

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 号	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奇形である。口唇口蓋裂の日本人における発生頻度は約 500~600 人に 1 人と報告されており¹⁻³⁾、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^{4, 5)}。しかしながら、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。

ヒトの口蓋の発生⁶⁾は、胎生 6 週頃に口蓋の前駆体である口蓋突起が舌の両側に形成され、さらに、左右の口蓋突起は下方に伸長していき、胎生 8 週頃に舌が下方へ移動するとともに左右の口蓋突起は挙上して舌の上方で水平位をとる。水平位となった左右の口蓋突起は互いに正中に向かって伸長し、胎生 10 週頃に正中で接触する。正中の接触部において両側の口蓋突起は上皮索を形成し、癒合を開始する。胎生 12 週頃には上皮細胞のアポトーシスにより上皮索が消失することで口蓋の癒合が完了し、口蓋が形成される。口蓋の発生段階のどこかで異常が生じることによって口蓋裂が発生すると考えられている。口蓋裂の発生機序としては、左右の口蓋突起が挙上せず水平転位が起こらないことにより口蓋裂が発生する機序⁷⁾、口蓋突起は挙上したものの水平方向に成長せず口蓋突起が接触しないことにより口蓋裂を発生する機序⁸⁾、口蓋突起の水平転位および水平方向の成長により左右の口蓋突起が接触した後に癒合せずに口蓋裂が発生する機序^{9, 10)}、口蓋突起が癒合した後に口蓋が離開することにより口蓋裂が発生する機序^{11, 12)}があると考えられている。また、口蓋裂の発生要因としては、*TGFβ*、*MSX1*、*TBX22*、*IRF6*、*MEOX2*、*Hoxc* などの遺伝子変異による遺伝的要因¹³⁻¹⁶⁾と、アルコール、タバコ、妊婦の肥満、2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) やビタミン A 等の化学物質への暴露などといった環境的要因^{17, 18)}が影響し合い、一定のしきいを超えると発生するという「多因子しきい説」が有力視されている。環境的要因の原因となる TCDD は環境汚染物質であるダイオキシン類の一種で、ダイオキシン類の中で最強毒性を有するとされており、マウス実験により TCDD の催奇形性として水腎症および口蓋裂の発症が報告されている¹⁹⁾。

これまで当研究室では、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²⁰⁻²²⁾。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、Yamada ら²³⁾は、胎仔口蓋形成期の妊娠マウスに臨界濃度の TCDD を投与すると 100%の胎仔に口蓋裂が発生したと報告している。さらに、Imura ら²⁴⁾は、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%口蓋裂を発生していたが、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可能性があることを報告している。Kitamura¹¹⁾の研究において、癒合した組織が離開したことを示した報告がある。Kitamura¹¹⁾は、中絶した 500 例のヒト胎児の口唇および口蓋組織を観察したところ 80 例に口唇・口蓋裂胎児を認め、口蓋裂胎児では口蓋突起先端付近の口蓋組織に上皮真珠が存在しており、この上皮真珠は一度癒合した口蓋が離開して口蓋裂を発症したために形成されたと報告している。従って、ヒト胎児においても起こっている現象であることから、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られる。

本研究では、口蓋癒合後の離開について、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、その異常が一旦癒合した口蓋の離開に関与しているのではないかという仮説を立て、実験を行ったので報告する。

II. 材料および方法

1) 実験動物および胎仔摘出

8-10週齢のICR系雌マウス(CLEA, Tokyo, Japan)を購入し、室温 $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、定期的な12時間ごとの明暗サイクル下、標準固形試料と飲料水を制限なく摂取できる環境で飼育した。未経産雌マウスを同系の成熟雄マウスと終夜交配させ、翌朝膈栓形成が確認できたものを、当日の午前0時に妊娠したと想定し、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%発症する濃度である $40 \mu\text{g}/\text{kg}$ のTCDD(Accu Standard Inc., New Haven, CT, USA)をトルエン含有オリーブ油0.4mlに溶解し、それぞれ胃管にて単回経口投与した。口蓋形成期の口蓋部の観察を行うため、帝王切開により摘出した胎仔を使用した。TCDD投与群は先行研究²¹⁾において最も高い頻度で口蓋が癒合していた胎生15日にマウス胎仔を摘出し、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胎仔を38個体使用した。TCDD投与群は対照群に比べ口蓋形成期のステージが約1日遅れることから²⁵⁾、対照群は胎生14日のマウス胎仔4個体を使用した。

