty2* KO マウスの外観を図 3A に示す。*Sprouty2* KO マウスは *Sprouty2* WT マウスと比較していずれも体長、体色に差はなかった。また、四肢の形成異常や眼の異常、口唇裂などの体表奇形は認めなかった。下顎除去後、腹側から観察したところ、*Sprouty2* KO マウスでは矢印に示すように二次口蓋に裂を認めた (図 3B)。一次口蓋に裂はなかった。*Sprouty2* KO マウスの口蓋突起の状態を確認するため、頭部前頭断切片を作製し、HE染色を行った。*Sprouty2* WT マウスでは E14.5 で口蓋突起が接合し、接合部上皮の消失が始まっており (図 3C, D)、E16.5 で完全に癒合している (図 3G, H) のに対し、*Sprouty2* KO マウスでは E14.5 (図 3E, F)、E16.5 (図 3I, J) でいずれも口蓋突起が舌の側方に位置しており接合していなかった。また、E16.5 の *Sprouty2* KO マウスでは E16.5 の *Sprouty2* WT マウスの口蓋と同様に口蓋突起中央部に膜内骨化の兆候を認めた (図 3D, J, 矢頭)。*Sprouty2* KO マウスの口蓋裂発症頻度について検討したところ、E16.5 の *Sprouty2* KO マウスの胎仔の 21.9% に口蓋裂を認めた。口蓋裂発症例は 1 例を除きすべて口蓋突起が接合していない状態であった。*Sprouty2* WT マウスとヘテロ接合マウスも同様に頭部前頭断切片を作製し観察したが、口蓋裂は認めなかった (表 2)。

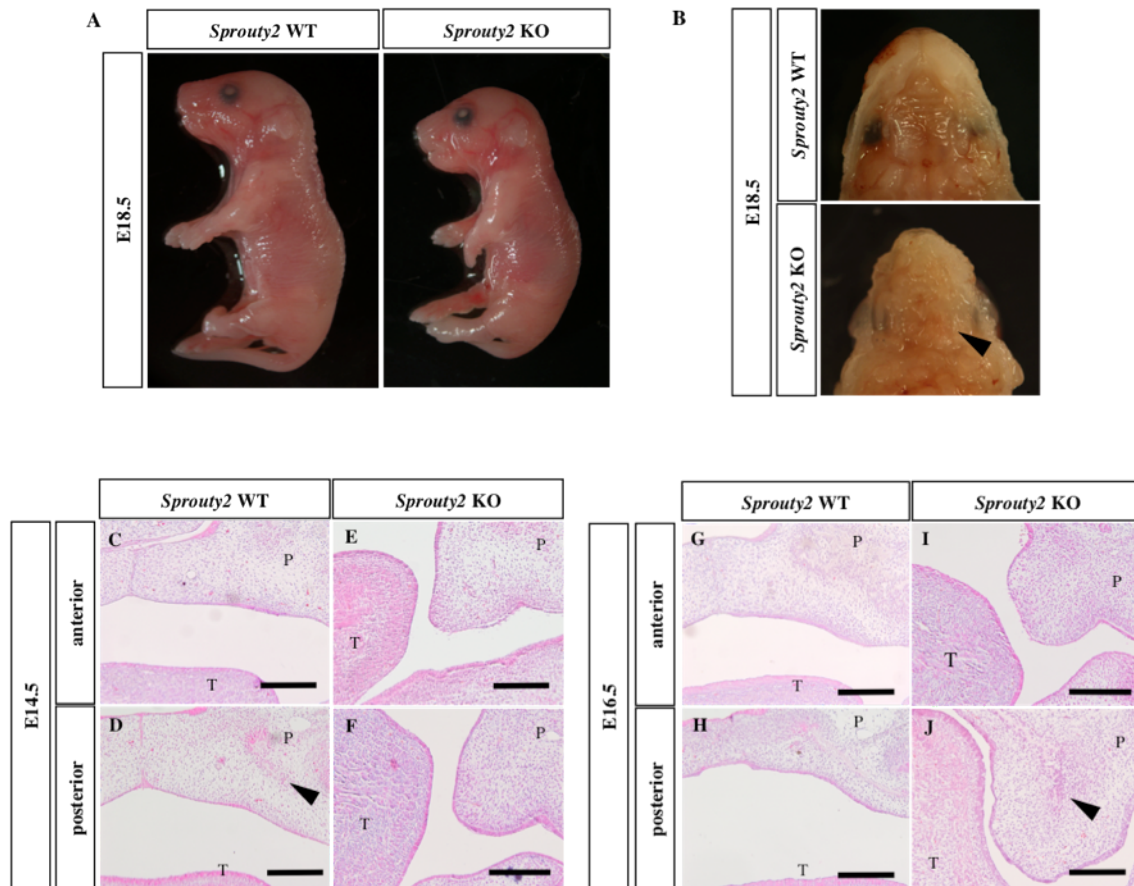


図 3 *Sprouty2* KO マウスの表現型とその特徴

(A) *Sprouty2* WT マウス、*Sprouty2* KO マウス胎仔の全体像 (E18.5)。 *Sprouty2* WT マウスと *Sprouty2* KO マウスを比較して体長や体色の差はない。

(B) *Sprouty2* WT マウス、 *Sprouty2* KO マウス胎仔の口蓋 (E18.5)。 *Sprouty2* KO マウスの口蓋に裂を認める (矢頭)。

