

氏名	竹 林 俊 明
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博乙第 3046 号
学位授与の日付	平成8年9月30日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者(学位規則第4条第2項該当)
学位論文題名	マウス発生過程におけるHepatocyte growth factor (HGF) 遺伝子の発現の検討
論文審査委員	教授 松村智弘 教授 永井教之 教授 滝川正春

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

Hepatocyte growth factor(HGF)は、種々の間葉系細胞より産生され、主として上皮系細胞に対して増殖促進作用、細胞運動促進作用、形態形成誘導作用等、多様な生物学的活性を持った増殖因子であるが、近年いくつかの間葉系細胞に対しても作用することが見いだされた。そのレセプターは、c-met proto-oncogeneの産物であることが判明している。また、肝臓、腎臓、肺などの器官傷害に伴いHGFの発現は速やかに高まり、これらの器官の再生因子であることが明らかになってきている。さらにHGFは発生過程においても、頭尾軸に沿った神経系の誘導、肝臓の形態形成や、四肢の形態形成などにおいて重要な役割を担っている可能性が考えられており、発生段階におけるHGF蛋白や遺伝子の発現が検討されているが、まだその作用は十分に解明されてはいない。本研究は、HGFの作用をさらに明らかにすることを目的に、発生過程の組織、器官形成におけるHGF遺伝子の発現部位をIn situ ハイブリダイゼーション法にて検討した。

【材料ならびに方法】

器官形成期から成長発育期となる胎生10.5日から胎生16日のマウス胎児を経過的に採取し、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後、適法にてパラフィン包埋し、5 μ mの切片を作製した。HGFcDNAの1.4kb EcoRI 断片をpGEM7ベクターにサブクローニングし、 $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]$ UTPでラベルしたRNAを合成後、約150bpの長さとなるようにアルカリ加水分解を行い、これをリボプローブとしてin situ ハイブリダイゼーション法を行った。組織標本を脱パラフィン、グリシン、無水酢酸処理後、プローブと50°Cで16時間ハイブリダイズを行い、スライドガラスを2 \times SSCで洗浄、RNaseA処理、0.1 \times SSCで洗浄後、乳剤処理を行い、2週間露光後に現像、HE染色を行った。

【結果と考察】

1. 四肢、肋骨におけるHGF mRNAの発現

HGF mRNAは胎生10.5日では肢芽前方部基部、11.5日では肢芽の基部全体に発現し

ていた。肢の軟骨パターンの複雑な構築は、極性化活性帯（ZPA）、外胚葉頂堤（AER）、進行帯（PZ）より生じた拡散性因子の相互作用により制御されていると考えられている。HGFを産生するMRC-5細胞は、ZPAと同様に、肢芽前方基部に移植した場合に重複肢が出現することが報告されており、HGFがZPA因子である可能性も考えられたが、肢芽後部のZPA領域ではHGF mRNAの発現はみられなかった。今回の結果よりZPAからのシグナルをHGFが伝達しているのではなく、MRC-5細胞は他の誘導因子を産生しているのであろうと考えられた。胎生12.5日以降において軟骨性の細胞凝集による構成要素が生ずるに伴い、HGF mRNAは将来の関節領域において軟骨性細胞凝集部に隣接した間葉細胞に局限して発現した。肋骨部では、軟骨性細胞凝集部の先端部周辺の肋間部間葉細胞にHGF mRNAの発現を認めた。これらは軟骨形成が活発に行われている部位であり、HGFは軟骨形成に関与している可能性が考えられた。

2. 頭部、顔面部におけるHGF mRNAの発現

胎生10.5日から12日の第一鰓弓、第二鰓弓および胎生12日の下顎部で将来メッケル軟骨が発生すると思われる部位と胎生13日の喉頭軟骨が生じる部位でHGF mRNAは発現した。その後の時期では上下顎および喉頭軟骨部において発現は認められず、HGFは軟骨誘導による顔面形成の初期の段階に作用している可能性が考えられた。また鼻腔上皮に近接した間葉細胞、鬚の毛包の毛根部周囲間葉細胞、歯胚の歯乳頭部と周囲間葉細胞にHGF mRNAは発現していた。

3. 肝臓におけるHGF mRNAの発現

HGF mRNAは、肝臓発生初期には横隔膜の初期構造である横中隔および肝臓原基に発現し、肝臓が発育するにつれ、肝臓に隣接している横中隔に局限した発現を示した。横中隔で産生されるHGFが肝臓の誘導、増殖に作用していることが示唆された。

4. 尿膜におけるHGF mRNAの発現

尿膜の基部にある血管周囲間葉細胞にHGF mRNAの発現が認められた。尿膜は臍帯の一部となる組織であり、遠位端は子宮粘膜とともに胎盤を形成する絨毛膜と融合する。尿膜の血管は胎盤全体に広がり毛細血管網を形成し母体との間の物質代謝を仲介する。HGF遺伝子欠失変異体マウスの発生における検討では胎盤の構造、容積の異常が報告されており、尿膜でのHGFの産生が胎盤の発育、増殖に関与することが示された。

【結論】

HGF mRNAは胎生期の発生過程において多様な部位で発現を示し、次のような作用が判明した。四肢、肋骨、顔面部領域において、HGFは軟骨誘導、軟骨形成および歯の発生、毛包の発生に作用することが示唆された。また横中隔で産生され肝臓の誘導、増殖に、および尿膜で産生され胎盤の増殖に作用していると考えられた。

論文審査結果の要旨

本研究は、マウス胎生期の器官発生過程において、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor:HGF) 遺伝子の発現を検討したものである。その結果、HGF遺伝子は四肢では関節領域の間葉細胞、肋骨では先端部周囲の肋間部間葉細胞、顔面部領域では軟骨形成の前段階で間葉細胞に発現し、HGFは四肢、肋骨において軟骨形成に、顔面部領域では軟骨誘導に作用していることが示唆された。また、歯および鬚の毛包においてHGF遺伝子は間葉細胞に発現し、HGFが歯の発生、毛包の発生にも関与していることが判明した。さらにHGFは肝臓の発生において横中隔で産生され肝臓の誘導、増殖に作用し、また尿膜で産生され胎盤の増殖に作用していると考えられた。これらのことにより、器官発生過程においてHGFは器官誘導作用、形態形成作用、増殖作用を有することを明きらかとした本研究は価値ある業績と認める。

よって、本研究者は博士（歯学）の学位を得る資格があると認める。