

学 位 論 文 題 名

ラット骨髄間質細胞の
I 型コラーゲンゲル内三次元培養における
骨芽細胞関連遺伝子群の発現誘導

学位論文内容の要旨

骨髄中には多分化能を有する間葉系幹細胞が存在し、おかれた環境条件により中胚葉由来の骨芽細胞、軟骨細胞、筋原細胞、脂肪細胞等の様々な細胞に分化することが知られている。また、細胞は生体内において、I 型コラーゲンを含めた、種々の細胞外マトリックス(ECM)との接着による相互作用を受けている。すなわち細胞表面には、インテグリン等の細胞接着分子が存在し、ECM とインテグリンが結合して接着斑が形成されると、チロシンキナーゼ活性をもつ focal adhesion kinase (FAK) が活性化され、様々な情報伝達物質を介して細胞骨格のアクチンファイバーあるいは、mitogen activated protein kinase (MAPK) 系等の下流の情報伝達系を活性化する。このように ECM は細胞の接着や移動のみならず増殖や分化に関与していることが知られている。しかし、通常の培養条件下では、生理的条件下と同等な ECM からのシグナルを細胞が受容し得ないと考え、ECM から細胞が受容するシグナルをより生理的な環境に近づけるため、細胞を三次元的に配置して培養する三次元培養法が開発されており、様々な細胞の分化および形質発現に影響を及ぼすとの報告がされている。

そこで本研究は、ラット骨髄間質細胞の I 型コラーゲンゲル内三次元培養法を用い、細胞の三次元的配置ならびに ECM と骨芽細胞分化との関連性について調べる目的で、ラット骨髄間質細胞を、通常の培養ディッシュを用いて単層培養した群 (2D 群)、I 型コラーゲンにてコートされたディッシュで単層培養した群(COAT 群)、ならびに I 型コラーゲンゲル内で三次元的に培養した群(3D 群)の 3 条件にてそれぞれ培養し、骨芽細胞関連遺伝子群の発現を比較検討した。

実験に用いた細胞は、6 週齢ウィスター系雄ラットの大腿骨骨髄より採取し、15%FBS 含有 α -MEM 培地にて培養し、細胞培養用フラスコに付着した細胞の

みを分離して、得られた細胞を骨髄間質細胞として以下の実験に使用した。また、コラーゲンは、ウシ真皮よりペプシン処理で可溶化された I 型コラーゲン酸性溶液を、COAT 群では、培養用ディッシュ上に薄く引き伸ばした後、乾燥させ、コラーゲンフィルムの酸を除去するために、PBS で洗浄したものを、3D 群では、HEPES buffer および 5 倍濃度の α -MEM を加えて中性化した I 型コラーゲン溶液に細胞を混和した後、CO₂ インキュベータ内に約 2 時間放置しゲル化させた。また、本研究においてはデキサメタゾン、 β -グリセロホスフェート等の分化誘導物質を添加せずに細胞培養を行なった。

最初に、2D 群ならびに 3D 群の細胞数の経時的变化を MTS アッセイにて測定した。2D 群では、0 日後から 5 日後にかけて細胞数は経時的に増加し、6 日後には 5 日後と比較して減少した。3D 群では、0 日後から 28 日後にかけて細胞数は経時的に増加し、35 日後の細胞数は 28 日後とほぼ同じ細胞数を示した。この結果から、3D 群における 28 日後の細胞密度、すなわち 15×10^5 個/ml をコンフルエントの細胞数とみなし、以後の実験における 3D 群の播種密度とした。また、各群の細胞がコンフルエントに達した時点を以下の実験の開始日とし、実験開始日より 1、2、ならびに 3 週後に各群の細胞を回収して以後の実験に用いた。

次に、骨芽細胞が特異的に産生する非コラーゲン性細胞外マトリックスであるオステオカルシン (OCN) およびボーンシアロプロテイン (BSP) の相対的 mRNA 量を Smart Cycler System を用いたリアルタイム RT-PCR 法にて測定した。OCN の mRNA は、1 週後では 2D 群、COAT 群ならびに 3D 群のいずれにおいても検出できなかった。2 週後では、3D 群のみ OCN の mRNA が検出され、3 週後では、3D 群の OCN の発現が、2 週後に比べて著しく増加したが、2D 群ならびに COAT 群ではその発現は検出されなかった。BSP の mRNA は、OCN と同様に 1 週後では、いずれの群においても検出できなかった。2 週後では、3D 群のみ BSP の mRNA が検出され、3 週後では、3D 群の BSP の発現が、2 週後に比べて著しく増加したが、2D 群ならびに COAT 群ではその発現は検出されなかった。

さらにリアルタイム PCR 法にて mRNA 量の著しい増加が認められた OCN および BSP の、培養 3 週後の各サンプルを、ノーザンブロット法にて確認した。

OCN の mRNA は 3D 群にのみ約 0.6kb のバンドが検出され、2D 群及び COAT 群においては検出されなかった。また、BSP の RNA プロブを用いたところ、3D 群にのみ約 2kb 及び 1.6kb の BSP の mRNA に相当する位置に 2 本のバンドが検出され、他の 2 群では検出されなかった。

次に、骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化の指標の一つとして、alkaline phosphatase (ALP) の活性を測定した。ALP 活性はフェニルリン酸基質法にて測定し、また DNA 量はヘキスト 33258 を用いて測定して、求められた ALP 活性値を DNA 量で除し、細胞あたりの ALP 活性値を算出した。1 週後では 3 群間に顕著な差は認められなかったが、2 週後では、3D 群は 2D 群及び COAT 群と比較して約 2 倍高い値を示した。さらに 3 週後では 3D 群は 2D 群の約 4.7 倍、COAT 群の約 3.2 倍高い値を示した。また、3 週後の COAT 群は 2D 群と比較してやや高い値を示した。

