

氏名 藤原 久美子

授与した学位 博士  
専攻分野の名称 歯学

学位授与の番号 博 甲 第 2 9 8 1 号

学位授与の日付 平成 1 7 年 3 月 2 5 日

学位授与の要件 医歯学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)

学位論文題名 ダイオキシン誘発マウス口蓋裂の発症機序に関する研究

論文審査委員 教授 杉本 朋貞 教授 佐々木 朗 教授 菅原 利夫

## 学位論文内容の要旨

＜緒言＞口唇口蓋裂 (cleft lip and/or palate、以下 CL/P) は最も多い先天異常の一つで、その発生原因は遺伝的因子と環境的因子からなる多因子閾説で説明されている。遺伝的因子についてはヒトでは疫学調査や連鎖解析、動物実験ではノックアウトマウスや突然変異誘発マウスによる報告がある。一方、環境因子としては、ステロイドや抗てんかん薬の内服や風疹ウイルスによる感染など、種々のものが知られている。しかし日常生活中で恒常的に暴露するような他の環境因子が関与している可能性がある。そこで本研究では環境汚染物質として近年問題になっているダイオキシン類、なかでも 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) に着目した。妊娠動物への TCDD 投与実験においては出生仔に口蓋裂や水腎症を発症することが報告されているが、それ以外に目立った体表異常は認められない。ヒトにおける口蓋裂患児は nonsyndromic であることも多く、TCDD 誘発マウス口蓋裂と類似している。本研究では、口蓋裂の発症原因を明らかにするために TCDD 誘発マウス口蓋裂モデルは有用であると考え、TCDD 誘発口蓋裂の発生機序の検討を行った。

＜実験方法＞実験 1 マウス系統の違いによる口唇口蓋裂の発生率の差を検討した。CL/P 非発生系の ICR 系と C57BL 系、CL/P 自然発生系の A/J 系マウスを用い、TCDD の投与量および投与日による口唇口蓋裂発生率の差を検討した。実験 2 ICR 系マウスを用いて 100%口蓋裂を発症する TCDD 濃度量を投与し、口蓋形成期の形態的観察を行った。(1) SEM による口蓋形成期の口蓋突起の動態の観察 (2) SEM による Medial Edge Epithelial (MEE) 細胞表面性状の観察 (3) HE 染色での組織学的観察 実験 3 実験 2-(3)で得られた試料を用い、口蓋形成期の3つのステージ(挙上前、挙上後、接触期/癒合期)について口蓋裂関連遺伝子 (TGF $\beta$ 3、FGFR1、FGFR2、MSX1、LHX8) の免疫染色を行った。実験 4 器官培養法による TCDD の直接的影響を検討した(予備実験)口蓋組織の器官培養は回転培養法を用い、コントロール群として口蓋が癒合できる実験系を確立した。

(1) TCDD 添加 (0.1 ng/ml、1.0 ng/ml、10.0 ng/ml、50.0 ng/ml) による口蓋癒合率の検討 (2) 培養 24、48、72 時間後に試料を取り出し、実験 3 と同様の抗体について免疫染色を行った 実験 5 マウス胎仔口蓋間葉細胞 (MEPM) 培養により TCDD 添加による影響を観察した。TCDD 添加 (1.0 ng/ml、10.0 ng/ml、100.0 ng/ml) 1 時間後と 3 時間後に細胞を回収し、半定量 RT-PCR 法を用いて口蓋裂関連遺伝子 (*Tgfb3*、*Fgfr1*、*Fgfr2*、*Msx1*、*Lhx8*) への影響を比較、検討した。

<結果> 実験 1 いずれのマウス系統でも胎生 12.5 日目に TCDD を投与するとほとんどの胎仔が口蓋裂を発症しており、その感受性はマウスの系により差が認められた。TCDD 投与にて口唇裂は誘発されなかった。実験 2 (1) TCDD 投与群では口蓋突起の挙上時期が約 1 日遅れていた。(2) TCDD 群では filopodia が消失し細胞表面の凹凸も認められなかった。(3) コントロール群では MEE に相当する部分は 2 から 3 層の上皮であり、接触期まで同様の形態であった。TCDD 投与群では挙上前より口蓋突起先端部の上皮は単層の上皮で、一部には上皮が肥厚した部分が認められた。実験 3 TCDD 投与群では胎生 15.5 日目に FGFR1 の発現が消失していた。実験 4 (1) TCDD 濃度 1.0 ng/ml で口蓋癒合率は著明に低下していたが、TCDD 濃度を上げて癒合率に変化はなかった。(2) TGF $\beta$ 3 の発現は TCDD 添加群で 72 時間後に消失を認めた。実験 5 TCDD 濃度 100 ng/ml 群においては、添加 1 時間後に *Tgfb3* が、3 時間後では *Tgfb3* と *Msx1* および *Lhx8* の発現が低下していた。

<考察> TCDD 投与により誘発された口蓋裂は口蓋突起の挙上期の遅れが観察され、口蓋の挙上動態に影響を与えていることが示された。形態観察により口蓋突起接触時に MEE 部の filopodia が消失することから *Tgfb3* への影響が考えられた。MEPM cell への TCDD 添加実験によっても *Tgfb3* の発現を著明に抑制する結果を得たことから、TCDD は *Tgfb3* に影響を与えることで口蓋裂の発生に関与していることが示唆された。器官培養で口蓋裂が認められる TCDD 濃度と MEPM cell への添加で影響が観察される TCDD 濃度には大きな差が認められた。また TCDD の MEPM cell への添加においては *Tgfb3* のみならず *Lhx8*、*Msx1* にも影響を与えていた。挙上時期や癒合時の障害だけでなく TCDD の多岐にわたる作用が複数の口蓋裂誘発因子となり、多因子疾患である口蓋裂を確実に発症させるだけの作用を持つものと考えられた。本実験系は多因子閾説のモデルとしても有用であり、ヒトの自然発症口蓋裂の研究において応用できることが期待される。

## 論文審査結果の要旨

口蓋裂の発生原因は未だ明らかではないが、環境因子として、母体の抗てんかん薬の内服や風疹ウイルスによる感染などが知られている。環境汚染物質として近年問題になっているダイオキシン類によってマウスに誘発される口蓋裂は他に大きな体表異常を伴わず、ヒトにおける口蓋裂に類似していることが知られている。本研究は、口蓋裂発生機序を解明する目的で、マウスの生体および器官培養にダイオキシン(TCDD)を投与し、その影響を検討した。

妊娠マウスへのTCDD投与により口蓋裂の発生が増加し、マウス口蓋組織の器官培養にTCDDを添加した実験においては、約半数で口蓋裂が発生した。

口蓋形成期の口蓋突起の動態を形態学的に観察したところ、TCDD投与によって突起の挙上時期が約1日遅れていることが明らかとなった。さらに口蓋突起上皮の肥厚やMEE (Medial Edge Epithelial cell) の菲薄化、filopodia様構造の消失といった上皮の分化異常が観察された。

免疫染色の結果では母体へのTCDD投与においては口蓋突起上皮のFGFR1の発現に変化が認められた。一方、口蓋以外の組織からの影響を遮断されている器官培養においては、FGFR1とTGF $\beta$ 3の発現が攪乱されていたことが観察された。

FGFR1は口蓋突起の挙上に重要な役割を果たし、FGFR1とTGF $\beta$ 3は上皮の分化に関与していることが知られている。TCDDはこれらサイトカインやレセプターの発現を攪乱することにより口蓋裂を誘発することが示唆された。

以上により本申請論文は博士(歯学)の学位論文に値するものと認められた。