学位論文題名

骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化に対する
細胞外マトリックスの影響The Effect of the Extracellular Matrix on Differentiation
of Bone Marrow Stromal Cells into Osteoblasts

学位論文内容の要旨

【目的】細胞の分化は、種々の成長因子ばかりでなく細胞外マトリックスの影響も受けることが、近年明らかとなった。細胞外マトリックスはコラーゲンを主成分としているが、骨芽細胞の分化誘導とどのような関わりを持っているのかは不明である。そこで今回骨髄間質細胞(骨髄細胞)を用い、各種形状のコラーゲンが骨芽細胞の分化にどのように影響するかを調べ、細胞外マトリックスと細胞分化の間にはどのように関わりがあるかを検討した。

【材料と方法】雄Wistar系ラット 6-8週齢を屠殺後、無菌的に大腿骨を採取、可及的に軟組織を除去後、骨端を分離した。骨髄腔を培養液で洗浄後、骨髄細胞を採取し、培養に用いた。培地は α -MEMに15%FCS、抗生物質を加えたもの(以下 St. Mem. とする)を使用した。骨髄細胞はT-25 flask内で培地を一日おきに交換しながらコンフルエントまで培養した。浮遊細胞を可及的に除去後、付着細胞を継代し、 5.6×10^3 個/cm²に細胞数を調製して実験に供した。この際通常のディッシュで培地に St. Mem. を用いたものをnegative control, St. Mem. に 10^{-8} M dexamethasone (DEX) および10mM β -glycerophosphate (β -GP)を加えたものをpositive controlとした。

細胞は細菌培養用ディッシュにI型コラーゲンゲル(高研、PC、ゲル濃度0.1%, 0.3%, 0.5%)をコートしたディッシュ、I型コラーゲンコートディッシュ、そして細菌培養用ディッシュにIV型コラーゲン(高研、ゲル濃度0.3%)をコートしたディッシュ上で培養した。培地としては St. Mem. に3mM β -GP を加えたものを使用した。

位相差顕微鏡による経時的形態観察、培養終了後の光学顕微鏡、透過型電子顕微鏡による形態学的観察および生化学的分析により、骨芽細胞への分化の程度を検討した。

【結果】ラット骨髄より骨髄細胞を採取し、通法に従い培養すると線維芽細胞の形態を示しながら増殖し、コンフルエントに達した。その後浮遊細胞を除去し、継代したものを骨髄細胞として使用した。コラーゲンゲル上で培養した場合、骨髄細胞はコンフルエントに達した後、形態を多角形で敷石上に変化させた。その後も細胞は緩やかに増殖を続け、培養開始後約2週間で結節を形成し、結節内部に不透過像を形成した。この不透過結節は経時的に拡大し、さらに培養開始後4週間で不透過部位が融合し、さらに大きな不透過結節を形成し

た。この不透過結節は Von Kossa染色で黒褐色を呈し、石灰化組織であることが明らかとなった。なお他の培養条件下では線維芽細胞の形態を保持し、結節の形成は認められなかった。

この石灰化組織が骨様組織であるか否かを検討するため、光学ならびに電子顕微鏡による観察を行った。石灰化結節部では細胞がゲル内に侵入し、細胞は三次元的に配列していた。そして電子顕微鏡による観察から、盛んにコラーゲンを合成しているのが認められた。さらに細胞外マトリックス中には内部に針状結晶を伴った二重膜構造を示す基質小胞様の構造物、コラーゲン線維上への針状結晶の沈着が認められた。このことは、コラーゲンゲル上で培養された細胞は生体内における初期石灰化の過程をたどっていることを示すものである。なお石灰化結節部の細胞を観察すると、細胞質に層板構造をしめす豊富な粗面小胞体が認められ、その間にはミトコンドリアが散在していた。ゴルジ体は核の近傍に存在し、タンパク合成が盛んであることがうかがわれた。微量元素分析法より石灰化結節部の結晶を分析すると、CaとPが多量に検出され、ヒドロキシアパタイトと推定された。

