

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792047

研究課題名（和文）鼻口蓋管におけるオートファジーの役割の解明

研究課題名（英文）The role of Autophagy at nasopalatine duct

研究代表者

松崎 聖美 (MATSUZAKI KIYOMI)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：00551920

研究成果の概要（和文）：

今回の研究では、マウスの組織切片を用い胎生期から出生後数日まで、鼻口蓋管部の構成細胞の形態変化を確認した。また、オートファジーの機能を欠失させた *Atg5* ノックアウトマウスにおける鼻口蓋管上皮の形態変化を確認した。また、Genechip 解析にて、鼻口蓋管形成中に発現量の変化する遺伝子を確認した。これらの結果から、鼻口蓋管部形成時にオートファジーが特異的に発現し、鼻口蓋管形成にオートファジーが関連することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, our objective is to identify the role of Autophagy at the nasopalatine duct. First, we clarified the morphological change of nasopalatine ducts with tissue sections of mice from embryonic stage to postnatal stage. And we revealed the morphological distinctions of the nasopalatine ducts between control and *Atg5* knockout mice, too. Next, we elucidated the genes which change the expression levels when the nasopalatine ducts develop and differentiate. From these results, we suggest that Autophagy is specifically expressed in the nasopalatine ducts, and it has important roles in development and differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：歯科矯正学，オートファジー，鼻口蓋管

## 1. 研究開始当初の背景

鼻口蓋管とは、口蓋形成時に口蓋突起の癒合不全によって取り残される間隙であり、神経や血管が通る部位や上皮の残遺として哺乳類に認められる器官である。臨床的に鼻口蓋管は嚢胞形成の好発部位として知られて

いるが、鼻口蓋管嚢胞内には重層扁平上皮や繊毛円柱上皮、移行上皮など様々な上皮の形態が認められ、その起源は未だに不明な点が多い。(Nakano T, et al., 1988) また、鼻口蓋管上皮の分化は、口蓋や鼻腔の上皮とやや様相が異なるとの報告がある。つまり、鼻口蓋

管の発生と形成、およびその上皮の由来や分化に関してはほとんど報告がなく、未だに不明な点が多い。

一方、オートファジーとは細胞内の非選択的なタンパク分解機構であり、神経系の疾患に関与していることが知られている。

オートファジーは、その働きから飢餓栄養や感染防御の機能を有している。またその他、プログラム細胞死に関与しているとされており、発生過程において重要な役割を担っていることが明らかにされている。

しかし、国内外において今までオートファジーと鼻口蓋管の器官形成や上皮の分化との関連についての検討はなされていない。

このことから本研究は、鼻口蓋管の発生におけるオートファジーの関与の有無および関与している場合の役割を解明することを目的として行った。

## 2. 研究の目的

本研究の前に行った実験で、オートファジーを可視化する GFP-LC3 トランスジェニックマウスを用い、胎仔の口蓋の癒合部および鼻口蓋管でオートファジーが生じることを確認したことから、本研究では口蓋突起から器官形成される鼻口蓋管に対してオートファジーが関与している可能性に着目した。

また、鼻口蓋管の形成・分化については明らかにされていない部分が多いことから、本研究では、以下の点を解明することを目的に実験を行った。

- (1) 鼻口蓋管の形成および上皮の分化における形態学的特徴の把握
- (2) オートファジーの鼻口蓋管における発現部位の特定
- (3) *Atg5*<sup>-/-</sup>マウスの鼻口蓋管上皮内の細胞死の同定
- (4) *Atg5*<sup>+/+</sup>および *Atg5*<sup>-/-</sup>マウスの鼻口蓋管上皮において変動を認める発現遺伝子の特定

## 3. 研究の方法

上記目的に対し、以下の実験方法を用いた。

### (1) 鼻口蓋管の形成および上皮の分化における形態学的特徴の把握

①正常マウスの鼻口蓋管の形成および上皮の分化を確認するために、ICR マウスを用いて実験を行った。ICR マウスの胎生 14 日目、15 日目、16 日目、17 日目の胎仔および、出生後 0 日目、1 日目、2 日目、5 日目、10 日目、15 日目、20 日目の幼若マウスから、口蓋組織を採取した。口蓋組織は 4%PFA にて固定後、規定の手順で脱水を行い、パラフィン包埋を行った。

包埋した口蓋組織から 7μm の厚さの組織切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、鼻口蓋管の形態学的特徴およびその

