

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18917

研究課題名（和文）口蓋発生における組織変容のダイナミズム

研究課題名（英文）Histological analysis of developing oral palate

研究代表者

鎌田 将史（Kamata, Masafumi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：60815950

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：口唇口蓋裂は本邦において600人に1人の割合で発生する頻度の高い先天異常であるが、その発生原因についての詳細は不明であり、予防的手段は存在しない。口蓋は胎生期に前頭鼻隆起と上顎隆起が癒合することによって発生し、その癒合不全が口唇口蓋裂につながると考えられる。本研究は、マウスの口蓋組織の正常発生の様子を組織学的に解析することによって、口蓋裂発症のメカニズムの一端を明らかにする目的で行われた。Fucciマウスを用いて間葉系組織の増殖が認められることを確認し、また口蓋組織のホールマウント染色標本の系を確立して血管を中心とする三次元組織の可視化に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口唇口蓋裂の多くは多因子遺伝様式でその詳細な発症メカニズムには依然として不明な点が多い。口蓋の発生は組織同士の癒合という稀な生理現象によって成り立っており、口蓋裂はその過程で何らかの障害がおこるために生じると考えられている。本研究では口蓋が生理的のどのような仕組みで発生するのかを明らかにするために、Fucciマウスを用いた細胞増殖の解析を行い、また口蓋組織のホールマウント染色標本で解析する系を確立した。本研究を下地として口蓋発生の更なる解析が可能になるとと思われる。

研究成果の概要（英文）：Cleft lip and palate is a congenital anomaly with high frequency worldwide, accounting for about one in 600 birth in Japan. Its pathogenesis remain elusive and there is no prophylactic approach. Occurrence of cleft palate results from failure of adhesion of frontonasal process and maxillary processes. The purpose of this study was to elucidate the mechanism of physiological fusion of these tissues by histological analysis. Study using Fucci mice revealed huge proliferation of mesenchymal cells. Wholmount tissue model was also prepared to analyze 3-dimensional vessels.

研究分野：口唇口蓋裂

キーワード：口唇口蓋裂

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口唇・口蓋裂は、本邦において約 600 人に 1 人の割合で発生する頻度の高い外表奇形であり、手術による段階的な治療が行われるが、治療後に残存する整容的・機能的問題は患者の社会生活上の大きな障壁となるため、発症のメカニズムを解明し有効な予防手段を開発することができれば社会的なインパクトは非常に大きい。

口唇・口蓋裂のうち単一遺伝子の異常によって生じるものは比較的少数(10%以下)であり、大部分は多因子遺伝様式をとり、環境要因の寄与も大きいとされる。発生学的に、前頭鼻隆起と左右の上顎隆起の「癒合」が何らかの原因によって妨げられることによって生じると考えられているが、それが真実であるという決定的な証拠は得られていない。それは、正常な発生過程において口唇・口蓋が癒合する詳細なメカニズムに不明な点が多いからだと考えられる。哺乳類の生後の組織では非常にまれな、組織が「癒合する」という現象がなぜ可能となっているのかを解明することができれば、「癒合しない」原因についても推測できるようになると考えられる。つまり、口唇・口蓋裂の発症メカニズムについて新規の知見を得るためには、生理的に口蓋の癒合がどのようなメカニズムで起こるのかを明らかにすることが近道になると考えられた。

2. 研究の目的

本研究においては、上記のようなコンセプトのもと、特に 細胞の増殖とアポトーシス、血管とリンパ管新生の 2 点に着目して生理的な口蓋の癒合過程を検討することによって、口唇・口蓋裂の発症メカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

マウス胎仔の口蓋を用いてその発生過程について検討する。マウス口蓋は胎生 14~16 日目に前頭鼻隆起、左右の上顎隆起が互いに癒合することによって形成される(図 1)。その間の胎仔組織を採取し、主に組織学的解析を行うことにより発生過程のメカニズムを特定していく。

