



Title	口蓋突起癒合における環境因子としてのデキサメタゾン (DEX) 投与の影響の解析
Author(s)	廣瀬, 匠
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/87974
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (廣 瀬 匠)	
論文題名	口蓋突起癒合における環境因子としてのデキサメタゾン(DEX)投与の影響の解析
<p>【諸言】</p> <p>口唇口蓋裂はヒトの顎顔面領域において最も多い先天疾患であり、咀嚼、嚥下、構音、聴覚障害や顔面形態の異常を伴うことにより、患者のQOLに多大な影響を及ぼす。口蓋裂の原因として、口蓋突起の成長障害や癒合不全など形成過程における障害や、舌および下顎など口蓋突起周囲組織の構造異常が挙げられている。口蓋裂は、複数の遺伝因子と環境因子との相互作用で病態が発症する多因子疾患であると考えられており、発症のメカニズムは非常に複雑であり、未だ解明されていない部分が多く残されている。</p> <p>DEXは抗炎症作用、免疫抑制作用を持ち、臨床的に最も使用されている合成副腎皮質ホルモンの一つである。合成副腎皮質ホルモンの妊婦への使用は胎児の口唇口蓋裂発症のリスクが増加するとの報告や、妊娠マウスへの腹腔内投与が口蓋裂を引き起こすといった報告がある。しかし、DEXが口蓋裂を引き起こすメカニズムについては未だ不明な点が多い。</p> <p>そこで本研究では、DEX投与が癒合時の口蓋突起に及ぼす影響の解明を目的とした。</p> <p>【材料および方法】</p> <p>1、<u>実験動物と口蓋組織の摘出</u></p> <p>妊娠したICR系統野生型雌性マウス（日本チャールス・リバー株式会社、神奈川）の胎仔とC57BL/6J系統野生型雌性マウスの胎仔を使用した。胎生13.0日齢（E13.0）、E14.0、E14.5の胎仔を摘出後、口蓋組織を摘出した。</p> <p>2、<u>使用薬剤</u></p> <p>DEXを用いた。DEXの溶解にはジメチルスルホキシド(DMSO)を用いた。</p> <p>3、<u>妊娠マウスへの腹腔内投与と口蓋組織の摘出</u></p> <p>妊娠13.0日目のC57BL/6J系統野生型雌性マウスにDEX12.5mg/kg,25mg/kg,50mg/kgの濃度で100μl腹腔内投与を行い、胎仔をE14.5もしくはE17.0で摘出後、口蓋組織を摘出した。対照群として等量のDMSOを腹腔内注射にて投与した。</p> <p>4、<u>口蓋突起の器官培養、上皮接触モデルでの器官培養</u></p> <p>BGJb培地を用いて培養を行った。実験群はDEXを200ng/ml添加し、対照群は実験群と等量のDMSOを添加した。器官培養はE14.0の口蓋突起をBGJb培地1mlを用いて37℃、5%CO₂下で24時間培養を行った。上皮接触モデルではE14.0の左右の口蓋突起半側を摘出し、12時間器官培養を行った後、両側の口蓋突起内側縁上皮同士を接触させた状態（口蓋突起上皮接触モデル）で培養を行った。BGJb培地1mlを用いて6、24または48時間培養を行った。</p> <p>5、<u>免疫組織化学染色</u></p> <p>口蓋組織から前頭断の凍結切片を作製した。一次抗体は抗Stat3抗体、抗pStat3抗体、抗pStat1抗体、抗pERK抗体、抗p63抗体、抗E-cadherin抗体、抗Ki-67抗体を用いた。二次抗体は抗マウスIgG抗体、抗ウサギIgG抗体を用いて染色を行った。</p> <p>6、<u>ウェスタンブロッティング法</u></p> <p>培養した口蓋組織の口蓋突起を摘出して用いた。一次抗体は抗Stat3抗体、抗pStat3抗体、抗pStat1抗体、抗pERK抗体、抗α-tubulin抗体を用いた。二次抗体は抗マウスIgG抗体、抗ウサギIgG抗体を用いた。</p> <p>7、<u>ヘマトキシリンエオジン染色</u></p>	

