



Title	エナメル芽細胞の増殖・分化に関する研究：初代培養系の確立とHGFの作用の解析
Author(s)	松村，達志
Citation	大阪大学，1997，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40090
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	まつ 村 たつ し 松 村 達 志
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 13073 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 9 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学 位 論 文 名	エナメル芽細胞の増殖・分化に関する研究：初代培養系の確立と HGF の作用の解析
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 作田 正義 (副査) 教 授 栗栖浩二郎 講 師 岩本 資己 講 師 村上 伸也

論 文 内 容 の 要 旨

上皮間葉相互作用は器官形成の初期に見られる発生に必須の過程であり、歯胚もその例外ではない。近年、この上皮間葉相互作用に関与する因子の解析が進み、歯胚においては骨誘導因子-4 (BMP-4)、酸性線維芽細胞増殖因子 (aFGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、神経成長因子 (NGF) 等が報告されている。著者の研究室でもマウス臼歯歯胚の器官培養系とアンチセンス法を用いた特定因子の翻訳阻害実験を行い、肝細胞増殖因子 (HGF) が歯胚の上皮間葉相互作用に必須な成長因子であることを報告している。これによると HGF は他の多くの組織・器官と同様、歯胚においても間葉細胞である歯乳頭細胞で合成分泌が行われ、エナメル芽細胞系列の細胞に対して作用していることが明らかになった。しかし、エナメル器由来の細胞の培養が困難であるため、エナメル芽細胞系列の細胞に対する HGF をはじめとする各種成長因子の作用についての細胞レベルの解析は現在のところ進んでいない。そこで本研究では、歯胚から分離したエナメル芽細胞系列細胞の初代培養系の確立をまずおこない、次に歯胚発生における HGF の機能を細胞レベルで解析することを試みた。

初代培養は、ラット切歯歯胚の内エナメル上皮から分離した細胞 (内エナメル上皮細胞、前エナメル芽細胞、エナメル芽細胞を含む細胞で、以下 AL [Ameloblast-lineage] 細胞と呼ぶ) を無血清培地である完全 MCDB 培地を用いて行った。まず、細胞形態の上から AL 細胞は遊走細胞、クラスター細胞、トール細胞 (背の高い細胞) に分類された。次に、分化マーカーの検索を免疫組織化学的に行った。その結果、(1)エナメル器のすべての細胞に発現する HGF レセプター c-Met, (2)前エナメル芽細胞の段階からエナメル芽細胞に発現するサイトケラチン 14 (K14), (3)エナメル芽細胞の分泌蛋白であるアメロジェニン、の三つを分化マーカーとして用いることが明らかとなり、細胞形態の上からの分類と一致した。また、プロモデオキシウリジン (BrdU) 取込み実験により、細胞増殖活性は分化段階によって差があることを確認した。以上の結果より、AL 細胞初代培養系は内エナメル上皮細胞から分泌期エナメル芽細胞までを in vitro で再現できる実験系であり、本研究の目的にかなうものであることが明らかになった。さらに、細胞数の検定についてはクリスタルバイオレット法を導入して、大量の試料を定量的に計測することを可能にした。

ところで、歯胚発生における HGF の関与についてのこれまでの知見はすべて臼歯歯胚を用いて得られているが、我々の AL 細胞初代培養系では大量の細胞を得やすい切歯歯胚を用いている。そこでまず切歯での HGF と c-Met の発現を免疫組織化学的に調べた。その結果、胎生 18 日齢～出生 0 日齢の SD ラットの切歯での HGF の分布は内エ

ナメル上皮の増殖部位近傍の歯乳頭細胞に認められ、c-Met はエナメル器全体に持続的に分布する事を確認した。臼歯では HGF は歯乳頭でまず発現してその後消失していくが、切歯では頸係蹄付近の歯乳頭で弱いながら発現し続けた。この差異は歯種の違いによるもので、むしろ増殖部位近傍に発現するという点から HGF の歯の発生における基本的な役割は変わらないと考えられた。また、切歯から上述の方法で初代培養に移した細胞が c-Met を発現し続けているのを確認できた。

そこで AL 細胞に種々の濃度の組換えヒト HGF (rhHGF) を添加して培養を行った結果、6 ng/ml まで濃度依存的な著しい細胞増殖の促進が見られた。従って、6 ng/ml を HGF の in vitro における最適濃度として、以後の実験に用いた。

HGF は培養 AL 細胞に対して明らかな遊走性を誘導し、クラスター形成率を低下させた。また、この遊走性の誘導は可逆的であることを細胞分散度の比較により確認した。次に、実際に増殖している細胞がどの分化段階にあるかを検索するため、BrdU 取込み実験を行なった。その結果、遊走細胞の細胞分裂活性はクラスター細胞より明らかに高く、トール細胞では分裂活性は認められなかった。また、HGF は各分化段階の細胞の分裂活性には影響を与えなかった。従って、HGF は AL 細胞の総数を増加させるが、これは HGF がより分裂活性の高い遊走細胞の割合を増加させることによるものであることが明らかになった。

【結論】

1) AL 細胞初代培養系は内エナメル上皮細胞から分泌期エナメル芽細胞までの各分化段階を in vitro で再現できる実験系であり、歯胚における上皮間葉相互作用に関わる因子の機能を解析することに適した実験系であることが明らかになった。

2) HGF は、歯胚の上皮間葉相互作用に必須の成長因子の一つであり、エナメル芽細胞系列の細胞を増殖期の分化段階に維持し、結果としてこの系列の細胞の総数を増加させていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、上皮間葉相互作用を細胞レベルで解析することを目的として、エナメル芽細胞系列の細胞 (AL 細胞) の初代培養系を確立し、歯胚発生における HGF の機能の解析を試みたものである。

その結果、AL 細胞の初代培養系は、内エナメル上皮細胞から分泌期エナメル芽細胞までを in vitro で再現できる歯胚の上皮間葉相互作用を詳細に解析することに適した実験系であることを初めて明らかにした。

さらに、この系を用いて歯胚の上皮間葉相互作用に必須の成長因子である HGF の機能を細胞レベルで明らかにした。

本研究は、歯胚の上皮間葉相互作用の解明に大きく貢献するものであり、博士 (歯学) の学位を授与するに十分値するものと認められる。