

予報 (announcement)

## 頭蓋骨縫合線のパターン形成

三浦 岳

京都大学大学院医学研究科

生体構造医学講座 形態形成機構学教室

Department of Anatomy and Developmental Biology,

Kyoto University Graduate School of Medicine.

E-mail: miura-takashi@umin.net.

### 1 要約

脊椎動物の頭部の頭蓋骨は複数の骨が組み合わさってできている。骨のつなぎ目の部分の組織は縫合線と呼ばれ、未分化の軟組織が一定幅に残っていて骨の成長やつなぎ目の支持の働きをしている。この組織は出生直後は直線的だが、年を経るにつれて湾曲してフラクタル構造を形成する。多数の遺伝子がこのプロセスに関わっている事が知られているが、それらの遺伝子の相互作用がなぜこのような形態変化を引き起こすのか、その原理はわかっていなかった。我々はこれらの遺伝子を機能と局在で分類することで、このプロセスを2変数の反応拡散系で定式化した。このモデルは縫合線の形態変化を再現できるだけでなく、形態の違いから遺伝子の作用の差を推定することができ、モデルが実際の実験デザインにも役に立つことを示した。

### 2 縫合線の生物学

脊椎動物の頭部は、複数の骨が組み合わさってできている。これらの骨のつなぎ目の組織は縫合線と呼ばれる。側頭骨同士の間矢状断面の縫合線は矢状縫合、前頭骨と側頭骨の間は冠状縫合、側頭骨と後頭骨の間はラムダ縫合と呼ばれる。これらの縫合線組織は出生直後は比較的広く、可動性がある。従って、出産時に頭蓋骨が変形して産道を通すのを助ける。縫合線は20代までは骨にまだ分化していない軟組織からなっており、頭蓋骨の端の部分から骨を付け足して行くことで、頭蓋全体が成長するための成長中心の役

割を果たす。中年期以降はこの組織は繊維化して骨に置き換わっていく。この性質を利用して、法医学や人類学の分野では縫合線の骨化は個体の年齢の推定に使われる。

この縫合線組織が早期に骨に置き換わって頭蓋の成長が阻害される状態を頭蓋骨早期癒合症 (craniosynostosis) という (Cohen 2000)。この疾患の原因遺伝子がヒト患者から同定され、それらの遺伝子が頭蓋骨が形成される際にどのような働きをしているのか、発生学的な解析が進んでいる。また、遺伝子改変マウスの表現型としても頭蓋骨早期癒合症は多く見いだされるため、多くの遺伝子が関与することがわかっている。(Morris-Kay & Wilkie 2005)。しかし、これらの遺伝子の相互作用がなぜ縫合線組織を一定幅に保ったり、湾曲構造を作りだしたりするのか、その機構はわかっていなかった。

縫合線組織は、出生直後ではほぼ直線状だが、発達に従って湾曲していく (図 1a)。この湾曲構造は生体内のフラクタル構造の例であると言われ、Koch 曲線の形成とよく比較される (Long 1985, Yasuda & Yohro 1987)。しかし、これまでの研究では形態のフラクタル次元の計測と類似性の指摘にとどまり、なぜこのような形状になるのか、そのメカニズムは不明であった。これまでのモデルで縫合線組織の形成メカニズムについて言及しているのは、Oota et al. (2004) らの提唱した Eden 衝突モデルのみである。これは、フラクタル構造を形成する事が知られている Eden front が2つ衝突する、というモデルであるが、これでは縫合線が形成される以前からフラクタル構造が存在することになり、新生児では縫合線がほぼ直線状であるというダイナミクスと合わない。

### 3 モデル化

この現象をモデル化するため、我々はまず関与する遺伝子群を局在と機能で分類することから始めた。この現象では、骨と未分化な間葉の領域が時間によって変化していく。従って、変数としてモデルに取り込む因子は、これらのどちらかに存在するものに限った。なぜなら、どちらの領域にも存在しない因子はこの現象に関与しないはずであるし、双方の領域に一様に存在する遺伝子は、変数ではなくパラメータとして取り込むべきだからである。また、たまたまこの領域に存在したとしても、骨分化に関与しない因子は、何か別の上流の因子の制御を受けてたまたまそこに存在する可能性が高い。これらのことから、

