

## 頭蓋底軟骨結合 その成長を調節する分子メカニズムと異常

永 山 元 彦<sup>1)</sup> Eiki Koyama<sup>2)</sup> 渋 川 義 宏<sup>3)</sup> 中 澤 純 子<sup>4)</sup>  
今 泉 佳 宣<sup>4)</sup> 塚 原 隆 司<sup>4)</sup> 日 下 義 章<sup>4)</sup> 大 友 克 之<sup>4)</sup>  
竹 内 宏<sup>1)</sup>

### The Cranial Base Synchrondrosis: A Function and Skeletal Diseases

NAGAYAMA MOTOHIKO<sup>1)</sup>, KOYAMA EIKI<sup>2)</sup>, SHIBUKAWA YOSHIHIRO<sup>3)</sup>, NAKAZAWA JUNKO<sup>4)</sup>, IMAIZUMI YOSHINOBU<sup>4)</sup>,  
TSUKAHARA TAKASHI<sup>4)</sup>, KUSAKA YOSHIAKI<sup>4)</sup>, OHTOMO KATSUYUKI<sup>4)</sup> and TAKEUCHI HIROSHI<sup>1)</sup>

頭蓋底は頭蓋骨の一部として脳と頭頸顔面骨の間に神経頭蓋底として存在する。この骨化様式は軟骨性骨化であり、同時に頭蓋底を構成する骨の成長を制御することになる。ヒトの場合、頭蓋底は後頭骨基底、蝶形骨、篩骨ならびに前頭骨から構成される。頭蓋底には軟骨結合と呼ばれる非常に特徴的な軟骨組織がこれら骨間に存在し、骨化成長点として、特に前後軸方向への頭蓋底の伸長に寄与すると同時に、頭蓋顔面骨の成長全体に重要な役割を担っている。組織学的に頭蓋底の軟骨結合は、その中央部に静止あるいは休止軟骨細胞層が存在し、これを前後で挟むように増殖軟骨細胞層、前肥大軟骨細胞層および肥大軟骨細胞層の順に規則正しく軟骨細胞が配列する。最近の遺伝子的研究から、非常に興味ある知見が報告されているが、軟骨結合の生物学的な意義を含めた謎は解決されていないことが多い。特に頭蓋底の形態的な変化を示す発育異常として知られる唇裂/口蓋裂、Crouzon 症候群、Apert 症候群や鎖骨頭蓋異形成症などの詳細を理解する上で、軟骨結合の重要性は高い。この総説は、これまでに知られている先天異常を含む発育異常の中で、特に頭蓋底の変化によって頭蓋顔面に異常を来す疾患を紹介するとともに、これらの発症する分子メカニズムのひとつとして重要であると考えられている Indian hedgehog (Ihh) や Wnt/ $\beta$ -catenin のシグナルを、マウスの軟骨結合を中心にまとめたものである。著者らはこれらの成果や発育異常の発症メカニズムの解明が将来、治療を目的とした分野に発展することを期待して止まない。

キーワード：頭蓋底，軟骨結合，成長板，Indian hedgehog，Wnt/ $\beta$ -catenin

*The cranial base is a part of the craniofacial skeleton. It is located between the brain and the craniofacial bones and forms a floor of the neurocranium. The cranial base is formed by endochondral ossification and is established by the coordinated development and growth of several skeletal elements. In human the cranial base is composed of the basioccipital, sphenoid, ethmoid and frontal bones. The cranial base is characterized by the presence of the synchrondroses, cartilaginous segments persisting between the ossification centers, which are essential growth centers of the anterior-posterior cranial base elongation. The synchrondroses play a significant role for the overall organization and the craniofacial development. Histologically, the synchrondroses consist of a central resting zone of chondrocytes, mirror-image growth plates arranged in opposing direction, which includes proliferative, pre-hypertrophic and hy-*

<sup>1)</sup>朝日大学歯学部口腔病態医療学講座口腔病理学分野  
501 0296 岐阜県瑞穂市穂積1851

<sup>2)</sup>Department of Orthopaedic Surgery, Thomas Jefferson University College of Medicine  
1025 Walnut St., College Rm 511, Philadelphia, PA 19107, USA

<sup>3)</sup>東京歯科大学歯周病学講座  
261 8502 千葉県美浜区真砂町1 2 2

<sup>4)</sup>朝日大学歯学部附属村上記念病院一般外科学分野整形外科学分野  
500 8523 岐阜市橋本町 3 23

<sup>1)</sup>Department of Oral Pathology, Division of Oral Pathogenesis and Disease Control, Asahi University School of Dentistry

Hozumi 1851, Mizuho, Gifu 501 0296, Japan

<sup>2)</sup>Department of Orthopaedic Surgery, Thomas Jefferson University College of Medicine  
1025 Walnut St., College Rm 511, Philadelphia, PA 19107, USA

<sup>3)</sup>Department of Periodontology, Tokyo Dental College  
Masago 1 2 2, Mihama-Ku, Chiba 261 8502, Japan

<sup>4)</sup>Division of Surgery, Department of General Medicine, Murakami-Memorial Hospital, Asahi University School of Dentistry  
Hashimoto 3 23, Gifu, Gifu 500 8523, Japan

(平成20年12月25日受理)

*peritrophic zone of chondrocytes. Recently, several genetic studies have shown to understand this intriguing nature, however, much remains to be understood about synchondrosis developmental biology. Particularly with regard to how they form and acquire their characteristic organization and locations along the cranial base, what factors maintain their function, and what changes in these fundamental mechanisms may contribute or lead to craniofacial developmental diseases, including malformations such as cleft lip/palate, Crouzon and Apert syndromes, and cleidocranial dysplasias. In this review, we summarize recent studies of congenital craniofacial disorders caused by cranial base malformation, and introduce recent studies focused on the roles of Indian hedgehog ( Ihh ) and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in mouse synchondrosis development and function.*

Key words: cranial base, synchondrosis, growth plate, Indian hedgehog, Wnt/ $\beta$ -catenin

