

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 中庭 麻友子
学位 博士(歯学)
学位記番号 新大院博(歯)第449号
学位授与の日付 令和2年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Primary cilia in murine palatal rugae development
(マウス口蓋皺壁発生における一次繊毛の役割)

論文審査委員 主査 教授 大峽 淳
副査 教授 前田 健康
副査 教授 高木 律男

博士論文の要旨

[背景および目的]

ある特定の形態が繰り返す構造は生体の様々な部位に認められ、それらの形成には共通の分子メカニズムが存在すると考えられている。ヒト以外の哺乳類の口蓋皺壁は波状の形態が規則的なパターンを示す繰り返し構造であり、*Shh*、*Fgf*、古典的 *Wnt* シグナルが関与すると考えられている。一次線毛は、脊椎動物のほぼ全ての細胞に認められ、細胞運動、外液移動、化学受容(嗅覚)、光受容(視覚)、機械受容(聴覚)など多岐にわたる機能を有することが、明らかとなってきた。さらに、一次線毛はこれらの機能のみならず、*Shh* および非古典的 *Wnt* シグナルなどのシグナル伝達経路の調節に関与していることが分かってきた。しかし、口蓋皺壁の発生における一次線毛の役割は未だ不明である。そこで、本研究は、口蓋皺壁発生における一次線毛の役割を明らかにすることを目的に、マウス口蓋皺壁発生期における *Shh* および非古典的 *Wnt* シグナル関連分子の発現ならびに口蓋皺壁上皮肥厚部特異的な一次線毛の機能欠損における口蓋皺壁への影響を検索した。

[材料および方法]

マウスの口蓋皺壁は、胎生 14 日に上皮の一部が肥厚し、胎生 16 日で波状の形態が確認できるようになる。そこで、*acetylated- α -tubulin* の免疫染色にて、それぞれのステージにおける一次線毛の局在を確認し、さらに 35S 標識プローブを使用した *in situ hybridization* により、*Shh* シグナルおよび非古典的 *Wnt* シグナル関連遺伝子の口蓋皺壁発生における発現の検索を行った。また、口蓋皺壁上皮肥厚部特異的に一次線毛の機能が欠損するマウスを作成し、口蓋皺壁における変化を検索した。

[考察]

口蓋皺壁は、肥厚上皮、肥厚上皮間上皮、それぞれの上皮直下の間葉組織によって形成されるが、それぞれの部位の役割については、明らかとなっていなかった。本研究では、肥厚上皮部特異的に一次線毛関連遺伝子である *Ift88* を欠損させた結果、その配列に乱れが生じたことから、口蓋皺壁発生において肥厚上皮部の一次線毛が、口蓋皺壁のパターン決定に重要な役割を果たすことが示唆された。一方、本研究で観察した *Shh* および非古典的 *Wnt* シグナル関連遺伝子の時空間的な発現パターンから、上皮と間葉の間、肥厚上皮と肥厚上皮間上皮の間でシグナルの交換が行われていることが示された。肥厚上皮部における一次線毛のパターン制御の機能も、これらの組織間の相互作用を通して行われている可能性が示唆された。本研究では、肥厚上皮部特異的に一次線毛関連遺伝子である *Ift88* を欠損させたマウスで、非古典的 *Wnt* シグナルの活性の減弱を認めた。非古典的 *Wnt* シグナルには、細胞の極性をコントロールするシグナルである *planar cell*

polarity ; PCP 経路も含まれており、一次線毛は非古典的 Wnt シグナルを介して細胞極性を制御し、口蓋皺壁の規則的な配列の形成に関わっている可能性が示唆された。

[結論]

一次線毛は、*Shh* シグナル、非古典的 *Wnt* シグナルに関与する様々な分子の厳密な制御を介して、繰り返し構造である口蓋皺壁の発生に関わることが示唆された。

