

論文要旨等報告書

氏名	黒坂寛
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3358 号
学位授与の日付	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	医歯学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	両生類の下顎の再生における分子・細胞生物学的研究

論文審査委員 教授 山城 隆 教授 山本 敏男 助教授 市川 博之

学位論文内容の要旨

論文内容の要旨 (2000 字程度)

有尾両生類に属するイモリ (*Cynopus pyrrhogaster*) は高い再生能力を有しており、手足やレンズのみならず、顎までも再生する事ができる。一方、同じ両生類に属するが、無尾両生類のアフリカツメカエル (*Xenopus tropicalis*) は変態後にその再生能力を失い、四肢等も切断後“スパイク”と呼ばれる軟骨様な組織に置換されたり、顎も再生できなくなる。すなわち、この再生能力の違いを産み出す原因を明らかにできれば、人間の再生研究にも通ずる可能性がある。そこで、両者 (イモリ、カエル) の下顎の再生過程における分子生物学的、細胞生物学的解析を詳細に行い、再生のどの段階でこの細胞でどのような分子レベルでのイベントの差があるのかを明らかにすることをを行った。

具体的な解析方法としては、両者 (イモリ、カエル) の下顎の再生過程において 1. 増殖している細胞に差異があるかを BrdU 取り込み実験によって調査した。2. 切断刺激に対して、筋肉細胞や軟骨細胞がどのような反応をするのか BrdU の取り込みの他に、細胞分化マーカー (筋肉: Myosin heavy chain、軟骨: Collagen type II) を用いた免疫染色、in situ hybridization を行い、比較検討を行った。

再生できるもとできないもの大きな違いとして、増殖性の細胞に違いがあると期待されたが、BrdU や細胞分化マーカーを用いた免疫組織学的な解析では、意外にも、両者において切断後の初期段階 (4 日~7 日) では筋肉細胞や軟骨細胞中に BrdU 陽性細胞が認められ、切断刺激に反応して細胞増殖を始めていると思われる細胞種や細胞数に大きな差は認められなかった。

一方、同じステージにおける in situ hybridization による細胞種特異的な遺伝子発現解析では、顕著な違いが検出された。イモリでは、下顎切断面直下の組織において Myosin heavy chain (MHC) の顕著な mRNA 発現レベルの上昇をしている細胞が見られたのに対し、カエルでは、オルソロガスな遺伝子の発現を検出しているにもかかわらず、そのような細胞は検出されなかった。また Myosin heavy chain mRNA の発現変化を経字的に観察すると、その現象は切断 4 日後から始まり、その後、発現範囲は拡張していく事が明らかとなった。更に、MHC mRNA を強く発現している細胞集団は大きく分けると 2 種類存在する事が明らかとなった。1 種類目は MHC mRNA を強く発現し、多核のもの、2 種類目は筋繊維の先端部にのみ限局的に MHC mRNA を強く発現するものである。BrdU を用いた解析でこれ

ら 2 種類の細胞種は共に細胞増殖を行っている事が明らかとなり、筋肉再生に関して非常に重要な役割を担う事が示唆された。

Collagen type II (Col2) mRNA の発現についても調べたところ、MHC mRNA 同様、イモリでは切断後、切断面直下の骨表面で著しい発現上昇が見られた。しかし、カエルでは Col2 mRNA 発現細胞が広範囲に出現するが、発現強度は切断前後で大きな違いが無い事が示された。

これらの結果からイモリの下顎切断初期の切断面における mRNA 発現上昇が再生出来るものと出来ないものを分ける重要なイベントである事が示唆された。遺伝子発現の上昇を行っている細胞が再生に強い関与を示すかどうかについて、現在トランスジェニックイモリを作成して、細胞運命を追跡することにも成功しており、これを用いたキメラ実験等を行う事により、両生類の再生現象がより詳しく解明される事が期待される。

論文審査の結果の要旨

有尾両生類に属するイモリ (*Cynopus pyrrhogaster*)は非常に高い再生能力を有しており、手足やレンズのみならず、顎までも再生することができる。一方、無尾両生類のアフリカツメガエル (*Xenopus tropicalis*)は変態後にその再生能力を失い、ヒトと同様に顎を再生できなくなる。すなわち、この再生能力の違いを原因を明らかにできればヒトの顎の再生研究にも通ずる可能性がある。そこで本研究は下顎の再生が可能な動物(イモリ)と不可能な動物(カエル)の違いを免疫組織化学染色、BrdU 取り込み実験、in situ hybridization 法を用いて組織学的、細胞学的に検討したものである。

その結果、両者の下顎切断後の初期段階(切断7日後)においてはBrdUを取り込む細胞数や細胞種には大きな違いは認められなかった。このことから両者共に下顎切断刺激に対して反応し、細胞増殖を行う細胞数や細胞種は同じである事が明らかとなった。同じステージにおける in situ hybridization 法による細胞種特異的な遺伝子発現解析によりイモリでは下顎切断面直下において Myosin heavy chain 及び Collagen type II の顕著な発現上昇をしている細胞が検出されたのに対し、カエルではその様な細胞は検出されなかった。このことから、イモリでは切断後に細胞増殖を始める細胞が細胞種特異的な mRNA を発現上昇させる事によって失われた組織を再生する事が可能であり、カエルは不可能である事が示唆された。また、イモリの Myosin heavy chain に関しては、切断後非常に早い時期(切断4日後)から切断面直下において発現上昇する事も明らかとなった。以上のことから、イモリは下顎切断後早期に組織特異的な mRNA を発現上昇させる事が可能であり、この現象が再生できるものと出来ないものを分ける重要な出来事である事が示唆された。

現在までに再生出来る動物と出来ない動物を直接比較検討したものは無く、本研究がイモリの高い再生能力を持つ理由を解明し将来的にヒトの口腔組織再生研究に貢献するものと考えられる。

したがって、本研究はヒトの口腔組織再生研究の基盤となる基礎的研究である事が高く評価され、本申請論文は博士(歯学)の学位論文に値するものと認められた。