(C - J) *Sprouty2* WT マウス、*Sprouty2* KO マウス胎仔の頭部前頭断切片による HE 染色。 *Sprouty2* WT マウスは E14.5で口蓋突起が接合し癒合開始しており (C, D)、E16.5 では完全に癒合している (G, H)。 *Sprouty2* KO マウスでは E16.5 でも口蓋突起が挙上していない (I, J)。 E16.5 の *Sprouty2* WT マウスおよび *Sprouty2* KO マウスいずれも口蓋突起中央に膜内骨化の兆候を認める (D, J: 矢頭)。 P: palate (口蓋)、T: tongue (舌)、スケール : 200  $\mu$ m

表 2 *Sprouty2* KO マウスの口蓋裂発症頻度

| 遺伝子型                   | 口蓋裂<br>(口蓋突起非接触) | 口蓋裂<br>(口蓋突起接触) | 口蓋癒合             |
|------------------------|------------------|-----------------|------------------|
| <i>Sprouty2</i> WT マウス | 0/34 (0.0%)      | 0/34 (0.0%)     | 34/34 (100.0%)   |
| ヘテロ接合マウス               | 0/110 (0.0%)     | 0/110 (0.0%)    | 110/110 (100.0%) |
| <i>Sprouty2</i> KO マウス | 6/32 (18.8%)     | 1/32 (3.1%)     | 25/32 (78.1%)    |

### 3. *Sprouty2* 遺伝子欠損マウスにおける骨格系の評価

*Sprouty2* KO マウスの下顎骨形態について検討するため、E13.5、E14.5 の *Sprouty2* WT マウス、*Sprouty2* KO マウスの下顎骨の幅 (図 4A)、近遠心的長さ (図 4B) を肉眼的に計測した。下顎の幅、長さとも *Sprouty2* WT と *Sprouty2* KO の間に有意な差は認めなかった。

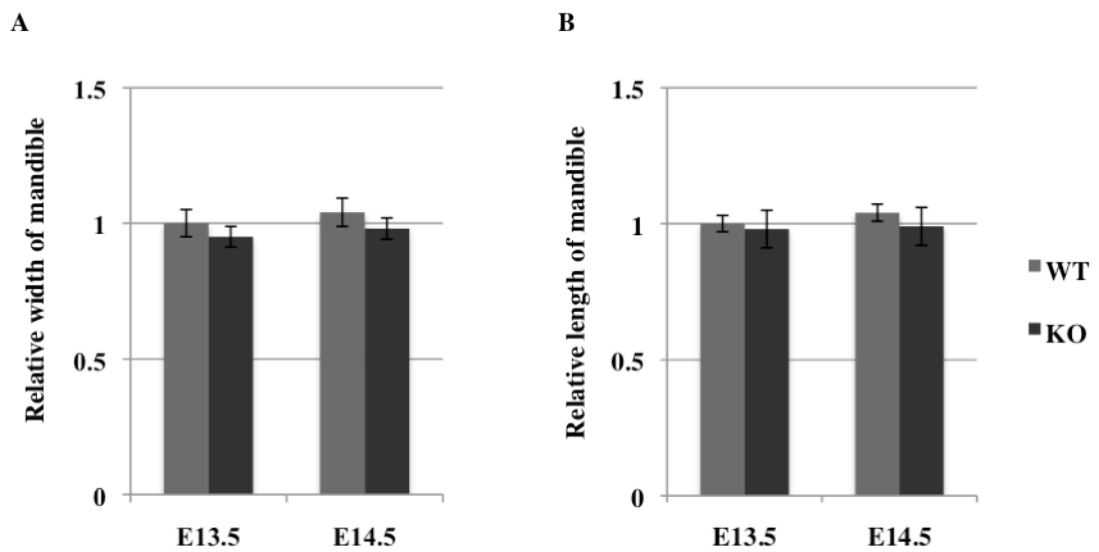


図 4 *Sprouty2* KO マウスの骨格系に関する評価

(M, N) *Sprouty2* KO マウスの下顎の幅 (M)、近遠心的長さ (N) を計測し、WT マウスと比較した (n=6)。E13.5 の WT マウスの計測値を基準として相対的長さを算出し、2 群間で Mann-Whitney の *U* 検定を行った ( $P < 0.05$ )。

#### 4. 口蓋器官培養における *Sprouty2* 遺伝子発現抑制の効果

E13.5 の C57BL/6J マウスより両側の口蓋突起を採取し、*Sprouty2* 遺伝子発現抑制下に口蓋器官培養を行った。500 nM の *Sprouty2* siRNA をリポフェクション法にて導入し、48 時間後にリアルタイム PCR 法で導入効率を確認したところ、対照群と比較して *Sprouty2* の発現は 91.2% 抑制されていた (図 5A)。遺伝子発現抑制群、対照群ともに 72 時間培養後に癒合部の口蓋上皮は完全に消失しており、癒合が確認された (図 5B, 表 3)。

