

氏名(本籍)	よし だ あさこ 吉 田 阿佐子 (北海道)
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	博 甲 第 6239 号
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	エナメル上皮細胞の分化に伴う分子機構に関する研究

主	査	筑波大学教授	薬学博士	永 田 恭 介
副	査	筑波大学准教授	博士(医学)	柳 川 徹
副	査	筑波大学講師	博士(理学)	小 林 麻己人
副	査	筑波大学講師	博士(医学)	山 縣 憲 司

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

歯の発生は、ヒトでは妊娠6～7週目、マウスでは胎齢10日目に歯の予定領域の口腔上皮組織が肥厚することで始まる。歯の発生過程において、上皮細胞と間葉細胞は相互作用しながら、間葉細胞は象牙質を、上皮細胞はエナメル質を形成する。これまでの研究から、歯の発生において、上皮と間葉細胞からそれぞれ産生されるシグナル分子群が、上皮から間葉、あるいは間葉から上皮へと相互に作用し、歯胚を形成していること明らかとなっている。しかし、歯の発生に関する分子メカニズムの詳細については、未だ不明な点が多い。発生過程における上皮細胞の分化メカニズムを明らかにするためには、2つの点が重要であると考えた。1つは、初期の細胞外マトリクス (ECM) を介した上皮-間葉相互作用である。初期の上皮細胞はECMを介して間葉細胞からのシグナルを受け取り、分化する。そのため初期の上皮細胞の分化にはECMが重要な役割を担っているのではないかと考えられる。2つ目は、エナメルマトリクスの発現調節である。上皮細胞は、エナメル芽細胞 (アメロブラスト) へと分化するとエナメルマトリクスを大量に発現する。このエナメルマトリクスは、エナメル質形成に必須であり、その発現調節機構は上皮細胞の分化にとって重要であると考えられる。本研究は、上皮細胞の分化に着目し、上記2つの観点から、分化の分子メカニズムを明らかにすることを目的としている。

(対象と方法)

上皮-間葉細胞の相互作用を解析するための体外培養系 (細胞シート法または、コラーゲン膜を用いて三次元培養システム) を構築した。分化の程度については、分化マーカー遺伝子の mRNA 発現量とタンパク質発現量を指標として解析した。エナメルマトリクスタンパク質の発現調節機構を明らかにするため、*Amelogenin* のプロモーターの細胞特異的制御機構について、レポーターアッセイを用いて解析を行った。

(結果)

エナメル上皮細胞 (HAT-7) - 間葉細胞 (BCPb8) の相互作用を解析するため各種の体外培養系を試み、コラーゲン膜を直接挟んだ共培養系では HAT-7 の分化マーカーが増加を観察しているが、膜を直接挟まない共培養では分化マーカーの発現上昇は見られなかったと述べている。このことから、エナメル上皮細胞の分化には ECM が重要な役割を担っている可能性を示している。

IGFがエナメルタンパク質の発現誘導に関わっていることが知られていることから、IGFの分化への関与について調べている。IGF、およびIGFレセプターの発現を解析したところ、前者のうちIGF2がBCPb8において、後者についてはIGFR1、IGFR2ともにHAT-7とBCPb8の両者において発現を確認している。さらに、共培養によってBCPb8細胞のIGF2発現量が培養14日後で増加していることを見出している。HAT-7では通常培養では、IGF2添加によりIGF2の分解に関わるIGFR2の発現が著しく増加していたことから、分化誘導が起こりにくい状態であることを推定している。ところが、膜を直接挟み込んで共培養すると、IGF2Rの発現が抑制されていることを見出している。これらのことから、IGF2は本研究で作製した共培養系で重要な役割を果たしており、上皮-間葉相互作用がIGF2の発現制御に関与している可能性を示唆している。

分化によって誘導される遺伝子発現の組織特異的な調節機構を明らかにする目的で、エナメルマトリクスの主成分であるAmelogeninについて、その遺伝子のプロモーター上流域とイントロン1に着目し、レポーターアッセイを用いて、シス制御配列について解析している。その結果、Amelogeninプロモーター領域の-250から-172の配列にサプレッサー部位が存在することを見出している。また、このサプレッサー部位には、転写因子Oct-1が結合し、Amelogeninの発現を抑制していることを示している。この抑制がイントロン1依存的に起こり、さらにエナメル上皮細胞特異的に観察されることから、イントロン1には細胞種特異的エンハンサーが存在していることを示唆している。

(考察)

上記の結果をまとめて、共培養系では、一方の細胞から分泌された因子がコラーゲン膜で安定化・集積されてもう一方の細胞に作用し、分化が誘導されていると結論している。対照として用いた離れた状態の共培養系では、細胞から分泌された因子は培地中に拡散しコラーゲン膜に到達する前に分解されてしまうため、もう一方の細胞の分化誘導が起こらないと推測している。

Amelogeninの発現調節機構解析においては、Oct-1がイントロン1依存的にAmelogeninの転写を負に抑制していることを見出したことから、Oct-1はイントロン1に結合する細胞特異的転写因子の機能を抑制しており、分化に伴いOct-1による抑制が解除されることにより、Amelogeninの分化特異的発現が起こる可能性があると考えしている。

審査の結果の要旨

本論文は、歯の発生過程における分子メカニズムを明らかにするため、上皮細胞の分化に対する細胞外マトリクス(ECM)の役割を解析するための培養系の構築を行い、コラーゲン膜を挟み込んで間葉細胞と共培養することによって上皮細胞の分化を促進する共培養系の構築に成功している。また、共培養系での上皮-間葉相互作用には間葉細胞由来のIGF2が関与しており、ECMを介して上皮細胞に有効に働いている可能性を示している。またエナメルマトリクスの1つであるAmelogeninプロモーター領域には、転写因子Oct-1が結合するサプレッサー部位が存在し、イントロン1に存在する細胞種特異的エンハンサー領域を介して、発現抑制を行なっていることを示した上で、分化に伴ってOct-1が減少することでAmelogeninの発現が促進されると考察している。これらを要するに、本研究は、エナメル上皮細胞の分化を部分的に再現できる系を開発し、これを用いて歯のエナメル上皮細胞の分化に伴う分子メカニズムの解明に貢献しており、今後の歯の発生分化の基本機構解明とそれに基づく医学的な応用につながる重要な知見を生み出している点で、価値ある研究と考えられる。

平成23年12月28日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。