

氏 名	たき がわ とし や 滝 川 俊 也
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1871 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Terminal differentiation of palatal medial edge epithelial cells in vitro is not necessarily dependent on palatal shelf contact and midline epithelial seam formation. (in vitro における口蓋突起内側縁上皮の最終分化は口蓋突起の接触や正中部上皮性縫合の形成に必ずしも依存しない)
論文調査委員	(主 査) 教 授 鈴 木 茂 彦 教 授 伊 藤 壽 一 教 授 瀬 原 淳 子

論 文 内 容 の 要 旨

哺乳類の口蓋は、胎児期に上顎から発生する左右一対の口蓋突起が正中部で癒合することにより形成される。この口蓋突起癒合過程では、左右の口蓋突起先端の内側縁上皮細胞が正中部で互いに接着して上皮性縫合を形成した後、最終分化することにより消失すると考えられている。内側縁上皮細胞の最終分化として、プログラム細胞死、間葉細胞へのトランスフォーメーション、および鼻腔上皮または口腔上皮側への移動と分化という、3つの説がこれまでに提唱され、内側縁上皮細胞の運命に関する論争が長い間続いている。また一方、上皮性縫合を形成しなければ、内側縁上皮細胞の最終分化は決して起こらないと広く信じられており、これを裏付けるように、ヒトおよびマウスの口蓋裂において口蓋突起内側縁上皮が消失していたという症例は存在しない。

本研究では、以上の仮説を検証するために、異なる器官培養方法および培養条件、さらに子宮内環境が口蓋突起内側縁上皮細胞の最終分化に与える影響を *in vitro* 実験系を用いて検討した。

胎齢14日のマウス胎児を用いて、単一口蓋突起培養体(片側の口蓋突起を取り除いた上顎部分)を作成し、静置培養法と回転浮遊培養法に2種類の混合ガス(95% O₂/5% CO₂, 95% Air/5% CO₂)を組み合わせた4種類の培養系を使って培養して、走査型電子顕微鏡による細胞形態変化の観察と免疫組織染色、組織化学染色による細胞分化、細胞死、基底膜の分解についての組織学的解析を行った。その結果、単一口蓋突起を95% O₂/5% CO₂を用いた回転浮遊培養法で36時間培養することにより、内側縁上皮細胞は100%の再現性をもって口蓋突起先端から消失した。一方、95% Air/5% CO₂を用いた静置培養法では内側縁上皮細胞の消失はほとんど認められなかった。さらに、この高濃度酸素を用いた回転浮遊培養における内側縁上皮細胞の消失過程を経時的に観察した結果、アポトーシス、間葉細胞へのトランスフォーメーション、鼻腔上皮または口腔上皮側への移動と分化のいずれもが内側縁上皮の消失に関わっていることが判明した。また、子宮内環境を *in vitro* で再現するために、マウスまたはヒトの羊水を加えた培養液で口蓋突起を培養し同様に解析した結果、羊水は口蓋突起の癒合を妨げないが、上皮性縫合が形成されない場合、内側縁上皮細胞の最終分化を抑制して、その消失を妨げることが明らかとなった。以上の結果により、本研究は口蓋突起内側縁上皮細胞の最終分化能力を *in vitro* で明瞭に示すとともに、子宮内では内側縁上皮細胞の最終分化が羊水の影響を強く受けていることを初めて示唆したものである。

口蓋裂は、ヒトの頭蓋顔面部の先天奇形としては唇裂に次いで発生頻度が高く、実験動物(特にマウス、ラット)でも種々の催奇形性因子や遺伝子異常によって頻発するが、その成因や発症メカニズムの解明はまだまだ不十分である。本研究により確立された高濃度酸素と無血清培養液による単一口蓋突起回転浮遊培養法は、口蓋形態形成の発生生物学的研究および口蓋裂発症機構の解明のためにきわめて有用であると考えられる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

哺乳類胎児の口蓋突起癒合過程では、左右一対の口蓋突起の内側縁上皮(medial edge epithelium; MEE)細胞が上皮性

縫合を形成した後、MEE細胞が消失するが、MEE細胞の運命に関して論争が続いている。また、上皮性縫合を形成しなければMEE細胞の最終分化は起こらないと広く信じられてきた。

本研究では、胎齢14日のマウス胎児の単一口蓋突起の器官培養を用いて、種々の培養条件がMEE細胞の最終分化に与える影響を走査型電子顕微鏡と組織学的解析により検討した。その結果、高濃度の酸素を用いた回転浮遊培養法で培養することにより、MEE細胞は上皮性縫合を形成しなくても口蓋突起内側縁から消失することが明らかになった。さらに、このMEE細胞の消失過程を経時的に観察した結果、アポトーシス、間葉細胞へのトランスフォーメーション、鼻腔および口腔上皮側への遊走のいずれもがMEE細胞の消失に関わっていることが判明した。次に、マウスおよびヒトの口蓋裂ではMEE細胞が消失する例がないことから、*in vitro*で子宮内環境を再現するためマウスまたはヒトの羊水を加えた培養液で口蓋突起を培養した。その結果、羊水は対になった口蓋突起の癒合を妨げなかったが、単一口蓋突起培養群のMEE細胞の最終分化を抑制した。これらの実験により、子宮内では口蓋突起の接触と上皮性縫合の形成がMEE細胞の最終分化に必須であることが示された。

以上の研究は、口蓋形成メカニズムの解明に貢献し、正常および異常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17年1月12日実施の論文内容とそれに関連した研究分野ならびに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。