Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2026-07-15

Periderm cells covering palatal shelves have tight junctions and their desquamation reduces the polarity of palatal shelf epithelial cells in palatogenesis.

吉田, 美登里

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2012-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲5616
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005616

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

Periderm cells covering palatal shelves have tight junctions and their desquamation reduces the polarity of palatal shelf epithelial cells in palatogenesis.

口蓋発生において、口蓋棚を被覆しているペリダームにはタイトジャンクションが存在し、ペリダームの落屑によって上皮細胞の極性が低下する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
口腔外科学
（指導教員：古森　孝英教授）

吉田　美登里

はじめに

口蓋裂は胎生期の顔面形成異常によって引き起こされる奇形で、その発症頻度は2500人に1人とされる。ヒトの口唇口蓋裂で細胞間接着分子ネクチン-1の変異が報告されているが、細胞間接着分子の異常が口唇・口蓋の発生とどのように関連するのかは依然明らかではない。発生の過程では、左右から伸長する口蓋棚が正中で癒合して口蓋となる。癒合前の口蓋棚の先端部は、最表層にペリダーム細胞を持つ正中上皮（medial edge epithelium、MEE）で覆われている。左右の口蓋棚が伸長し、MEE同士が癒合すると正中縫線（midline epithelial seam、MES）が形成される。このMESの消失に伴い左右の間葉組織が交通し、口蓋棚の癒合が完了する。本研究ではタイトジャンクション(TJ)とアドヘレンスジャンクション(AJ)の構成タンパク質および細胞極性マーカーに着目し、口蓋形成期のMEEにおけるそれぞれの局在および機能について解析した。

方法

口蓋形成期である胎生13.5日～14.5日のマウス口蓋を用いて、免疫電子顕微鏡法と免疫組織化学法により、細胞形態の変化やTJとAJの構成タンパク質および細胞極性マーカーの局在の変化を解析した。ビオチントレーサーアッセイ法を用いてTJのバリア機能を評価した。マウス口蓋の器官培養法を用いて、TGF-β阻害剤添加下でのMEEの細胞形態の変化およびタンパク質の局在を解析した。

結果

1. 胎生13.5日のMEEにおけるTJ構成タンパク質と細胞極性マーカーgp135の局在

胎生13.5日では、MEEは2または3層からなる。クローディン-4のシグナルは隣接するペリダーム細胞間と、ペリダームとその直下に存在する上皮細胞との間で認められた。オクルーディンのシグナルは隣接するペリダーム間に点状に認められ、クローディンとオクルーディンの裏打ちタンパク質ZO-1は隣接するペリダーム間およびペリダームとその直下の上皮細胞との間にびまん性に観察された。したがって、隣接するペリダーム間にはクローディン-4、オクルーディンおよびZO-1はすべて濃縮しており、さらに、抗オクルーディン抗体を用いた免疫電子顕微鏡によりこの部位にTJ構造体が認められた。これらの結果から、TJは隣接するペリダームの間に存在することが明らかになった。

細胞極性マーカーgp135のシグナルはペリダームの頂端面、隣接するペリダーム間、およびペリダームとその直下の上皮細胞との間に強く認められた。TJ構成タンパク質とgp135の局在から、ペリダームとその直下にある上皮細胞は、頭頂-基底軸に極性をもつことが示唆された。

2. 胎生13.5日のMEEにおけるAJ構成タンパク質の局在

ネクチン-1のシグナルは隣接するペリダーム間、ペリダームとその直下の上皮細胞

との間に強く濃縮していた。ネクチン-2とネクチン裏打ちタンパク質アファディンのシグナルは、すべての上皮細胞の細胞膜に観察された。ネクチン-3のシグナルは認められなかった。カドヘリンファミリーであるE-カドヘリンとカドヘリン裏打ちタンパク質β-カテニンのシグナルは、すべての上皮細胞の細胞膜に観察されたが、ペリダームの頂端面には観察されなかった。免疫電子顕微鏡では、AJ構造体は、隣接するペリダーム間にTJ構造体とともに存在し、さらにペリダームとその直下の上皮細胞との間にも認められた。ネクチン-1のシグナルが特異的に濃縮しているペリダームとその直下の上皮細胞との間にAJが存在していることから、ネクチン-1のAJ形成への関与が示唆された。ネクチン-2、アファディン、E-カドヘリン、β-カテニンのシグナルは、ペリダーム周囲に限らずすべての上皮細胞の細胞膜全体に濃縮していたが、電子顕微鏡による観察ではこれらの部位には典型的なAJ構造体は認められなかった。したがって、これらの部位の接着はデズモソームが主体であると考えられた。