2) 組織固定および切片作製

摘出した胎仔頭部を4%パラホルムアルデヒド(PFA)0.1Mリン酸緩衝液(PBS)溶液(pH7.4)を用いて、24時間浸漬固定を行った。上昇エタノール系列及びキシレンによる脱水・脱脂処理後、パラフィン包埋した。回転式マイクロトームを用いて、厚さ $6 \mu\text{m}$ の胎仔頭部前頭断切片を作製した。

3) 組織学的観察

胎仔口蓋部前頭断切片を用いてHematoxylin-Eosin(H-E)染色を行い、口蓋形成期の口蓋を前方から後方にかけて観察し、対照群とTCDD投与群との比較を行った。

4) 免疫組織学的観察

(1) 蛍光免疫組織染色による上皮組織、上皮細胞間接着因子および基底膜組織の観察

一次抗体は、マウス・モノクローナル抗E-cadherin抗体(ab76055, Abcam, Cambridge, UK)、ウサギ・ポリクローナル抗laminin抗体(L9393, Sigma, St. Louis, MO, USA)を使用した。抗E-cadherin抗体は上皮組織および上皮細胞間接着因子の観察、抗laminin抗体は基底膜組織の観察をするために用いた。

胎仔口蓋部前頭断切片を脱パラフィン後、沸騰したクエン酸緩衝液(pH7.0)の中でマイクロウェーブを5分照射し、抗原賦活化処理を行い、 $15,000\text{U}/\text{ml}$ ヒアルロニダーゼ(H0164, 東京化成工業、東京)/0.01Mリン酸緩衝液(PBS)を用いて 37°C 、30分でヒアルロニダーゼ処理を行った。5%ブロッカー(UKB80, DS Pharma Biomedical, 大阪)で2時間ブロッキングを行い、予備実験により最適化した濃度に希釈した一次抗体の混合溶液に浸漬して室温で1時間振盪し、さらに 4°C で一晩反応させた。翌日、二次抗体を室温で2時間反応させ、洗浄後に封入し、口蓋前方から後方にかけて観察を行った。二次抗体は、Goat anti-Mouse IgG (H+L);Alexa Fluor 488(A-11029, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、Goat anti-Rabbit IgG (H+L);Alexa Fluor 594(R37117, Invitrogen)を使用した。

(2) 上皮細胞間接着因子の観察

一次抗体は、ウサギ・モノクローナル抗 β -catenin抗体(ab32572, Abcam)、マウス・モノクローナル抗 α -catenin抗体(66221-1-1g, Proteintech, Rosemont, IL, USA)を使用し、口蓋前

方から後方にかけて上皮細胞間接着因子の観察を行った。

胎仔口蓋部前頭断切片を脱パラフィン後、沸騰したクエン酸緩衝液 (pH7.0) の中でマイクロウェーブを5分照射し、抗原賦活化処理を行った。5%ブロックエース (UKB80、DS Pharma Biomedical) で2時間ブロッキングを行い、予備実験により最適化した濃度に希釈した一次抗体の混合溶液に浸漬して室温で1時間振盪し、さらに4℃で一晩反応させた。翌日、一次抗体に対応した標識ポリマーを室温で30分反応させ、ペルオキシダーゼ染色キット (Nova RED Substrate Kit、SK-4800、Vector、Burlingame、CA、USA) を用いて、室温で5-10分反応させて染色した。

