

機関番号：33902
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21792040
 研究課題名(和文)
 新たな口蓋裂発症メカニズムの解析 -口蓋突起癒合後離開する原因について-
 研究課題名(英文)
 Analysis of new cleft palate development mechanism -about the factor of cleft palate after palatal fusion -
 研究代表者
 井村 英人 (IMURA HIDETO)
 愛知学院大学・歯学部・非常勤助教
 研究者番号：10513187

研究成果の概要(和文)：

口蓋突起癒合後に解離し、口蓋裂が発症している現象に着目し、口蓋裂発生のメカニズムを細胞・分子レベルでのシグナル伝達の相互作用と、制御機構から解明することを目的とした。口蓋形成期における口蓋突起癒合時に、上皮索基底膜のペルレカンおよびコラーゲンIVの消失が認められ、口蓋突起上皮細胞が分泌したヘパラーゼは間葉系細胞の分化・増殖を惹起する可能性が推測された。また、口蓋突起が伸長する際、口蓋突起鼻腔側の基底膜にLamininの陽性反応を認めた。癒合前の口蓋突起全体にPCNAの局在を認め、活発に細胞増殖が行われていることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：

The purpose of our study is to clarify the mechanism of cleft palate development from the interaction of the signal transduction in cells and molecules from the phenomenon of cleft palate after palatal fusion. We observed disappearance of Perlecan and IV collagen in the basement membrane of the epithelial funiculus when both palatine processes were fusing. We observed Laminin positive cells in the basement membrane of the nasal side. And the localization of PCNA positive cells was observed in the entire of palatine processes previous palatal fusion, suggesting that cell proliferation have been active.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口蓋裂、口蓋突起、基底膜、器官培養、上皮、上皮索、発生

1. 研究開始当初の背景

(1) 口蓋の形成過程は、1)舌側方において垂直位に形成された2つの口蓋突起が、舌の下方移動に伴って、舌背上に挙上して水平位をとる挙上期、2)水平位となった口蓋突起は伸長し、正中において互いに接触する接触期、3)接触部の上皮細胞の接着とアポトーシスが起これ、さらに両側口蓋突起の間葉組織が結合する癒合期となり、4)上皮索の消失により癒合が完了し、口蓋が形成される。したがって、口蓋の形成過程のこれらのどこかが障害されると口蓋裂が発生すると考えられている。

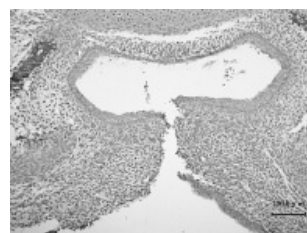
従来からの口蓋裂の発生メカニズムは、口蓋突起の癒合時における programmed cell death の不調によるとする報告が一般的であるが、それに相反する報告 (Int. J. Dev. Biol. 48:39-46, 2004) も出されており、口蓋裂の発症メカニズムについての明確な解答は出されていない。

私は口蓋裂の発症のメカニズムを解明するため、ダイオキシン投与によるマウス口蓋裂発症実験や口蓋の正常な発生における基底膜の関与によりそのメカニズムについての研究を行ってきた。

ダイオキシンの中でもっとも強い毒性を持つ2, 3, 7, 8, -tetrachloridibenzo-*p*-dioxin (TCDD)は、臨界濃度での妊娠マウスへの投与で、100%口蓋裂が発症することが知られており、口蓋裂発症モデルとして広く研究に用いられている。TCDD投与マウス胎仔での口蓋裂発症機序について、TakagiらはTCDDが口蓋突起の間葉細胞の増殖を抑制することにより、挙上の遅延及び成長障害によって左右の突起の接触が起こらないとしている (Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis 20:73-86, 2000)。また、Abbott

らは、MEE細胞の分化がTCDDによって変化することにより、癒合不全となると報告している (Toxicology 105:365-373, 1995)。このようにTCDDによる口蓋裂の発生は、口蓋突起が癒合しないことによると考えられてきた。

しかし、私自身のこれまでの研究によって、妊娠マウスへの臨界濃度のTCDD投与により、出生直前に100%口蓋裂を発症しているにもかかわらず、胎生14日では4%、胎生15日では17%、胎生16日では13%の口蓋突起の癒合率を示すことを明らかにした。そして、1)TCDD投与群では両側の口蓋突起が口蓋形成の途中で一旦癒合し、口蓋を形成したのちに口蓋裂を発生するという新しい口蓋裂発生のメカニズムが考えられ、組織学的観察においてもこのことを証明した (図1)。