(1)Fucci を用いた細胞増殖の解析

細胞増殖について検討するために、2008 年に開発・報告された Fucci マウスを用いて解析を行った。Fucci は、細胞周期観察のための蛍光プローブであり、細胞周期の異なる時期に存在する 2 つのタンパク質の調節領域をコードする遺伝子と、赤および緑の蛍光タンパク質(mK02 および mAG)をコードする遺伝子を結合させた融合遺伝子である(Sakae-Sakano et al Cell 2008)。神経の発生や創傷治癒過程の細胞周期を解析した報告がある。特殊な免疫染色を行わずとも蛍光タンパクにより各細胞の分裂状態を評価することができる点が特色である。

各胎齢のマウスを妊娠母体から摘出し、頭部組織を 4% PFA で固定する(4、overnight)、20%スクロースへ置換し 4 で 48 時間浸漬する。Tissue-Tek O.C.T. compound (Sakura)へ埋没させドライアイス上に静置して凍結する。Cryostat(Leica)で厚さ 12 μm の凍結切片を作製し、室温で乾燥させる。ProLong Gold Antifade Mountant (Invitrogen)で包埋し暗所に 1 晩静置する。共焦点顕微鏡(FV 3000、Olympus)で観察する。

(2)口蓋ホールマウント免疫染色標本を用いた血管・リンパ管新生の解析

血管や神経などの脈管や線維組織は薄切片では輪切りとなった断面の観察しかできず、全体を観察するためには、ある程度の厚みを持ったホールマウント染色標本が適している。胎仔口蓋のホールマウント染色を行った研究報告はこれまで渉猟し得た限り存在しなかったため、他組織の手法をヒントに条件検討し、試行錯誤の末に開発した。

各胎齢のマウスを妊娠母体から摘出し、頭部組織を 4% PFA で固定する(4、3 時間)。顕微鏡視下にマイクロ剪刀とマイクロ鑷子を用いて口蓋組織を切り出す。その際、まず左右の口角から口蓋面に水平に後方へ切開し、上顎と下顎を分離する。次いで、鼻孔から口蓋面に水平に眼窩下縁を通して顔面の外側を切開し、口蓋組織を切り出す。その際、胎生 14 日目以前は口蓋の癒合が不完全であるため、器具等で破損しないように留意する。4% PFA でさらに固定する(4、3 時間~overnight)。血管、リンパ管、神経線維等に対する一次抗体を 0.5% PBST (Triton X-100 in PBS)で希釈し、浸透させながら反応させる(4、overnight)。0.5% PBST で 5 回洗浄し、対応する二次抗体および DAPI を 0.5% PBST で希釈し、浸透させながら反応させる(4、3 時間~overnight)。



口蓋の癒合(E14-16)

(from Kaufmann "The Atlas of Mouse Development" Elsevier 2003)

図 1. マウス胎仔期の口蓋発生の様子

0.5% PBST (Triton X-100 in PBS)で希釈し、浸透させながら反応させる(4、overnight)。0.5% PBST で 5 回洗浄し、対応する二次抗体および DAPI を 0.5% PBST で希釈し、浸透させながら反応させる(4、3 時間~overnight)。