## はじめに

頭蓋顔面は、20個以上の骨から構成される頭蓋顔面骨としてまとめられ、その役割から、脳や中枢神経組織を外から保護する頭蓋骨群、あるいは下部から支持する頭蓋底骨群、そして顔を構成する顔面骨群の3つに大別することができる。特に頭蓋底骨群は、篩骨、蝶形骨、側頭骨岩様部および後頭骨からなり、その機能は脳の成長に合わせた形態発生を示す以外に、脳下垂体を収容するトルコ鞍の形成や下顎関節突起（下顎頭）とともに顎関節の形成にも関わる<sup>1,2)</sup>。これら骨の形成には2種類の骨化様式が存在し、頭蓋骨や顔面骨の多くは、骨芽細胞が直接、骨を形成する膜性骨化様式であるのに対し、頭蓋底は一旦、軟骨形成を経た後に骨に置き換わる内軟骨性骨化様式をとる<sup>3)</sup>。しかし、これら複雑な骨の発生における分子メカニズムについて、どのように制御されるのか不明な点が多く、実際に頭蓋顔面における個々の発育異常を説明できるのは限られている<sup>4)</sup>。

頭蓋顔面の発育異常の中で、頻度高くみられる唇裂・口蓋裂に比べて稀ではあるが、頭蓋底骨群の形成異常を示す疾患にCrouzon症候群（Crouzon syndrome）、アペール症候群（Apert syndrome）や鎖骨頭蓋異形成症（Cleidocranial dysplasia, CCD）があり、これら疾患の多くに、頭蓋顔面骨の発育と成長の異常がみられる。最近、数種の原因遺伝子が同定され、軟骨、骨形成過程におけるそれらの機能や、他の遺伝子との関連も検索されているが、特に頭蓋底骨の異常が症状と関連する場合が多い<sup>5-8)</sup>。

このように頭蓋底の成長とその異常は、頭蓋底に存在する内軟骨性骨化の異常に影響を受ける要素が大きく、中でも頭蓋底骨を構成する骨間に存在し、成長発育の中心的な役割を担う軟骨結合は、その発生過程と成長を維持する分子メカニズムの解明や個々の発育異常における発症機序の理解に多大な貢献を与えてきた<sup>9-11)</sup>。以下に、これまでにわかってきた頭蓋顔面における頭蓋底の発育異常の知見と著者らの報告成果の

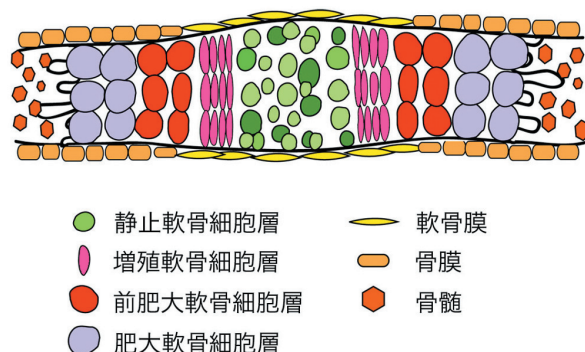


図1 頭蓋底軟骨結合成長板の模式図

一部を含めた最近の知見を紹介したい。

## 頭蓋底軟骨結合

ヒトの頭蓋底では、胎生1～2ヶ月までに頭蓋底を構成する骨群の前駆体として前脊軟骨（prechordal plate）、下垂体軟骨（hypophyseal plate）と傍索軟骨（parachordal plate）の3種の軟骨小塊が生じる。これら軟骨のうち、前二者は主に神経堤由来細胞から、後者は第1頸部体節椎体由来の細胞から発生する<sup>1,12,13)</sup>。その後、各軟骨塊は互いに融合し、一塊の軟骨板となり、大後頭孔から眼窩鼻腔まで拡がりつつ、脳を下方から支持するようになる。やがて、軟骨板に複数の骨化中心が独立して出現し、次第に骨組織へと置き換えられていくが、それぞれの骨組織の間には軟骨組織が残存した軟骨結合がみられる<sup>3,14,16)</sup>。ヒトでもマウスでも、軟骨結合は基本的に増殖軟骨細胞層、前肥大軟骨細胞層そして肥大軟骨細胞層で構成される鏡像対称的な2つの成長板が中央部の静止軟骨細胞層を介して存在する（図1, 2）。この軟骨結合は、蝶形篩骨軟骨結合、蝶形骨間軟骨結合、蝶形後頭軟骨結合および後頭骨間軟骨結合として存在し、それぞれが骨への成長を司るが、軟骨結合の骨化時期はそれぞれ部位特異的であり、例えばヒトの場合、蝶形骨間軟骨結合は生後間もなく骨に置換されるが、蝶形後頭軟骨結合は10歳後半まで存在し、頭蓋底の前後方向に沿った成長時期に関与す

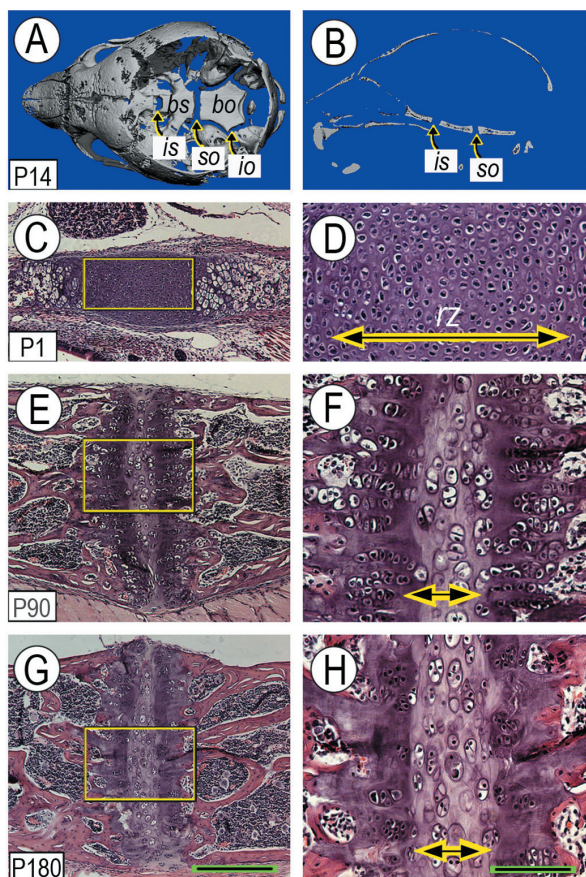


図2 マウス頭蓋底軟骨結合成長板の加齢による構造変化  
生後14日齢マウスの頭部水平断と(A)と正中矢状断  
(B)のマイクロCTイメージ。蝶形骨間軟骨軟骨結合と蝶後頭軟骨結(矢印)は頭蓋底の正中部に配置され、前後軸方向の成長に関与する。生後1日齢(C, D), 90日年齢(E, F), と180日齢(G, H)の蝶後頭軟骨結合の弱拡大像(C, E, G)と表示された領域の強拡大像の組織所見(D, F, H)。生後1日齢の成長板の静止層(rz)は小円形の幼弱な軟骨細胞で占められているが(2重矢印), 生後90日の静止層は、大型の軟骨細胞により占められ、その幅も狭くなる(2重矢印)。成長板軟骨細胞のカラム形成は保存されており成長が営まれている。生後6ヶ月齢までにカラムの形成は大きく崩れ、軟骨細胞は小集団化または消失するため、成長は起こらない。C-H; ヘマトキシリン-エオジン染色, is: 蝶形骨間軟骨結合; so: 蝶形後頭軟骨結; io: 後頭骨間軟骨結合  
Bar in G for C, E and G: 450 $\mu$ m and bar in H for D, F and H: 85 $\mu$ m.