審査結果の要旨

全ての動物に共通のメカニズムを見出すことは、生物学にとって大きな意味を持つ。進化の過程を考慮すれば、体の様々な器官や臓器の全てが全く独立した分子機構で形成されているとは考えにくく、各器官や臓器はある程度共通のメカニズムを使用して形成されていると考えられている。その共通性を同定するためには、多くの動物に共通した現象のメカニズム解明が必要となる。ある特定の形態が繰り返す構造は、生体の様々な部位に認められ、それらの形成には共通の分子メカニズムが存在すると考えられている。本研究は、この「繰り返し構造」を各器官や臓器間に存在する共通のメカニズムとして着目しており、その独創的発想は特筆すべきことと感じる。口蓋皺壁は、哺乳類全てに存在する構造体であること、ほぼ全ての哺乳類の数や走行が規則正しく規制されていることを鑑みれば、口蓋皺壁は実験モデルとして極めて有用と思われる。さらに、ヒトだけが規則性がなく、個人差が極めて強く、人種間での違いもある。このことは、口蓋皺壁の解析を通して、ヒトの進化の解明にもつながる可能性を有しており、本実験の実験モデルの影響範囲の大きさを示している。一次線毛は、脊椎動物のほぼ全ての細胞に認められるオルガネラであるが、長年機能を検知できず、進化の過程で機能を失ったと考えられてきた。しかし、近年の分子生物学の発展により、細胞運動、外液移動、化学受容（嗅覚）、光受容（視覚）、機械受容（聴覚）など多岐にわたる機能を有することが、明らかとなってきている。この一次線毛は、繰り返し構造を形成する際に必須となる細胞の極性の制御に関わることが知られており、一次線毛と繰り返し構造の形成との関連性に着目した点のため、一次線毛の解析によって、2つのシグナルの役割を同時に包括的に検索でき、シグナルの機能解析という点でも本実験の有用性の高さを示している。本研究では口蓋皺壁形成期における種々の遺伝子の発現を確認しているが、一つのステージだけでなく、上皮の一部が肥厚する胎生 14.5 日、波状の形態が確認できる胎生 16.5 日という形態的な違いの大きい2つのステージで行っていることは、本研究の知見を広げる意味で大きな意義がある。*acetylated- α -tubulin* の免疫染色で一次線毛の部位を検索しているが、口蓋皺壁の肥厚上皮間部と肥厚上皮部で局在のパターンが異なることを見出したことは、肥厚上皮間部と肥厚上皮部で一次線毛の機能に差があることを示している。この発見は肥厚上皮間部と肥厚上皮部を別々に検索する必要性を示唆した非常に重要なデータと言える。本研究では、肥厚部、肥厚間部において時空間的に異なる遺伝子の発現パターンを示しており、肥厚部、肥厚間部の機能の差をさらに確実なものとして表している。そのようなデータの集積から、口蓋皺壁上皮肥厚部特異的に一次線毛の機能が欠損するマウス (*Ift88^{fl/fl};ShhCre* マウス) を作成した点は、本研究の論理的展開の高さを示している。検索の結果、*Ift88^{fl/fl};ShhCre* マウスにおいて口蓋皺壁の配列に著しい乱れを認め、肥厚部、肥厚間部それぞれの個別の機能の存在を証明している。さらに、*Ift88^{fl/fl};ShhCre* マウスの口蓋皺壁の乱れが9本ある皺のうち、遠心の6本に限られたことを見出したことは、近心3つの皺と、遠心の6本の皺の形成メカニズムが違うことも示唆しており、本研究が口蓋皺壁形成メカニズムを俯瞰的に捉えることができた非常に重要な知見と言える。また、*Ift88^{fl/fl};ShhCre* マウスにおいて、*Shh* シグナルの減少と、非古典的 *Wnt* シグナルの減少を認めており、非古典的 *Wnt* シグナルが口蓋皺壁形成に関与することを示した最初の報告となっている。非古典的 *Wnt* シグナルは細胞極性に関わることが知られており、*Ift88^{fl/fl};ShhCre* マウスにおける配列の乱れた口蓋皺壁も非古典的 *Wnt* シグナルの減少とリンクしている可能性を強く示唆しており、本研究で得られた結果の確かさを反映していると考えられる。このように、本研究結果は生物学的にも重要な内容を多く含んだものとなっている。

本研究によって得られた口蓋皺壁形成における一次線毛の機能解析は、器官発生研究にとっても、進化研究にとっても、さらに繊毛病を含めた先天異常の発症メカニズムの理解にとっても、非常に意義のある研究といえ、学位論文としての十分な価値が認められる。この一次繊毛は、Shh シグナルと Wnt シグナルの活性の場である。