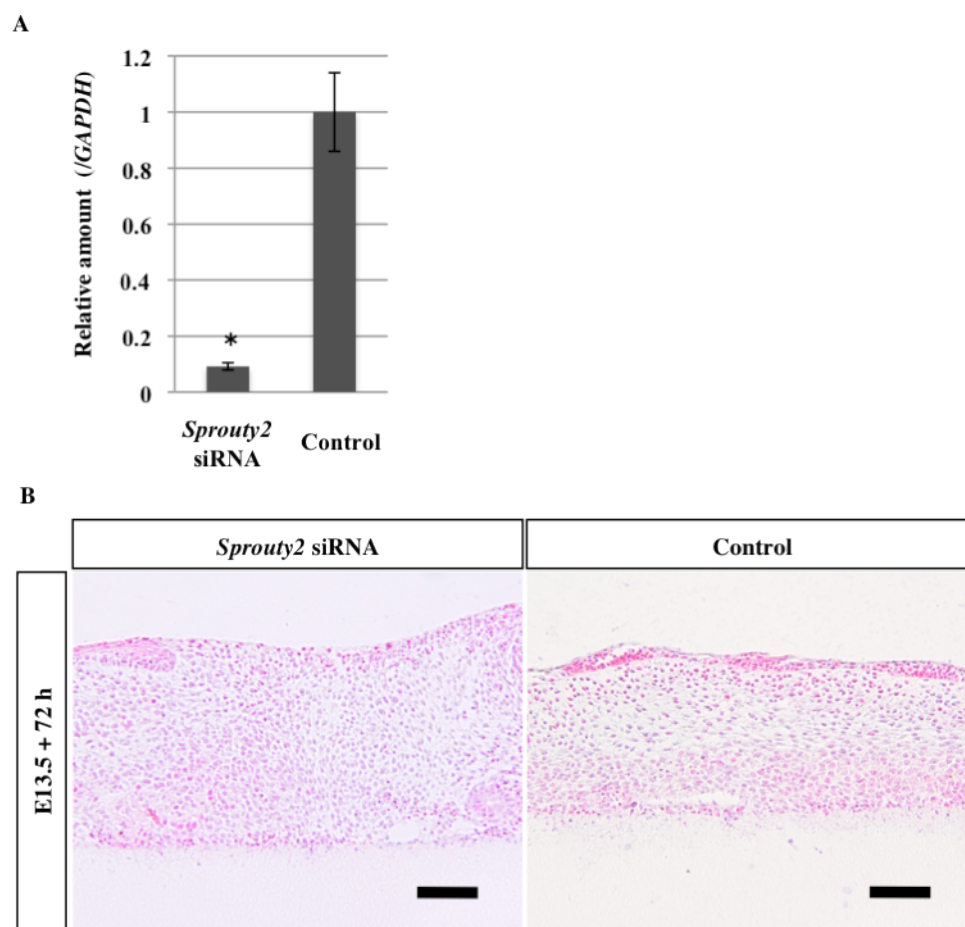


図 5 口蓋器官培養における *Sprouty2* 遺伝子発現抑制の効果

(A)口蓋器官培養時の siRNA による遺伝子発現抑制効果を定量的リアルタイム PCR で確認した。500 nM の *Sprouty2* siRNA を導入後、48 時間後の導入効率を確認し、2 群間で Mann-Whitney の *U* 検定を行った ( $P < 0.05$ )。

(B) 器官培養開始後 72 時間経過時の口蓋パラフィン切片による HE 染色。*Sprouty2* siRNA 導入群、対照群とも完全に癒合している。スケール：200  $\mu\text{m}$

表 3 口蓋器官培養における *Sprouty2* siRNA の影響

|                       | 口蓋癒合           | 口蓋非癒合       |
|-----------------------|----------------|-------------|
| Control               | 18/18 (100.0%) | 0/18 (0.0%) |
| <i>Sprouty2</i> siRNA | 26/26 (100.0%) | 0/26 (0.0%) |

## 5. *Sprouty2* 遺伝子欠損マウス口蓋の細胞増殖とアポトーシスに関する検討

*Sprouty2* KO マウスの口蓋におけるアポトーシスおよび細胞増殖について検討するため、E13.5 の *Sprouty2* KO マウス胎仔および *Sprouty2* WT マウス胎仔の頭部前頭断切片を用い、TUNEL 染色 (図 6A, B) および Ki-67 の免疫組織化学染色 (図 6C, D) を行った。TUNEL 染色ではいずれも陽性細胞をほとんど認めなかった (図 6E)。一方、Ki-67 陽性細胞は *Sprouty2* KO マウスの口蓋間葉で有意に多く認められた (図 6F)。