る<sup>17,18)</sup>。一方、頭蓋底の前方は顔面中央部と連続しているために、その形成ならびに機能不全は顔面骨格の成長に大きく影響を与える<sup>17,19,21)</sup>。以上からもわかるように、軟骨結合の発生および成長のメカニズムが頭蓋顔面の正常な発育や異常の理解だけでなく、治療へ

表1 頭蓋底に異常がみられる主な発育異常

| 疾患                           | 変異                           | 頭蓋底の異常(文献)                                           |
|------------------------------|------------------------------|------------------------------------------------------|
| Apert syndrome               | FGFR2                        | 頭蓋底前方部の非対称性かつ短縮(6)                                   |
| Crouzon syndrome             | FGFR2                        | 頭蓋底の前方、後方部の短縮、軟骨結合の早期融合(5)                           |
| Turner syndrome              | X染色体                         | 頭蓋底後方部の短縮、頭蓋底角の増大(37)                                |
| Down syndrome                | Xp11.23,<br>21q22.3,<br>1q43 | 頭蓋底前方部の短縮(38)                                        |
| Saethre-Chotzen syndrome     | TWIST,<br>FGFR2,<br>FGFR3    | 頭蓋底後方部の短縮と位置異常(23)                                   |
| Klinefelter syndrome         | 47, XXY                      | 頭蓋底の多方成長と頭蓋底角の異常(39)                                 |
| Williams syndrome            | 7q11.2                       | 頭蓋底前方部の短縮(40)                                        |
| Treacher Collins syndrome    | TCOF1                        | 頭蓋底の狭小化(77)                                          |
| Ceicranial dysplasia (CCD)   | Runx2/cbfa1                  | 頭蓋底の骨化遅延、斜台や大後頭孔の歪み(8)                               |
| Thanatophoric dysplasia (TD) | FGFR3                        | 軟骨結合の早期融合による頭蓋底の短縮(29)                               |
| Achondroplasia (ACH)         | FGFR3                        | 肋骨の肋骨長の減少、蝶形骨前方長の増大、後方頭蓋底長の減少、頭蓋底角の減少、蝶後頭軟骨結合の融合(28) |

の道をも秘めているといえる<sup>22)</sup>。

頭蓋底の形成および成長異常を伴う遺伝性ならびに染色体異常疾患

内軟骨性骨化を経て形成される骨格に変異をきたす遺伝性疾患や染色体異常疾患の中に、頭蓋底の発育異常を伴うことが報告されており、その表現系では頭蓋底の後方よりも前方の異常として認められる傾向が強い。頭蓋骨縫合早期癒合症(Craniosynostosis)、CCDや口蓋裂関連疾患(Cleft palate and related disorders)などにみられる形態的な異常には、前後径短縮、頭蓋底角度変化や非対称性の頭蓋底発育が挙げられるが、その原因に、軟骨結合部の早期閉鎖や成長板の機能不全などが考えられる<sup>7,23,25)</sup>。

これらの原因に関して、これまでに多数の染色体異常や遺伝子の変異が明らかにされ、頭蓋冠や頭蓋底を含む骨格がその影響を受けることが報告されている(表1)。頭蓋骨縫合早期癒合症候群(Craniosynostosis syndrome)や非症候群性頭蓋骨縫合早期癒合症(Non-syndromic craniosynostosis)では頭蓋縫合が早期に癒合し、その原因遺伝子として1型線維芽細胞成長因子受容体(fibroblast growth factor receptor 1: FGFR1)とFGFR2遺伝子が同定された<sup>26,27)</sup>。一方、FGFR3の変異で発症する軟骨無形成症(Achondroplasia, ACH)は常染色体優性遺伝形式を示し、頭蓋底後方部が短縮するとともに急速な骨の角ばった症状を示す<sup>28,29)</sup>。致死性骨無形成症(Thanatophoric dysplasia, TD)もFGFR3の遺伝子異常によって短肢小人様化を示し、生後数

時間以内に死に至る疾患であるが、クローバー葉状の頭蓋冠と呼ばれる著しい頭蓋と顔面の形成異常を示す。これは未熟な段階で軟骨結合が骨組織に置換された結果、頭蓋底が成長できず、頭蓋冠が代償的に異常成長するためである<sup>29,30)</sup>。Saethre-Chotzen syndrome は FGFR2 と関係する Twist の遺伝子異常で、頭蓋底の短小と異常を示すために頭蓋骨縫合早期癒合がみられる<sup>23)</sup>。CCD は runt-related transcription factor2 (Runx2/cbfa1) の遺伝子異常で鎖骨、頭蓋骨などの膜性骨化不全や歯の萌出異常を示すが、最大の特徴は骨化の遅延と大後頭孔とこれに続く斜台のひずみを含む頭蓋底の骨変化である<sup>8,31)</sup>。口唇裂や口蓋裂の病態と頭蓋底の欠損に関する研究は広く行われており、完全口唇裂の患者では顎骨や口蓋そして頭蓋底を含めた発育異常がみられる<sup>32,33)</sup>。骨の解剖学的な指標から示されるバジオン、トルコ鞍とナジオンからなる頭蓋底角は小児期では135度であるが、成人では125度程度となる。この角度の異常は不正咬合の一因となるため歯科臨床では重視されている。しかし現在では、まだ頭蓋底の変化と不正咬合との遺伝子レベルでの因果関係を解明するに至っていない。脳の発生異常は顔面骨格の欠損を伴うことが多く、無脳症や水頭症では、後頭骨基底突起の短径と狭窄や、頭蓋底の平坦化と短小化を示すことが報告されている<sup>34,35)</sup>。その他、クレチン病 (Cretinism syndrome)、ターナー症候群 (Turner syndrome) やダウン症候群 (Down syndrome) においても、頭蓋底の長さが減少して頭蓋底角度が増し、頭蓋顔面骨は極端に短く、上顎が後退した容貌となる<sup>36,38)</sup>。Apert syndrome では、頭蓋底の形成不全で非対称となることが多く<sup>6)</sup>、Crouzon syndrome では、頭蓋底の前方と後方の両方が障害を受ける結果、頭蓋底の短小化が生じる<sup>5)</sup>。クラインフェルター症候群 (Klinefelter syndrome) やウィリアムズ症候群 (Williams syndrome) でも頭蓋底部の低形成を伴う<sup>39,40)</sup>。以上の発育異常にみられる原因遺伝子の中には、それぞれが独立したのではなく、互いに関連するものもあり、例えば Twist, FGFR2, FGFR1 ならびに Runx2/cbfa1 は互いに発生段階における分子の発現と関連する一連のものであることが示唆されている<sup>41)</sup>。