(図1) 口蓋後方部の癒合した口蓋の離開

(2) また口蓋突起の癒合後の離開の原因としては、頭蓋骨成長の差が口蓋裂を発生させる一因である可能性を考えたが、頭蓋骨および口蓋の側方へ成長に差はなく、成長の差による口蓋裂の発生は否定された。また、口蓋突起上皮における細胞間接着の異常が考えられたが細胞間接着因子である E-Cadherin, α -Catenin, β -Catenin の局在に差異はなかった。以上のことからダイオキシン投与時の口蓋突起の発育と癒合状況はダイオキシン非投与での口蓋癒合とは様相が異なっていることが明らかになったが、その様態と口蓋の解離の原因については未解決である。

2. 研究の目的

口蓋裂発生モデルにおいて、口蓋形成の途上で、左右の口蓋突起が一旦癒合した後、再び口蓋突起が解離し、口蓋裂が発症している現象に着目し、正常の口蓋形成系と対照とすることで口蓋裂発生のメカニズムを細胞・分子レベルでのシグナル伝達の相互作用と、制御機構から解明することを目的とする。

2) 左右の口蓋突起基底膜が断裂・消失することにより、口蓋突起の癒合が行われるため、この基底膜の消長が口蓋裂発生の鍵を握ると考えられる。口蓋突起基底膜はIV型コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンであるパールカンなどによって構成され、さらに、パールカンは5つのドメインからなるコアプロテインとドメインIに結合する3本のヘパラン硫酸鎖からできている。そして、口蓋突起の基底膜の断裂・消失には基底膜を構成する成分に対する特異的酵素による分解が必要である。

本研究は、基底膜の断裂を起こす特異的酵素であるパールカン、ヘパラーゼの局在を免疫染色により解析し、さらに、ICR 妊娠マウス胎仔の器官培養法を用いて、口蓋突起の増殖期細胞の動態を観察した。

3. 研究の方法

口蓋裂発症のメカニズムを解明するため、C57/BL10 マウスの胎生 13.5 日, 14.5 日, 15.5 日, 出生後の口蓋部を用いて、基底膜の断裂を起こす特異的酵素であるパールカン、ヘパラーゼの局在を免疫染色により解析した。B) さらに、器官培養法を用いて、口蓋突起の増殖期細胞の動態を観察した。方法は I C R 妊娠 12 日のマウス胎仔を、HBSS 培養液を入れたシャーレに取り出し、図に従い、眼窩を通る水平断面で頭部の上部を切除した。次

に口蓋を通る水平断面で下顎以下を切除した。上顎部に舌の一部が残っている場合はピンセットで取り除き、口蓋棚を採取する際には口蓋棚を傷つけないように留意した。左右の両口蓋棚は前後方向を合わせ、内側面が接するように平行に 0.8 mm のニトロセルロース膜（ザルトリウス）に位置させた。この口蓋棚を乗せた膜は 60 mm のシャーレに入れ、膜が浸る程度（約 3 mL）に MEM を添加した。

培養方法：膜ごとシャーレに移し、MEM を添加した口蓋棚は CO₂ インキュベータ内で 2 時間 Pre 培養した。その後、余分な MEM を除去し、DMEM/F12 (1:1) を同様に膜が浸る程度に入れて本培養を開始する（この時間を培養 0 時間として起算した）。

培養条件：37°C、5%CO₂、加湿下

1.1 口蓋棚のホルマリン固定

固定開始時間：培養開始 24 時間後および 72 時間後とした。

固定方法：採取した口蓋棚はニトロセルロース膜ごと 10% 中性緩衝ホルマリン液に固定する。なお、固定時間は 24 時間とする。

1.2 病理組織標本作製

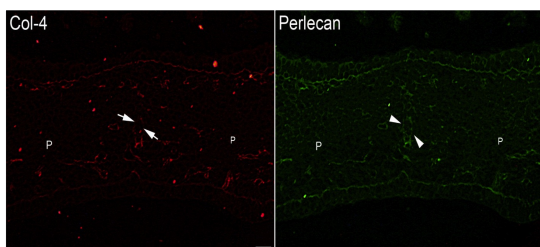
口蓋棚を 24 時間固定後、パラフィン包埋する。切片の作製およびヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施した。

また、抗ラミニン抗体を用いた免疫染色により上皮組織を、抗 PCNA 抗体により増殖期細胞の観察を行った。

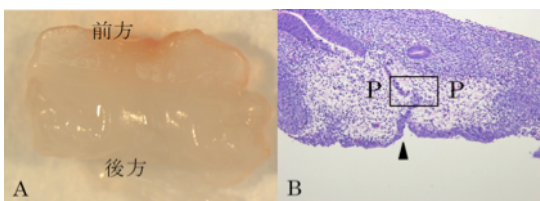
4. 研究成果

正常な口蓋形成期において口蓋突起癒合期には、上皮索基底膜において、パールカン (perlecan) および、コラーゲンIV (col-4) の消失が観察された (矢頭)。口蓋突起上皮細胞が分泌したヘパラーゼはパールカンのヘパラン硫酸鎖に抱合されている増殖因