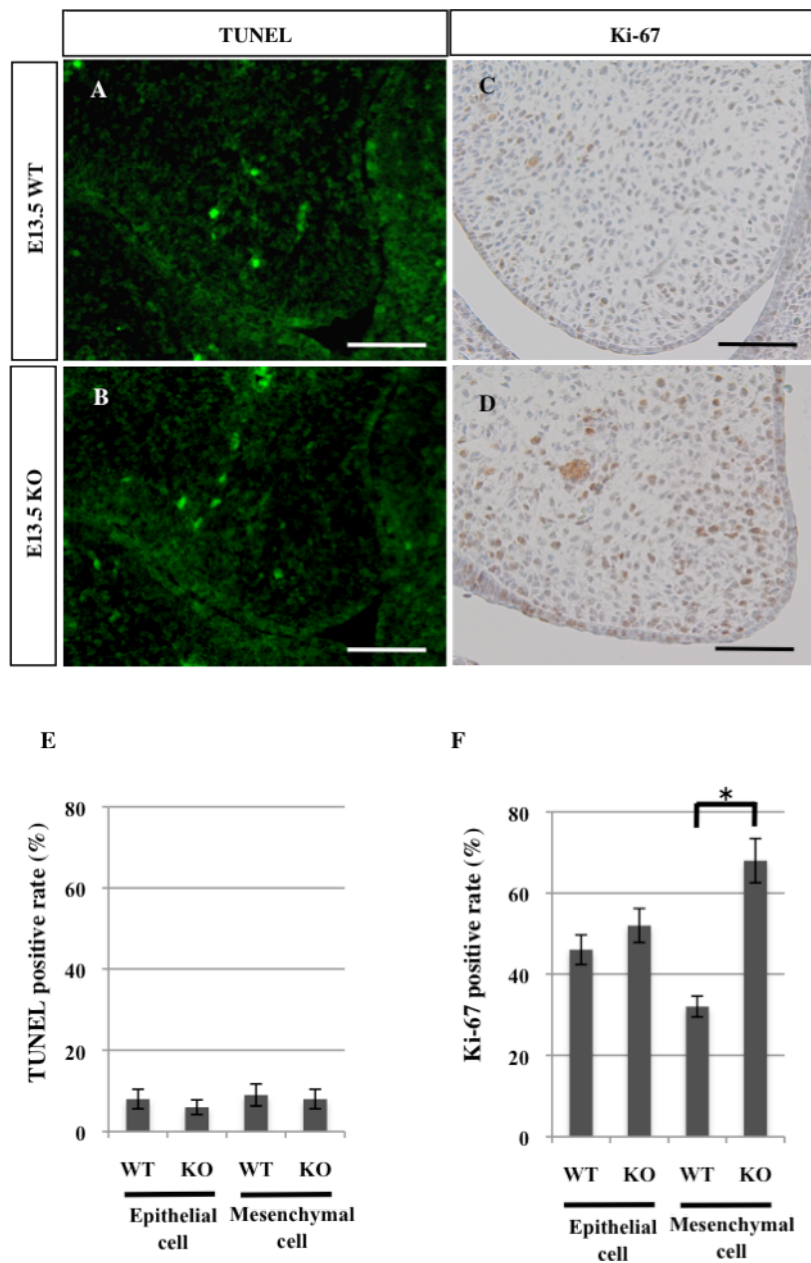


図 6 *Sprouty2* KO マウスにおけるアポトーシス、細胞増殖に関する検討

(A - D) E13.5 の WT マウス、*Sprouty2* KO マウスの頭部前頭断切片による TUNEL 染色 (WT: A, KO: B)、Ki-67 免疫組織化学染色 (WT: C, KO: D)。スケール：200  $\mu$ m

(E, F) TUNEL 陽性細胞率 (E)、Ki-67 陽性細胞率 (F) を示す。WT マウスおよび *Sprouty2* KO マウス間で Mann-Whitney の *U* 検定を行った (\* $P < 0.05$ )。

## 6. *Sprouty2* 遺伝子発現抑制による口蓋間葉細胞増殖の変化

E13.5 の C57BL/6J マウスの口蓋より間葉細胞を採取し、初代培養を行った。*Sprouty2* siRNA をリポフェクション法にて遺伝子導入し、細胞増殖について検討を行った。*Sprouty2* siRNA 導入効率をウエスタンブロット法にて確認したところ、25 nM の siRNA 導入で *Sprouty2* の発現が抑制できていることが確認できた (図 7A)。siRNA 導入後に WST-8 法にて経時的に生細胞数を測定したところ、96 時間培養後に *Sprouty2* siRNA 導入群で細胞増殖が有意に亢進していた (図 7B)。また、BrdU 標識を行ったところ、*Sprouty2* siRNA 導入群では 対照群に比べ、BrdU 陽性細胞が有意に多かった (図 7C)。