#### 頭蓋底軟骨結合の成長に關与する成長因子

これまで、成長因子が頭蓋底の発生と成長におよぼす影響を調べた報告は四肢の長幹骨のそれに比べると非常に少ないが、例を挙げると、Bone morphogenetic protein (BMP) は軟骨細胞の増殖分化を調節していることが知られており、その阻害剤である Noggin は BMP と細胞外で結合し、受容体への結合を阻害してその機

能を強力に抑制する<sup>42)</sup>。頭蓋底軟骨の発生過程で、BMP 遺伝子群は時空的な発現パターンを示し、*in vitro* では BMP 存在下で器官培養すると軟骨細胞の増殖は促進され、コントロール群と比べると頭蓋底軟骨が伸張するが、反対に Noggin により増殖は抑えられる<sup>43,44)</sup>。一方、BMP ファミリーの中で BMP 3 が軟骨結合の静止細胞層と増殖細胞層の成長板の軟骨細胞を未分化の状態に維持しようと軟骨細胞の増殖、供給の調節を行っていることが報告されている<sup>45)</sup>。また、軟骨結合の成長板の維持に、軟骨の細胞外マトリックスであるヒアルロン酸の合成と蓄積が必須であることが報告されている<sup>46)</sup>。このように、軟骨結合の軟骨細胞も成長因子や細胞外の環境因子によって、その性質が大きく左右されることが示唆された。一方、Koyama らや Yang らは、長管骨の発生に重要な役割を果たしている Ihh と Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルに着目し、それらの因子の変異がどのような頭蓋顔面骨の異常に繋がるのかを検討してきた<sup>47,50)</sup>。

#### Ihh 遺伝子の欠損により引き起こされる頭蓋底の形態異常と軟骨結合の機能不全

ヘッジホッグ (hh) は脊椎動物の初期発生において、体軸や四肢の前後軸の決定に中心的な役割を果たすことが知られている<sup>51,52)</sup>。hh には、脊椎動物ではソニックヘッジホッグ (Shh)、デザートヘッジホッグ (Dhh) および Ihh の3種が知られている<sup>53,54)</sup>。コレステロールの修飾を受け、細胞外に分泌された hh タンパクは、標的細胞の細胞表面に存在する Patched1 (Ptch1) に結合し、その機能を抑制する。その結果、Smoothered (Smo) を介して転写因子の Gli が活性化され、核に移行し、hh ターゲット遺伝子の発現を誘導する<sup>55,58)</sup>。最近、primary cilium と呼ばれる細胞表面の小器官が、Smo による Gli の活性に重要な役割を果たしていることから、primary cilium の欠損によって、骨や軟骨の形成が障害されることが示された<sup>56,59,62)</sup>。Koyama らは、primary cilium のモータータンパクを構成する kif3a に着目し、軟骨組織特異的に kif3a 遺伝子をノックアウトした場合のマウス頭蓋底軟骨結合の異常は、hh レセプターの Ptch1 と hh タンパクをトラップするための細胞外基質である Syndecan3 の減少によって、分泌された hh タンパクが異常な分布を示すためだと説明している<sup>49)</sup>。

Ihh は軸骨格や四肢などの骨の発生過程において時空間的に発現し、骨細胞および軟骨細胞の増殖と成熟を調節することが報告されている<sup>51,63,65)</sup>。このように、Ihh は hh の中でも軟骨の成熟と骨化に重要な分子であるが、これと共役する分子に軟骨端の関節周囲組織



に由来する甲状腺ホルモン関連タンパク (PTHrP) が知られている<sup>52, 65)</sup>。軟骨結合の成長板で、Ihh タンパクは前肥大軟骨細胞から産生され、軟骨端の関節周囲組織に作用するが、これはPTHrPの産生を正に制御する。さらにPTHrPは受容体を発現している軟骨細胞に働き、増殖を促進させるとともに、増殖軟骨細胞の前肥大軟骨細胞への分化を抑制する<sup>66)</sup>。最近になって、Ihh タンパクは軟骨細胞に直接作用し、分化を促進することも報告されている<sup>67)</sup>。

頭蓋底の軟骨結合では四肢の長管骨関節にみられるような軟骨端の関節周囲組織が存在しないため、関節のモデルをそのまま頭蓋底の軟骨結合の成長に適用することができない。そこでYoungらは頭蓋底の軟骨結合の発生と成長を制御する分子メカニズムを解明するため、Ihh 遺伝子欠損マウスにおける頭蓋底の表現系を詳細に解析した。新生児の野生型マウスの頭蓋底では、蝶形骨間軟骨結合 (is)、蝶形後頭軟骨結合 (so) や後頭骨間軟骨結合 (io) が既に形成されており、それら軟骨結合の成長板の組織像では、小円形の静止軟骨細胞層 (静止層, rz)、扁平な増殖軟骨細胞層 (増殖層, pz) と円形の前肥大層 (phz) ならびに成熟した肥大軟骨細胞層 (肥大層, hz) の明瞭な層分けが可能で、肥大層から1次海綿骨や骨髄へと自然に移行していた。遺伝子発現では、Sox9、アグリカン、および2型コラーゲンのmRNAは静止層と増殖層に、細胞増殖を示すH4CのmRNAは増殖層に、また肥大層の軟骨細胞マーカーとなる10型コラーゲンは肥大層に発現していて、遺伝子レベルでも明確な層分けが可能であった。これに対し、Ihh 遺伝子欠損マウスの頭蓋前後径は約8割程度に短縮し、頭蓋がドーム状に盛り上がり全体的に丸味を帯びた形態を示し、軟骨結合の形成異常が疑われた。成長板の層構造は乱れ、増殖層は消失し、静止層の軟骨細胞が肥大化して軟骨細胞の分化の異常亢進が認められた。遺伝子レベルにおける層構造についても完全に乱れ、10型コラーゲンおよびオステオポンチンなどの肥大層の軟骨細胞マーカーが異所性に静止層の軟骨細胞にも検出された。