3. 胎生14.0日のMEEにおけるTJ構成タンパク質と細胞極性マーカーgp135の局在

胎生14.0日ではMEEは多層化し、ペリダームが落屑し始める。クローディン-4のシグナルは最表層の上皮細胞の頂端面を除くすべての上皮細胞の細胞膜に認められた。オクルーディンとZO-1のシグナルは、ペリダームが残存している部分に点状にわずかに認められるのみであった。免疫電子顕微鏡では、ペリダーム細胞は変形し、凝集したオクルーディンのシグナルが認められ、下層にある細胞との接着が疎であった。gp135は最表層にある上皮細胞の頂端面にびまん性に観察された。以上の結果から、多層化したMEEでは、ペリダームの落屑後はTJが存在しないと考えられた。

4. 胎生14.0日のMEEにおけるAJ構成タンパク質の局在

ネクチン-1のシグナルは減弱し断片化され点状であった。ネクチン-2はすべての上皮細胞の細胞膜で観察されたが、胎生13.5日に比べると連続性を失っていた。アファディンもすべての上皮細胞の細胞膜で観察されたが、胎生13.5日に比べるとシグナルがわずかに減弱していた。E-カドヘリンとβ-カテニンのシグナルはすべての上皮細胞の細胞膜で観察されたが、最表層の上皮の頂端面では観察されなかった。免疫電子顕微鏡では、ペリダームの変形と落屑が観察された。また、残存しているペリダーム間およびペリダームとその直下の上皮細胞間のAJ構造体は、胎生13.5日と比較すると明らかに数が減少していた。電子顕微鏡による観察ではこれらの部位に典型的なAJ構造は認められなかったが、ネクチン-2、アファディン、E-カドヘリン、β-カテニンのシグナルはすべての上皮細胞の細胞膜で観察された。したがって、これらの部位にAJ様の構造が存在する可能性は示唆された。ペリダームを除く上皮細胞は胎生13.5日では立方体または長方体で整然と配列していたが、胎生14.0日になると丸くなり、規則正しい配列は失われた。細胞の形態変化や細胞接着構造の変化から、ペリダームの落屑後、残存する上皮細胞の極性が低下することが示唆された。

5. 胎生14.5日のMEEにおけるTJ構成タンパク質と細胞極性マーカーgp135の局在

胎生14.5日ではペリダームが落屑し、左右の多層化した上皮同士が癒合する。クローディン-4のシグナルは胎生13.5～14.0日と比較して減弱していたが、すべての上皮細胞の細胞膜に認められた。オクルーディンとZO-1のシグナルは認められなかった。また、gp135のシグナルもほぼ消失しており、散在する点状のシグナルがわずかに観察されるのみであった。これらことから、癒合中のMEEにはTJが存在せず、上皮細胞の極性は低下していると考えられた。

6. 胎生14.5日のMEEにおけるAJ構成タンパク質の局在

癒合した上皮細胞ではネクチン-1のシグナルは主に基底側の2、3層目に散在する点状に観察された。ネクチン-2、E-カドヘリン、β-カテニンのシグナルはMEEのすべての上皮細胞の細胞膜で観察された。電子顕微鏡による観察から癒合中の上皮細胞でAJ構造体が認められなかったことからも、癒合中のMEEには典型的なAJ構造は存在しないと考えられた。