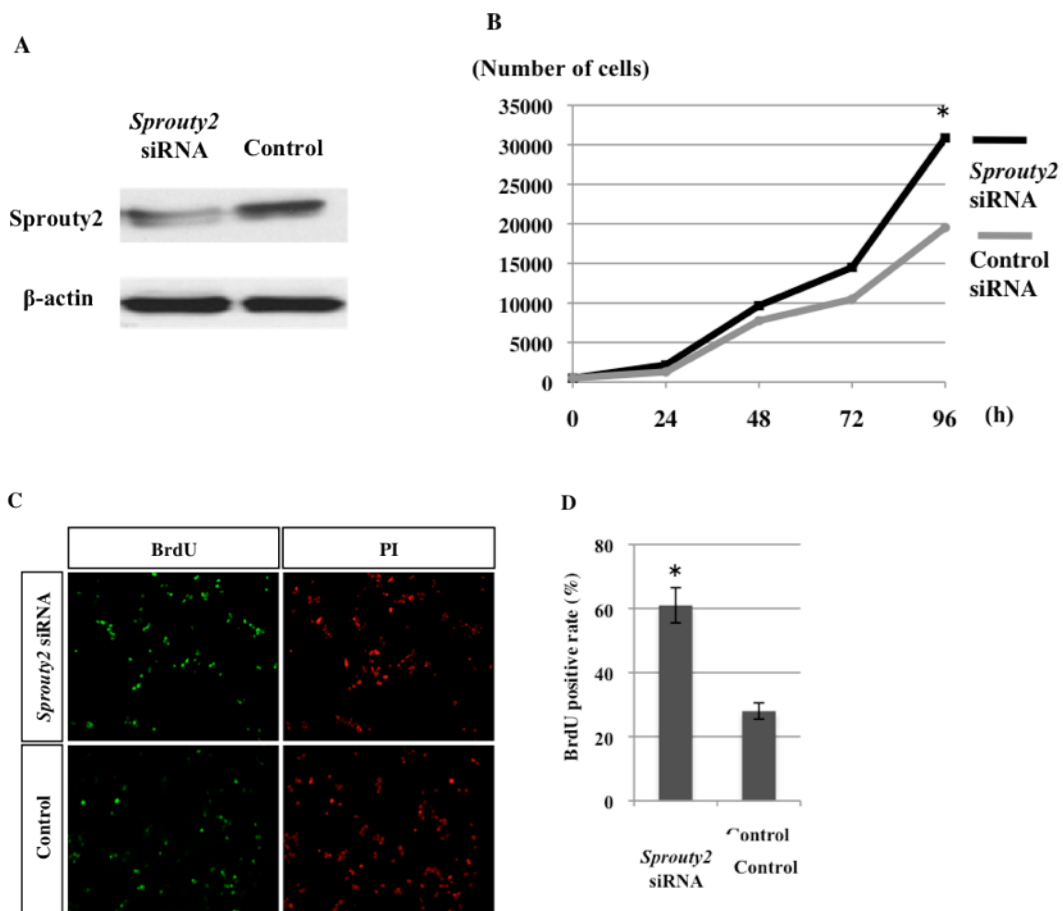


図 7 口蓋間葉細胞における *Sprouty2* 遺伝子発現抑制の影響

(A) 口蓋器官培養時の siRNA による遺伝子発現抑制効果をウエスタンブロット法で確認した。

(B) *Sprouty2* siRNA を導入した口蓋間葉細胞を用いて WST-8 アッセイを行った。siRNA 導入群および対照群間で ANOVA により検定を行った (\* $P < 0.05$ )。

(C, D) *Sprouty2* siRNA を導入した口蓋間葉細胞に BrdU 標識を行った (C)。陽性細胞率を算出し (D)、siRNA 導入群および対照群間で Mann-Whitney の  $U$  検定を行った (\* $P < 0.05$ )。

## 7. *Sprouty2* による FGF シグナルを介した口蓋間葉細胞増殖制御

E13.5 と E14.5 の *Sprouty2* KO マウスの口蓋より mRNA を採取し、FGF シグナルにより誘導される転写因子である *Msx1*、*Ptx1*、*Etv5* の発現を RT-PCR 法にて確認した (図 8A)。*Msx1*、*Etv5* は E13.5 の *Sprouty2* KO マウス、*Ptx1* は E14.5 の *Sprouty2* KO マウスで *Sprouty2* WT マウスに比べ発現が上昇していた (図 8B)。

次に、*Sprouty2* siRNA 導入下に培養した口蓋間葉細胞よりタンパクを抽出し、ウエスタンブロット法にて解析を行った。*Sprouty2* siRNA 導入群では、FGF 刺激時に細胞増殖の指標となる ERK1/2 のリン酸化が亢進していた (図 9A, C)。一方、EGF 刺激時は *Sprouty2* siRNA 導入群と対照群間で ERK1/2 のリン酸化には有意な差は認めなかった (図 9B, D)。

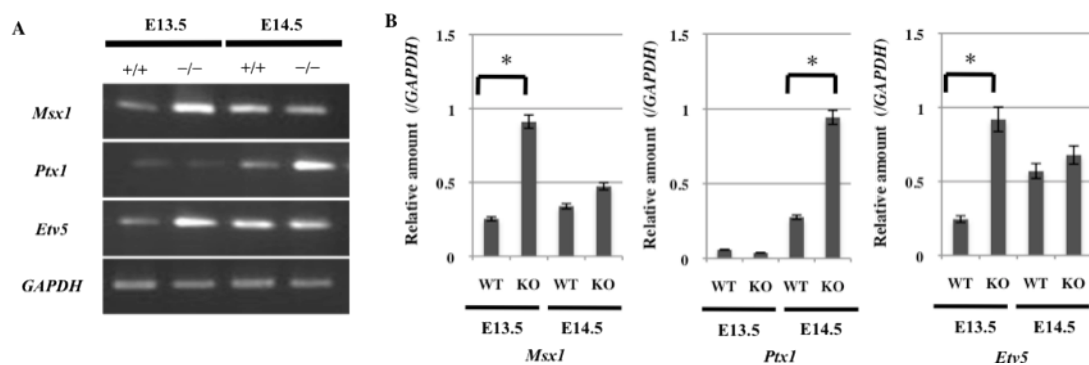


図 8 *Sprouty2* KO マウスにおける口蓋裂関連分子の発現

(A) *Sprouty2* KO マウスの口蓋突起より採取した mRNA を用いて、RT-PCR 法にて口蓋裂関連分子の発現を確認した。*GAPDH* はポジティブコントロールとして用いた。

(B) NIH image を用い、相対的な mRNA 発現量を算出した。WT マウスおよび KO マウス間で Mann-Whitney の *U* 検定を行った (\**P* < 0.05)。