1. 骨の領域に存在し、骨分化を促進する因子
2. 骨の領域に存在し、骨分化を抑制する因子

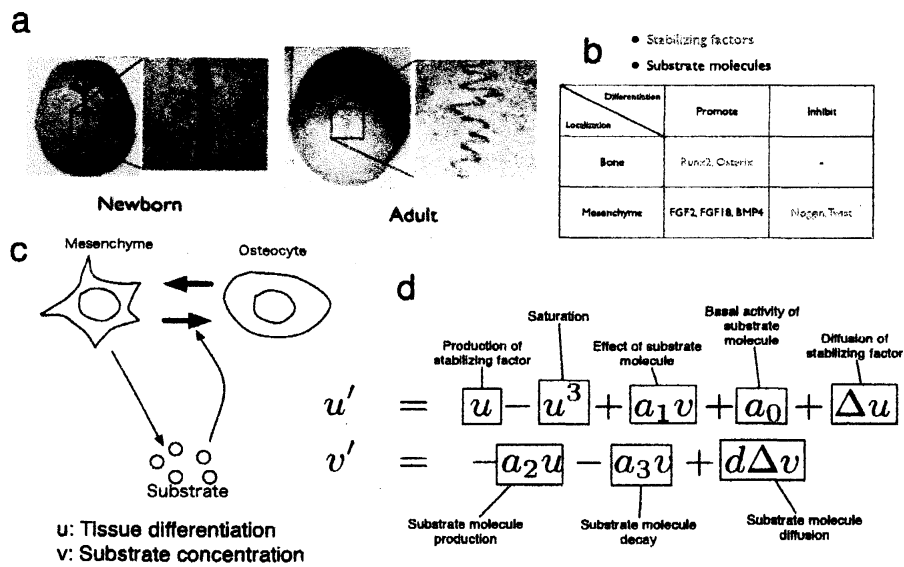


図 1: モデルの定義. (a) ヒト頭蓋骨の発達. 成人になると縫合線が湾曲し、幅も細くなる. (b) 局在と機能による遺伝子の分類. (c) モデルのスキーム. 我々は組織の分化度 ( $u$ ) と基質因子の濃度 ( $v$ ) の 2 つの因子を取り入れた. 未分化な間葉 ( $u = 1$ ) と骨組織 ( $u = -1$ ) は二つの安定な状態で、そのままでは変換しない. 未分化な間葉組織は基質因子を産生し、基質因子は未分化な間葉を骨に分化させる. (d) 支配方程式の各項の説明.

3. 間葉の領域に存在し、骨分化を促進する因子

4. 間葉の領域に存在し、骨分化を抑制する因子

の4種類に関わっている遺伝子を分類した(図 1b)。2. のカテゴリーに入る分子はこれまで見つかっていない。1. と 4. のカテゴリーの分子は、要するにいったん組織が骨になったら骨の状態に安定させる、または間葉になったら間葉の状態に安定させる、という役割を果たすので、**安定化因子**と呼ぶ。これらの働きに関しては、組織の分化度  $u$  という変数を定義して、 $u' = u - u^3$  という形で書いてしまう。また、3. の因子群の濃度を  $v$  という変数で定義して、**基質因子**と呼ぶ。分子の種類を見ると、基質因子の方が拡散性のシグナル因子の個数が多いため、 $v$  の拡散係数は  $u$  の  $d$  倍早いとする ( $d > 1$ )。分子の相互作用も考慮にいとそれぞれの支配方程式は

$$u' = u - u^3 + a_1 v + a_0 + \Delta u \quad (1)$$

$$v' = -a_2 u - a_3 v + d \Delta v \quad (2)$$

と書くことができる(図 1c, d)。ここで  $a_0$  は基質因子のベースの活性、 $a_1$  は基質因子が骨分化に与える影響、 $a_2$  は基質因子の産生、 $a_3$  は分解速度である。これは、FitzHugh-Nagumo 型の反応拡散方程式の  $v$  の符号を反転したものになっている。この系の数理的な解析は以前に行われており (Ohta et al. 1989, Hagberg & Meron 1994)、細長い領域が湾曲して行くダイナミクスを再現できる事が知られている(図 2a)。直感的な説明は以下の通りである。縫合線組織のうち、生後すぐの状態で骨が少し突出している部分がどのように動くかを考える。この部分は、他の部分よりも未分化な間葉に取り囲まれるような形になるので、未分化な間葉が産生する基質因子により接しやすくなる。すると、その部分はさらに骨化が進んで骨が広がるので、最初のちょっとしたゆがみが増幅されて行く。反対側の骨ではちょうど逆のことが起こるので、未分化な組織が一定の幅のまま湾曲する現象が生じる(図 2c)。