さらに結節中に存在する細胞が骨芽細胞であるかどうか、また細胞外マトリックスにより細胞の形質発現がどのように変化するかを、骨芽細胞の形質であるアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、オステオカルシン量を定量することで検討した。

I型コラーゲンゲル上で培養した場合、ALP活性は経時的に増加し、骨芽細胞の形質を発現していることが明らかとなった。細胞の増殖をDNA量の変化にて分析を行ったところ、コラーゲンゲル上でのDNA量の変化は播種後3週目まで経時的に増加し、その後増加は認められなかった。同時にALP活性が上昇し、細胞増殖が停止すると形質発現の増加が認められた。

骨髄細胞はin vitroにおいて 10^{-8} M DEX および 10mM β -GP 存在化で骨芽細胞に分化し骨様組織を形成することが報告されており、オステオカルシンの産生が認められた。コラーゲンゲル上で培養した場合でも培養開始後3週よりオステオカルシンの産生が認められ、DEX投与骨髄細胞と同様、コラーゲンゲル上で骨髄細胞は骨芽細胞に分化していることが明らかとなった。

I型コラーゲンゲル濃度が骨芽細胞への分化にどのような影響があるかを検討するため、0.1%、0.3%、0.5%濃度のゲル上で骨髄細胞を培養した。骨芽細胞への分化能はゲル濃度が高いものほど高い傾向を示したが、ALP活性、オステオカルシンの産生に有意な差は認められなかった。

コラーゲンの性状および種類が骨芽細胞の分化にどのような影響を与えるかを検討するため、I型コラーゲンコートディッシュ、細菌培養用ディッシュにIV型コラーゲンをコートしたディッシュ上で骨髄細胞を培養した。両ディッシュいずれの場合でもALP活性、オステオカルシンの産生はほとんど検出されず、骨芽細胞の分化は認められなかった。しかしDNA量はcontrol群、ゲル上培養群と比較して高い値を示し、分化は促進しないが増殖を促進していることが考えられた。

【考察】骨髄細胞をI型コラーゲンゲル上で培養すると骨芽細胞に分化し、骨様組織を形成することを明らかにした。しかしI型コラーゲンコートディッシュ、IV型コラーゲンをコートしたディッシュ上で培養した場合骨芽細胞の分化は認められず、このことからI型コラーゲンとの接触のみでは効果を持たないこと、またコラーゲンの効果はI型に特異的であることが示された。

I型コラーゲンゲルによる分化誘導の作用機構として①I型コラーゲンのみによる効果、②I型コラーゲンおよび細胞間の相互作用、③細胞が高密度化するための単なる足場を提供、が考えられる。今後これらのどの機構が働いて骨芽細胞の分化が生じたのかを検討する必要がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 口 春 久
副 査 教 授 久 保 木 芳 徳
副 査 教 授 松 本 章

学 位 論 文 題 名

骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化に対する 細胞外マトリックスの影響

The Effect of the Extracellular Matrix on Differentiation
of Bone Marrow Stromal Cells into Osteoblasts

【目的】骨は骨芽細胞により形成されるが、骨芽細胞の分化やその調節機構には不明な点が多い。一方、細胞の分化は種々の成長因子ばかりでなく、細胞外マトリックスの影響も受けることが、近年明らかとなった。骨の細胞外マトリックスはコラーゲンを主成分としているが、骨芽細胞の分化誘導とどのような関わりを持っているのかは不明である。そこで今回骨髄間質細胞（骨髄細胞）を用い、各種形状のコラーゲンが骨芽細胞の分化にどのように影響するかを調べ、細胞外マトリックスと細胞分化の間にはどのような関わりがあるかを検討した。