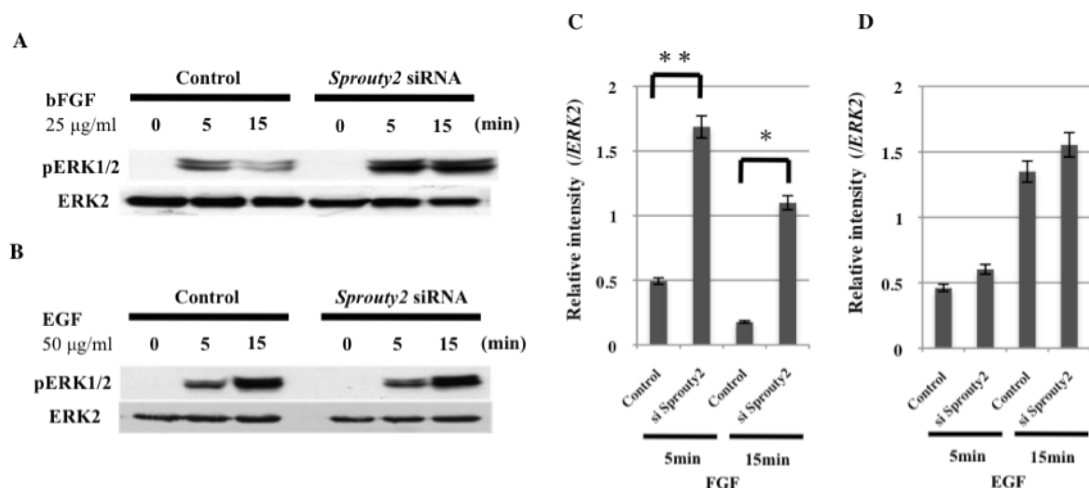


図 9 口蓋間葉細胞における FGF と EGF による ERK1/2 の活性化

(A, B) *Sprouty2* siRNA を口蓋間葉細胞に導入後、FGF 25 ng/ml (A)、EGF 50 ng/ml (B) で時間を追って刺激した。細胞からタンパク回収後、ウェスタンブロット法を用いて ERK1/2 の活性化を解析した。抗 ERK2 ポリクローナル抗体はポジティブコントロールとして用いた。

(C, D) NIH image を用い、相対的なタンパク発現量を算出した。FGF 刺激時 (C) と EGF 刺激時 (D) それぞれ siRNA 導入群および対照群間で Mann-Whitney の *U* 検定を行った (\**P* < 0.05)。

## 考 察

口唇口蓋裂は顎顔面領域で最も多い先天奇形のうちのひとつである。その発症機序は現在も明らかになっていないが、これまでにさまざまな増殖因子とその受容体、転写因子や細胞外マトリックス分子の遺伝子欠損マウスで口蓋裂発症の報告がある。これまでに報告されている口蓋裂発症 KO マウスの病態に大きな違いはないが、その発症機序は多様である。これまでに報告されている口蓋裂のパターンは次の5つに大別できる。1) 口蓋突起の形成不全、2) 挙上前の口蓋突起と舌や下顎との癒合、3) 口蓋突起の挙上障害、4) 挙上後の口蓋突起の接合不全、5) 接合部口蓋上皮の残存である [10]。 *Fgf10* KO マウスおよび *Fgf10* のレセプターである *Fgfr2b* の KO マウスでは、口蓋上皮細胞におけるアポトーシスが増加し、口蓋突起の形成不全をきたす [8]。 *Tgfb3* KO マウス [6] および *Egfr* KO マウス [7] では、口蓋突起の舌上方への挙上、接合までの過程は正常のマウスと同様であるが、接合部上皮が消失せず残存することで口蓋裂となる。また、*Osr2* KO [17, 18]、*Pdgfr* KO マウス [19]、*Gli3* KO マウス [20] では口蓋突起の挙上障害を認める。本研究において、*Sprouty2* KO マウスのうち口蓋裂を発症した胎仔では口蓋突起は形成されていたが、舌の側方にあり挙上していなかった。口蓋突起挙上のメカニズムについては諸説あるが、現在も詳細は明らかになっていない。現在の一般的な見解としては、口蓋突起の挙上は口蓋突起自体の増殖のタイミングや、下顎や口腔内の形態により制御されるとされている [5]。

*Sprouty2* KO マウス胎仔における口蓋裂発症率は 21.9% であった。これまでに、*Sprouty2* を含む領域を欠失した *36pub* 変異マウスで口蓋裂の発症が報

告されている [7] が、口蓋裂発症率は 83.3% であり、*Sprouty2* KO マウスの発症率と比較すると非常に高い頻度であった。これは、*36Pub* 変異マウスは全長約 1 Mb の遺伝子を欠失しており、この中には *Sprouty2* 以外の遺伝子も含まれているためと考えられる [22, 23]。

*Sprouty2* KO マウスにおける口蓋裂発症機序を明らかにするため、*in vitro* で口蓋の癒合能について検討した。口蓋の器官培養を *Sprouty2* 遺伝子発現抑制下に行ったところ、口蓋接合部の上皮は消失して完全に癒合しており、上皮残存といった癒合不全は認めなかった。次に、*Sprouty2* KO マウスにおいて免疫組織学的手法を用い細胞増殖活性およびアポトーシスについて検討したところ、*Sprouty2* KO マウスでは口蓋間葉の細胞増殖が亢進していることが示唆された。*Sprouty2* KO マウスの口蓋突起の形態に関しては詳細な定量的検討を行っていないが、口蓋突起の長さや幅は *Sprouty2* WT マウスと比較して明らかな差は認めなかったことから、口蓋間葉細胞増殖の亢進により口蓋突起挙上のタイミングにずれが生じている可能性が考えられた。同様に口蓋間葉細胞の増殖亢進がみられる口蓋裂発症マウスとして *homeobox-A2* (*Hoxa2*) KO マウスが過去に報告されている [24]。*Hoxa2* はホメオドメインを持つ転写因子のひとつで [25]、*Hoxa2* KO マウスでは口蓋間葉細胞増殖の亢進により口蓋突起が挙上せず口蓋裂となる [24]。これは *Sprouty2* KO マウスの表現型に極めて類似している。また、*Hoxa2* KO マウスでは口蓋間葉細胞の増殖異常の他に、舌骨舌筋が舌骨大角へ異常付着することによる舌の位置異常も報告されており [26]、*Sprouty2* KO マウスも同様に舌の異常を伴う可能性がある。舌の位置や形態に関しては今後さらに検討する必要があると考

