

氏 名 やま だ たか はら さち こ  
山田(高原) 祥子  
学位の種類 博 士 (医 学)  
学位記番号 論医博第 1862 号  
学位授与の日付 平成 16 年 3 月 23 日  
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
学位論文題目 Programmed cell death is not a necessary prerequisite for fusion of  
the fetal mouse palate  
(プログラム細胞死はマウス胎児の口蓋癒合に必須ではない)

論文調査委員 (主査) 教授 鈴木茂彦 教授 飯塚忠彦 教授 塩田浩平

### 論 文 内 容 の 要 旨

個体発生において、臓器や組織が正常に発生するためには、細胞の増殖、分化と同時に、一部の細胞が死滅することが必要であり、このような生理的な細胞死は、「プログラム細胞死 (programmed cell death; PCD)」と呼ばれる。いわゆる PCD の本体はアポトーシスである。二次口蓋癒合過程では、口蓋突起内側縁上皮 (medial edge epithelium: MEE) 細胞が死滅することが知られており、これは PCD の代表例とされる。しかし、口蓋形成過程における PCD の発現時期や意義については議論があり、一定の結論をみていない。MEE 部の運命については 1) PCD による除去の他に、2) 上皮から間葉への分化転換 (epithelial-mesenchymal transformation; EMT), 3) 遊走 (migration) による鼻腔上皮または口腔上皮への分化、を示唆する報告が見られる。

本研究においては口蓋突起の癒合における PCD の役割を調べるため、胎齢 13 日のマウス胎児の上顎部分を切り出し、浮遊回転培養法を用いた器官培養を行った。この培地に caspase-1 に対する阻害剤 YVAD-CHO と caspase-3 に対する阻害剤 DEVD-CHO, 及び caspase-activated Dnase の阻害剤 aurintricarboxylic acid (ATA) を添加して PCD を抑制し、口蓋の癒合に対するそれらの影響を調べた。対照は 92% の肉眼的癒合率を示した。YVAD-CHO, DEVD-CHO 添加の培養条件群では癒合率 91-95% で有意差は認めらなかった。

口蓋の癒合過程を組織学的に、接触前 (pre-contact), 接触 (contact), 癒合 (adhesion), 上皮縫線の断裂 (seam disruption), 間葉の交通 (mesenchymal confluence) の 5 つの段階に分けて解析した。組織的癒合率は、対照 92% に比べ、実験群 80-86% とやや低下したが、有意の差はなかった。各群の培養口蓋について、それぞれの段階の標本を、アポトーシスを検出する TUNEL 法と上皮細胞骨格の Keratin または基底膜構成成分の Type IV collagen との二重染色を施して調べた。培養時間の経過と共に、左右口蓋突起の接着、癒合が起こり、接着部に形成される上皮縫線の菲薄化・断裂, epithelial island の形成と消失, ならびに鼻腔側および口腔側への上皮の遊走が起こり、左右口蓋突起の癒合が完了した。この組織学的変化は、対照群と実験群の間で差がなかったが、実験群では各段階を通して TUNEL 陽性細胞がほぼ完全に抑制されていた。MEE 全体の細胞数に対する TUNEL 陽性細胞は対照群で 7.9-16.1%, 実験群で 0.2-0.9% であった。すなわち、阻害剤によって PCD が抑制されても、口蓋の癒合過程は正常に進行することが証明された。

以上の結果から、口蓋突起の接着、癒合、癒合部上皮の消失は、「プログラム細胞死」に依存していないことが明らかになった。このことから in vivo で口蓋形成時に観察される細胞死は口蓋の癒合に際して不可欠な現象ではなく、必ずしも「プログラム」されたものではないと言える。むしろ EMT や遊走をうまく行えなかった細胞を効率的に除去するのに関与しているのであろうと考えられた。

本研究の結果は、口蓋形成における細胞死の意義を解明し、発生におけるプログラム細胞死に関する教科書的な概念の一部を覆す新しい知見である。

## 論文審査の結果の要旨

口蓋形成時に観察される細胞死はプログラム細胞死（PCD）の代表例とされるが、その意義については議論がある。本研究では、口蓋突起の癒合における細胞死の役割を調べるため、浮遊回転培養法によるマウス胎児口蓋の器官培養を行い、caspase-1および-3、caspase-activated DNaseの阻害剤を添加して培養体の細胞死を抑制し、口蓋形成に対する影響を調べた。口蓋の癒合率は、肉眼的、組織学的ともに、対照群との間に有意の差は見られなかった。各群の標本について、TUNEL法で細胞死を、keratinおよびtypeIV collagenに対する二重免疫染色で上皮の消長を経時的に調べた。実験群では口蓋組織の細胞死がほぼ完全に抑制されていたが、口蓋突起の接着、上皮縫線の形成と消失など、口蓋形成過程の変化は正常に進行した。以上の結果から、口蓋突起の接着、癒合、癒合部上皮の消失はPCDに依存していないことが明らかになった。in vivoで口蓋形成時に観察される細胞死は口蓋形成に不可欠の現象ではなく、形質変換や遊走を適切に行えなかった細胞を効率的に除去するのに関与していると考えられた。これは、口蓋形成における細胞死の意義を明らかにし、発生におけるPCDに関する古典的な概念の一部を覆す新しい知見である。

以上の研究は口蓋の正常及び異常発生機序の解明に貢献し、発生学に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成16年3月2日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。