

氏名	永田 倭代
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第7025号
学位授与の日付	令和6年3月25日
学位授与の要件	医歯薬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)
学位論文の題目	口蓋の形成におけるメカニカルストレスの影響
論文審査委員	山本 直史 教授 岡村 裕彦 教授 中野 敬介 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

口蓋は、左右の口蓋突起の垂直的な成長、舌上での挙上、正中方向への伸展、正中部での癒合、癒合後の三次元的な成長により形成される組織である。この形成には遺伝子発現や外因性の環境因子が関与する事が報告されており、環境因子の1つにメカニカルストレスが挙げられる。メカニカルストレスは、組織の形成に関与することが数多く報告されており、口蓋においても、内因性に生じるメカニカルストレスが口蓋突起の伸展や癒合に関与する事が報告されている。しかし、口蓋の発生において、母体の運動により生じる外因性のメカニカルストレスがどのような影響を与えるのかについて、その詳細は明らかになっていない。

そこで、本研究では口蓋形成における一連の流れのうち、挙上後の口蓋突起の成長に注目し、外因性のメカニカルストレスが口蓋発生に与える影響について解明し、複雑な機序を示す、口蓋の発生に対する理解の深化を促すことを目的とした。

【方法】

1. 口蓋組織の器官培養およびメカニカルストレスの計測

胎生 13.5 及び 14.5 日のマウス胎児の口蓋組織を 24 時間器官培養した。この際、振動によるメカニカルストレスを負荷しない unload 群と負荷する load 群に分けて培養を行った。

2. Micro CT 撮影

器官培養後の口蓋組織を 1% リンタングステン酸溶液にて 24 時間染色後、micro CT にて撮影を行い、SkyScan ソフトウェアを用いて、計測領域に対する口蓋体積の割合を計測し、比較解析を行った。

3. 免疫組織化学的解析

器官培養後の口蓋組織を前頭断にて観察し、細胞増殖能及び骨分化能の比較を行った。

4. TUNEL アッセイ

器官培養後の組織を前頭断にて観察し、細胞死を示す細胞数の比較を行った。

5. 定量 RT-PCR 法

器官培養後の組織から Total RNA を抽出し、逆転写反応によって得られた cDNA を RT-PCR 法によ

6. Western blot 解析

器官培養後の組織からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット法により目的のタンパク質を検出した。

【結果】

胎生 13.5 日マウス胎児の口蓋組織を 24 時間器官培養後、YAP の発現を比較した結果、load 群での核内移行を認め、メカニカルストレスが口蓋組織の細胞へ影響を与えていることが確認された。また、胎生 14.5 日マウス胎児の口蓋を器官培養後、垂直的な厚みと体積を比較したところ、いずれも unload 群に対し load 群にて有意に大きいことが確認された。さらに、器官培養後の胎生 13.5 日マウス胎児の口蓋を前頭断にて観察し、細胞増殖及び細胞死示す細胞の割合を比較したところ、細胞増殖を示す細胞は load 群にて有意に増加していた。

Wnt/ β -catenin 経路のメディエーターである β -catenin 及び phospho- β -catenin の発現を確認したところ、load 群にて β -catenin 及び phospho- β -catenin の核内移行を認めた。

また、胎生 14.5 日マウス胎児の口蓋において、osterix の発現は unload 群に対し load 群にて増加し、同様に *osteocalcin* の発現は unload 群に対し load 群にて有意に増加した。

【考察】

Load 群と unload 群にて口蓋の三箇所での垂直的な厚みと体積を比較したところ、load 群にて口蓋の厚みはどの部位においても増加を示し、その体積も優位に大きい事が確認され、メカニカルストレスは口蓋の部位に関わらず、口蓋の発育を促す可能性が示唆された。さらに、細胞増殖および細胞死を示す細胞数を比較したところ、load 群では有意に細胞増殖が促進されており、メカニカルストレスは細胞増殖を促進させることにより、口蓋の発育を促す可能性が示唆された。