一方、長管骨で提唱されたPTHrP-Ihhの相関関係を野生型の頭蓋底の軟骨結合で詳細に調べた結果、Ihhが前肥大層の軟骨細胞に、PTHrPは静止層の軟骨細胞に、そしてPTHrP受容体は増殖層の軟骨細胞に局限して発現していた。興味あることに、Ihh 遺伝子欠損マウスでは、静止層のPTHrPと増殖層でのH4Cの遺伝子発現が消失していた。これらの結果から、頭蓋底の軟骨結合では、1) PTHrPは静止層の軟骨細胞に、Ihhは前肥大層の軟骨細胞にそれぞれ局限して発現し、2) PTHrPの軟骨細胞における発現はIhhによ

り維持され、3) Ihh シグナルはPTHrPの発現を促し、増殖層の軟骨細胞を未分化な状態に維持させるとともに、おそらくPTHrPと協調的に軟骨細胞の増殖を調節していると考えられた<sup>48, 50)</sup>。

Wnt/ $\beta$ -catenin シグナリングの欠如により引き起こされる頭蓋顔面の異常

分泌性タンパクであるWntファミリーは骨格形成を含む種々の組織の発生過程において重要な役割を果たすことが報告されている<sup>68)</sup>。分泌されたWntタンパクは標的細胞膜表面に存在するFrizzledとよばれる7回膜貫通型レセプターと低比重リポタンパク受容体関連性受容体 (LRP) の働きで、 $\beta$ -catenin LEF/TCF 標準経路 (Wnt/ $\beta$ -catenin シグナリング)、非標準経路と呼ばれる平面細胞極性経路やカルシウム経路を活性化する<sup>69)</sup>。特に標準経路のWnt/ $\beta$ -catenin シグナリングは骨格形成に必須で、四肢の間葉細胞の軟骨細胞への分化や軟骨細胞の増殖や成熟を制御していることが知られている<sup>47, 70, 71)</sup>。また、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナリングはIhhシグナリングとともに骨芽細胞の分化にも関与し<sup>72, 73)</sup>、この作用はWntアンタゴニストとして知られるsecreted frizzled-related protein-1 (sFRP1) によって阻害されることが報告されている<sup>74)</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin シグナリングを欠損したマウスにおいて、頭蓋顔面の一部の骨に異常が確認されたことから、このシグナルの関与が重視されていた<sup>75, 76)</sup>。

そこでNagayamaらは、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナリングが頭蓋底軟骨結合の発生ならびに成長に及ぼす影響を解明するために、Col2a1-Cre マウスと $\beta$ -catenin floxed マウスを用いて、軟骨組織特異的にこのシグナルを欠損させた。 $\beta$ -catenin 欠損マウスの軟骨細胞では、成長板を構成する多くの軟骨細胞は小円形で静止層の軟骨細胞様となり、明らかな層構造は形成されなかった。さらに軟骨を取り巻く軟骨膜の発生にも障害が起こり、正常な軟骨膜でみられる骨芽細胞への分化や、血管形成も障害されていた。一方、軟骨細胞にLef/TCFを恒常的に活性化させたマウスの軟骨結合では、上記の表現系とは逆に、成長板の一部の軟骨細胞は早期に肥大化を示し、結果的に異なった成熟過程の軟骨細胞が混在する状態を示した。また、成長板のすぐ傍では過剰な膜性骨化を示した。以上の結果から、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナリングが静止層の軟骨細胞の一部に作用し、細胞分化を開始させ、その後の細胞の増殖および肥大化を正に制御するとともに、成長板の形成に重要な役割を果たしていると考えられている<sup>50)</sup> (図3)。

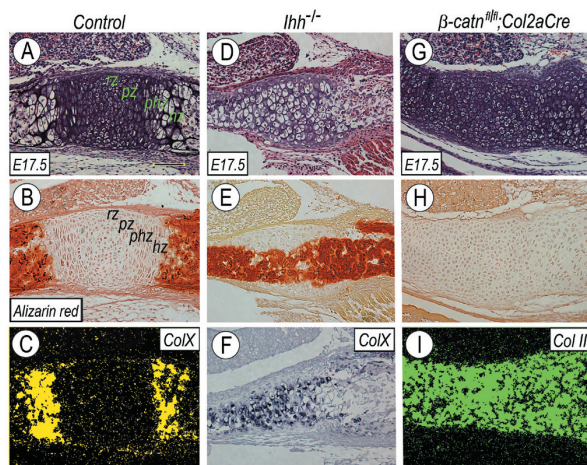


図3 Ihh 遺伝子と軟骨特異的  $\beta$ -catenin 遺伝子の改変により誘導された蝶形後頭軟骨結合の形成異常

胎生17日齢の野生型マウス (A, B, C) の蝶形後頭軟骨結合では、成長板の明確な層構造 (A)、肥大層における軟骨基質の石灰化 (B) と10型コラーゲン遺伝子の特異的な発現 (C) が観察される。Ihh 遺伝子欠損マウス (D, E, F) の軟骨結合では、軟骨細胞の分化が亢進するため、静止層において軟骨基質の一部が石灰化するとともに (E)、10型コラーゲン遺伝子 (F) が異所性に発現してくる。これに対して、軟骨特異的  $\beta$ -catenin 変異マウス (G, H, I) では、軟骨細胞の成熟過程が抑制されるために、2型コラーゲン遺伝子を発現している幼弱な軟骨細胞が軟骨結合の大部分を占めるようになり (I)、軟骨基質の石灰化はみられない (H)。

A, D, G: ヘマトキシリン-エオジン染色

B, E, H: アリザリンレッド染色

in situ hybridization with radioisotope-labeled RNA probe (C, I) and DIG-labeled RNA probe (F)

rz: 静止層; pz: 増殖層; phz: 前肥大層; hz: 肥大層の各軟骨細胞

Bar in A for A-I: 450  $\mu$ m.