(3) アポトーシスの観察

胎仔口蓋部前頭断切片を脱パラフィン後、TUNEL assay kit (ab66110、Abcam) を用いて一連の操作を行い、蛍光 TUNEL 染色法を行った。核は、DAPI (D9542、Sigma) にて染色を行った。口蓋前方から後方にかけてアポトーシスの観察を行った。

(4) 細胞増殖の観察

一次抗体は、マウス・モノクローナル抗 Ki67 抗体 (RM-9106、Lab Vision、Fremont、CA、USA) を使用し、口蓋前方から後方にかけて細胞増殖の観察を行った。

胎仔口蓋部前頭断切片を脱パラフィン後、沸騰したクエン酸緩衝液 (pH7.0) の中でマイクロウェーブを5分照射し、抗原賦活化処理を行った。5%ブロックエース (UKB80、DS Pharma Biomedical) で2時間ブロッキングを行い、予備実験により最適化した濃度に希釈した一次抗体の混合溶液に浸漬して室温で1時間振盪し、さらに4℃で一晩反応させた。翌日、一次抗体に対応した標識ポリマーを室温で30分反応させ、ペルオキシダーゼ染色キット (Nova RED Substrate Kit、SK-4800、Vector) を用いて、室温で5-10分反応させて染色した。

H-E 染色、免疫組織染色を行ったすべての組織切片は、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X710、Keyence、大阪) を使用して検鏡、撮影を行った。

Ⅲ. 結果

1) 組織学的観察

対照群において H-E 染色を行ったところ、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胎仔 38 個体のうち 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、代表的な H-E 染色像を示した。

対照群では、前方の口蓋癒合部において口蓋棚全体に細胞を認めたが、TCDD 投与群では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、上皮細胞間接着因子である E-cadherin は上皮細胞に陽性を示し、基底膜の構成成分である 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、E-cadherin と複合体を形成する上皮細胞間接着因子である β -catenin、 α -catenin の局在を調べたところ、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 および 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、対照群と同様に鼻腔側および口腔側粘膜において β -catenin、 α -catenin は上皮細胞に陽性を示したが、鼻腔側粘膜正中部では陰性であった。口蓋正中部の上皮索において β -catenin、 α -catenin は上皮細胞に陽性を示した。また、後方の口蓋離開部では、鼻腔側および口腔側粘膜において β -catenin、 α -catenin は上皮細胞に陽性を示し、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、上皮索にアポトーシスが起きていることを示す 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は対照群と同様に上皮索に 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、前方の口蓋では鼻腔側および口腔側粘膜、上皮索周囲に細胞増殖マーカーである Ki67 陽性細胞を認めた。後方の口蓋では鼻腔側および口腔側粘膜、口蓋棚全体に Ki67 陽性細胞を認めた。

TCDD 投与群では、前方の口蓋癒合部では鼻腔側および口腔側粘膜、上皮索周囲に Ki67 陽性細胞を認めた。後方の口蓋離開部では離開部周囲に 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おり、急性毒性、免疫毒性、生殖毒性、発生毒性、および発がん性を有することが報告されている²⁶⁾。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¹⁹⁾、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²⁷⁾。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芳香族炭化水素受容体(AhR)への結合が指摘されており、TCDD の毒性の作用機序に関する研究では、胎生 12.5 日に特定濃度の TCDD に暴露した胎仔は 100%口蓋裂を発症したが、同濃度の TCDD を AhR ノックアウトマウスに投与したところ口蓋裂の発症がなかったことから、胎生期の TCDD 暴露による口蓋裂の発症には AhR の存在が重要であると考えられている²⁸⁾。

これまで報告されていた TCDD による口蓋裂の発生機序は、口蓋突起の水平方向への伸長不全によって口蓋突起が接触しないことにより口蓋裂を発生する機序²⁸⁾、あるいは、口蓋突起接触後に上皮索の消失が起これば接触した左右の口蓋突起が癒合しないことによって口蓋裂を発生する機序²⁹⁾、口蓋癒合後の離開によって口蓋裂を発生する機序³⁰⁾が報告されている。本研究において、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胎生 15 日のマウス