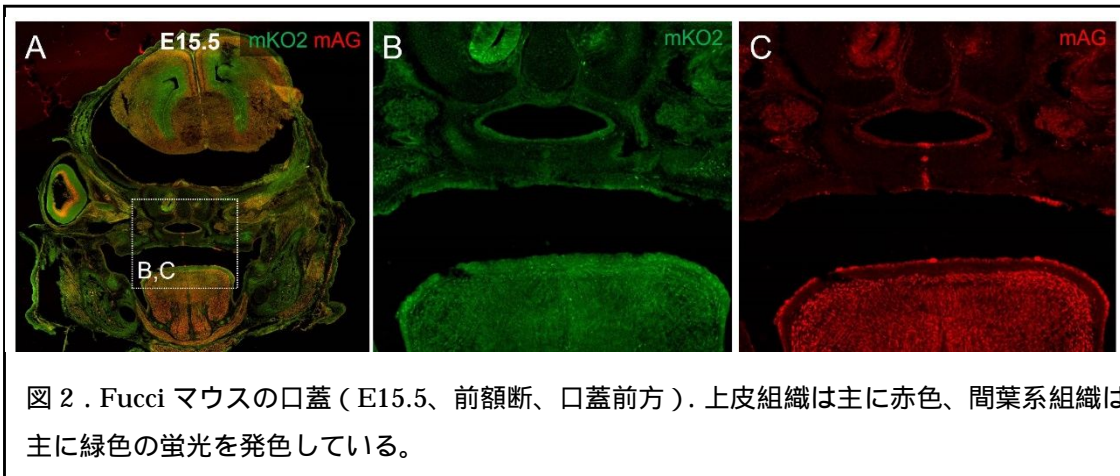


図 2 . Fucci マウスの口蓋 (E15.5、前額断、口蓋前方). 上皮組織は主に赤色、間葉系組織は主に緑色の蛍光を発色している。

0.5% PBST で 3 回洗浄し、スライドガラス上へ載せる。組織の水分をキムワイプで除去し、ProLong Gold Antifade Mountant (Invitrogen) で包埋する。暗所で 1 晩静置し共焦点顕微鏡 (FV3000、Olympus) で観察する。

使用した一次抗体は、CD31 (Hamster monoclonal [2H8]、Abcam)、Neurofilament (Mouse monoclonal[2H3]、DSHB)、F4/80 (Rat monoclonal[CI:A3-1]、AbD serotec)、LYVE1 (Rabbit polyclonal、RELIA Tech GmbH)、SMA (Mouse monoclonal[1A4]、SIGMA) である。

4 . 研究成果

(1)Fucci を用いた細胞増殖の解析

Fucci マウスの口蓋について、口蓋の前方、後方の前額断の切片をそれぞれ作成して観察した。緑色、赤色の蛍光発色は検出可能であったが、赤色の方がいずれも強い傾向があった (図 2)。E14.5 までの癒合する以前の口蓋、E15.5 で癒合した後の口蓋いずれにおいても上皮系組織や舌筋群は主として赤い発色を呈し、間葉系組織が主として緑色を呈することが分かった。

前額断の薄切切片による観察では血管や神経線維などの細長い構造は断片化されて全体としての観察ができないことから、口蓋面に平行なホルマウント染色を行って観察する必要があると考えられた。

(2)口蓋ホルマウント免疫染色標本を用いた血管・リンパ管新生の解析

胎子の口蓋組織を切り出してホルマウント染色の条件を検討することにより、大口蓋動脈を中心とした口蓋組織全体の血管網を明瞭に可視化することができた (図 3)。癒合しつつある口蓋先端部の組織では、filopodia を有する tip cell が散見されたことから、発生段階の口蓋棚においては発芽による血管新生が盛んに起こっていることが分かった。そのような血管新生を何が促しているのかについては、本研究期間内の観察のみから判断することはできなかった。今後、VEGF 受容体の変異マウスを使用する等で血管新生に介入し、口蓋癒合の様子を観察する

