

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

佐久間 千里

論文題目

TCDD 投与マウスにおける口蓋癒合後の離開による口蓋裂発生機序に関する組織学的研究および免疫組織学的研究

I. 緒言

口唇口蓋裂はヒトの先天異常疾患において最も多く発生する外表先天異常であり、日本人における発生頻度は約 500～600 人に 1 人と報告されている。口唇口蓋裂のうち口蓋裂の発生頻度は約 30%とされているが、その発生機序の詳細については明らかにされていない点が多い。

口蓋裂の発生機序としては、一般的に左右の口蓋突起の挙上障害により口蓋裂が発生する機序、口蓋突起は挙上したものの左右の口蓋突起が十分に移動せず接触できないため口蓋裂が発生する機序、左右の口蓋突起が接触したにも関わらず癒合に至らないことで口蓋裂が発生する機序が知られているが、口蓋癒合後に何らかの原因で口蓋が離開することにより口蓋裂が発生する機序があると想定されるが十分な証明はされていませんでした。そこで、環境的汚染物質の一つとされる

2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) の催奇形性に着目して口蓋癒合後に離開する現象の研究を立案した。

当研究室では、これまで葉酸摂取や貧血改善による口蓋裂発症予防方法の確立を行ってきた。一方で、口蓋裂モデルマウスの作製を行っており、TCDD への暴露と口蓋裂の発生について、臨界濃度の TCDD を投与した妊娠マウスから胎生 18 日に胎仔を取り出すと 100%口蓋裂が発生していたが、胎生 14、15、16 日に胎仔を取り出した場合はそれぞれ 4%、17%、13%の胎仔で口蓋の癒合が認められたことから、口蓋癒合後に口蓋突起が離開したことに

より口蓋裂が発生する場合があることを報告してきた。ヒト胎児においても同様の口蓋裂発症機序が報告されており、口蓋癒合後に口蓋が離開して口蓋裂の発生に至る機序を明らかにすることは口蓋裂発症原因を知る上で重要であると考えた。

本研究では、口蓋形成期の TCDD への暴露により口蓋組織構造に異常が生じることによって一度癒合した口蓋の離開に関与しているとの仮説を立て、その現象について証明するための実験を行った。

II. 材料および方法

8-10 週齢の ICR 系雌マウスを同系の雄マウスと交配させ、翌朝腭腺形成が確認できたものを胎生 1 日とした。胎生 12 日に、対照群にはトルエン含有オリーブ油 0.4ml、TCDD 投与群には口蓋裂を 100% 発症する濃度の TCDD40 μ g/kg をトルエン含有オリーブ油 0.4ml に溶解し、単回経口投与した。対照群は胎生 14 日、TCDD 投与群は胎生 15 日に胎仔を摘出した。

TCDD 投与群は実体顕微鏡下に前方の口蓋の癒合および後方の口蓋の離開を認めたマウス胎仔 38 個体の頭部前頭断切片を作製し、対照群は 4 個体のマウス胎仔前頭断切片を作製した。H-E 染色および免疫組織染色を通法に従って行い、口蓋形成期の口蓋癒合部および離開部の組織を観察し、対照群と TCDD 投与群で比較検討した。

III. 結果

1) 組織学的観察

H-E 染色にて、対照群では口蓋は前方から後方まで癒合しており、口蓋棚の正中部には上皮索を認めた。TCDD 投与群では、15 個体において口蓋前方の癒合および後方の離開が組織学的に確認された。

TCDD 投与群では対照群と比べて鼻腔側粘膜下の細胞密度が疎になっていた。また、口蓋後方部において、口腔側からの口蓋の離開を認めた。

2) 上皮および上皮細胞間接着因子、基底膜の観察

対照群の前方と後方の口蓋では、鼻腔側および口腔側粘膜、上皮索において、E-cadherin は上皮細胞に陽性を示し、laminin は連続的な染色像を認めた。

TCDD 投与群の前方の口蓋癒合部では、鼻腔側および口腔側粘膜、上皮索において E-cadherin は上皮細胞に陽性を示し、鼻腔側粘膜および上皮索において laminin は連続的な染色像を認めたが、口腔側粘膜では不連続な染色像を認めた。後方の口蓋離開部では、口腔側粘膜に離開を認め、laminin は口腔側粘膜において不連続な染色像を認め、同部の上皮細胞は E-cadherin 陰性であった。また、口蓋離開部付近の上皮索において E-cadherin は上皮細胞に陽性を示し、laminin の染色像を認めた。

また、対照群について、前方および後方の口蓋部では、鼻腔側および口腔側粘膜、上皮索において β -catenin、 α -catenin は上皮細胞に陽性を示した。

TCDD 投与群について、前方の口蓋癒合部では、 β -catenin、 α -catenin

の局在は対照群と同様であった。後方の口蓋離開部では、鼻腔側および口腔側粘膜、口蓋離開部付近の上皮索において β -catenin、 α -cateninは上皮細胞に陽性を示した。

3) アポトーシスの観察

対照群では、前方および後方の口蓋において上皮索に TUNEL 陽性細胞を認めた。

TCDD 投与群では、前方の口蓋癒合部において上皮索に TUNEL 陽性細胞を認め、後方の口蓋離開部では、離開部周囲に TUNEL 陽性細胞を認めた。

4) 細胞増殖の観察

対照群では、前方の口蓋において鼻腔側および口腔側粘膜、上皮索周囲に Ki67 陽性細胞を認め、後方の口蓋において口蓋棚全体に Ki67 陽性細胞を認めた。

TCDD 投与群では、前方の口蓋癒合部において鼻腔側および口腔側粘膜、上皮索周囲に Ki67 陽性細胞を認め、後方の口蓋離開部において離開部周囲に Ki67 陽性細胞を認めた。