胎仔 38 個体のうち 15 個体の TCDD 投与マウス胎仔において組織学的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。さらに、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形成後の離開による口蓋裂発生機序が報告されている。Jin ら³¹⁾は、*MEOX2* 遺伝子ノックアウトマウスで口蓋裂が 35.5%に発症し、口蓋裂を発生した胎生 15.5 日の *MEOX2* mutant mouse の口蓋突起は対照群と同様に水平位であったが、口蓋突起の先端では上皮が欠落していたことから、口蓋突起が癒合した後に、口蓋が何らかのメカニズムにより再び離開したことによって口蓋裂を発生した可能性があることを報告している。この報告から、TCDD 以外の要因による口蓋裂においても口蓋癒合後の離解現象により口蓋裂が発生する可能性があると考えられる。

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細胞が極性を失うことで細胞骨格を再構築し間葉細胞の形質に転換する、いわゆる、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³²⁻³⁶⁾。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 E-cadherin、 β -catenin、 α -catenin 陽性細胞を認め、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る。また、後方の口蓋において離開部付近の上皮索に E-cadherin、 β -catenin、 α -catenin 陽性細胞を認め、口蓋離開部周囲に TUNEL 陽性細胞が認められたことから、前方の口蓋と同様に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。

Gao ら³⁷⁾は、TCDD 投与マウスにおいて、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を報告している。本研究において、TCDD 投与群では後方の口蓋離開部周囲に Ki67 陽性細胞を認めたことから、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・転移が知られている³⁸⁾。がん細胞が他の組織へ移動する際には、最初のステップとして、基底膜を複数回にわたって破壊するとされている^{39, 40)}。基底膜は上皮組織と間葉組織の間に介在しており、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、パルカンなどから構成されている^{41, 42)}。特にラミニンは細胞の接着に関与しており、細胞の転移能に関わっているとされている⁴³⁾。また、ラミニンやコラーゲンは細胞外マトリックスと呼ばれ、細胞外の空間を充填し、細胞の付着および組織の発達や構造の維持を担っている⁴⁴⁾。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^{45, 46)}、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⁴⁷⁾。

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 は上皮組織の脆弱性を生じることが報告されている⁴⁸⁻⁵⁰⁾。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。上皮細胞は細胞間接着によって上皮組織を構築しており、細胞膜上に発現している細胞間接着因

子として E-cadherin がある。E-cadherin は細胞質内の β -catenin と結合し、さらに β -catenin は α -catenin と結合しており、上皮細胞膜上でこのような三者複合体を形成して細胞間接着機能が働いて上皮の強度を保っている⁵¹⁾。また、がん細胞において E-cadherin の発現が低下すると、細胞間接着因子や細胞外マトリックスの発現が消失するとの報告がある⁵²⁾。E-cadherin は代表的な上皮マーカーとされており⁵³⁾、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^{7-10, 28, 29)}、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、今後の口蓋裂研究において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る。

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場合があ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、がんの転移に類似した機序がある可能性が考えられた。また、異常な細胞増殖が口蓋の離開を生じる要因の一つである可能性が示唆された。

口蓋裂を発症するまでの段階において一度癒合した口蓋が離開に転じる機序を解明することにより、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る。

謝 辞

本研究に対し、御指導、御助力を賜りました口腔先天異常学研究室 夏目長門特殊診療科教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究の遂行に際し、終始懇切なる御指導をいただきました口腔先天異常学研究室 井村英人講師、および、貴重な御指導、御鞭撻を賜りました口腔先天異常学遺伝学・言語学寄附講座 菅原利夫客員教授に深く感謝いたします。さらに、実験全般にわたり、日頃から御懇篤な御指導を賜りました解剖学講座 池田やよい教授に深謝いたします。

最後に、本研究を行うにあたり、御協力を賜りました口腔先天異常学研究室および解剖学講座の諸先生方に深く御礼申し上げます。

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金 基盤研究 (C) (No. 16K11772)、基盤研究 (C) (No. 16K11773) を得て行われた。

文 献

- 1) Natsume N.: Incidence of cleft lip and palate among Japanese newborns, 1982 to 1984.