7. 隣接するペリダーム間に存在するTJのバリア機構の解析

TJのバリア機能を評価するため、胎生13.5日と胎生14.0日マウスにビオチン色素を投与し、口蓋上皮へのビオチン色素の浸透が観察された。胎生14.0日のマウス顔面皮膚では上皮の最表面のみでビオチンの染色が認められたことから、TJのバリア機能は完成していることが分かった。一方、胎生13.5日のマウス口蓋ではペリダーム間にTJが存在するにも関わらず、ビオチン色素がペリダームよりも下の上皮細胞層まで浸透した。このことからMEEのTJのバリア機能は不完全であることが示された。また、ペリダームが落屑した後の胎生14.0日では、ビオチン色素は多層化した上皮層全てに観察され、バリア機能が消失していると考えられた。

8. TGF-β阻害剤によるペリダームの落屑と多層化の阻害

TGF-β3ノックアウトマウスは口蓋裂を発症することがすでに報告されている。胎生13.5日のマウス口蓋を用いてTGF-β阻害剤SB431542添加下で器官培養を行なった。TGF-β阻害剤の添加によりペリダームの落屑は著明に抑制され、さらに隣接するペリダーム間にあるTJの消失、上皮細胞の多層化およびMEEの上皮細胞の極性といった癒合過程のMEEにみられる変化も抑えられた。したがって、ペリダームの落屑にはTGF-βシグナルが関与しており、さらにペリダームは、MEEの多層化、および細胞接着や極性の変化を制御していることが示唆された。

9. 口蓋形成におけるアポトーシスの関与

多層化したMEE同士の癒合により形成されるMESはその後消失し、連続した口蓋が完成する。MES消失のメカニズムとしては、アポトーシスや上皮-間葉転換（EMT）、細胞の遊走などが報告されている。そこで、今回はアポトーシスとEMTの解析を行なった。アポトーシスの指標である活性化型カスパーゼ3のシグナルは、MESと鼻腔および口腔側の上皮三角で観察された。また、胎生14.0日と15.0日の口蓋、および器官培養した口蓋では、E-カドヘリンとビメンチンはそれぞれMEEの上皮細胞の細胞膜と間葉細胞

の細胞質に限局していたことから、EMTを示唆する所見は認められなかった。したがって、MESの消失にはアポトーシスが関与していると考えられた。

まとめ

本研究により、隣接するペリダーム間には、TJとAJが存在し、さらにAJはペリダームとその直下の上皮細胞の間にも存在することが明らかになった。AJ構成タンパク質の中でも、特にネクチン-1はペリダーム周囲に特徴的に局在し、ペリダームの剥離とともにその特徴的な局在も消失した。MEEの多層化の過程では、ペリダームが剥離し、TJが失われるとともに、上皮細胞の極性が低下することが示唆された。また、TGF-βシグナルにより制御されるペリダームの落屑は、口蓋癒合過程のMEEの細胞接着や極性の変化に関わる重要な因子であると考えられた。口蓋の癒合過程では、対峙する上皮細胞層同士の癒合が起きるが、これを可能にする機構として、TJの消失と細胞極性の低下は重要であると考えられた。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2270号	氏 名	吉田 美登里
論文題目 Title of Dissertation	Periderm cells covering palatal shelves have tight junctions and their desquamation reduces the polarity of palatal shelf epithelial cells in palatogenesis. 口蓋発生において、口蓋棚を被覆しているペリダームにはタイトジャンクションが存在し、ペリダームの落屑によって上皮細胞の極性が低下する		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 古瀬 幹夫 副 査 Vice-examiner 丹生 健一 副 査 Vice-examiner 南 康博		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

個体発生の過程では、神経管や横隔膜の形成など伸長する組織同士が癒合して一体となった組織形成を行う現象がみられる。その過程では、伸長してきた組織の最表層を覆う上皮同士が癒合し、最終的には消失するが、その機構は複雑であり、不明な点が多い。口蓋棚の先端部は、最表層のペリダーム細胞を含む正中上皮（medial edge epithelium、MEE）で覆われている。左右の口蓋棚の伸長に伴いMEE同士が癒合し、その消失に伴い左右の間葉組織が交通し口蓋の癒合は完了する。ヒトでは細胞接着分子ネクチン-1の変異が口唇口蓋裂を伴う異常と関連することが報告されているが、口唇・口蓋の発生における細胞接着分子の役割は不明である。本研究では、細胞接着装置であるタイトジャンクション(TJ)、アドヘレンスジャンクション(AJ)の構成タンパク質と細胞極性マーカーに着目し、免疫染色法を中心に、さらに免疫電子顕微鏡観察、器官培養法などを用いて、口蓋形成期のMEEにおけるこれらのタンパク質の局在および機能について解析した。