## 4 モデルの実験的検証

次に、このモデルの挙動と実際の生体内の現象を比較して、モデルの妥当性を検証する。このモデルでは、ある程度以上湾曲が起これば、そこから出芽状の構造が生じることがある（図 2a、赤い円）。これは一見実際の生体内の現象と異なるように見えるが、じつはこのような構造はヒト標本でよく見られる（図 2b、赤い円）。したがって、本来モデルで再現できると予測していなかった構造がじつは再現できていたことになり、このモデルが生体内のパターン形成の本質的な部分をとらえていることが示唆される。

また、縫合線組織における骨分化はよく研究されているが、いったん形成される骨が脱分化するという現象についてはあまりわかっていなかった。このモデルではいったん形成された骨が脱分化する、という描像になっている。このことが本当に起こっているのかどうか、培養系を用いて縫合線組織の挙動を実際に観察した。すると、実際に骨組織が脱分化して行く像が観察され（図 2d,e）、モデルで見えている現象が実際に生体組織で起こっていることがわかった。さらに、骨の脱分化を起こす破骨細胞の活性を測る TRAP 染色によって、発達途中の頭蓋骨でも破骨細胞の活性が存在することがわかり（図 2f）、モデルで扱っている現象が実際に生体内でも起こっていることがわかった。

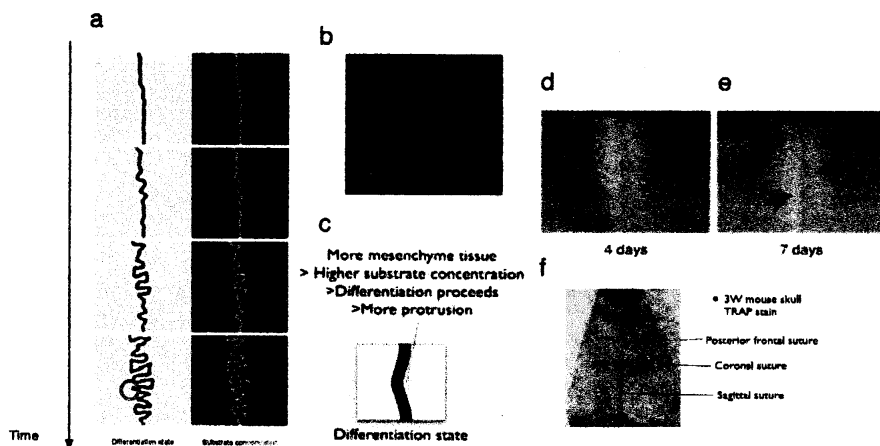


図 2: モデルによる湾曲構造の形成。(a) モデルの2次元の数値計算では、直線状の構造から湾曲した構造を形成することができ、生体内でのダイナミクスを忠実に再現することができる（白の領域が値の高い部分）。湾曲の曲率がきつところから、出芽用の構造が見られることもある（赤い円）。(b) ヒト頭蓋骨標本のパターン。出芽パターンは生体内でも見られる（赤い円）。(c) パターン形成の直感的説明（本文参照）。(d) 培養4日目の縫合線組織。(e) 培養7日目の縫合線組織。骨の成長単が後退している部分がある（矢頭）。(f) 生後3週のマウス頭蓋骨の TRAP 染色。縫合線の湾曲が起きている部分で破骨細胞の活性があることがわかる。

さらに、モデルのパラメータを変化させたときにどのようなことが起こるのか、モデルから推測して実際の実験系で検証してみる。頭蓋骨の縫合線がよく知られているのが、表面よりも裏側の方が縫合の湾曲が少なく、場合によっては骨が癒合してしまっている、という事実である（図 3b）。なぜこのようなことが起こるのか、モデルから推測される原因として、頭蓋骨の表面側より裏側の方が、外部から一律に供給される基質因子の量が多いのではないか、と仮定した。なぜなら、頭蓋骨を裏打ちしている硬膜からの拡散性の因子が骨分化に影響する、という報告が以前からあったからだ。これは基質因子のベースの活性である  $a_0$  を増加させることで表現することができる（図 3a）。このようなことが実際に起こっているのかどうか、実際の頭蓋骨で表側と裏側で発現している基質因子の蛋白の量を免疫染色で可視化してみた。すると、表側よりも裏打ち構造の硬膜の方で蛋白の量が多いことがわかり、これによって表面と深部の構造の差が生じていることがわかった（図 3c）。