【材料と方法】骨髄細胞は 6-8週齢雄のWistar系ラット大腿骨より通法に従って採取した。この細胞を15%FCSを含む α -MEM中で培養し、非接着性の細胞を除去後継代し、実験に供した。タイプIコラーゲングルまたはタイプIVコラーゲンをフィルム状にコートしたディッシュ、そのほかに既成のタイプIコラーゲンをコートしたディッシュ（コーニング社製）で3週間培養し、形態学的観察および生化学的分析を行い、骨髄細胞が骨芽細胞へ分化しているか否かを検討した。継代後は15%FCSと3mM β -glycerophosphate(β -BP)を含む α -MEM中で培養した。

【結果】タイプIコラーゲングル上で培養した場合、骨髄細胞はコンフルエントに達した後、緩やかに増殖を続け、培養開始後約2週間で不透過結節を形成した。この不透過結節は経時的に拡大し、培養開始後4週間で不透過部位が融合し、さらに大きな不透過結節を形成した。この不透過結節はVon Kossa染色で黒褐色を呈し、石灰化組織であることが明らかとなった。なお他の培養条件下では線維芽細胞の形態を保持し、結節の形成は認められなかった。

この石灰化組織が骨様組織であるか否かを検討するため、光学ならびに電子顕微鏡による観察を行った。石灰化結節部では細胞がゲル内に侵入し、細胞は三次元的に配列していた。そして電子顕微鏡による観察から、盛んにコラーゲンを合成している像が認められた。さらに細胞外マトリックス中には内部に針状結晶を伴った二重膜構造を示す基質小胞様の構造物、コラーゲン線維上への針状結晶の沈着が認められた。このことは、コラーゲンゲル上で培養された細胞は生体内における初期石灰化の過程をたどっていることを示すものである。石灰化結節部の結晶を微量元素分析法より分析すると、CaとPが多量に検出され、ヒドロキシアパタイトと推定された。

さらに結節中に存在する細胞が骨芽細胞であるかどうか、また細胞外マトリックスにより細胞の形質発現がどのように変化するかを、骨芽細胞の形質であるアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、オステオカルシン量を定量することで検討した。

I型コラーゲンゲル上で培養した場合、ALP活性は経時的に増加し、骨芽細胞の形質を発現していることが明らかとなった。骨髄細胞はin vitroにおいて 10^{-8} M dexamethasone (DEX) および 10mM β -GP 存在化で骨芽細胞に分化し骨様組織を形成することが報告されており、オステオカルシンの産生が認められた。コラーゲンゲル上で培養した場合でも培養開始後3週よりオステオカルシンの産生が認められ、DEXを投与した骨髄細胞と同様、コラーゲンゲル上で骨髄細胞は骨芽細胞に分化していることが明らかとなった。

コラーゲンの性状および種類が骨芽細胞の分化にどのような影響を与えるかを検討するため、I型コラーゲンコートディッシュ、細菌培養用ディッシュにIV型コラーゲンをコートしたディッシュ上で骨髄細胞を培養した。両ディッシュいずれの場合でもALP活性、オステオカルシンの産生はほとんど検出されず、骨芽細胞の分化は認められなかった。しかしDNA量はcontrol群、ゲル上で培養した群と比較して高い値を示し、分化は促進しないが増殖を促進していることが考えられた。

【考察】骨髄細胞をI型コラーゲンゲル上で培養すると骨芽細胞に分化し、骨様組織を形成することを明らかにした。しかしI型コラーゲンコートディッシュ、IV型コラーゲンをコートしたディッシュ上で培養した場合、骨芽細胞の分化は認められず、このことからI型コラーゲンとの接触のみでは効果を持たないこと、またコラーゲンの効果はI型に特異的であることが示された。

I型コラーゲンゲルによる分化誘導の作用機構として①I型コラーゲンのみによる効果、②I型コラーゲンおよび細胞間の相互作用、③細胞が高密度化するための単なる足場を提供、が考えられる。今後これらのどの機構が働いて骨芽細胞の分化が生じたのかを検討する必要がある。