

Title	口蓋形成時の口蓋上皮におけるオートファジーの発現解析
Author(s)	松崎, 聖美
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/57610">https://hdl.handle.net/11094/57610</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	まつ 松 崎 聖 美
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 23741 号
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学位論文名	口蓋形成時の口蓋上皮におけるオートファジーの発現解析
論文審査委員	(主査) 教授 高田 健治 (副査) 教授 天野 敦雄 教授 山城 隆 講師 本間 志保

## 論文内容の要旨

## 【緒言】

口蓋の形成には、遺伝要因ならびに環境要因が複雑に関与しており、口蓋の形成過程に障害が起こると口蓋裂が発生することが知られている。口蓋裂の発生原因を解明するためには、口蓋の形成過程に関与する要因やそれらの要因の相互作用を明らかにする必要がある。

口蓋の形成過程に関与する要因の中には、内側に存在する間葉組織からのシグナル分子が、外側を取り巻く上皮細胞に作用することで上皮の形態を変化させる、上皮と間葉の相互作用がある。そこで本研究では、口蓋の形成の一過程である口蓋の癒合に着目し、癒合前後における口蓋の上皮の形態変化に、オートファジーが関与するかどうかを検討した。オートファジーは、真核生物に普遍的に備わる細胞内タンパク分解機構であり、さまざまな生命現象に関与することが明らかにされている。

本研究の目的は、オートファジーを可視化する GFP-LC3 トランスジェニックマウスとオートファジーの機能を阻害した *Atg5* ノックアウト(以下 KO)マウスを用いて、口蓋の形成時におけるオートファジーの局在と機能について検討することにある。

## 【方法】

## 1. ICR マウス胎仔を用いた口蓋の形態学的変化の観察

癒合中の口蓋の特徴を把握するため、ICR マウスを用いて口蓋の形態を観察した。E14.5, E15.0, E15.5, E16.0, E16.5 の胎仔から上顎を摘出し、走査型電子顕微鏡を用いて口蓋の形態の観察を口腔側から行った。

## 2. GFP-LC3 トランスジェニックマウス胎仔口蓋を用いたオートファジーの発現解析

実験には、酵母菌から同定された *Atg8* のホモログである Light chain3 (LC3) を蛍光タンパク GFP に融合させ、オートファゴソームを蛍光標識する GFP-LC3 トランスジェニックマウスを用いた。胎生 14.5 日齢(以下 E14.5), E15.0, E15.5, E16.0, E16.5 および E18.0 の胎仔から上顎を摘出し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、口蓋の上皮の表面における LC3 のシグナルの発現を口腔側から観察した。同様に取り出した胎仔の口蓋の凍結切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて前頭断における口蓋上皮の LC3 のシグナルの発現を観察した。

3. *Atg5* KO マウスにおける口蓋形成終了時の口蓋の形態学的観察

*Atg5* は、*Atg12*-*Atg5* 共有結合体を作り、隔離膜に結合することで隔離膜の伸長を促すタンパクである。実験では、*Atg5* KO マウスの E18.0 胎仔の上顎を摘出し、走査型電子顕微鏡を用いて、口蓋の形態観察を口腔側から行った。さらに、*Atg5* KO マウスの E18.0 胎仔の、パラフィン連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡を用いて前頭断における口蓋の形態観察を行った。

## 【結果】

## 1. ICR マウス胎仔を用いた口蓋の形態学的変化の観察

E14.5 では、一次口蓋と口蓋突起部での癒合は認められず、口蓋突起の第三口蓋襞より後方で癒合する像が認められた。E15.5 では、一次口蓋と口蓋突起の癒合が開始する像が認められた。また、癒合直前の口蓋表面に敷石状の形態を示す上皮細胞が観察された。E16.0 では、一次口蓋と左右の口蓋突起の癒合がさらに進んだ像が認められ、口蓋表面に敷石状の形態を示す上皮細胞が観察された。E16.5 では、一次口蓋と口蓋突起の大部分が癒合している像が認められた。

## 2. GFP-LC3 トランスジェニックマウス胎仔口蓋を用いたオートファジーの発現解析

E14.5 では、口蓋突起の癒合直前、癒合中の上皮細胞内に LC3 のシグナルが認められた。E15.5 および E16.0 では、一次口蓋と口蓋突起癒合中の口腔側表面の敷石状の形態を示す上皮細胞内に LC3 のシグナルが認められた。E16.5 では、一次口蓋と口蓋突起癒合中の上皮細胞ならびに表面の敷石状の形態を示す上皮細胞内に LC3 のシグナルが認められた。また、E18.0 では、一次口蓋と口蓋突起癒合後の表面に残存する上皮細胞ならびに鼻口蓋管部の上皮細胞に LC3 のシグナルが認められた。一方、二次口蓋の癒合終了部の上皮には LC3 のシグナルは認められなかった。

3. *Atg5* KO マウスにおける口蓋形成終了時の口蓋の形態学的観察

走査型電子顕微鏡を用いた E18.0 の口蓋の口腔側表面の観察では *Atg5*<sup>+/+</sup>, *Atg5*<sup>-/-</sup> マウスいずれにおいても形態的に大きな差異は認められなかった。E18.0 の切片では、*Atg5*<sup>+/+</sup>, *Atg5*<sup>-/-</sup> マウスいずれにおいても一次および二次口蓋癒合部、二次口蓋同士癒合部に間葉の連続を認め、口蓋の癒合不全は認められなかった。一方で、*Atg5*<sup>-/-</sup> マウスにのみ鼻口蓋管部で上皮の顕著な剥離を認めた。

#### 【考察ならびに結論】

本研究は、オートファジーが、癒合に関与する口蓋の上皮ならびに鼻口蓋管の上皮に特異的に観察され、鼻口蓋管を除く癒合に関与しない口蓋の上皮には観察されないことが明らかとなった。

また、オートファジーの機能を阻害すると、鼻口蓋管の上皮に剥離が起こることが明らかとなった。

以上より、オートファジーが口蓋の形成過程に関与している可能性が明らかとなった。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、口蓋癒合時の口蓋上皮におけるオートファジーの局在と機能を解析することで、オートファジーが口蓋の形成に関与する可能性を検討したものである。

その結果、オートファジーは癒合に関与する口蓋ならびに鼻口蓋管の上皮に特異的に発現し、オートファジーの機能阻害により鼻口蓋管の上皮に剥離が起こることが明らかにされた。

以上の研究成果は、口蓋形成時における口蓋の上皮の動態を理解する上で重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める。