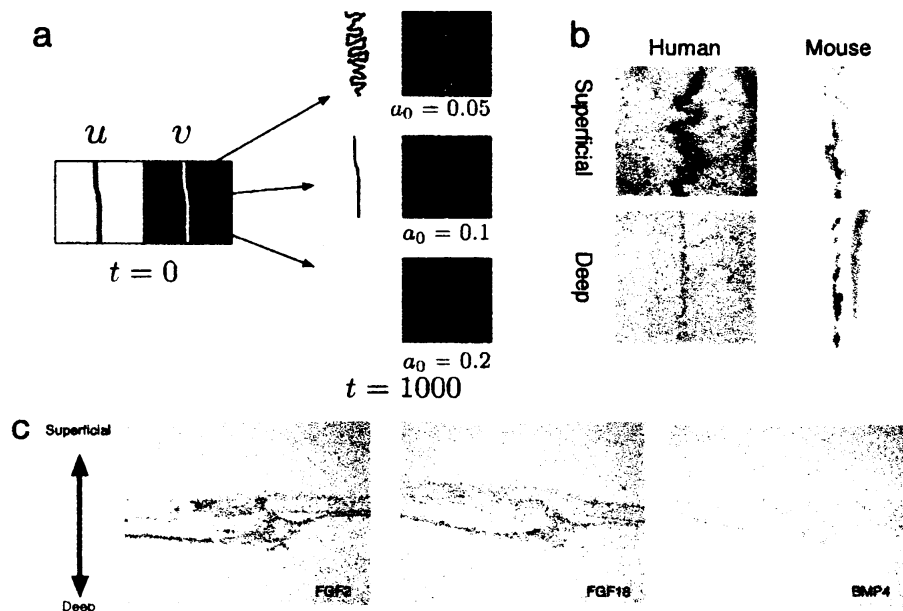


図 3: (a) 基質因子のベースの活性  $a_0$  の効果。  $a_0$  を増加させると、湾曲の度合いが少なくなって、縫合線の組織が細くなる。  $a_0$  をある程度以上少なくすると縫合線組織が消失する。 (b) 頭蓋骨の表面と深部の構造の違い。 マウス頭蓋はマイクロ CT を用いて撮影した。 ヒトとマウス双方で、深部の方が縫合線の湾曲が少なく、組織自体が細い。 これによって、深部では基質因子のベースの活性が高いことが予想される。 (c) 基質因子の蛋白の局在。 頭蓋深部の硬膜で強い発現が見られ、モデルの予想と合致した。

また、フラクタル構造の形成に関しては、先ほどのモデルだけではうまく説明できない。 図 4a のような形状を先ほどのモデルで再現しようとする、ある程度以上たつと出芽が増えてきて実際のパターンと一

致しなくなってくる (図 4b)。この構造を説明するため、我々は出生直後の縫合線が大人の縫合線よりも広いという事実に着目した。これは、数値計算の最初と最後で何かのパラメータが変化していないと起こらない。そこで、生体内で加齢とともに組織が繊維化していく (Cohen 2000) ことから、拡散係数が時間が経つにつれて減少していくという要素を取り入れた。これによって、数値計算上はほぼ一本につながった複雑な構造を再現することができ (図 4d)、フラクタル構造であることも Box count 法で示すことができた。直感的な説明は以下ようになる；修正版のモデルでは、作られるパターンの大きさが時間が経つにつれて小さくなって行くため、小さいパターンが大きいパターンの上に追加されていくような形になる。このやり方は Koch 曲線の生成と似ており、これによってフラクタル構造が形成されたと思われる (図 4e)。