頭蓋底軟骨結合の成長を維持する分子間相互作用機構

軟骨結合部での前後軸への成長は軟骨組織が骨に置換されることにより起こるが、成長を維持する分子間の相互作用メカニズムについては明らかにされていなかった。しかし遺伝子改変マウスによる軟骨結合の形成不全や頭蓋底の劣成長解析から、軟骨細胞の分化を正または負に制御している分子間の相互作用によって成長板が機能的に維持されていることが明らかとなった。例えば、 $\beta$ -catenin を介する Wnt のシグナルが亢進した場合、静止層の軟骨細胞の分化は強力に促進されることになり、増殖層に細胞を供給することができなくなることが想像される。一方、Ihh の欠損によって静止層の軟骨細胞が早期に肥大化することから、Ihh の下流シグナルが Wnt/ $\beta$ -catenin シグナリングを静止

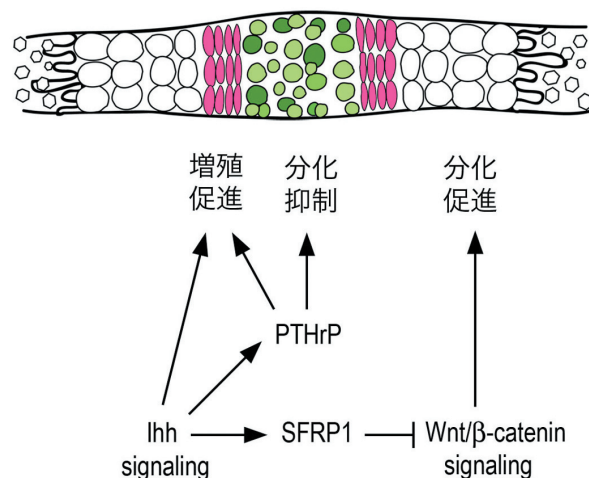


図4 頭蓋底軟骨結合の形成と成長を制御する分子モデル

Ihh シグナルは PTHrP の発現を静止軟骨細胞に誘導し、軟骨細胞を未分化な状態に維持するとともに、おそらく PTHrP と協調的に軟骨細胞の増殖を調節する。一方、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナリングは軟骨細胞の分化を強力に促進させる。sFRP1 は Ihh シグナルにより静止層の軟骨細胞に誘導され、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナリングを抑制することにより、静止層において軟骨細胞は未分化な状態に維持される。このように、Ihh やその関連分子、PTHrP と Wnt/ $\beta$ -catenin シグナリングの相互作用により軟骨細胞の増殖と分化が調節され、成長板が形成され、機能的に維持される。

層の軟骨細胞で抑制し、軟骨細胞を未分化の状態に維持していると考えられる。興味あることに、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナリングの調節に Ihh シグナリングが静止層の軟骨細胞における sFRP1 の発現を制御している可能性がある。つまり、Ihh シグナリングが sFRP1 を誘導し、静止層の軟骨細胞には Wnt の影響を抑える一方、静止層の軟骨細胞には PTHrP の発現を誘導することで、軟骨細胞の増殖を正に調節していると考えられる。これらの遺伝子の発現は出生後の頭蓋底軟骨結合にも検出されることから、これら分子間の相互作用が静止層の維持、軟骨細胞の増殖分化を制御し、頭蓋底の成長の中核として軟骨結合が骨間縫合を維持すると考えられる (図4)。

おわりに

頭蓋底の形態異常を起こす遺伝子関連性の発育異常は、容貌や咬合にも大きな影響を与えるため、歯科矯正学や小児歯科学分野では早くから注目され、また頭蓋底の軟骨結合の形成と成長制御に関する分子相互作用機構についても、その解明が強く望まれていた。これまでの遺伝子改変マウスによる頭蓋底軟骨結合に関する詳細な組織および遺伝子レベルの解析結果から、

Ihh やその関連分子が PTHrP,あるいは Wnt/ $\beta$ -catenin シグナリングとの相互作用によって,軟骨細胞の分化が調節され,未熟な状態である静止層から増殖層へと進み,やがて肥大層に成熟した後,骨や骨髄に置換するという一連の発生過程を経て,成長板を含む軟骨結合が機能的に維持されていくことが明らかになった.

今後これらの分子が,ヒトの場合においても頭蓋底や頭蓋顔面の先天性発育異常を起こす FGFR を介したシグナル異常や,Runx2などの転写調節因子の異常とどのように相互作用しているのかを明らかにしていかなければならない.このような基礎研究の結果に裏打ちされた一つ一つの知識の集積は,ヒトの発育異常の病態理解に必ず役立つものであり,また,どの分子間相互作用メカニズムの異常であるかが分かれば,これまでの外科的な治療に代わり,そのシグナルを特異的に調節して行う次世代の予防的治療の確立も可能になると著者らは期待している.

## 謝 辞

頭蓋底軟骨結合の成長の分子間相互作用の解明を目的とする研究を遂行するにあたり 絶え間ない激励と,討論に加わっていただいた Prof. Maurizio Pacifici, Associate Prof. Motomi Enomoto-Iwamoto ならびに Associate Prof. Masahiro Iwamoto に御礼申し上げます.