- Plast Reconstr Surg, **79**(3): 499-501, 1987.
- 2) Natsume N, Kawai T, Kohama G, Teshima T, Kochi S, Ohashi Y, Enomoto S, Ishii M, Shigematsu T, Nakano Y, Matsuya T, Kogo M, Yoshimura Y, Ohishi M, Nakamura N, Katsuki T, Goto M, Shimizu M, Yanagisawa, Mimura T, Sunakawa H: Incidence of cleft lip or palate in 303738 Japanese babies born between 1994 and 1995. Br J Oral Maxillofac Surg, **38**: 605-607, 2000.
 - 3) Imura H, Suzuki S, Mizuno S, Sakuma C, Natsume N: A case of Tetrasomy 15q with left cleft lip and alveolus. J Maxillofac Oral Surg, **29**(5): 427-429, 2017.
 - 4) Nagase Y, Natsume N, Kato T, Hayakawa T: Epidemiological analysis of cleft lip and/or palate by cleft Pattern. J Maxillofac Oral Surg, **9**(4): 389-395, 2010.
 - 5) Natsume N, Imura H: Technique of primary operation for a patient with an oblique facial cleft (Tessier number 2 cleft). Br J Oral Maxillofac Surg, **55**: 428-30, 2017.
 - 6) Bush JO, Jiang R: Palatogenesis: morphogenetic and molecular mechanisms of secondary palate development. Development, **139**(2): 231-243, 2012.
 - 7) Murray SA, Oram KF, Gridley T: Multiple functions of Snail family genes during palate development in mice. Development, **134**: 1789-1797, 2007.
 - 8) Fitch N: Developmental of cleft palate in mice homozygous for the shorthair mutation. J Morph, **109**: 151-157, 1961.
 - 9) Jin JZ, Warner DR, Lu Q, Pisano MM, Greene RM, Ding J: Deciphering TGF- β 3 function in medial edge epithelium specification and fusion during mouse secondary palate development. Dev Dyn, **243**: 1536-1543, 2014.
 - 10) Pratt, R. M: Mechanisms of fetal posture and casual mechanisms of congenital deformity of the palate, mandible and limbs. J. Dent. Res, **45**: 584-596, 1966.
 - 11) Kitamura H: Epithelial remnants and pearls in the secondary palate in the human abortus: A contribution to the study of the mechanism of cleft palate formation. Cleft Palate J, **3**: 240-257, 1966.
 - 12) Kitamura H: Evidence for cleft palate as a postfusion phenomenon. Cleft Palate J, **28**(2): 195-211, 1990.
 - 13) Mijiti A, Ling W, Guli, Morning A: Association of single-nucleotide polymorphisms in the *IRF6* gene with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in the Xinjiang Uyghur population. Br J Oral Maxillofac Surg, **53**: 268-274, 2015.
 - 14) Mori A, Imura H, Suzuki S, Ono M, Hayakawa T, Minami K, Niimi T, Furukawa H, Komada M, Ikeda Y, Natsume N: Genetic analysis of *MEOX2* in Japanese non-syndromic cleft palate patients. Aichi Gakuin Dent Sci, **29**: 9-17, 2016.
 - 15) Tran DL, Imura H, Mori A, Suzuki S, Niimi T, Ono M, Sakuma C, Nakahara S, Nguyen TTH, Pham PT, Hoang V, Tran VTT, Nguyen MD, Natsume N: Association of *MEOX2* polymorphism with nonsyndromic cleft palate only in a Vietnamese population. Congenit Anom (Kyoto), **58**(4): 124-129, 2017.
 - 16) Hirata A, Katayama K, Tsuji T, Imura H, Natsume N, Sugahara T, Kunieda T,