口蓋組織から前頭断の凍結切片を作製し、染色を行った。

8、アポトーシスの検出

口蓋組織から前頭断の凍結切片を作製し、TUNEL染色法を用いて検出を行った。

9、in situ hybridization法

培養した口蓋組織から前頭断の凍結切片を作製し、*in situ hybridization*法を用いて*Sox2*の検出を行った。

10、レーザーマイクロダイセクションを用いた全RNA精製とRT-qPCRによるmRNAの定量

培養した口蓋組織の口蓋突起上皮をレーザーマイクロダイセクションにて回収し、全RNA精製した。RT-qPCRにより*Sox2*,*Rn 18s*のmRNAの定量を行った。

【結果】

1、DEX腹腔内投与により口蓋の癒合は阻害される

E17.0で摘出した際、対照群では口蓋裂が確認できなかったのに対し、実験群では12.5mg/kgの濃度で8匹中1匹、25mg/kgの濃度で8匹中2匹、50mg/kgの濃度で15匹中8匹の口蓋裂を認めた。E14.5で摘出した際、対照群と同様に実験群でも口蓋突起の挙上と口蓋突起間葉での増殖細胞の発現を認めた。

2、DEX添加によりmedial epithelial seam (MES)消失は阻害される

DEXを添加したBGJb培地を用いて、E14.0から器官培養を行い、口蓋突起接触上皮を観察した。接触開始6時間後では実験群でMESにおけるTUNEL陽性細胞が減少した。接触開始24時間後では実験群でMESにおけるTUNEL陽性細胞の減少とKi-67陽性細胞の存在を認めた。接触開始48時間後では実験群でMESが残存したのに対し、対照群ではMESが完全に消失していた。MESの消失にはp63の消失が必要であることが知られているが、実験群では残存したMESにp63が認められた。

3、口蓋突起癒合時の口蓋突起上皮においてStat3のリン酸化は増加する

二次口蓋の癒合前であるE13.0、E14.0、E14.5の口蓋突起におけるStat3のリン酸化を観察したところ、口蓋突起癒合直前であるE14.0からE14.5にかけて口蓋突起の上皮でStat3のリン酸化が増加していることが示された。

4、DEX添加により口蓋突起におけるStat3, Stat1, ERKのリン酸化は低下する

DMSOを添加したBGJb培地を用いて、E14.0から24時間口蓋突起の器官培養を行った結果、実験群は対照群に対して口蓋突起でStat3, Stat1, ERKのリン酸化が低下した。また、腹腔内投与を行い、胎仔をE14.0で摘出した結果、同様に対照群と比べて実験群ではStat3のリン酸化が低下した。

5、DEX腹腔内投与により口蓋突起上皮におけるSox2遺伝子の発現は低下する

ヒトにおいて*Sox2*の変異により口蓋裂が生じること、*Sox2*^{+/+}マウスの表現型の一つとして口蓋裂があることが報告されている。また、*Sox2*は口蓋癒合時の口蓋突起上皮で発現することが知られている。DEXを添加したBGJb培地を用いて、E14.0から48時間器官培養を行い、*in situ hybridization*法を用いて*Sox2*を検出した。また、腹腔内投与を行い、E14.0で摘出した胎仔の口蓋突起上皮をレーザーマイクロダイセクションにて回収し、mRNAの定量を行った。その結果、実験群は対照群に対して*Sox2*の発現が低下していた。

【考察】

本研究によりDEX投与による口蓋裂発症の原因は、口蓋突起上皮の癒合不全であることが明らかになった。そのメカニズムは、口蓋突起癒合直前の口蓋突起上皮におけるStat3のリン酸化が抑制されることで、口蓋突起上皮の*Sox2*の発現が低下することによると示唆される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (廣 瀬 匠)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	山城 隆
	副 査	教授	野田 健司
	副 査	准教授	波多 賢二
	副 査	講師	山下 元三
論文審査の結果の要旨			
<p>本研究の目的は環境因子であるデキサメタゾン (DEX) 投与が癒合時の口蓋突起に及ぼす影響を解明することである。DEX の腹腔内投与と口蓋突起上皮接触モデルを用いた器官培養における DEX の添加を行い、DEX による口蓋裂発症の原因は口蓋突起上皮の癒合不全であることを明らかにした。また、癒合直前の口蓋突起上皮では DEX 投与により Stat3 のリン酸化の抑制を認めた。さらに口蓋裂の関連遺伝子として知られている Sox2 の発現の低下を認めた。今後、本モデルを用いて遺伝因子と環境因子の相互作用を解明することが期待される。</p> <p>以上のことより、本研究は DEX 投与が癒合時の口蓋突起に及ぼす影響とその分子メカニズム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。</p>			