

氏 名	樋 上 あつし
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1875 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Disruption of actin cytoskeleton and anchorage-dependent cell spreading induces apoptotic death of mouse neural crest cell cultured in vitro (細胞骨格の破壊および基質との接着阻害により惹起されるマウス神経堤細胞のアポトーシスについて)
論文調査委員	(主 査) 教 授 高 橋 良 輔 教 授 金 子 武 嗣 教 授 橋 本 信 夫

論 文 内 容 の 要 旨

脊椎動物の発生において、頭部神経堤細胞は後脳の神経上皮より出て腹側の鰓弓へ遊走し、顎顔面の硬組織や知覚神経節をはじめとする頭頸部の主要な組織を形作る。マウス正常発生では、この遊走経路中に一致してアポトーシス細胞が多く観察される。発生過程におけるプログラム細胞死は指間部に見られるもののようにその意義が明確になっているものもあるが、遊走中の頭部神経堤細胞のアポトーシスに関してはその詳細、意義は未だよく分かっていない。頭頸部の催奇形因子であるレチノイン酸を投与されたマウス胚子の神経堤細胞を調べると、神経管近傍において神経堤細胞の領域に一致して広範な細胞死が観察されることから、レチノイン酸投与による小顎症等の頭頸部奇形誘発に神経堤細胞のアポトーシスが関与している可能性が示唆される。本研究では、遊走するマウス頭部神経堤細胞の生存と遊走に、細胞骨格と足場依存性による細胞形態の保持が重要であろうとの仮説を立て、神経堤細胞の培養法を用いてそれを検証した。

胎生8.5日マウスの後脳上皮細胞を分離し、フィブロネクチンを含む培地上で培養した。神経堤細胞特異的抗体を用いた免疫組織化学法にて増殖した細胞が頭部神経堤細胞であることを確認した後、この培地にアクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D および頭部神経堤細胞の遊走に関わっていると考えられているプロテイナーゼ (MMP-2) をそれぞれ加えて培養を行った。処理群およびコントロール群それぞれについて、細胞化学法によりアクチンと細胞核 DNA の二重染色を行い形態の観察を行った。次に TUNEL 法によりアポトーシスの評価を行い、TUNEL 陽性細胞の割合を処理群とコントロール群とで比較検討した。

サイトカラシン D によりアクチンによる細胞骨格が保持できなくなった神経堤細胞は、アポトーシスに陥った細胞にしばしば見られる細胞核の凝縮をきたし、MMP-2 により基質との接着を阻害された神経堤細胞もアポトーシス細胞に特徴的な形態的变化をきたした。そして何れの場合も TUNEL 陽性細胞の割合がコントロール群と比して有意に上昇した。適切な細胞形態の維持と足場依存的な細胞の伸展が頭部神経堤細胞の生存に必須であることが本研究により示された。また MMP-2 などのプロテイナーゼの時間および部位特異的な発現が頭部神経堤細胞の遊走と分化を調節している可能性があると考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

脊椎動物の発生において、頭部神経堤 (CNC) 細胞は後脳背側より出て腹側の鰓弓へ遊走し、顎顔面の硬組織、知覚神経節などの頭頸部の主要な組織を形作る。マウス胎児では、CNC 細胞の遊走経路中にアポトーシス細胞が多く観察されるが、その詳細やメカニズムはよく分かっていない。本研究は、マウス CNC 細胞の細胞培養を用い、遊走中の CNC 細胞がアポトーシスに陥る条件と、そのメカニズムを明らかにすることを目的として行われた。マウス胎齢8.5日マウス胚の後脳神経上皮細胞を培養して CNC 細胞を得た。培地にアクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D および CNC 細胞の遊走に関わると考えられるプロテイナーゼ (MMP-2) をそれぞれ加え、免疫組織化学法を用いた細胞形態の観察と TUNEL

法によるアポトーシスの評価を行った。アクチン細胞骨格が保持できなくなった、もしくは MMP-2 により基質との接着を阻害された CNC 細胞は異常な形態的变化をきたし、何れの場合も TUNEL 陽性細胞が有意に増加した。本研究の結果から、適切な細胞形態の維持と足場依存的な細胞の伸展が CNC 細胞の生存に必須であることが示された。

以上の研究は、顎顔面の発生における頭部神経堤細胞の細胞学的特性の解明に貢献し、顎顔面の正常及び異常発生学に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成17年2月8日実施の論文内容とそれに関連した研究分野の試問を受け、合格と認められたものである。