

Title	マウス胎生期口蓋癒合機構の解析
Author(s)	美馬, 淳子
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49756
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【4】

氏名	美馬淳子
博士の専攻分野の名称	博士（歯学）
学位記番号	第 22826 号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学位論文名	マウス胎生期口蓋癒合機構の解析
論文審査委員	(主査) 教授 古郷 幹彦 (副査) 教授 阪井 丘芳 准教授 西村 理行 講師 墨 哲郎

論文内容の要旨

(研究目的)

口唇裂・口蓋裂は、口唇、歯槽部、口蓋に披裂を生じる先天異常であり、わが国では、新生児の約 600 人に 1 人の割合で出生しており、比較的頻度の高い疾患である。原因は遺伝的要因と環境的要因の両者が複雑に関与していると言われているが、発生段階の口蓋における遺伝子発現状況についての網羅的な解析は未だ十分なされていない。そこで本研究では、DNA マイクロアレイを用いて、マウス口蓋癒合前、癒合中、癒合後の各ステージで、口蓋突起先端部組織の遺伝子発現を比較するために遺伝子データベースを作成し、口蓋癒合に関わる遺伝子群を明らかにし、現在までに報告されていない口蓋癒合関連遺伝子を解明することを目的とした。

(方法)

1. 口蓋組織の器官培養

胎生 13.5 日齢（以下 E13.5）の ICR 系マウス胎仔の口蓋を摘出し、器官培養を行った。5、24、60 時間培養後に、実体顕微鏡下で形態観察を行い、パラフィン切片を作製し、HE 染

色を行い、光学顕微鏡で形態観察を行った。

2. Gene Chip® を用いた網羅的遺伝子発現解析

5、24、60 時間培養後の口蓋突起先端部組織をマイクロダイセクションし、total RNA を抽出し、cDNA を合成して Gene Chip® にハイブリダイゼーションを行った。癒合前の遺伝子発現量をコントロールとして各ステージでの遺伝子発現変化を比較した。

3. 定量的 Real time RT-PCR による遺伝子発現解析データベースにより得られた遺伝子の中から、口蓋癒合に伴い顕著に発現増加した遺伝子を抽出した。その中の *Ceacam1* に着目し、発現制御について定量的 Real time RT-PCR 法により解析した。

4. 免疫組織化学的解析

抗 CEACAM1 抗体を用いて、口蓋癒合前、癒合中、癒合後の CEACAM1 の発現分布を免疫組織学的に解析した。

5. 口蓋突起癒合阻害実験

CEACAM1 の機能阻害抗体を添加した 1%アガロースを含む BGJb 培地を用いて、E13.5 の ICR 系マウス胎仔の口蓋突起を 5%CO₂、37°C にて 60 時間培養し、口蓋癒合への影響を検討した。

(結果)

1. マウス口蓋の形態観察

5 時間培養後の口蓋組織では、左右口蓋突起は接触していなかった。24 時間培養の口蓋組織では、左右口蓋突起が接触し、一部では癒合を始めており、E14 の口蓋形態と同様であった。正中部に Medial Epithelial Seam (MES) の残存を認めた。60 時間培養後の口蓋組織では、残存していた MES は消失し、完全な癒合を認め、E16 の口蓋形態と同様であった。

2. 遺伝子発現データベースの作成

全遺伝子プローブをその変動率により増加群、減少群、無変動群に分類を行った。増加群は 3663 個、減少群は 2947 個、無変動群は 24575 個の遺伝子プローブが存在していた。

3. データベースにより同定された口蓋癒合時に発現増加する遺伝子の発現解析

データベースを元に増加群の中から複数の遺伝子プローブで発現増加傾向が認められた遺伝子として、*Carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 1 (Ceacam1)* , *Armc3 (armadillo repeat containing 3)* , *Car3 (Carbonic anhydrase 3)* , *Fmo2 (Flavin containing monooxygenase 2)* , *Hdc (Histidine decarboxylase)* , *Ker13 (Keratin 13)* が

同定された。その中でも特に口蓋癒合に伴い著しい発現増加を示す *Ceacam1* を着目した。マウス口蓋癒合過程において *Ceacam1* の発現が増加することを定量的 Real time RT-PCR 法により確認した。抗 CEACAM1 抗体を用いて免疫組織学的に発現分布を解析したところ、癒合前では、顕著な発現を認めず、癒合中では、口蓋癒合部や MES において高発現であった。癒合後では、口蓋組織だけでなく他の上皮組織にも高発現であった。

4. 口蓋癒合過程における CEACAM1 の機能解析

CEACAM1 機能阻害抗体を添加して器官培養を行うと、添加しない場合に比して口蓋癒合が有意に抑制された。

(結論と考察)

本研究により、マウス口蓋癒合過程において、口蓋突起先端部に多数の遺伝子発現調節が認められた。

データベースの中から、増加群の中の *Ceacam1* に着目し、解析したところ、口蓋癒合に伴い、癒合部上皮に高発現することが確認された。CEACAM1 の機能阻害抗体を添加して口蓋の器官培養を行うと、口蓋癒合が有意に抑制された。このことより、CEACAM1 はマウス口蓋癒合に関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、マウス口蓋癒合過程における口蓋突起先端部の遺伝子発現データベースを作製し、口蓋癒合に関与する遺伝子群を探索したものである。その結果、口蓋癒合に伴い、CEACAM1 の発現が増加し、機能阻害実験から、口蓋癒合に関与していることが示唆された。

これらの知見は、今後の口唇裂・口蓋裂の発生機序の解明に対し、有用な情報を提供するものであり、博士(歯学)の学位授与に値するものである。