## 文 献

- 1) Thorogood P. The developmental specification of the vertebrate skull. *Development* 1988; 103: 141-153.
- 2) Sperber GH. Craniofacial Development. Hamilton: B. C. Decker; 2001: 89-101.
- 3) Thilander B and Ingervall B. The human spheno-occipital synchondrosis. II. A histological and microradiographic study of its growth. *Acta Odontol Scand.* 1973; 31: 323-334.
- 4) Zelzer E and Olsen B R. The genetic basis for skeletal diseases. *Nature.* 2003;423: 343-348
- 5) Carinci F, Avantaggiato A and Curioni C. Crouzon syndrome: cephalometric analysis and evaluation of pathogenesis. *Cleft Palate Craniofac J.* 1994; 31: 201-209.
- 6) Kreiborg S and Cohen MM Jr. Is craniofacial morphology in Apert and Crouzon syndromes the same? *Acta Odontol Scand.* 1998; 56: 339-341.
- 7) Kreiborg S, Jensen BL, Bjork A and Skieller V. Abnormalities of the cranial base in cleidocranial dysostosis. *Am J Orthod.* 1981; 79: 549-557.
- 8) Kreiborg S, Jensen BL, Larsen P, Schleidt DT and Darvann T. Anomalies of craniofacial skeleton and teeth in cleidocranial dysplasia. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1999; 19: 75-79.
- 9) Wilkie AO and Morriss-Kay GM. Genetics of craniofacial development and maldormation. *Nat Rev Genet.* 2001; 2: 458-468.
- 10) Karsenty G and Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell.* 2002; 2: 389-406.
- 11) Ornitz DM and Marie PJ. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev.* 2002; 16: 1446-1465.
- 12) Helms JA and Schneider RA. Cranial skeletal biology. *Science.* 2003; 423: 326-331.
- 13) Couley GF, Coltey PM and Le Douarin NM. The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras. *Development.* 1993; 117: 409-429.
- 14) Scott JH. The cranial base. *Am J Phys Antropol.* 1958; 16: 319-348.
- 15) Melsen B. The cranial base: the postnatal development of the cranial base studied historically on human autopsy material. *Acta Odontol Scand.* 1974; 32: 57-71.
- 16) Roberts GJ and Blackwood HJJ. Growth of the cartilages of the mid-line cranial base: a radiographic and hisological study. *J Anat.* 1983; 136: 307-320.
- 17) Ingervall B and Thilander B. The human spheno-occipital synchondrosis. I. The time of closure appraised macroscopically. *Acta Odontol Scand.* 1972; 30: 349-356.
- 18) Kjaer I. Radiographic determination of prenatal basicranial ossification. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1990; 10: 113-123.
- 19) Wang X and Mao JJ. Accelerated chondrogenesis of the rabbit cranial base growth plate by oscillatory mechanical stimuli. *J Bone Miner Res.* 2002; 17: 1843-1850.
- 20) Wang X and Mao JJ. Chondrocyte proliferation of the cranial base cartilage upon in vivo mechanical stresses. *J Dent Res.* 2002; 81: 701-705.
- 21) Tang M and Mao JJ. Matrix and gene expression in the rat cranial base growth plate. *Cell Tissue Res.* 2006; 324: 467-474.
- 22) Kyrkanides S, Kambylakis P, Miller JH, Tallents RH and Puzas JE. The cranial base in craniofacial development: a gene therapy study. *J Dent Res.* 2007; 86: 956-961.
- 23) Evans CA and Christiansen RL. Cephalic malformations in Saethre-Chotzen syndrome. Acrocephalosyndactyly type III. *Radiology.* 1976; 121: 399-403.
- 24) Howard TD, Paznekas WA, Green ED, Chiang LC, Ma N, Ortiz de Luna RI, Garcia Delgado C, Gonzalez-Ramos M, Kline AD and Jabs EW. Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet.* 1997; 15: 36-41.
- 25) Lee B, Thirunavukkarasu K, Zhou L, Pastore L, Baldini A, Hecht J, Geoffroy V, Ducy P and Karsenty G. Missense mutations abolishing DNA binding of the osteoblast-specific transcription factor OSF2/CBFA1 in cleidocranial

- dysplasia. *Nat Genet.* 1997; 16: 307-310.
- 26) Captier G, Leboucq N, Bigorre M, Canovas F, Bonnel F, Bonnafé A and Montoya P. Plagiocephaly: morphometry of skull base asymmetry. *Surg Radiol Anat.* 2003; 25: 226-233.
- 27) Kimonis V, Gold JA, Hoffman TL, Panchal J and Boyadjiev SA. Genetics of craniosynostosis. *Semin Pediatr Neurol.* 2007; 14: 150-161.
- 28) Cohen MM Jr, Walker GF and Phillips C. A morphometric analysis of the craniofacial configuration in achondroplasia. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1985; Suppl 1: 139-165.
- 29) Cohen MM Jr. Achondroplasia, hypochondroplasia and thanatophoric dysplasia: clinically related skeletal dysplasias that are also related at the molecular level. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1998; 27: 451-455.
- 30) Dambrain R, Freund M, Verellen G, Pellerin P, Francke JP and Dhem A. Considerations about the cloverleaf skull. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1987; 7: 387-401.
- 31) Jensen BL and Kreiborg S. Craniofacial growth in cleidocranial dysplasia a roentgencephalometric study. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1995; 15: 35-43.
- 32) Harris EF. Size and form of the cranial base in isolated cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 1993; 30: 170-174.
- 33) Kyrkanides S, Klambani M and Subtelny JD. Cranial base and facial skeleton asymmetries in individuals with unilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 2000; 37: 556-561.
- 34) Babineau TA and Kronman JH. A cephalometric evaluation of the cranial base in microcephaly. *Angle Orthod.* 1969; 39: 57-63.
- 35) Huggare JA, Kantomaa TJ, Ronning OV and Serlo WS. Craniofacial morphology in shunt-treated hydrocephalic children. *Cleft Palate J.* 1986; 23: 261-269.
- 36) Kreiborg S and Dahl E. Cranial base and face in mandibulofacial dysostosis. *Am J Med Genet.* 1993; 47: 753-760.
- 37) Andersen E, Sonnesen L, Kjaer MS, Fischer Hansen B and Kjaer I. The prenatal cranial base complex and hand in Turner syndrome. *Eur J Orthod.* 2000; 22: 185-194.
- 38) Alio JJ, Lorenzo J and Iglesias C. Cranial base growth in patients with Down syndrome: a longitudinal study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008; 133: 729-737.
- 39) Brkic H, Kaic Z, Poje Z and Singer Z. Shape of the craniofacial complex in patients with Klinefelter syndrome. *Angle Orthod.* 1994; 64: 371-376.
- 40) Axelsson S. Variability of the cranial and dental phenotype in Williams syndrome. *Swed Dent J Suppl.* 2005; 3-67.
- 41) Wilkie AO and Morriss-Kay GM. Genetics of craniofacial development and malformation. *Nat Rev Genet.* 2001; 2: 458-468.
- 42) Pizette S and Niswander L. BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes. *Dev Biol.* 2000; 219: 237-249.
- 43) Daluiski A, Engstrand T, Bahamonde ME, Gamer LW, Agius E, Stevenson SL, Cox K, Rosen V and Lyons KM. Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat Genet.* 2001; 27: 84-88.
- 44) Shum L, Wang X, Kane AA and Nuckolls GH. BMP4 promotes chondrocyte proliferation and hypertrophy in the endochondral cranial base. *Int J Dev Biol.* 2003; 47: 423-431.
- 45) Kettunen P, Nie X, Kvinnsland IH, and Luukko K. Histological development and dynamic expression of Bmp2-6 mRNAs in the embryonic and postnatal mouse cranial base. *Anat Rec Part A.* 2006; 288A: 1250-1258.
- 46) Gakunga PT, Kuboki Y and Opperman LA. Hyaluronan is essential for the expansion of the cranial base growth plates. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 2000; 20: 53-63.
- 47) Yang Y, Topol L, Lee H and Wu J. Wnt5a and Wnt5b exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* 2003; 130: 1003-1015.
- 48) Young B, Minugh-Purvis N, Shimo T, St-Jacques B, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M, Koyama E and Pacifici M. Indian and sonic hedgehogs regulate synchondrosis growth plate and cranial base development and function. *Dev Biol.* 2006; 299: 272-282.
- 49) Koyama E, Young B, Nagayama M, Shibukawa Y, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Maeda Y, Lanske B, Song B, Serra R and Pacifici M. Conditional Kif3a ablation causes abnormal hedgehog signaling topography, growth plate dysfunction, and excessive bone and cartilage formation during mouse skeletogenesis. *Development.* 2007; 134: 2159-2169.
- 50) Nagayama M, Iwamoto M, Hargett A, Kamiya N, Tamamura Y, Young B, Morrison T, Takeuchi H, Pacifici M, Enomoto-Iwamoto M and Koyama E. Wnt/beta-catenin signaling regulates cranial base development and growth. *J Dent Res.* 2008; 87: 244-249.
- 51) Koyama E, Leatherman JL, Noji S and Pacifici M. Early chick limb cartilaginous elements possess polarizing activity and express hedgehog-related morphogenetic factors. *Dev Dyn.* 1996; 207: 344-354.
- 52) Lanske B, Karaplis AC, Lee K, Lutz A, Vortkamp A, Pirro A, Karperien M, Defize LH, Ho C, Mulligan RC, Abou-Samra A-B, Jüppner H, Segre GV and Kronenberg HM. PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science.* 1996; 273: 663-666.
- 53) McMahon AP, Ingham PW and Tabin CJ. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol.* 2003; 53: 1-114
- 54) Hooper JE and Scott MP. Communicating with Hedge-