## 5 考察

本研究では、非常に単純ながら、実際の遺伝子の働きとの対応の付けられるモデルを定式化することができた。生物のパターン形成では、わかっている分子の数が多いため、単純な数理モデルとの対応をつけるのが難しいように見える。しかし、いろいろな因子が関わっているから、という理由で変数の多いモデルを作ってしまうと、数値計算で似た形をつくりました、というところで息切れをして終わってしまい、結局なぜ形ができるのか、本質的な部分が理解できないことが多い。この研究では分子を機能と局在で分類するという比較的古典的な方法を用いて、わかっている情報をうまくまとめて、数理と実験の双方から利用できる形のモデルを定式化することができた。生物の実験系の方が多数の分子を扱っているからといって、多変数の系の方が定式化として適当かという、必ずしもそうではない。「増殖」「分化」「モルフォゲン」といった、分子の情報がわからなかった実験発生学の時代から引き継がれている概念をうまく使って現象の記述をまとめることは実験家の間で普通に行われており、同様のやり方を用いて、少数の自由度で見通しがよいま定式化するのはそれほど難しいことではないと思われる。

ただし、単純化したことで抜け落ちていた情報もある。たとえば、冠状縫合は前頭骨と側頭骨の間に作られるが、前頭骨は神経堤細胞由来、側頭骨は頭部間葉由来の細胞から作られ、細胞の由来が異なる (Jiang et al. 2002)。また、縫合線組織の中でも、骨に取り込まれる細胞と取り込まれない細胞がある (Lana-Elola et al. 2007)。これらの細胞運命の情報は、反応拡散の枠組みで描いたモデルでは抜け落ちてしまうため、別種の定式化が必要となると思われる。また、古くから、縫合線の湾曲はその部分にかかる力学的な負荷と関