メカニカルストレスによる細胞増殖の機序を解明するため、 β -catenin の発現を確認し、メカニカルストレスによる、Wnt/ β -catenin 経路の関与についても検討した。その結果、load 群にて β -catenin の核内移行が確認され、メカニカルストレスにより Wnt/ β -catenin 経路が活性化される事が示唆された。これまでの報告から、メカニカルストレスが細胞増殖に影響を及ぼす機序として、メカニカルストレスの影響で核内移行した YAP が、核内の β -catenin に作用し、細胞増殖を促している事が考えられた。また、 β -catenin が口蓋突起の被覆上皮にも発現しており、これが抑制された場合、左右の突起同士が癒合出来ず、口蓋裂が発症することが報告されている。このことから、被覆上皮における β -catenin の発現低下を原因とする口蓋裂症例においては、メカニカルストレスにより β -catenin の発現を促進させることで、口蓋の癒合不全を改善できる可能性が推察される。

また、メカニカルストレスによる骨分化能への影響についても検討したところ、unload 群に対して load 群での骨芽細胞分化マーカーの発現は有意に増加しており、メカニカルストレスは骨分化能にも影響を与える可能性が示された。しかしこの機序の解明には、今後さらなる検討が必要である。

【結論】

メカニカルストレスは Wnt/ β -catenin 経路を活性化させることにより細胞増殖を促し、口蓋の成長を促進させる可能性が示唆された。また、メカニカルストレスは Wnt/ β -catenin 経路を活性化させることにより、骨分化能にも影響を与える可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

【緒言】メカニカルストレスは、様々な組織の形成に関与することが報告されており、口蓋においても内因性に生じるメカニカルストレスが、口蓋突起の伸展や癒合に関与する事が知られている。しかし口蓋の形成において、母体の運動により生じる外因性のメカニカルストレスがどのような影響を与えるのかについて、その詳細は明らかになっていない。本研究では、口蓋の発生段階における口蓋突起の挙上後の水平方向への成長に注目し、外因性のメカニカルストレスが口蓋の形成に与える影響について解明することを目的とした。

【方法】13.5 及び 14.5 日齢マウス胎児の口蓋組織を摘出し、器官培養組織にメカニカルストレスを負荷しない unload 群と振盪器を用いた振動を負荷する load 群の 2 群に分け、24 時間器官培養を行った。培養した組織を回収し、組織切片での口蓋の垂直的な厚みと、Micro CT 撮影によって測定した口蓋の体積を両群で比較した。また、免疫組織化学的に増殖細胞数及び骨芽細胞マーカー陽性細胞数、TUNEL アッセイにより細胞死を示す細胞数の比較を行った。さらに、培養した組織からタンパク質を抽出し、Western blot 解析により Yap 及び β -catenin の発現を確認した。また、器官培養後の組織から Total RNA を抽出し、逆転写反応によって得られた cDNA に対して骨芽細胞マーカーの発現を RT-PCR 法により比較解析した。

【結果】両群の比較から、メカニカルストレスは口蓋突起の厚み及び体積を増加させる事が示された。また、免疫組織化学的な増殖細胞数の比較から、メカニカルストレスは口蓋における細胞増殖を促進する事が示唆された。さらに、Western blot 解析にて load 群での Yap 及び β -catenin の核内移行が確認された。また、免疫組織化学的解析及び RT-PCR 法の結果から、メカニカルストレスによる骨芽細胞マーカーの発現増加が確認された。

【考察】本研究では load 群において、Yap の核内移行が有意に上昇しており、口蓋組織にメカニカルストレスが負荷されていることが確認できた。また、メカニカルストレスが細胞増殖を促し、口蓋の成長を促す事が示唆された。さらに load 群では β -catenin が核内移行し、骨芽細胞マーカーの発現が亢進したことから、メカニカルストレスは Wnt/ β -catenin 経路の活性化や、骨形成にも影響を与える可能性が示唆された。

これら結果は、外因性のメカニカルストレスが口蓋の形成に影響を与える事を示唆しており、このメカニズムの一端を明らかにした有用な知見である。得られた成果は新規性に富んでおり、母体の運動と胎児の発育に対する知見の礎となるものである。今後さらに、メカニカルストレスと口蓋の癒合への影響についても解明が期待される。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。