また、骨芽細胞関連遺伝子であるオステオポンチン (OPN)、I 型コラーゲン α 1(I) 鎖 ($\alpha 1$) ならびに ALP の相対的 mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法にて測定した。OPN 遺伝子の発現は、1 週後では 3D 群は他の 2 群と比較してやや多く発現しており、2 週後および 3 週後において経時的に増加した。これに対し、2D 群及び COAT 群では、1 週後から 3 週後において、その発現量の変化は認められなかった。 $\alpha 1$ の mRNA は、いずれの群でも産生が認められたが、3 週後の 3D 群でのみ高い発現が見られた。ALP の mRNA は、OPN と同様に 1 週後では 3D 群が他の 2 群と比べて高く、2 週後および 3 週後において発現量が増加したが、他の 2 群では 1 週後から 3 週後において変化は認められなかった。

本研究において、ラット骨髄間質細胞を I 型コラーゲングル内三次元培養法および通常の単層培養法やコラーゲンコート上での単層培養法にてそれぞれ培養し、骨芽細胞関連遺伝子群の発現を比較検討した。

以上をまとめると

1. 骨芽細胞特異的に発現が認められる、OCN 及び BSP の mRNA は、3D 群の 2 週及び 3 週後において発現が誘導されたが、2D 群及び COAT 群では検出されなかった。
2. ALP 活性は、3D 群の 2 週及び 3 週後において 2D 群及び COAT 群と比較して高値を示した。
3. OPN、 $\alpha 1$ 及び ALP の mRNA の発現量は、3D 群において 2D 群及び COAT 群と比較して高値を示した。

以上の結果より、ラット骨髄間質細胞をコラーゲングル内で三次元的に配置して培養すると、骨芽細胞への分化が誘導されることが明らかになった。このことから、培養下におけるラット骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化において、三次元的な細胞配列と、三次元的に構築された ECM からのシグナルが重要な要素であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 浪 雅 光

副 査 教 授 田 村 正 人

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

ラット骨髄間質細胞の

I 型コラーゲンゲル内三次元培養における

骨芽細胞関連遺伝子群の発現誘導

審査は主査、副査全員が一同に会して口頭で行なった。はじめに申請者に対し本論文の要旨の説明を求めたところ、以下の内容について論述した。

本研究は、ラット骨髄間質細胞の I 型コラーゲンゲル内三次元培養法を用い、細胞の三次元的配置ならびに細胞外マトリックス(ECM)と骨芽細胞分化との関連性について調べる目的で、ラット骨髄間質細胞を、通常の培養ディッシュを用いて単層培養した群 (2D 群)、I 型コラーゲンにてコートされたディッシュで単層培養した群(COAT 群)、ならびに I 型コラーゲンゲル内で三次元的に培養した群(3D 群)の 3 条件にてそれぞれ培養し、骨芽細胞関連遺伝子群の発現を比較検討した。実験に用いた細胞は、ウィスター系雄ラットの大腿骨骨髄より採取し、15%FBS 含有 α -MEM 培地にて培養し、細胞培養用フラスコに付着した細胞のみを分離して、得られた細胞を骨髄間質細胞として以下の実験に使用した。最初に、骨髄間質細胞の細胞数の経時的変化を MTS アッセイにて測定したところ、3D 群では、0 日後から 28 日後にかけて細胞数は経時的に増加し、35 日後の細胞数は 28 日後とほぼ同じ細胞数を示した。この結果から、3D 群における 28 日後の細胞密度、すなわち 15×10^5 個/ml をコンフルエントの細胞数とみなし、以後の実験における 3D 群の播種密度とした。また、各群の細胞がコンフルエントに達した時点を以下の実験の開始日とし、実験開始日より 1、2、ならびに 3 週後に各群の細胞を回収して以後の実験に用いた。次に、骨芽細胞が特異的に産生する非コラーゲン性細

胞外マトリックスであるオステオカルシンおよびボーンシアロプロテインの mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法及びノーザンブロット法にて測定したところ、3D 群の 2 週及び 3 週後において発現が誘導されたが、2D 群及び COAT 群では検出されなかった。また、骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化の指標の一つとして、alkaline phosphatase (ALP) の活性を測定したところ、3D 群の 2 週及び 3 週後において 2D 群及び COAT 群と比較して高値を示した。さらに、骨芽細胞関連遺伝子であるオステオポンチン、I 型コラーゲン α (I)鎖ならびに ALP の相対的 mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法にて測定したところ、3D 群において 2D 群及び COAT 群と比較して高値を示した。以上の結果より、培養下におけるラット骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化において、三次元的な細胞配列と、三次元的に構築された ECM からのシグナルが重要な要素であることが示唆された。

引き続き審査担当者と申請者のあいだで論文内容および関連事項について質疑応答が行なわれた。

主な質問事項として、

- (1) 三次元培養により、骨芽細胞への分化が誘導された理由
 - (2) 細胞外マトリックスと骨芽細胞分化との関係について
 - (3) 他の中胚葉由来細胞への分化の可能性について
 - (4) リアルタイム RT-PCR 法について
 - (5) 臨床応用を考慮した上での将来的展望について
- などであった。

これらの質問に対し、申請者は適切な説明によって回答し、本研究の内容を中心とした専門分野はもとより、関連分野についても十分な理解と学識を有していることが確認された。本研究は、ラット骨髄間質細胞をコラーゲングル内で三次元的に配置して培養すると、骨芽細胞への分化が誘導されることを明確にした点が高く評価され、歯科医学の発展に十分貢献するものであり、審査担当者全員は、学位申請者が博士（歯学）の学位を授与するに価するものと認めた。