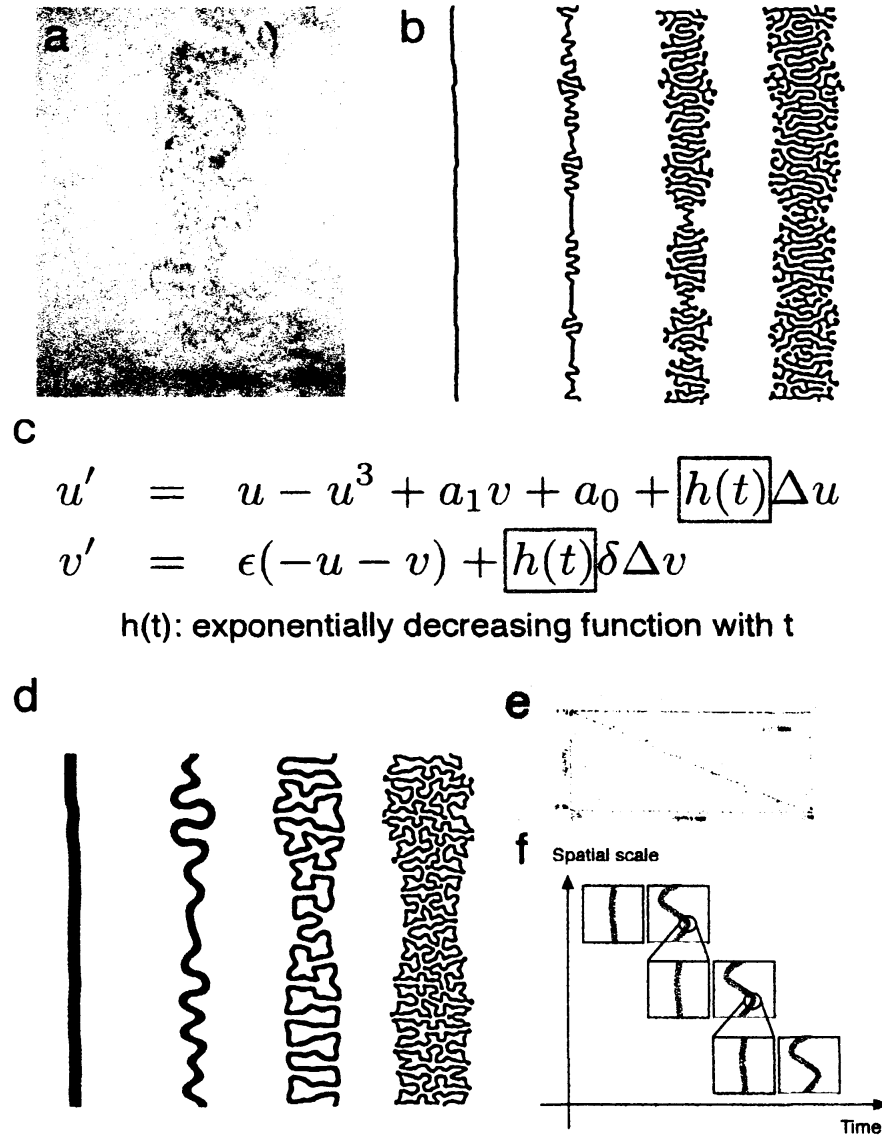


図 4: フラクタル構造の形成. (a) ヒトのラムダ縫合の一例. 非常に複雑なフラクタル構造を作り、しかも基本的には一本の線でできている. (b) 元のモデルの数値計算を長時間行くと、出芽パターンがほとんどになって実際に生体内で見られるパターンとは異なる. (c) 修正版のモデル. 拡散係数が時間が経つに従って減少するようになっている. これは、生体内で加齢とともに組織が繊維化していくことに対応している (Cohen 2000). (d) 修正版のモデルの数値計算の結果. パターンが一本の線になり、実際の生体内のパターンと類似する. (e) (d) で作られたパターンの Box count 法による解析. 1 以上のフラクタル次元を持つ. (f) パターン形成のメカニズムの直感的説明 (本文参照).

連すると言われているが (Byron et al. 2004)、このモデルではそのような側面は入っていない。近年になって、力学的負荷によって縫合線組織の遺伝子発現が変化するという報告があり (Fong et al. 2003, Collins et al. 2005)、これらによって、力学的な負荷と形態の変化をうまく結びつけて考えることが将来的には可能になるかもしれない。

フラクタル構造の形成に関しては、まだ実験的な証拠が不足している。マウスの縫合線は湾曲のごく初期の段階しか起こらないので、実験的な検証を行うことができない。ヒトの縫合線は、骨標本を集めて統計的に検証する以外の方法が倫理的に不可能である (三次元 CT による発達の時系列データがあればよいのだが、放射線被曝の問題があって行うことができない)。組織中での拡散係数の計測も現時点であまり良い方法がない。大型動物での非侵襲的な観察や、実験的な検証が将来的には必要になってくると思われる。

## 参考文献

- Byron, C. D., Borke, J., Yu, J., Pashley, D., Wingard, C. J. & Hamrick, M. (2004), 'Effects of increased muscle mass on mouse sagittal suture morphology and mechanics.', *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **279**(1), 676–84.
- Cohen, M. (2000), *Craniosynostosis: Diagnosis, Evaluation, and Management*, abridged edn, Oxford University Press, Cambridge.
- Collins, J. M., Ramamoorthy, K., Silveira, A. D., Patston, P. & Mao, J. J. (2005), 'Expression of matrix metalloproteinase genes in the rat intramembranous bone during postnatal growth and upon mechanical stresses.', *J Biomech* **38**(3), 485–492.
- Fong, K. D., Nacamuli, R. P., Lobo, E. G., Henderson, J. H., Fang, T. D., Song, H. M., Cowan, C. M., Warren, S. M., Carter, D. R. & Longaker, M. T. (2003), 'Equibiaxial tensile strain affects calvarial osteoblast biology.', *J Craniofac Surg* **14**(3), 348–355.
- Hagberg, A. & Meron, E. (1994), 'From labyrinthine patterns to spiral turbulence', *Phys. Rev. Lett.* **72**, 2494–2497.
- Jiang, X., Iseki, S., Maxson, R. E., Sucov, H. M. & Morriss-Kay, G. M. (2002), 'Tissue origins and interactions in the mammalian skull vault.', *Dev Biol* **241**(1), 106–16.

- Lana-Elola, E., Rice, R., Grigoriadis, A. E. & Rice, D. P. C. (2007), 'Cell fate specification during calvarial bone and suture development.', *Dev Biol* **311**(2), 335–346.
- Long, C. A. (1985), 'Intricate sutures as fractal curves', *J Morphol* **185**, 285–295.
- Morriss-Kay, G. M. & Wilkie, A. O. M. (2005), 'Growth of the normal skull vault and its alteration in craniosynostosis: insights from human genetics and experimental studies.', *J Anat* **207**(5), 637–653.
- Ohta, T., Mimura, M. & Kobayashi, R. (1989), 'Higher-dimensional localized patterns in excitable media', *Physica D* **34**, 115–144.
- Oota, Y., Nagamine, T., Ono, K. & Miyazima, S. (2004), 'A two-dimensional model for sagittal suture of cranium', *Forma* **19**, 197–205.
- Yasuda, Y. & Yohro, T. (1987), 'Are there any regularities in cranial sutures?', *Okajimas Folia Anat Jpn.* **64**, 39–46.