- Nakamura H, Otsuki Y: Homeobox family Hoxc localization during murine palate formation. *Congenit Anom (Kyoto)*, **56**(4): 172-179, 2016.
- 17) Blanco R, Colombo A, Suazo J: Maternal obesity is a risk factor for orofacial clefts: a meta-analysis. *Br J Oral Maxillofac Surg*, **53**: 699-704, 2015.
- 18) Natsume N, Kawai T, Ogi N, Yoshida W: Maternal risk factors in cleft lip and palate: case control study. *Br J Oral Maxillofac Surg*, **38**: 23-25, 2000.
- 19) Couture LA, Harris MW, Birnbaum LS: Characterization of the period of sensitivity for the induction of hydronephrosis in C57BL/6N mice following exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Fundam Appl Toxicol*, **15**(1): 142-150, 1990
- 20) Furukawa H, Natsume N, Niimi T, Kawai T: CLEFT LIP AND PALATE AND CARDIOVASCULAR ANOMALIES IN THE A/J MICE. *Aichi-Gakuin Dent Sci*, **13**: 47-51, 2000.
- 21) Natsume N, Nagatsu Y, Akiyama Y, Kawai K: Influence of folic acid on pregnant women. *Br J Oral Maxillofac Surg*, **37**(5): 421-422, 1999.
- 22) Natsume N, Sugimoto S, Yoshida K, Kawai T: Influence of maternal anaemia during early pregnancy on the development of cleft palate. *Br J Oral Maxillofac Surg*, **37**(4): 330-331, 1999.
- 23) Yamada T, Mishima K, Fujiwara K, Imura H, Sugahara T: Cleft lip and palate in mice treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: a morphological in vivo study. *Congenit Anom (Kyoto)*, **46**(1): 21-25, 2006.
- 24) 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. *Congenit Anom (Kyoto)*, **50**(2): 77-84, 2010.
- 25) Fujiwara K, Yamada T, Mishima K, Imura H, Sugahara T: Morphological and immunohistochemical studies on cleft palates induced by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in mice. *Congenit Anom (Kyoto)*, **48**: 68-73, 2008.
- 26) Fujimaki H, Nohara K, Kobayashi T, Suzuki K, Eguchi-Kasai K, Tsukumo S, Kijima M, Tohyama C: Effect of a single oral dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on immune function in male NC/Nga mice. *Toxicol Sci*, **66**(1): 117-124, 2002.
- 27) Puhvel SM, Sakamoto M: Effect of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on murine skin. *J Invest Dermatol*, **90**(3): 354-358, 1988.
- 28) Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M, Fujii-Kuriyama Y: Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells*, **2**: 645-654, 1997.
- 29) Takagi NT, Matsui KA, Yamashita K, Ohmori H, Yasuda M: Pathogenesis of cleft palate in mouse embryos exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin(tcdd). *Teratog Carcinog Mutagen*, **20**: 73-86, 2000.
- 30) Yamada T, Hirata A, Sasabe E, Yoshimura T, Ohno S, Kitamura N, Yamamoto T: TCDD