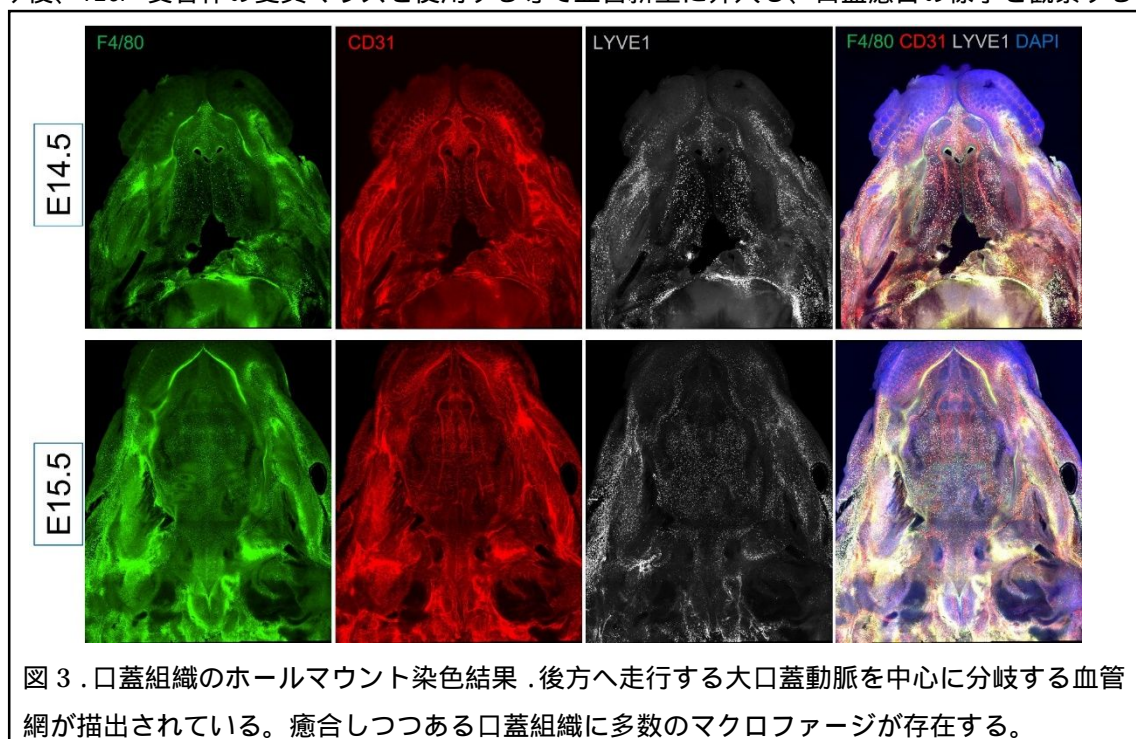


図 3 . 口蓋組織のホルマウント染色結果 . 後方へ走行する大口蓋動脈を中心に分岐する血管網が描出されている。癒合しつつある口蓋組織に多数のマクロファージが存在する。

E14.5

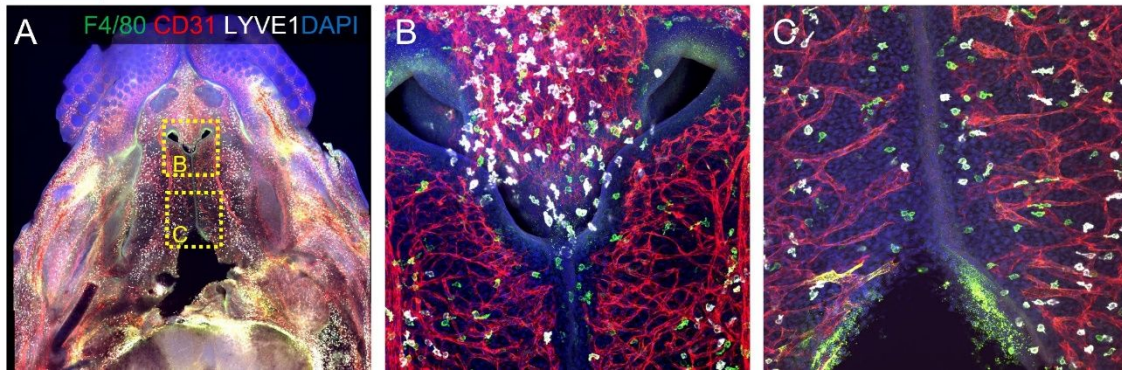


図4.口蓋組織のホールマウント染色結果(E14.5).癒合しつつある口蓋同士の間隙に多数のマクロファージが存在していることが分かる。血管周囲のマクロファージはLYVE1を強く発現する傾向がある。

ことで更なる手がかりが得られる可能性がある。

LYVE1陽性のリンパ管はE14.5までは検知できず、E15.5になると歯槽に近い口蓋外側部位において少数観察された。このことから、リンパ管の発生が口蓋の癒合と密接に関連している可能性は低いと考えられた。

F4/80陽性のマクロファージは発生過程の口蓋組織全体に多数分布していた。LYVE1を発現するものと発現しないものが存在したが、LYVE1陽性マクロファージは血管周囲に多く分布する傾向が認められた。さらには、E14.5で癒合しつつある口蓋の間隙にもマクロファージが散見されたことから、口蓋の癒合や血管新生の誘導においてマクロファージが何らかの役割を果たしている可能性が示唆された(図4)。今後、マクロファージを遺伝的に欠損するマウスやクロドロン酸の投与によりマクロファージを欠損させたマウスで同様の観察を行い、口蓋の癒合の様子を観察する予定である。

本研究では発生過程の口蓋を材料に組織学的観察を行った。同様の研究はこれまでに存在せず、本研究で得られた知見を発展させることにより更なる新規の知見が得られるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------