

氏名	中野崇文
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第 569 号
学位授与年月日	平成 31 年 3 月 20 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	ラット下顎切歯のエナメル器の特殊性の評価と培養下における細胞識別研究
論文審査委員	(委員長) 教授 田中 亨 (委員) 教授 西野 宏 准教授 高橋 将文

論文内容の要旨

1 研究目的

ラット切歯は常生歯であるため、エナメル質を常に形成している。その唇側面には全ての分化段階のエナメル芽細胞が常に存在し、必要な段階の細胞を容易に摘出できるため、エナメル質形成の研究に有用で、特に細胞研究には広く使われてきた。ただし、ラット切歯にもエナメル器があるが、エナメル芽細胞以外の細胞がエナメル質形成にどのようにかかわっているかは不明である。ヒトやラット臼歯のエナメル器であれば、基質形成期ではエナメル芽細胞、中間層細胞、星状網細胞、外エナメル上皮という構成であり、成熟期では中間層細胞と星状網細胞が乳頭層に変わる。だが、これがラット切歯にもあてはまるかどうかはこれまでの研究では検討されていない。

エナメル芽細胞の初代培養や株細胞は分子生物学的な研究には必須の材料であるが、培養下では円柱状ではなく、扁平化してしまい、細胞の特徴を大きく失う。このことは、エナメル器の構成細胞においても同様で、初代培養下におけるエナメル器の構成細胞がどのように生存し、生理的な特性を残しているか、またエナメル芽細胞とどのように相互関係を維持しているのかも不明である。そこで有用なのは細胞分化マーカーである。

例えば、サイトケラチン 14 (cytokeratin14: CK14) は口腔上皮や歯胚上皮に強く発現する構造タンパク質であり、その後、P63、p75NGFR、Notch2 mRNA などがエナメル器構成細胞の特定な部位で発現することが示された。しかし、これらを培養下で用いても、組織染色で得られた知見、一般の歯胚で知られている細胞構成の知見などと食い違いがあったために細胞の識別が難しかった。そこで、こうした食い違いの原因を明らかにし、照合できるようにする必要があった。

本研究では、エナメル質形成の機能研究には、エナメル芽細胞だけでなく、エナメル器の構成細胞すべてを視野に入れることが必須と考え、ラット切歯のエナメル器の構成細胞を組織切片と培養細胞の両面から識別できる手技を確立することを目指した。そのために、組織解析による組織学的構造の検証、細胞分化マーカーを用いた組織上での細胞識別と培養下での細胞識別を行い、初代培養細胞とエナメル器構成細胞の対応関係を明らかにすることを目的とした。

2 研究方法

常生歯であるラット切歯のエナメル器の構成細胞を形態学的に確認し、さらに細胞分化マーカー

ーを用い、構成細胞の組織解析を行った。組織解析には生後 8~14 日齢の下顎骨の非脱灰パラフィン切片、生後 10 日齢のエナメル上皮シートのテクノビット樹脂切片および成獣のエナメル上皮シートのパラフィン切片、生後 4 日齢の新鮮凍結切片を用いた。また生後 10 日齢のエナメル上皮シートを用いて初代培養における構成細胞の形態学的観察を行い、同様に細胞分化マーカーの発現の確認を行った。

細胞分化マーカーとしては上皮に特異的な構造タンパクである CK14、エナメル芽細胞の分化段階が進むと分泌が増える、エナメル質特有のタンパクであるアメロゲニン(amelogenin: Am)、硬組織形成に必須な酵素である ALP、歯胚発生に必要なエネルギー源であるグリコーゲンをはじめとする多糖類を検出する PAS 染色を使用した。

3 研究成果

ラット切歯のエナメル器を構成する細胞としてエナメル芽細胞、中間層細胞が確認できた。また、星状網細胞にあたる中間層細胞の外側に血管の侵入が豊富な細胞層が確認できた。これは乳頭層様の構造であったが、中間層細胞と共存していることと、基質形成期のエナメル芽細胞と共存している二点で特徴的な偽乳頭層細胞(pseudopapillary layer cell: PPL)と呼称して、区別する必要があると考えられた。

組織解析では 4 種類の細胞分化マーカーの発現を確認した。CK14 ではラット切歯でエナメル器を構成していると考えられる全ての細胞(エナメル芽細胞、中間層細胞、偽乳頭層細胞)が陽性であった。また、ALP では中間層細胞、偽乳頭層細胞が陽性、PAS では全体的に発現が認められるが、偽乳頭層細胞は強陽性であった。これにより偽乳頭層細胞が明瞭に識別することが可能であった。以上より、中間層細胞と偽乳頭層細胞が共存しており、乳頭層細胞とは異なることが明確になった。また Am に関してはエナメル芽細胞のみ発現を認めた。

ラット切歯エナメル器の初代培養では、培養細胞は集塊形成するものとしめないものに分かれた。集塊形成をする細胞群では多角形の大型細胞と円形の中型細胞が見られた。集塊形成しない細胞群では紡錘形の細胞と他の細胞に重層する円形の小型細胞が見られ、培養下では 4 種類の細胞が確認され、集塊形成をする細胞群としめない細胞群では相互に細胞の移動は見られなかった。