- hogs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6: 306-17.
- 55 ) Huangfu D, Liu A, Rakeman AS, Murcia NS, Niswander L and Anderson KV. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature.* 2003; 426: 83-87.
  - 56 ) Haycraft CJ, Banizs B, Aydin-Son Y, Zhang Q, Michaud EJ and Yoder BK. Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genet.* 2005; 1: e53.
  - 57 ) Rohatgi R, Milenkovic L and Scott MP. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science.* 2007; 317: 372-376.
  - 58 ) Chen MH, Wilson CW and Chuang PT. SnapShot: hedgehog signaling pathway. *Cell.* 2007; 130: 386.
  - 59 ) Corbit KC, Aanstad P, Singla V, Norman AR, Stainier DYR and Reiter JF. Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature.* 2005; 437: 1018-1021.
  - 60 ) May SR, Ashique AM, Karlen M, Wang B, Shen Y, Zarbalis K, Reiter JF, Ericson J and Peterson A.S. Loss of retrograde motor for IFT disrupts localization of Smo to cilia and prevents the expression of both activator and repressor functions of Gli. *Dev Biol.* 2005; 287: 378-389.
  - 61 ) Olsen BR, Kolpakova E, McBratney-Owen B, Li X, Zhou J and Fukai N. Genetic and epigenetic determinants of skeletal morphogenesis - role of cellular polarity and ciliary function in skeletal development and growth. *Oral Biosci Med.* 2005; 213: 57-65.
  - 62 ) Xiao Z, Zhang S, Mahlios J, Zhou G, Mangenheimer BS, Guo D, Dallas SL, Maser R, Calvet JP, Bonewald L and Quarles LD. Cilia-like structures and polycystin-1 in osteoblasts/osteocytes and associated abnormalities in skeletogenesis and Runx2 expression. *J Biol Chem.* 2006; 281: 30884-30895.
  - 63 ) Nakamura T, Aikawa T, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Higuchi Y, Pacifici M, Kinto N, Yamaguchi A, Noji S, Kurisu K and Matsuya T. Induction of osteogenic differentiation by hedgehog proteins *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 237: 465-469.
  - 64 ) St-Jacques B, Hammerschmidt M and McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* 1999; 13: 2076-2086.
  - 65 ) Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM and Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science.* 1996; 273: 613-622.
  - 66 ) Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Science.* 2003; 423: 332-336.
  - 67 ) Mak KK, Kronenberg HM, Chuang PT, Mackem S and Yang Y. Indian hedgehog signals independently of PTHrP to promote chondrocyte hypertrophy. *Development.* 2008; 135: 1947-1956.
  - 68 ) Logan CY and Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004; 20: 781-810.
  - 69 ) Gordon MD and Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem.* 2006; 281: 22429-22433.
  - 70 ) Enomoto-Iwamoto M, Kitagaki J, Koyama E, Tamamura Y, Wu C, Kanatani N, Koike T, Okada H, Komori T, Yoneda T, Church V, Francis-West PH, Kurisu K, Nohno T, Pacifici M and Iwamoto M. The Wnt antagonist Frzb-1 regulates chondrocyte maturation and long bone development during limb skeletogenesis. *Dev Biol.* 2002; 251: 142-156.
  - 71 ) Tamamura Y, Otani T, Kanatani N, Koyama E, Kitagaki J, Komori T, Yamada Y, Costantini F, Wakisaka S, Pacifici M, Iwamoto M and Enomoto-Iwamoto M. Developmental regulation of Wnt/beta-catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification. *J Biol Chem.* 2005; 280: 19185-19195.
  - 72 ) Hu H, Hilton MJ, Tu X, Yu K, Ornitz DM and Long F. Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development.* 2005; 132: 49-60.
  - 73 ) Rodda SJ and McMahon AP. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development.* 2006; 133: 3231-3244.
  - 74 ) Wang FS, Lin CL, Chen YJ, Wang CJ, Yang KD, Huang YT, Sun YC and Huang HC. Secreted frizzled-related protein 1 modulates glucocorticoid attenuation of osteogenic activities and bone mass. *Endocrinology.* 2005; 146: 2415-2423.
  - 75 ) Brault V, Moore R, Kutsch S, Ishibashi M, Rowitch DH, McMahon AP, Sommer L, Boussadia O and Kemler R. Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development.* 2001; 128: 1253-1264.
  - 76 ) Day TF, Guo X, Garrett-Beal L and Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell.* 2005; 8: 739-750.
  - 77 ) Kolar JC, Munro IR and Farkas LG. Anthropometric evaluation of dysmorphology in craniofacial anomalies: Treacher Collins syndrome. *Am J PhysAnthropol.* 1987; 74: 441-51.