

Title	マウス鼻中隔と二次口蓋癒合時の上皮における細胞形態および動態の解析
Author(s)	山本, 沙優里
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/72256">https://doi.org/10.18910/72256</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 山本 沙優里 )	
論文題名	マウス鼻中隔と二次口蓋癒合時の上皮における細胞形態および動態の解析
論文内容の要旨	
<p><b>【緒言】</b></p> <p>ヒトの頭部はきわめて複雑な発生過程を呈し、その過程における細胞増殖や組織分化などの異常は多様な顎顔面形成不全を引き起こす。顎顔面形成不全は全ての先天的異常の約30%に現れることが知られておりその頻度の高さから古くから多くの研究がなされている。また、一次口蓋や鼻中隔と二次口蓋は由来とする突起が異なることが知られている。それぞれの突起の成長、癒合は正常な顎顔面発生には必須であり何らかの原因で癒合不全が起こった場合にはその部位に応じた裂が生じる。その中でも最も頻度が高いのが口唇口蓋裂であり、哺乳障害や嚥下障害、構音障害や咬合異常といった口腔の機能的な問題や、顎顔面の形態異常による審美障害を引き起こすことが知られている。近交系実験マウスを用いた研究では、二次口蓋突起同士あるいは一次口蓋と二次口蓋の癒合時には細胞死や細胞移動による上皮除去や間葉における適切な細胞増殖等が必要不可欠であることが証明されている。一方で二次口蓋と癒合する鼻中隔の発生過程に関しては、鼻中隔の発生や鼻中隔と二次口蓋突起の癒合が顎顔面の発生に重要な役割を果たすことが示唆されるが、研究報告は少数でありそれらのメカニズムについては未解明な部分が多く存在する。</p> <p>そこで本研究では、口蓋突起半側除去器官培養を用いて発生中の鼻中隔の器官培養を行い、走査型電子顕微鏡 (SEM) 解析を行うことにより鼻中隔の発生過程における詳細な形態学的観察を行った。また、上皮細胞特異的に <b>Green Fluorescent Protein</b> を発現するマウス (<b>K14-GFP mouse</b>) の鼻中隔のライブイメージングを行うことにより、鼻中隔と二次口蓋の癒合時における鼻中隔上皮の細胞動態を解析した。また、二次口蓋癒合時の上皮動態の制御を行うことが知られている <b>Runx</b> シグナルが鼻中隔上皮の動態に関与する可能性についても遺伝的な手法を用いて検証を行った</p> <p><b>【実験方法】</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>走査型電子顕微鏡 (SEM) 解析を用いた鼻中隔の上皮細胞の形態観察 C57BL/6J系統野生型マウスを交配させ、その胎仔を対象とした。E14.5-E15.0の胎仔を摘出後、0.1 M PBSで洗浄し、BGJb中に浸漬させた。ガラス製特殊培養瓶に口蓋突起を半側除去した鼻中隔組織を設置し、回転式胎仔培養装置の回転ドラムに装着した。回転式胎仔培養装置をインキュベーター内に設置し、回転速度を35-40 rpmとして、37°C、50% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、45% N<sub>2</sub>下で12時間、あるいは24時間培養を行った。鼻中隔組織はSEMを用いて観察した。</li> <li>鼻中隔上皮細胞のライブイメージングによる細胞移動の検証 健康なK14-GFP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、その胎仔を対象とした。E15.0のK14-GFPマウスの鼻中隔を摘出し、摘出時から蛍光顕微鏡を使用し、ライブイメージング技術を用いてリアルタイムで鼻中隔組織の経時的な観察を行った。培養環境としてBGJb培地500 μlにアガロースを添加し、0.6%アガロース添加BGJb培養液を作成した。ガラスボトムディッシュの底面に鼻中隔を設置し、15分間隔で24時間タイムラプス撮影を行った。時間ごとの連続した全焦点画像からAVI形式動画ファイルを作成した。</li> <li>蛍光染色を用いた鼻中隔上皮細胞のアポトーシスの検証 健康なK14-GFP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、その胎仔を対象とした。E15.0のK14-GFPマウスの鼻中隔を摘出し、回転式胎仔培養装置を用いて、37°C、50% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、45% N<sub>2</sub>下で12時間、あるいは24時間培養を行った。アポトーシス細胞の検出は、培養後の鼻中隔組織を4%パラホルムアルデヒド (以下4%PFA) /0.1 M PBS溶液 (pH7.4) にて4°Cで24時間固定後、Whole mount染色あるいは組織切片を作製し、TUNEL法を行った。写真撮影は共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察を行った。</li> <li>SEM解析を用いた上皮特異的Runx1ノックアウトマウスの鼻中隔上皮細胞の形態観察 口腔上皮におけるRunx1の役割を明らかにするために、Cre/loxPシステムを用いて上皮特異的にRunx1の発現を除去したホモ欠失マウス <i>K14-Cre;Runx1<sup>fl/fl</sup></i> を作製した。E15.0のK14-GFPマウスの鼻中隔を摘出し、回転式胎仔培養装置を用いて、37°C、50% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、45% N<sub>2</sub>下で12時間培養を行った。鼻中隔組織はSEMを用いて観察した。</li> </ol>	

## 【研究結果】

### 1. 走査型電子顕微鏡 (SEM) 解析を用いた鼻中隔の上皮細胞の形態観察

E15.0から12時間培養した鼻中隔表面では、上皮細胞の一部が球状になり突出する様子が確認された。上皮細胞の突出が生じる領域は鼻中隔の前方部正中に位置していた。本研究で認められた鼻中隔の上皮細胞の突出は二次口蓋と癒合直前である鼻中隔に時期及び部位特異的に生じる現象であることが示された。