変化を光学顕微鏡にて確認した。

②オートファジーの鼻口蓋管における関連を組織学的に確認するため、オートファジーの機能を欠失させた *Atg5*<sup>-/-</sup>マウスの鼻口蓋管が形成された 17 日目の胎仔において①と同様の手法で染色を行い、光学顕微鏡にて鼻口蓋管部を確認した。

### (2) オートファジーの鼻口蓋管における発現部位の特定

オートファジーの鼻口蓋管における発現部位を確認するため、オートファジーを可視化できる GFP-LC3 マウスを用いた。

GFP-LC3 マウス胎仔口蓋組織周辺を採取し、4%PFA にて固定後、10%、20%、30%のスクロース置換を行い、tissue tek に包埋した。

包埋した口蓋組織から 20μm の厚さの組織切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、オートファジーの特異的発現部位を確認した。

### (3) 正常マウスおよび *Atg5*<sup>-/-</sup>マウスの鼻口蓋管上皮内の細胞死の同定

鼻口蓋管形成時の細胞死がオートファジーによるものかを確認するため、胎生 17 日目の正常マウスおよび *Atg5*<sup>-/-</sup>マウスから口蓋組織を採取し、(2)と同様の方法で 7μm の凍結切片を作成し、Tunel 染色を行い鼻口蓋管部におけるアポトーシス細胞死の有無を確認した。

### (4) 正常マウスおよび *Atg5*<sup>+/+</sup>、*Atg5*<sup>-/-</sup>マウスの鼻口蓋管上皮において変動を認める発現遺伝子の特定

①鼻口蓋管の形成および分化時の発現遺伝子の変化について解析するため、ICR マウスの胎生 15 日目、17 日目、生後 2 日目の口蓋組織を採取し、4%PFA で固定後、tissue tek に包埋した。

包埋した組織から 20μm の厚さの組織切片を作成し、酢酸固定を行った後、トルイジンブルーで染色後、レーザーマイクロダイセクションを用いて鼻口蓋管周囲の組織を採取し、マイクロアレイ解析を用いて遺伝子発現を確認した。

②*Atg5*<sup>+/+</sup>、*Atg5*<sup>-/-</sup>マウスの鼻口蓋管の形成および分化時の発現遺伝子の相違について解析するため、胎生 17 日目の口蓋組織を採取し、①と同様の方法を用いて、マイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現の相違を確認した。

#### 4. 研究成果

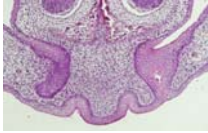
それぞれの実験結果を以下に示す。

##### (1) 鼻口蓋管の形成および上皮の分化における形態学的特徴の把握

###### ① 正常マウスの形態学的特徴について

###### a. 胎生 15 日目

###### 構成する細胞の特徴



口腔粘膜上皮は重層扁平上皮であり有棘層が薄く顆粒層が認められ、角化が始まっているが、鼻口蓋管部との境目はわかりにくい状態であった。鼻口蓋管粘膜は、重層扁平上皮であり有棘層が多いが、角化はほとんど認められなかった。

鼻腔粘膜は単層円柱上皮であり、境目ははっきりしていた。

###### 組織形態の特徴

前頭断にて一次口蓋の垂直的な高さが短い状態であった。duct 様構造はほとんど認められず、一次口蓋と二次口蓋の間隙は上皮細胞が、特に有棘層が多く存在していた。

###### b. 胎生 16 日目

###### 構成する細胞の特徴

口腔粘膜上皮は有棘層がさらに減少し、顆粒層が増加していた。一部は角化しており、ケラトヒアリンが口腔側を覆っていた。鼻口蓋管粘膜は、有棘層は口腔粘膜より多いが胎生 15 日目より減少しており、顆粒層が出現し、一部角化が始まりケラトヒアリンも少量存在した。腹側は有棘層が厚く、背側ほど角化が多く有棘層が薄くなる傾向があった。鼻腔側は単層円柱上皮で線毛も認められた。境目はやや曖昧で、単層円柱上皮の一部に有棘細胞を認めた。

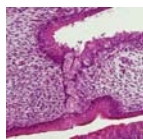
###### 組織形態の特徴

一次口蓋部の壁が増え垂直的な高さが増す分、鼻口蓋管の長さは長くなっていた。duct 様構造が一部認められ始める。腹側から背側の距離は胎生 15 日目とあまり変わらなかった。

###### c. 胎生 17 日目

###### 構成する細胞の特徴

口腔粘膜上皮は口腔粘膜壁の部分に有棘層を認めるが、多くは顆粒層もしくは角化層で構成され、扁平な細胞およびケラトヒアリンが増加していた。鼻口蓋管粘膜は有棘層 4, 5 層程度から成り、顆粒層が増加している。duct 様構造部では角化が進みケラトヒアリンが増加していた。一部切片に味蕾細胞が存在した。



