

Title	Differentiation of chicken gizzard smooth muscle cells.
Author(s)	高, 知愛
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39938
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	高 知 愛
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 3 4 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生理学専攻
学 位 論 文 名	Differentiation of chicken gizzard smooth muscle cells. (ニワトリ砂胃の平滑筋細胞の分化)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 小 倉 明 彦 (副査) 教 授 中 西 康 夫 講 師 井 上 明 男

論 文 内 容 の 要 旨

1. はじめに

平滑筋は血管の収縮、内臓の運動等の動物にとって必須の機能を担っている。平滑筋は結合組織と共に中胚葉から間充織細胞を経て分化するが、どのような機構によって平滑筋細胞が誘導されるのかは明らかにはされていない。平滑筋の構造や収縮ならびにその制御の機構については生化学的にも詳しく調べられている。また、平滑筋細胞の培養はすでになされており、平滑筋細胞は培養下でも増殖する。しかしながら、未分化の細胞の培養はまだ報告されていない。また平滑筋細胞は種々の細胞外基質に囲まれて存在しており、平滑筋の機能維持にこれら基質が重要な働きをしていることが明らかにされているが、平滑筋細胞の分化にこれらの成分がどのように関与しているかは明かではない。そこで、ニワトリの砂胃を用いて培養下で未分化の細胞を平滑筋細胞に分化させることを試みた。

2. ニワトリ胚の砂胃における平滑筋の分化

ニワトリの砂胃の平滑筋は、最初平滑筋になる細胞と結合組織を作る細胞が区別できないまま増殖し、分化はその後で起こる。また平滑筋ならびに網状結合組織への分化は同時に起こる。平滑筋細胞は分化すると、一定方向に長くなり、規則正しい構造をとる。産卵後 7 日目の砂胃は構造的にも不規則で、抗ニワトリ平滑筋ミオシン抗体による間接蛍光法で染色されず、またウエスタンブロッティングによってもミオシンは殆ど検出されなかった。そこで、7 日目の砂胃を未分化状態の平滑筋細胞として用いた。ニワトリ胚のステージは胚の形態から推定することができる。その結果、平滑筋の分化は産卵後 7 日目胚 (26-28 期) から 10 日目胚 (30-32 期) の間で起こることが示された。

3. ニワトリ胚砂胃の組織培養

未分化状態の砂胃の細胞は通常の条件では生育しない。そこで、ニワトリ砂胃の組織片の培養を試みた。7 日目胚の砂胃を小さく切り、切片にして培養を行った。砂胃の組織片を培養すると組織片は培養皿の底に接着した。培養開始から 4 日目になると、移植した組織片からフィブロblast様の細胞のさかんな遊走が見られた。培養後 7 日目になると、フィブロblast様細胞の層の上を丸い形の細胞 (myoblast cells) がさらに広がっていった。この時期の細胞を抗ミオシン抗体を用いた蛍光法で調べても、まだ染まりは弱く、平滑筋細胞は完全に分化していなかった。さらに、培養が 2 週間目になると、フィブロblast細胞層上に広がった丸い形の細胞の中からリボン状の細胞が現れた。この細胞は抗ミオシン抗体で強く染色され、平滑筋細胞が分化したものと結論した。なお、移植した組織片内に

は平滑筋細胞は観察されなかった。これらの結果は平滑筋細胞の分化にはフィブロblast細胞の存在が強く関与することを示唆している。

4. フィブロblast細胞ならびにその抽出液上での平滑筋細胞の分化

株化したフィブロblast細胞 (10T $\frac{1}{2}$) を培養し、シート状になってから、その上にトリプシンでばらばらにした砂胃の細胞を蒔いて培養を行った。その結果、培養後4日目になるとリボン状の細胞が抗平滑筋ミオシン抗体により強くそまり、平滑筋細胞が分化したことがわかった。さらに、フィブロblastを脱イオン水で処理し、細胞自身が死んでとれてしまった状態に未分化の細胞を蒔いても平滑筋細胞の分化は起こった。このことから平滑筋細胞の分化にフィブロblastが出している不溶性の物質が必要であることがわかった。次に株化されたフィブロblast (10T $\frac{1}{2}$) の抽出液を用いて培養を行うと、このような抽出液中にも分化誘導活性があることがわかった。活性物質は熱等に安定で、シャーレの底面に敷くことにより活性があり、培養液に加えても活性はなかった。

抽出液を遠心により上清と沈澱に分けると、両方に活性があった。上清をさらにゲル濾過すると、分子量が約10万の分画に分化誘導の活性が見られた。興味あることに、この分画に隣接する分子量約6万の分画は、未分化細胞との接着能はあるが分化は引き起こさなかった。このことから、平滑筋の分化には接着を起こす成分と分化を起こす成分の両成分が必要であることが示唆された。他方、沈澱の成分は尿素で可溶化し、濾過すると活性は可溶性成分に見いだされた。このようにして可溶化した成分をゲル濾過すると、分子量が約12万の分画に活性が見いだされた。沈澱の成分から接着のみを起こす成分は見いだされなかったことから、この分画には接着、分化の両機能を持つ成分が含まれているものと思われる。

5. まとめ

未分化の砂胃の細胞を培養下で平滑筋細胞に分化させることに成功した。この平滑筋細胞の分化にはフィブロblast細胞が重要な役割を果たしている。単離した未分化細胞はフィブロblast細胞由来の成分上で平滑筋細胞に分化した。この成分は細胞が基質と接着するときと細胞が平滑筋へ分化するときの両方で必要である。

論文審査の結果の要旨

平滑筋細胞の分化の機構は、骨格筋のそれに比べて不明な点が多い。それを調べるための解析系として、高知愛君は、独自にニワトリ砂のうの組織培養の系を確立したあと、これを用いて以下の新知見をえた。①砂のう平滑筋細胞の分化は線維芽細胞を必要とする、②線維芽細胞は平滑筋接着因子と平滑筋分化因子を細胞外に分泌している、③これらの因子は種を超えて働く、④ゲル濾過の結果から判断するとこれらの因子は既知の因子とは異なる分子である可能性が高い。

これらの結果は、平滑筋分化の機構研究に新しい視点を与えるものであり、博士(理学)の学位論文として十分価値のあるものと認める。