胎生 13.5 日では、TJ 構成タンパク質であるクローディン-4、オクルーディンおよび ZO-1 のシグナルはすべて隣接するペリダーム間に濃縮がみられ、抗オクルーディン抗体を用いた免疫電子顕微鏡でもこの部位に TJ 構造体を認めた。これらの結果から、TJ は隣接するペリダームの間に存在することが明らかになった。このような TJ 構成タンパク質の濃縮は、ペリダームが剥離し MEE が多層化する胎生 14.0 日以降消失し、電子顕微鏡による観察でも、TJ 構造体を認めなくなった。一方、AJ 構成タンパク質であるネクチン-1 のシグナルは隣接するペリダーム間およびペリダームとその直下の上皮細胞との間に強く濃縮するという特徴的な分布を示した。ネクチン-3 は観察されなかったが、ネクチン-2 とその裏打ちタンパク質アファディン、カドヘリンファミリーである E-カドヘリンとその裏打ちタンパク質β-カテニンのシグナルは、基本的にすべての上皮細胞の細胞膜に観察された。電子顕微鏡で AJ 構造体は、隣接するペリダーム間に TJ 構造体とともに存在し、さらにネクチン-1 のシグナルが特異的に濃縮しているペリダームとその直下の上皮細胞との間にも認められた。胎生 14.0 日ではネクチン-1 のシグナルは減弱し断片化され、胎生 14.5 日では主に基底側の 2、3 層目に観察された。胎生 14.0 日以降もその他の AJ 構成タンパク質のシグナルは MEE の上皮細胞の細胞膜に観察されたが、これらの部位には電子顕微鏡では典型的な AJ 構造体は認めなかった。また、細胞極性マーカーgp135 のシグナルについても検討した。胎生 13.5 日ではペリダーム周囲に強く認められたが、胎生 14.0 日では gp135 は最表層にある上皮細胞の頂端面に観察されるようになり、胎生 14.5 日ではほぼ消失した。上皮細胞の形態も胎生 13.5 日では立方体または長方体で整然と配列していたが、胎生 14.0 日になると丸くなり、規則正しい配列は失われた。細胞極性マーカーgp135 の分布、細胞の形態変化や細胞接着構造の変化から、ペリダームの落屑後、残存する上皮細胞の極性が低下することが示唆された。さらに胎生 13.5 日と胎生 14.0 日マウスにビオチン色素を投与し、上皮層への色素の浸透を観察することで TJ のバリア機能を評価した。胎生 13.5 日のマウス口蓋では色素が TJ を越えて上皮細胞層まで浸透したことから、ペリダーム間の TJ のバリ

ア機能は不完全であることが示された。また、胎生 14.0 日では、TJ を伴うペリダーム落屑を反映し、色素は多層化した上皮層すべてで観察された。さらに、胎生 13.5 日のマウス口蓋を用いて TGF-β阻害剤添加下で器官培養を行なったところ、培養 48 時間後の口蓋では TGF-β阻害剤添加によりペリダームの落屑、隣接するペリダーム間にある TJ の消失、上皮細胞の多層化および MEE の上皮細胞の極性といった癒合過程にある MEE にみられる特徴的変化が抑えられた。以上の結果から、口蓋形成期の上皮細胞における TJ および AJ の存在部位が明らかになるとともに、それらの構造の消失とそれに付随する上皮細胞の細胞極性の変化が、癒合過程にある口蓋の上皮層で起きていることが示された。またそのような変化をおこす分子機構として、TGF-βシグナルによるペリダームの落屑およびそれに伴う MEE の多層化、細胞接着や極性の変化を制御の重要性を示した。

本研究は、マウスの口蓋形成ついて、左右の口蓋棚の癒合における上皮細胞のふるまいを研究したものであるが、従来ほとんど解析されていなかった発生期の上皮構造の癒合過程における上皮細胞の細胞間接着と細胞極性の変化について重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。