The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	マウス二次口蓋における口蓋突起癒合時のmedial edge epithelial cellの動態
Author(s)	青山, 剛三
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/70704
rights	This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY).
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　青山 剛三　）	
論文題名	マウス二次口蓋における口蓋突起癒合時のmedial edge epithelial cellの動態

論文内容の要旨

【緒言】

口蓋裂は、ヒトにおける顎顔面形成不全のうち最も多く認められる先天性疾患の1つであり、言語、咀嚼、嚥下障害や顎顔面の形態異常により、機能的および審美的に問題が生じ患者の生活の質に大きな影響を与える。

口蓋裂は二次口蓋の癒合不全により生じ、二次口蓋の癒合には口蓋突起の先端に存在するmedial edge epithelial cell（MEE 細胞）が消失することが必要である。二次口蓋発生中のMEE細胞の動態については様々な研究が行われており、これまでに発生中の二次口蓋においてMEE細胞の細胞移動や細胞死、上皮間葉形質転換などが確認されている。しかし実際に生体内での二次口蓋の癒合過程において、これらのMEE細胞の挙動がどのように関与しているか、また口蓋裂の発生にどれだけ寄与しているかは未解明な部分が多く存在する。この様な問題を解決する為にはライブイメージング技術を用いたMEE細胞の観察が必須である。

一方、過去の当科における研究より、二次口蓋の半側除去モデルを用いて二次口蓋上皮の動態が生体内の状態を反映しており、二次口蓋深部におけるMEE細胞も直接観察可能であることを見出している。本研究では口蓋突起の半側培養モデルとMEE細胞を含む上皮細胞特異的にGreen Fluorescent Protein (GFP)を発現するマウス（K14-GFP mouse）を組み合わせることにより発生中の二次口蓋のライブイメージングを行い、MEE細胞の動態を詳細に解析することを目的とした。

【材料および方法】

1、 K14-GFPマウス培養口蓋突起の経時的観察

Cytokeratin 14-GFP（K14-GFP）遺伝子改変雄性マウスと、生後8週齢のC57BL/6J系統野生型雌性マウスを交配させ、その胎生14.0日齢の胎仔を摘出後、口蓋突起半側を摘出した。BGJb培地500 μlにて半側の口蓋突起の器官培養を行った。時間の経過による組織の移動を防ぐ目的で前述の培地に、アガロースを添加し、0.6%アガロース培養液を作製し、ガラスボトムディッシュの底面に、半側の口蓋突起内側縁上皮もしくは口蓋突起口腔側口蓋上皮を設置し、37℃、5%CO_2下で20時間培養を行った。観察には蛍光顕微鏡（BZ X-700 Keyence社）を使用した。

2、 K14-GFPマウス培養口蓋突起のライブイメージング観察および動画解析

蛍光顕微鏡を使用し、タイムラプス撮影機能を用いて、培養開始12時間後から8時間、10分間隔で撮影を行った。培養時間の経過とともに、MEE細胞の移動が認められる領域を事前に確認し、その部位に焦点を当てて観察を行った。画像解析はAdobe Photoshop Creative Cloud 2017を使用した。ライブイメージ観察像から、細胞の動態を詳細に観察するために、MEE細胞移動後の領域について、200 μm四方の観察範囲を選択し、分析を行った。このうち、観察視野内でGFPの発現が消失する領域から外側に大きく移動する上皮細胞をType 1細胞、GFPの発現が消失する細胞をType 2細胞、8時間観察後もGFPの発現を維持していた細胞をType 3細胞として定義づけを行い、4個体について細胞数を計測した。次に、Type 1細胞、Type 2細胞およびType 3細胞を無作為に各々30個選択し、ライブイメージング観察を行った開始時の位置と終了時の位置までの直線の移動距離と軌跡の総距離を測定した。

3、 細胞移動阻害時のMEE細胞の挙動の評価

Rho kinase シグナル阻害剤であるY27632 dihydrochloride 50 μMをアガロース培養液に添加して、実験1と同様の条件下で器官培養を行い、口蓋突起内側縁上皮の観察を行った。

次に実験2と同様の条件を設定し、ライブイメージング観察を行った。また、Type 2細胞（74細胞）

の移動距離と実験2のType 1細胞、Type 2細胞およびType 3細胞（合計90細胞）の平均移動距離を比較した。

【結果】

1、 K14-GFPマウス培養口蓋突起の経時的観察

摘出時、全域にGFPが発現していた口蓋突起内側縁上皮は、培養開始12時間後ではGFPが消失する領域が出現し、培養開始20時間後ではGFPが消失している領域が前後方にかけて拡大し、内側縁上皮全域に達した。さらに口蓋突起内側縁上皮は時間の経過とともにGFPの消失が認められたのに対し、口蓋突起口腔側口蓋上皮は培養開始12時間後、20時間後においてGFPの消失は認められなかった。これらのことから、本研究で認められたGFPの消失はMEE細胞の消失と深く関与していることが示唆された。