えられる。

*Sprouty2* は MAPK 経路抑制因子であるが、これまでにさまざまな MAPK 経路関連分子の遺伝子欠損マウスで口蓋裂発症の報告があり、口蓋の発生や癒合に MAPK 経路は深く関与していると考えられる。中でも FGF シグナルは口蓋の細胞増殖に重要な役割を果たしている。*Fgf10* は口蓋間葉に発現し、*Fgfr2b* を介して口蓋上皮の細胞増殖を正に調節する。また一方では、口蓋上皮における sonic hedgehog (Shh) の発現にも関与し、Shh 経路を介して口蓋間葉の細胞増殖も制御している [8, 27]。*Sprouty2* は FGF シグナルの負の制御因子であることから、*Sprouty2* KO マウスの口蓋間葉では FGF シグナルが過剰に入ることによって細胞増殖が亢進すると推察される。*Sprouty2* KO マウスの口蓋では FGF シグナルの下流で働く *Msx1* [28, 29]、*Ptx1* [29]、*Etv5* [30] の発現が *Sprouty2* WT マウスの口蓋に比べ増加していた。また、口蓋間葉細胞を FGF で刺激したところ、*Sprouty2* 遺伝子発現抑制群で ERK1/2 のリン酸化は増強していた。このことから、*Sprouty2* は口蓋間葉細胞において FGF シグナル経路を介して細胞増殖を制御していることが示唆された。

以上の結果より、*Sprouty2* KO マウスでは FGF シグナルの増強および口蓋間葉の細胞増殖の異常により、適切な時期に口蓋突起の挙上が行われず口蓋裂を発症するという可能性が示唆された。今回は検討を行っていないが、*Sprouty2* KO マウスにおいて、口蓋裂の発症に影響があると考えられている舌の形態や位置に関して今後検討していきたいと考えている。

また、口唇口蓋裂の発症には複数の遺伝子がシグナルクロストークを介して関与するとされているため、今後は *Sprouty* をはじめとした MAPK 関連

分子の口蓋裂発症への関与についてさらに検討し、ヒトにおける口唇口蓋裂発症原因の解明へと繋げていきたい。

## 参考文献

- [1] P. Stanier, G.E. Moore, Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts, *Hum. Mol. Genet.* 13 Spec No 1 (2004) R73-81.
- [2] 木下弘幸, 夏目長門, 口唇・口蓋裂の家族内発現について, *小児口腔外科*. 2 (1992) 41-47.
- [3] A. Jugessur, J.C. Murray, Orofacial clefting: recent insights into a complex trait, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15 (2005) 270-278.
- [4] A. Gritli-Linde, Molecular control of secondary palate development, *Dev. Biol.* 301 (2007) 309-326.
- [5] M.W. Ferguson, Palate development, *Development*. 103 Suppl (1988) 41-60.
- [6] Y. Taya, S. O'Kane, M.W. Ferguson, Pathogenesis of cleft palate in TGF-beta3 knockout mice, *Development*. 126 (1999) 3869-3879.
- [7] P.J. Miettinen, J.R. Chin, L. Shum, H.C. Slavkin, C.F. Shuler, R. Derynck, Z. Werb, Epidermal growth factor receptor function is necessary for normal craniofacial development and palate closure, *Nat. Genet.* 22 (1999) 69-73.
- [8] R. Rice, B. Spencer-Dene, E.C. Connor, A. Gritli-Linde, A.P. McMahon, C. Dickson, I. Thesleff, D.P. Rice, Disruption of Fgf10/Fgfr2b-coordinated epithelial-mesenchymal interactions causes cleft palate, *J. Clin. Invest.* 113 (2004) 1692-1700.

- [9] I.C. Welsh, A. Hagge-Greenberg, T.P. O'Brien, A dosage-dependent role for Spry2 in growth and patterning during palate development. *Mech Dev.* 124 (2007) 746-761.
- [10] Y. Chai, R.E. Maxson Jr, Recent advances in craniofacial morphogenesis, *Dev. Dyn.* 235 (2006) 2353-2375.
- [11] T. Taketomi, D. Yoshiga, K. Taniguchi, T. Kobayashi, A. Nonami, R. Kato, M. Sasaki, A. Sasaki, H. Ishibashi, M. Moriyama, K. Nakamura, J. Nishimura, A. Yoshimura, Loss of mammalian Sprouty2 leads to enteric neuronal hyperplasia and esophageal achalasia, *Nat. Neurosci.* 8 (2005) 855-857.
- [12] K. Shim, G. Minowada, D.E. Coling, G.R. Martin, Sprouty2, a mouse deafness gene, regulates cell fate decisions in the auditory sensory epithelium by antagonizing FGF signaling, *Dev. Cell.* 8 (2005) 553-564.
- [13] O.D. Klein, G. Minowada, R. Peterkova, A. Kangas, B.D. Yu, H. Lesot, M. Peterka, J. Jernvall, G.R. Martin, Sprouty genes control diastema tooth development via bidirectional antagonism of epithelial-mesenchymal FGF signaling, *Dev. Cell.* 11 (2006) 181-190.
- [14] K. Taniguchi, T. Ayada, K. Ichiyama, R. Kohno, Y. Yonemitsu, Y. Minami, A. Kikuchi, Y. Maehara, A. Yoshimura, Sprouty2 and Sprouty4 are essential for embryonic morphogenesis and regulation of FGF signaling, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352 (2007) 896-902.
- [15] A.R. Vieira, J.R. Avila, S. Daack-Hirsch, E. Dragan, T.M. Felix, F. Rahimov, J. Harrington, R.R. Schultz, Y. Watanabe, M. Johnson, J. Fang, S.E. O'Brien, I.M.