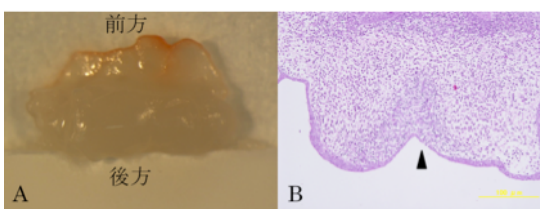
子を遊離・活性化することにより、間葉系細胞の分化・増殖を惹起する可能性が推測された。また、口蓋突起上皮細胞が分泌したMMP(matrix metalloproteinase)は、コラーゲンIV分子を細分化することで、上皮索基底膜の分解に関与することが示唆された。



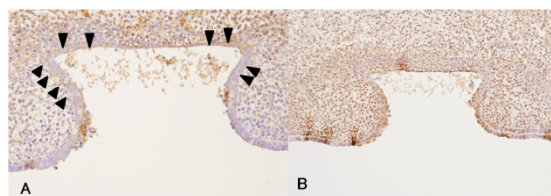
B) 口蓋器官培養系において、口蓋培養 24 時間後に口蓋突起が癒合している像や、口蓋突起が接触し、上皮索の消失した像 (B) が観察された。(A:実体顕微鏡像 B:HE 像 (×200) P:口蓋突起 矢頭:口蓋突起癒合部)



口蓋培養 72 時間において上皮索は消失し、陥凹 (矢頭) が残るものの口蓋突起の癒合が観察できた。(A:実体顕微鏡像 B:HE 像 (×200))



また、口蓋培養 24 時間において口蓋突起先端基底膜から鼻腔側に沿って Laminin 陽性反応を示した (矢頭)。先端から口腔側は陰性であった (A) (×400)。また、PCNA は口蓋突起全体に陽性反応を認めた (B) (×200)。



結果とまとめ

1. 口蓋突起癒合時に、上皮索基底膜のペルレカンおよびコラーゲンIVの消失が認められた。
2. 口蓋突起上皮細胞が分泌したヘパラーゼはペルレカンのヘパラン硫酸鎖に抱合されている増殖因子を遊離・活性化することにより間葉系細胞の分化・増殖を惹起する可能性が推測された。
3. 口蓋突起上皮細胞が分泌した MMP (matrix metalloproteinase) はコラーゲンIV分子を細分化することで、上皮索基底膜の分解に関与することが示唆された。
4. 口蓋突起が伸長する際、口蓋突起鼻腔側の基底膜に Laminin の陽性反応を認めた。癒合前の口蓋突起全体に PCNA の局在を認め、活発に細胞増殖が行われていることが考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Imura H, Yamada T, Mishima K, Fujiwara K, Kawaki H, Hirata A, Sogawa N, Ueno T, Sugahara T: Effect of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin suggests abnormal palate development after palatal fusion. *Congenital Anomalies* 50(2):77-84 2010 (査読有)
- ② Shirasu N, Ueno T, Hirata A, Kagawa T, Kanou M, Sawaki M, Wakimoto M, Ota A, Moritani N, Imura H, Matsumura T,

Yamada T, Yamachika E: Bone formation in a rat calvarial defect model after transplanting autogenous bone marrow with beta-tricalcium phosphate. Acta Histochemica : 112(3) 270-7 2010 (査読有)

- ③ Hirata A, Imura H, Natsume N, Sugahara T: Localization of the HOXC homeobox gene family during palate formation in mice. EUROPEAN ASSOCIATION FOR CRANIO-MAXILLO-FACIAL SURGERY 2010. International Proceedings P. 415-420 2010 (査読有)

[学会発表] (計2件)

- ① 井村英人 平田あずみ 山田朋弘 南克浩 新美照幸 古川博雄 三島克章 藤原久美子 鈴木 聡 菅原利夫 前田初彦 夏目長門: 口唇口蓋裂に関する実験的研究 -第124報- 器官培養による口蓋突起癒合時の観察. 第55回日本口腔外科学会総会 幕張メッセ 千葉 2010.10.16-18
- ② 平田あずみ, 井村英人, 山田朋弘, 植野高章, 三島克章, 南克浩, 夏目長門, 菅原利夫: Homeobox family HOXC 遺伝子は口蓋形成に関与する. 第55回日本口腔外科学会総会 幕張メッセ 千葉 2010.10.16-18

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井村 英人 (IMURA HIDETO)
愛知学院大学・歯学部・非常勤助教
研究者番号: 10513187