###### 組織形態の特徴

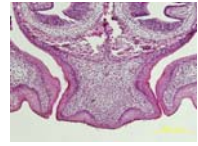
口蓋の腹側から背側の距離が増加し、前後的な鼻口蓋管の長さは胎生 15, 16 日目より長

くなっていた。Duct 様構造部が増加していた。

###### d. 生後 0 日目

###### 構成する細胞の特徴

口腔粘膜上皮は角化が進んでいるが、大きな変化は認められなかった。鼻口蓋管粘膜に有棘層は多いが、胎生期より減少し、顆粒層が増加し角化が進んでいた。Duct 様構造部ではケラトヒアリンが増加し厚みがあった。鼻腔側付近には有棘層はほとんど存在せず、角化層から単層円柱上皮に移行していた。



###### 組織形態の特徴

前後的な鼻口蓋管はさらに長くなり、Duct 様構造部が増加していた。二次口蓋の形態が細く変化していた。

###### e. 生後 1 日目

###### 構成する細胞の特徴

細胞の厚み、性状などは生後 0 日目と比べ大きな変化は認められなかった。

###### 組織形態の特徴

2 次口蓋の壁の部分の切れ込みが深くなっていた。形態に大きな変化は認められなかった。

###### f. 生後 2 日目

###### 構成する細胞の特徴

腹側の構成は生後 1 日目とほぼ変わらないが、背側 2/3 では、上皮の厚みが薄くなり、有棘層が減少し、角化が進んでいた。

背側 2/3 では上皮の厚みが薄くなっていた。

###### 組織形態の特徴

形態に大きな変化は認められなかった。

###### g. 生後 5 日目

構成する細胞の特徴 角化は生後 2 日目よりさらに進み、上皮は薄くなっていた。

###### 組織形態の特徴

形態に大きな変化は認められなかった。

###### h. 生後 10, 15, 20 日目

###### 構成する細胞の特徴

有棘層、顆粒層ともに薄く、角化が著しい。口蓋粘膜と大きな差は認められなかった。

###### 組織形態の特徴

ケラトヒアリンが多く、角化部は波打った形態をしていた。

※鼻口蓋管が形成され始める胎生 15 日目から胎生 2 日目まで上皮の分化・形態形成がなされると考えられる。口腔粘膜は外胚葉由来、鼻腔粘膜は内胚葉由来であり、分化中はそれら上皮が混在しているようである。ただし、上皮の構成は口腔粘膜に類似していること、上皮内に味蕾が存在していたことなどから

鼻口蓋管の上皮の多くは外胚葉由来と考えられた。

#### Atg5<sup>-/-</sup>マウスの形態学的特徴について 組織形態の特徴

基底細胞層は正常であるが、有棘層が薄く、角化した部分の多くが分離している状態であった。

#### (2) オートファジーの鼻口蓋管における発現部位の特定

オートファジーを可視化した GFP-LC3 マウスにおいて、鼻口蓋管の上皮部およびその表層に剥離している細胞のみに特異的にオートファジーの発現を認めた。

#### (3) 正常マウスおよび Atg5<sup>-/-</sup>マウスの鼻口蓋管上皮内の細胞死の同定

鼻口蓋管の形態形成時、上皮にオートファジーを特異的に認めたが、オートファジーとアポトーシスの関連を確認するため胎生 17 日目の正常マウスおよび Atg5<sup>-/-</sup>マウス切片を TUNEL 染色で確認したが特異的な発現は認められず、アポトーシスが関連する可能性は低いと考えられた。

#### (4) 正常マウスおよび Atg5<sup>+/+</sup>, Atg5<sup>-/-</sup>マウスの鼻口蓋管上皮において変動を認める発現遺伝子の特定

①、②ともにマイクロアレイによる遺伝子発現の変化および部位特異性については現在確認中である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Periderm cells covering palatal shelves have tight junctions and their desquamation reduces the polarity of palatal shelf epithelial cells in palatogenesis. Yoshida M, Shimono Y, Togashi H, Matsuzaki K, Miyoshi J, Mizoguchi A, Komori T, Takai Y. Genes Cells. 査読あり, 2012 Jun;17(6):455-472.  
DOI: 10.1111/j.1365-2443.2012.01601.x.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松崎 聖美 (MATSUZAKI KIYOMI)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 00551920