Orioli, E.E. Castilla, D.R. Fitzpatrick, R. Jiang, M.L. Marazita, J.C. Murray, Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate, *PLoS Genet.* 1 (2005) e64.

[16] C.F. Shuler, Y. Guo, A. Majumder, R.Y. Luo, Molecular and morphologic changes during the epithelial-mesenchymal transformation of palatal shelf medial edge epithelium in vitro, *Int. J. Dev. Biol.* 35 (1991) 463-472.

[17] Y. Gao, Y. Lan, C.E. Ovitt, R. Jiang, Functional equivalence of the zinc finger transcription factors *Osr1* and *Osr2* in mouse development, *Dev. Biol.* 328 (2009) 200-209.

[18] Y. Lan, C.E. Ovitt, E.S. Cho, K.M. Maltby, Q. Wang, R. Jiang, Odd-skipped related 2 (*Osr2*) encodes a key intrinsic regulator of secondary palate growth and morphogenesis, *Development.* 131 (2004) 3207-3216.

[19] H. Ding, X. Wu, H. Bostrom, I. Kim, N. Wong, B. Tsoi, M. O'Rourke, G.Y. Koh, P. Soriano, C. Betsholtz, T.C. Hart, M.L. Marazita, L.L. Field, P.P. Tam, A. Nagy, A specific requirement for PDGF-C in palate formation and PDGFR- $\alpha$  signaling, *Nat. Genet.* 36 (2004) 1111-1116.

[20] X. Huang, S.L. Goudy, T. Ketova, Y. Litingtung, C. Chiang, *Gli3*-deficient mice exhibit cleft palate associated with abnormal tongue development, *Dev. Dyn.* 237 (2008) 3079-3087.

[21] C. Lazzaro, Sul meccanismo di chiusura del palato secondario, *Monit Zool Ital.* 51 (1940) 249-273.

- [22] K.A. Peterson, B.L. King, A. Hagge-Greenberg, J.J. Roix, C.J. Bult, T.P. O'Brien, Functional and comparative genomic analysis of the piebald deletion region of mouse chromosome 14, *Genomics*. 80 (2002) 172-184.
- [23] J.J. Roix, A. Hagge-Greenberg, D.M. Bissonnette, S. Rodick, L.B. Russell, T.P. O'Brien, Molecular and functional mapping of the piebald deletion complex on mouse chromosome 14, *Genetics*. 157 (2001) 803-815.
- [24] T.M. Smith, X. Wang, W. Zhang, W. Kulyk, A.J. Nazarali, Hoxa2 plays a direct role in murine palate development, *Dev. Dyn*. 238 (2009) 2364-2373.
- [25] Z.N. Akin, A.J. Nazarali, Hox genes and their candidate downstream targets in the developing central nervous system, *Cell. Mol. Neurobiol*. 25 (2005) 697-741.
- [26] J.R. Barrow, M.R. Capecchi, Compensatory defects associated with mutations in Hoxa1 restore normal palatogenesis to Hoxa2 mutants, *Development*. 126 (1999) 5011-5026.
- [27] S.R. Alappat, Z. Zhang, K. Suzuki, X. Zhang, H. Liu, R. Jiang, G. Yamada, Y. Chen, The cellular and molecular etiology of the cleft secondary palate in Fgf10 mutant mice, *Dev. Biol*. 277 (2005) 102-113.
- [28] Z. Zhang, Y. Song, X. Zhao, X. Zhang, C. Fermin, Y. Chen, Rescue of cleft palate in Msx1-deficient mice by transgenic Bmp4 reveals a network of BMP and Shh signaling in the regulation of mammalian palatogenesis, *Development*. 129 (2002) 4135-4146.

- [29] A.J. Barlow, J.P. Bogardi, R. Ladher, P.H. Francis-West, Expression of chick Barx-1 and its differential regulation by FGF-8 and BMP signaling in the maxillary primordia, *Dev. Dyn.* 214 (1999) 291-302.
- [30] H.J. Kim, D.P. Rice, P.J. Kettunen, I. Thesleff, FGF-, BMP- and Shh-mediated signalling pathways in the regulation of cranial suture morphogenesis and calvarial bone development, *Development*. 125 (1998) 1241-1251.

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導を頂きました中村誠司教授に深甚なる謝意を表します。また直接御指導頂きました武富孝治助教、吉崎恵吾先生に深謝致します。九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座顎顔面腫瘍制御学分野および九州大学病院口唇口蓋裂クリニックの皆様には多くの建設的御意見と御指導を賜り、心より感謝致します。