- disrupts posterior palatogenesis and causes cleft palate. *J Craniomaxillofac Surg*, **42**: 1-6, 2014.
- 31) Jin JZ, Ding J: Analysis of Meox-2 mutant mice reveals a novel postfusion-based cleft palate. *Dev Dyn*, **235**(2): 539-546, 2006.
- 32) Greenburg G, Hay ED: Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol*. **95**(1): 333-339, 1982.
- 33) García de Herreros A: Epithelial to mesenchymal transition in tumor cells as consequence of phenotypic instability. *Front Cell Dev Biol*. **2**: 71, 2014.
- 34) Porto LP, dos Santos JN, Ramalho LM, Figueiredo AL, Carneiro Júnior B, Gurgel CA, Paiva KB, Xavier FC: E-cadherin regulators are differentially expressed in the epithelium and stroma of keratocystic odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med*. **45**(4): 302-311, 2016.
- 35) Fitchett JE, Hay ED: Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse. *Dev Biol*, **131**(2): 455-474, 1989.
- 36) Iseki S: Disintegration of the medial epithelial seam: is cell death important in palatogenesis? *Dev Growth Differ*, **53**(2): 259-268, 2011.
- 37) Gao Z, Bu Y, Zhang G, Liu X, Wang X, Ding S, Wang E, Shi R, Li Q, Fu J, Yu Z: Effect of TCDD on the fate of epithelial cells isolated from human fetal palatal shelves (hFPECs). *Toxicol Apl Pharmacol*, **305**: 186-193, 2016.
- 38) Imura H, Furukawa H, Sakuma C, Yoshida M, Natsume N: Reconstruction after resection of carcinoma of the lower lip. *Br J Oral Maxillofac Surg*, **56**(2): 153-154, 2018.
- 39) Barsky SH, Siegal GP, Jannotta F, Liotta LA: Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab Invest*, **49**(2): 140-147, 1983.
- 40) Liotta LA: Adhere, Degrade, and Move: The Three-Step Model of Invasion. *Cancer Res*, **76**(11): 3115-3117, 2016.
- 41) Furuyama A, Mochitate K: Assembly of the exogenous extracellular matrix during basement membrane formation by alveolar epithelial cells in vitro. *J. Cell Sci*, **113**: 859-868, 2000.
- 42) Hirata A, Katayama K, Tsuji T, Natsume N, Sugahara T, Koga Y, Takano K, Otsuki Y, Nakamura H: Heparanase localization during palatogenesis in mice. *Biomed Res Int*, 2013: 760236, 2013.
- 43) Halper J, Kjaer M: Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv Exp Med Biol*, **802**: 31-47, 2014.
- 44) Kiaer M, Magnusson P, Krogsgaard M, Boysen Møller J, Olesen J, Heinemeier K, Hansen M, Haraldsson B, Koskinen S, Esmarck B, Langberg H: Extracellular matrix adaptation of tendon and skeletal muscle to exercise. *J Anat*, **208**(4): 445-450, 2006.
- 45) Tanzer ML: Current concepts of extracellular matrix. *J. Orthop Sci*, **11**(3): 326-331, 2006.

- 46) Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M: A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature*, **370**: 61-65, 1994.
- 47) Gligorijevic B, Wyckoff J, Yamaguchi H, Wang Y, Roussos ET, Condeelis J: N-WASP-mediated invadopodium formation is involved in intravasation and lung metastasis of mammary tumors. *Biol Chem*, **384**: 749-754, 2012.
- 48) B. D. Abbott, L. S. Birnbaum, R. M. Pratt: TCDD-induced hyperplasia of the ureteral epithelium produces hydronephrosis in murine fetuses. *Teratology*, **35**: 329-334, 1987.
- 49) B. D. Abbott, L. S. Birnbaum: TCDD alters medial epithelial cell differentiation during palatogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, **99**: 276-286, 1989.
- 50) Bryant PL, Reid LM, Schmid JE, Buckalew AR, Abbott BD: Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on fetal mouse urinary tract epithelium in vitro. *Toxicology*, **162**(1): 23-34, 2001.
- 51) Mehta S, Nijhuis A, Kumagai T, Lindsay J, Silver A: Defects in the adherens junction complex (E-cadherin/ β -catenin) in inflammatory bowel disease. *Cell Tissue Res*, **360**(3): 749-760, 2015.
- 52) Takeichi M: Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, **251**: 1451-1455, 1991.
- 53) Theiery JP: Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progresion. *Nat Rev Cancer*, **2**: 442-454, 2002.