

学位授与番号：甲 1 0 0 3 号

氏 名：中原 貴

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 28 年 2 月 24 日

学位論文名：

ミニブタ胎仔歯胚由来の胎生期エナメル芽細胞の分離と同定

主論文名：

**Isolation and characterization of embryonic ameloblast lineage cells derived from tooth buds of fetal miniature swine.**

（ミニブタ胎仔歯胚由来の胎生期エナメル芽細胞の分離と同定）

学位審査委員長：教授 岡野ジェームズ洋尚

学位審査委員：教授 吉田清嗣 教授 林勝彦

# 論文要旨

(2部提出)

論文提出者名

中原 貴

指導教授名

岡部 正隆

Isolation and characterization of embryonic ameloblast lineage cells derived from tooth buds of fetal miniature swine

(ミニブタ胎仔歯胚由来の胎生期エナメル芽細胞の分離と同定)

Taka Nakahara, Noriko Tominaga, Junko Toyomura, Toshiaki Tachibana, Yoshiaki Ide, Hiroshi Ishikawa

*In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, Published online: 23 December 2015  
DOI: 10.1007/s11626-015-9987-7.

エナメル質は、生体の中で最も硬い組織であり、その形成はエナメル芽細胞が担う。しかし、歯の萌出過程でエナメル芽細胞は消失するため、完成後のエナメル質は代謝がなく修復・再生がみられない。これまで、げっ歯類の常生歯に由来するエナメル芽細胞が *in vitro* 研究に用いられてきた。しかし、常生歯はヒトの歯とは大きく異なるため、ヒトに類似した高等動物の細胞材料が求められている。

本研究は、ミニブタ胎仔歯胚のエナメル上皮組織から初代培養を通じて上皮細胞群の分離と同定を行った。実験は、胎齢 90 日目のクラウン系ミニブタ頭部の下顎骨から第四乳臼歯歯胚を摘出し、歯胚内部の歯髓組織を除去した後、初代培養を行った。アウトグロースした細胞がコンフルエントに達した後、上皮細胞群を選択的に分離するため“セル・フィッシング法”によって敷石状細胞群だけを分離培養して、継代数 7 まで継代培養を行った。

選択的分離に成功した敷石状細胞は、デスモゾーム-トノフィラメント細胞間接着装置を有する上皮細胞であった。また、RT-PCR によって一連のエナメル芽細胞特異的マーカー遺伝子の発現を認めた。ウェスタンブロット法ではエナメルマトリックスタンパク質である ameloblastin と amelogenin の産生、ならびに蛍光免疫染色によって細胞質内に顆粒状に存在し、一部の分泌顆粒では両者の共局在が観察された。細胞表層では、開口分泌された分泌顆粒の膜回収機構を示唆する多胞化した小胞構造も観察された。また、TEM 解析では、同細胞は豊富なグリコーゲンの蓄積が観察され、PAS 染色でも陽性像を認めた。

本研究で分離・同定に成功したエナメル芽細胞群は、エナメル芽細胞特異的マーカー遺伝子の発現と主要なエナメルマトリックスタンパク質の産生、および開口分泌を示唆する分泌顆粒の局在が明らかとなった。今後は、single cell cloning を併用した細胞株の樹立を試みる。そして、エナメル質の実質欠損に対して、再生エナメル質“バイオエナメル”による修復治療を可能とする研究開発をめざす。

## 論文審査の結果の要旨

中原貴氏の学位申請論文は、主論文1編、副論文12編からなり、主論文は「Isolation and characterization of embryonic ameloblast lineage cells derived from tooth buds of fetal miniature swine.」という題名の英文論文で、2015年にIn Vitro Cellular & Developmental Biology . Animal誌 (IF=1.145)に発表されております。以下、審査委員会の審査結果をご報告いたします。

去る平成28年2月17日、吉田清嗣教授、林勝彦教授のご臨席のもと、公開学位審査委員会を開催し、中原貴氏による研究概要の発表に続いて、口頭試験を行いました。

席上、

- ・ げっ歯類のエナメル芽細胞とヒトおよびブタのエナメル芽細胞の性状が異なるが、その根底にある分子メカニズムはなにか？
- ・ 胎生90日の胎仔を使用しているが、この発生段階を選んだ理由は何か？
- ・ 中原氏が開発したCell Fishing法において線維芽細胞の含有を最小限に留めるためどのような技術的工夫をしたのか？
- ・ 臨床の現場でヒトエナメル芽細胞を採取できないか？
- ・ ヒトiPS細胞からエナメル芽細胞を分化誘導して研究に使用することはできないか？
- ・ 何世代まで細胞の性質を変えずに継代培養が可能か？
- ・ グリコーゲンを有する形態は継代培養しても変化はないのか？
- ・ 再生医療への応用を見据え、In vitroでエナメル質シートを作成するための培養方法はないのか？

など多くの質問があり活発な議論が行われましたが、中原氏は的確に回答いたしました。

その後、吉田清嗣教授、林勝彦教授と慎重に審議した結果、中原氏の研究はヒト細胞に近い性状を持つブタエナメル芽細胞株を樹立し細胞生物学的研究への利用を可能にした功績があり、本論文は学位申請論文として十分価値があるものと認めた次第です。