### 2. 鼻中隔上皮細胞のライブイメージングによる細胞移動の検証

ライブイメージング観察像から、培養開始後3時間から8時間の間に鼻中隔前方部の上皮細胞がわずかに正中に収束する様子が観察された。収束する上皮細胞についてはGFPの発現強度が強く認められた。

### 3. 蛍光染色を用いた鼻中隔上皮細胞のアポトーシスの検証

E15.0摘出直後の鼻中隔と比較して、培養開始12時間後および培養開始24時間後の鼻中隔前方正中中部でアポトーシス陽性細胞の増加を認めた。アポトーシスを伴う細胞の一部は上皮の外側に特異的に出現し、実験1のSEM解析において上皮細胞の突出を認めた領域と一致していた。

### 4. SEM解析を用いた上皮特異的Runx1ノックアウトマウスの鼻中隔上皮細胞の形態観察

対照群と比較して*K14-Cre:Runx1<sup>fl/fl</sup>* マウス鼻中隔では上皮細胞の突出が減少する傾向が見られた。

## 【考察】

口唇口蓋裂は顔面領域に発生する先天性疾患の中で高頻度に発症することが知られており、裂の部位により様々なタイプに分けられる。二次口蓋突起同士の癒合あるいは一次口蓋と二次口蓋の癒合時の上皮細胞の消失メカニズムについてはこれまで広範に研究が行われている。二次口蓋においては、口蓋突起の内縁上皮に存在する周囲の口蓋上皮細胞とは区別されたmedial edge epithelial cell (MEE細胞) と呼ばれる細胞の消失メカニズムについて、細胞移動や細胞死が関係しているという説が提唱されている。一方で鼻中隔と二次口蓋突起の癒合が顎顔面の発生と関係することを示唆する文献は散見されるが、鼻中隔と二次口蓋が癒合するメカニズムについての研究報告は数少ない。これは口腔側から口蓋を観察した場合に、鼻中隔は二次口蓋の癒合により覆い隠され、その観察が阻まれることがひとつの要因といえる。そこで本研究では、二次口蓋と鼻中隔の癒合メカニズム詳細な解析のために発生中の鼻中隔上皮の癒合予定領域の動態の詳細な解析を行った。SEM解析の結果から、E15.0から12時間培養後の鼻中隔に上皮細胞の突出を認め、鼻中隔と二次口蓋が癒合するためには上皮組織の除去が必要になることからこの上皮細胞の突出が鼻中隔の上皮除去のメカニズムと関係することが示唆された。

次に鼻中隔上皮細胞の動態を詳細に観察するために、口蓋突起半側除去培養モデルとK14-GFPマウスを用いて鼻中隔のライブイメージング観察を行った。その結果、鼻中隔の上皮細胞は培養3時間後からわずかに正中に移動するのみでその後もGFPシグナルは存在し続けて上皮の脱落には至らなかった。一般に、細胞は細胞間接着が失われると、その形態は球形を示す。今回認めた鼻中隔の突出した細胞の形態はMEE細胞のような球形ではなくより不定形であり、間葉の露出は認めなかったことから、二次口蓋と鼻中隔で上皮細胞が除去される際の細胞接着状態の変化に関して相違点が存在する可能性がある。

これらのことを踏まえて、前述した鼻中隔上皮の突出や消失に関わるメカニズムとアポトーシスとの関係を検証するために発生中の鼻中隔の蛍光TUNEL染色を行った。その結果、鼻中隔上皮の突出を認めた部位近傍にTUNEL陽性細胞を検出した。このことは本研究結果にて認められた鼻中隔の細胞突出とアポトーシスに関連があることを示唆している。

以上の観察から鼻中隔と二次口蓋が癒合する際の上皮細胞の形態および動態はこれまでに提唱されている二次口蓋突起同士の癒合時の細胞挙動とは完全には一致しないことが示唆された。このことはヒトにおいても二次口蓋の癒合が正常に行われている状態であっても鼻中隔と二次口蓋の癒合が完了しないことがあることを意味し、上顎骨の成長の観点から同部位の形態的な観察をする必要性を示唆している。

口蓋の発生に重要な役割を担う分子としてRunt-related transcription factor(Runx)がある。本研究では、鼻中隔の上皮に関わる分子メカニズムを検証するために、*K14-Cre:Runx1<sup>fl/fl</sup>* マウスの解析を行った。その結果、対照群マウスと比較して*K14-Cre:Runx1<sup>fl/fl</sup>* マウスにおいて鼻中隔の上皮細胞の突出が減少したことから、Runx1が鼻中隔と二次口蓋の癒合直前に生じる上皮細胞の突出に関連していることが示された。

今日の医療では遺伝子検査による疾患の診断やリスクの検索が行われるようになってきている。鼻中隔を含め癒合不全に関与する遺伝子を解明し、それらを臨床に応用することで口唇口蓋裂の発症のリスク診断や表現型の予測に役立てる可能性がある。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 山本 沙優里 )		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 山城 隆
	副 査	教授 加藤 隆史
	副 査	准教授 波多 賢二
	副 査	講師 相川 友直
<b>論文審査の結果の要旨</b>		
<p>本研究は鼻中隔と二次口蓋の癒合過程における細胞動態の解明を目的として、口蓋突起半側除去器官培養を応用し鼻中隔上皮の癒合予定領域の動態を解析したものである。その結果、二次口蓋と癒合直前の鼻中隔において上皮細胞の突出およびアポトーシスが起きることを見出した。さらに、この鼻中隔上皮細胞の突出は Runx1 シグナルにより制御されることを明らかにした。この結果は、顔面突起癒合不全（顔面裂など）の発症メカニズムを探索し、診断や治療法を開発する点で有意義であり、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。</p>		