2、 K14-GFPマウス培養口蓋突起のライブイメージング観察および動画解析

ライブイメージング観察開始時（培養開始12時間後）は観察領域全体にGFPが発現していたが、観察開始2時間後（培養開始14時間後）から、GFPを発現する上皮細胞が口腔側と鼻側の両方向に移動する挙動と、GFPの消失が観察された。観察開始8時間後（培養開始20時間後）ではGFPが消失している領域は拡大し、その領域内で点在するGFP陽性細胞が観察された。挙動の特徴から3種類に分類したType 1細胞、Type 2細胞、Type 3細胞の構成比はそれぞれ、66.5%、11.9%、21.6%であった。直線移動距離はType 1細胞がType 2細胞、Type 3細胞と比較して有意に長かった。軌跡の移動距離は、Type 1細胞とType 3細胞の比較では有意差が認められなかった。Type 2細胞がType 1細胞、Type 3細胞と比較して有意に短かった。また、Type 1細胞が直線移動距離と軌跡の移動距離との間に最も強い相関関係が認められた。これらのことから癒合中の二次口蓋のMEE細胞は多様な挙動を示すことが判明し、それぞれの挙動がMEE細胞の消失に重要な役割を果たしていることが示唆された。

3、 細胞移動阻害時のMEE細胞の挙動の評価

次に上記の実験系にて明らかとなったMEE細胞挙動の分子メカニズムを解明する為に細胞移動に重要なことが知られているRho kinase シグナル阻害剤（Y27632 ）を添加して器官培養およびライブイメージング観察を行った。その結果、Rho kinase シグナル阻害剤を添加して器官培養を行った口蓋突起内側縁上皮は、培養開始時から20時間経過後においてもGFPの消失は一部分でのみ認められた。さらに実験群におけるType 2細胞の直線移動距離と軌跡の移動距離はともに、対照実験群と比較して有意に短かった。これらの結果から二次口蓋癒合中のMEE細胞の移動はRho kinase シグナルにより制御されていることが示唆された。

【考察】

本研究では二次口蓋の半側培養モデルとK14-GFPマウスを組み合わせて二次口蓋癒合時のMEE細胞のライブイメージング観察を行った。二次口蓋半側除去モデルを用いることにより、口腔側から従来より深部のMEE細胞の挙動が観察可能であった。また、詳細な細胞挙動解析からMEE細胞の細胞移動のパターンにはバリエーションがあること（Type 1, Type 2, Type 3細胞）が明らかとなった。また、細胞移動を阻害するRho kinase シグナル阻害剤を作用させた二次口蓋では、MEE細胞の移動が著しく阻害された。さらに本実験系を用いて、口蓋突起癒合時のMEE細胞の詳細な解析が可能であったことから、将来的に、口蓋裂の遺伝的因子や環境因子を解明できる有効な実験系であることが示された。

さらに本実験系を用いて口蓋裂の要因（遺伝的要因や環境的要因）を作用させることにより口蓋裂の病因をMEE細胞の挙動という観点から詳細に解析することが可能であると考えられる。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　青山　剛三　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	山城　隆
	副 査　教授	古郷　幹彦
	副 査　准教授	波多　賢二
	副 査　講師	阿部　真土

論文審査の結果の要旨

本研究の目的は、マウスの口蓋突起癒合過程における内側縁上皮細胞 (medial edge epithelial cell; MEE 細胞）の動態を詳細に解明することである。口蓋突起内側縁上皮のライブイメージングを行うことにより、MEE 細胞の動態が明らかになった。MEE 細胞の消失過程において、3 つの型に分類される細胞の移動様式を示した。また、それぞれの細胞計測結果から、MEE 細胞の消失に細胞移動が寄与する割合が高いことが示唆された。このように本実験系を用いて、口蓋突起癒合時の MEE 細胞の詳細な解析が可能であったことから、将来的に、口蓋裂の遺伝的要因や環境的要因を解明できる有効な実験系であることが示された

以上のことより、本研究はマウス二次口蓋における口蓋突起癒合時の MEE 細胞消失過程の一端を明らかにしたことから、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。