培養細胞で 4 種類の細胞分化マーカーの発現の確認を行った。CK14 は全ての細胞で陽性であり、集塊形成する細胞群で特に強い陽性が認められた。ALP に関しては集塊形成する細胞群では発現が見られず、集塊形成しない細胞群に強く発現していた。PAS では小型の円形細胞のみに発現が見られた。Am は集塊形成する細胞群の中で中型の円形細胞が強く発現を認め、他の細胞にも発現を認めた。

4 考察

ラット切歯の組織解析によって、エナメル器を構成する細胞の構成が明らかになった。ヒトやラットの臼歯とは異なり、星状網細胞に代わり、偽乳頭層細胞で構成されていた。エナメル質形成側よりエナメル芽細胞、中間層細胞、偽乳頭層細胞となっており、外エナメル上皮は存在していなかった。偽乳頭層細胞は ALP 活性と PAS 反応を認め、中間層細胞と星状網細胞の特徴を同時に持つことがわかった。また、基質形成期も含めた全段階のエナメル器内の偽乳頭層細胞間に血管の侵入を認め、これらがエナメル器を栄養していることが考えられた。

生後 10 日齢のエナメル上皮シートのテクノビット樹脂切片、成獣のエナメル上皮シートのパラフィン切片および新生仔顎骨の非脱灰凍結切片を 4 種の細胞マーカーで染色することにより、各部位の違いを明らかにし、組織での細胞識別を可能にした。

初代培養では形態的に 4 種類の細胞が見られた。そして 4 種の細胞マーカーで染色することによりエナメル器のどの細胞であるかを識別することが可能となった。すなわち、初代細胞培養における全ての細胞に CK14 の発現が見られ、初代培養系の細胞群で見られる 4 種すべてがエナメル器の上皮由来であることが確認できた。ALP では集塊形成しない細胞である紡錘形細胞と他の細胞に重層する小型細胞に活性が見られ、集塊形成する細胞に発現が見られなかったことから集塊形成しない細胞群は中間層細胞、偽乳頭層細胞にあたり、集塊形成する細胞群はエナメル芽細胞にあたることがわかった。PAS においては他の細胞に重層する細胞に発現が見られたことから、偽乳頭層細胞であることが示唆された。また、紡錘形細胞は中間層細胞であることも示唆された。アメロゲニンにおいては集塊形成する細胞群の中で大型多角形細胞より中型円形細胞がより強い発現を認めていることから、大型多角形細胞が分化段階の低いエナメル芽細胞、中型円形細胞が分化段階の進んでいる細胞であることが考えられた。

5 結論

本研究では、4 種類の細胞分化マーカーを用い、ラット下顎切歯エナメル器構成細胞の組織解析と培養細胞の比較を行うことにより、初代培養下でのエナメル器構成細胞の識別を可能にした。また、ラット切歯のエナメル器の構成を明らかにし、これまで確認されていない細胞層があることを確認できた。そしてこれを偽乳頭層細胞と名付け、その性状を明瞭にした。

論文審査の結果の要旨

申請者は常生歯であるラット切歯を用いて、形態学的観察、初代培養、テクノビット樹脂包埋法とマーカー検索により、ラット切歯は、ラット臼歯やヒトの歯とは異なるエナメル器構成細胞となっていることを明らかにした。さらに、その過程で、今まで報告のなかった、偽乳頭細胞と呼ぶべき細胞層の存在を明らかにすることに成功した。また、すべての構成細胞にアメロゲニン発現があることから、エナメル質形成能力はすべての構成細胞に存在する可能性を示した。

ラット切歯の組織形態や初代培養に関しては、多くの報告がすでにある。それでも、新たな細胞層の発見やすべての構成細胞にアメロゲニン発現が認められることは興味深い知見といえる。この領域の研究の発展にわずかながら貢献するものである。ただ、常生歯であるラット切歯から得られた知見であり、常生歯ではないヒトの歯におけるエナメル質形成との関連は十分に検討されていない。従って、ヒトの病態に迫る展開も提示できていない。ヒトの病態生理の観点からは、本研究により得られた知見についての意義は不明確である。

一方、最初の原稿では、**clinical question** から仮説、検証にいたるプロセスが明示されておらず、発表でも同様であった。博士課程という、**break through** を要求される見地からはやや物足りない。また、論文も受理されていない。

以上、様々な問題点はあるものの、最低限度の新たな知見は示すことができている、ぎりぎりの線ではあるが全員一致で合格と判定した。

最終試験の結果の要旨

ラット切歯を用い、形態観察、初代培養、テクノビット樹脂包埋切片の手法により観察し、細胞層やエナメル質形成能に関して新たな知見を提示している。ただ、現象の観察にとどまり、機能的な解析やヒト疾患への応用への展開力に欠ける内容である。従って、本研究の意義について、現段階では定めがたい。

発表についても、疑問、仮説、検証とその結果、という一連の流れが不明確である。特に大きな問題として感じられたのは、申請者に、研究目的という大きな観点が欠けていることである。そのため、本研究により、何が明らかになったのかが、伝わらない発表となっている。博士課程のレベルを **break through** に求めるのであれば厳しい内容と言える。また、研究期間内で論文受理まで至っていないことも留意すべき事項と言える。

様々な問題点はあるものの、それなりの新たな知見は提示できている。また、修正要求に対して真摯に対応し、かなり改善した内容となっている。特に、質疑応答の際、申請者が、この領域の基礎知識を十分に有していることが明らかであり、可能性や潜在能力の観点からは今後に期待できる。

以上、ぎりぎりの線ではあるが全員一致で合格と判定した。