IV. 考察

内分泌攪乱物質である TCDD は様々な生体毒性を生じることが知られている。特に、組織に生じる発生毒性として胎生期の TCDD 暴露により水腎症や口蓋裂などがあり、また、細胞に生じる発生毒性として上皮の異形成があるとされている。ダイオキシン類の様々な毒性発現に共通する機序として

は芳香族炭化水素受容体 (AhR) への結合が指摘されており、胎生期の TCDD 暴露による口蓋裂の発症にも AhR の存在が重要であると考えられている。

これまで報告されていた TCDD による口蓋裂の発生機序として、左右の口蓋突起が接触しない場合、左右の口蓋突起は接触するものの癒合に至らない場合、口蓋癒合後に離開する等の機序がある。本研究においては、15 個体の TCDD 投与マウス胎仔に口蓋前方の癒合および後方の離開を認め、口蓋癒合後の離開により口蓋裂を発生するという口蓋裂発生機序の再現性が確認された。一方、遺伝的要因による口蓋裂の研究においても本研究と同様の口蓋癒合後の離開による口蓋裂発生機序が報告されており、TCDD 以外の要因でも口蓋癒合後の離開現象により口蓋裂が発生する場合があると考えられた。

左右の口蓋突起が接触後に癒合する際には、上皮索において上皮間葉転換 (EMT) やアポトーシスを生じているとされている。本研究において、TCDD 投与群の前方の口蓋で正中部の上皮索に上皮細胞間接着因子の発現を認め、同部では TUNEL 陽性細胞が認められたことから、口蓋の癒合に伴うアポトーシスを生じていると考えられ、口蓋は癒合途中であるといえた。また、後方の口蓋において離開部付近の上皮索においても同様の所見が認められたことから、口蓋は癒合途中であると考えられ、口蓋癒合中に離開に至っていることが確認された。

TCDD 投与マウスでは、加速度的な細胞増殖が関与して上皮索の細胞の分

化を阻害することにより口蓋裂を発生する可能性が報告されており、本研究において、TCDD 投与群では後方の口蓋離開部周囲に細胞増殖を認めたことから、異常な細胞増殖が生じることにより口蓋癒合中に上皮索細胞の分化が阻害され、口蓋の離開が生じる可能性が示唆された。

癒合している組織が断裂する現象としては、がんの浸潤・転移が知られており、がん細胞が他の組織へ移動する際には、基底膜の破壊を伴うとされている。基底膜はラミニン、IV型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチン、パールカンなどの細胞外マトリックスから構成されている。がんが転移に至る過程において、この細胞外マトリックスがマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) によって分解される。報告されているヒトの MMP は 20 種類以上あり、特に MMP-2、MMP-9 が基底膜の断裂および消失に関与しており、MMP-2 や MMP-9 によって基底膜が消失し、がん細胞の移動が促進されるとの報告がある。

本研究において、TCDD 投与群の口蓋離開部を含む口蓋粘膜で上皮および基底膜の断裂を認めたことから、口蓋癒合後の離開による口蓋裂の発生原因の一つには基底膜構造の異常があると考えられ、マトリックスプロテアーゼである MMP-2 や MMP-9 などの関与についても今後調べることが重要であると考えられた。

TCDD により上皮組織の脆弱性を生じることが報告されている。TCDD 投与群の前方の口蓋癒合部において、鼻腔側粘膜で上皮細胞間接着因子である

β -catenin、 α -catenin の消失を認めたことから、口蓋癒合後の鼻腔側粘膜においても上皮組織の異常を生じている可能性が示唆された。また、細胞間接着因子である E-cadherin は代表的な上皮マーカーとされており、本研究において、TCDD 投与群の口腔側粘膜の基底膜の断裂を認めた部位では、E-cadherin の消失を認めたことから、TCDD 投与群では基底膜の断裂とともに上皮細胞間接着の低下を生じることにより上皮組織の強度が不足した結果、一度癒合した口蓋が離開すると考えられた。TCDD 投与群の口蓋において確認された基底膜および上皮の消失から、癒合後の口蓋が離開する機序は、がんの転移に似た機序である可能性が考えられた。

従来、口蓋形成時に左右の口蓋突起が癒合に至らないことで口蓋裂を発症するという説が一般的であり、口蓋が癒合しない原因について様々な研究が行われてきたものの、疾患の予防には至っていない。一方、本研究は一度癒合した口蓋が離開に転じることによって口蓋裂を発症する場合があることを示しており、新たながんの転移に類似した口蓋裂の発生機序の一つとして口蓋癒合後の離開による口蓋裂の発症機序を解明することにより、口蓋の離開を阻止する要素が発見される可能性が考えられ、新たな口蓋裂発症の予防法の確立につながることを期待された。

V. まとめ

口蓋裂を 100%発症する濃度の TCDD に暴露された口蓋癒合期のマウス胎仔では、複数の個体において口蓋癒合途中で離開に転じていることが確認

された。

TCDD 投与マウスにおいて口蓋癒合後の離開による口蓋裂の発症機序として、異常な細胞増殖により口蓋の離開を生じるがんの転移に類似した機序がある可能性が考えられた。

この一度癒合した口蓋が離開に転じるという口蓋裂発症機序を解明することにより、離開を阻止することで新たな口蓋裂発症の予防法の確立につながることを期待された。