

医用ミニブタ歯根膜由来細胞株の樹立とその特徴

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯根膜は、歯と歯槽骨という 2 つの硬組織間に位置する解剖学上靭帯に分類される線維性結合組織であり、線維芽細胞様細胞、セメント芽細胞や骨芽細胞およびそれらに分化しうる未分化間葉系細胞等をはじめ血管ならびに神経由来の細胞を含む heterogeneous な細胞集団から成る。これらのなかで、線維芽細胞様細胞は他の結合組織の線維芽細胞とは異なり、アルカリフォスファターゼ (ALP)、オステオポンチン (OPN)、Runx2 等の骨芽細胞が発現する遺伝子を発現する。歯根膜組織は、骨組織と異なり基質の石灰化は起こさない組織であるが、その機構の詳細は明らかではない。そこで、歯根膜細胞の機能を明らかにするために、歯根膜組織の特性を反映したクローン化した細胞株を樹立し、この細胞株を用いた研究が必要であると考えた。

近年、TERT (telomere reverse transcriptase) を利用して細胞の不老化を試みて、良好な結果を得られている報告がある。TERT 遺伝子産物はテロメラーゼの活性を高め、細胞の分裂回数を規定するテロメア領域の長さを維持し、細胞の分裂回数の制限をなくすことにより不老化へと導く。また、この TERT による細胞の不老化は、細胞分化や増殖に与える影響が少ないと考えられている。

本研究は、クラウン系ミニブタより歯根膜由来細胞を分離培養し、ヒト TERT 遺伝子 (hTERT) を導入した stable transfectant を作製し、歯根膜由来細胞株の樹立を行うこと、および、複数の細胞株間でそれらの性質を比較検討することを目的とした。

【材料と方法】

雄 28 ヶ月齢のクラウン系医用ミニブタ (ジャパンファーム, 鹿児島) の下顎より前臼歯を抜去し, Somerman らの方法に準じ, 歯根中央部周囲に付着した歯根膜組織を剥離し, 10%ウシ胎仔血清および 1 ng/ml ヒト組換え Fibroblast growth factor-2 を含む MEM 培地で 37°C, 5%CO₂ 存在下にて培養を行い, 分離増殖した細胞を歯根膜由来細胞とした。分離増殖した歯根膜由来細胞を 3 回継代後, I 型コラーゲンコートしたディッシュに細胞を 1×10⁶ 個/dish で播種し, コンフルエントに近い状態になったところでヒト TERT 発現プラスミド (pCI-neohTERT) をリン酸カルシウム法によりトランスフェクトした。トランスフェクト 1 週間後, アミノグリコシド系抗生物質である G418 によりトランスフェクタントの選別を行った。10 日後, G418 耐性クローン細胞がコンフルエントに近い状態になったところで, 限界希釈法を用いて細胞のクローニングを行った。得られた

27 種類のクローン化された細胞株を TeSPDL (Telomerase Swine Periodontal Ligament) 1-32 と名付けた。それらの中から比較的増殖傾向の高い 3 種 (TeSPDL23, 31 ならびに 32) の細胞を選択し, BrdU の取り込みによる細胞増殖活性, Reverse transcriptase-polymerase chain reaction 法による mRNA 発現, ALP 活性およびアリザリンレッド染色による細胞間基質石灰化能について調べた。

【結果】

TeSPDL23, 31, および 32 細胞の形態を位相差顕微鏡により観察したところ, すべての細胞が線維芽細胞様の形態を示していた。また, 各 TeSPDL 細胞の細胞増殖活性について調べたところ, TeSPDL23 細胞が最も高く, 次いで TeSPDL32, TeSPDL31 細胞の順であった。各 TeSPDL 細胞の $\alpha 1(I)$ collagen, OPN, オステオカルシン (OCN) および Runx2 の mRNA 発現は, TeSPDL23 細胞では $\alpha 1(I)$ collagen, OPN, OCN および Runx2 のいずれもが発現していた。一方, TeSPDL31 細胞は $\alpha 1(I)$ collagen が発現していたが, OPN, OCN および Runx2 の mRNA の発現は検出されなかった。また, TeSPDL32 細胞は $\alpha 1(I)$ collagen および OPN の発現が認められたが, Runx2 と OCN の発現は認められなかった。TeSPDL23 細胞は, 培養 1 週および 2 週後における ALP 活性が調べた各 TeSPDL 細胞のうち最も高かった。TeSPDL31 細胞は, 培養 1 週および 2 週後における ALP 活性が各 TeSPDL 細胞のうち最も弱く, TeSPDL32 細胞は TeSPDL31 と TeSPDL23 細胞の中間の活性を示していた。最も ALP 活性が高かった TeSPDL23 細胞とマウス線維芽細胞 NIH3T3 およびマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 の ALP 活性を比較検討したところ, TeSPDL23 細胞は MC3T3-E1 細胞と同程度の高い ALP 活性を示していた。この TeSPDL23 細胞と, NIH3T3 および MC3T3-E1 の細胞間基質石灰化能力をアリザリンレッド染色により調べたところ, MC3T3-E1 細胞では明らかに石灰化形成物が認められたが, TeSPDL23 細胞ではアリザリンレッド染色により染色されず石灰化は認められなかった。

【考察】

調べた 3 種類の TeSPDL 細胞のうちで増殖活性の高い TeSPDL23 細胞は, $\alpha 1(I)$ collagen, OPN, OCN および Runx2 のいずれの mRNA 発現が顕著に認められ, また, MC3T3-E1 細胞と同程度の高い ALP 活性を示したが, 細胞間基質石灰化能力は有さなかった。これらから, TeSPDL23 細胞は歯根膜細胞の性質を有していると考えられた。また, mRNA 発現の細胞株間による違いから, 歯根膜に存在する線維芽細胞様細胞に多様な subpopulation が存在している可能性が考えられた。

【結論】

本研究において, クラウン系ミニプタの歯根膜組織より hTERT 遺伝子導入によって 27 種の細胞株を得た。調べた 3 種類の TeSPDL 細胞は, 増殖活性, $\alpha 1(I)$ collagen, OPN, OCN ならびに Runx2 の mRNA 発現に違いが見られた。本研究で得られた歯根膜由来細胞株は, 歯根膜に存在する多様な subpopulation の細胞を反映している可能性が示唆され, 今後の歯根膜の機能の解明に有用であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 飯 田 順一郎
副 査 教 授 田 村 正 人
副 査 教 授 鈴 木 邦 明
副 査 助 教 授 石 崎 明

学位論文題名

医用ミニブタ歯根膜由来細胞株の樹立とその特徴

審査は審査員全員出席の下で行った。まず申請者に提出論文要旨の説明を求め、その後に提出論文と関連分野に関する口頭試問の形式で審査した。まず申請者から以下の説明がなされた。

歯根膜は、歯と歯槽骨という2つの硬組織間に位置する解剖学上靭帯に分類される線維性結合組織であり、線維芽細胞様細胞、セメント芽細胞や骨芽細胞およびそれらに分化しうる未分化間葉系細胞等をはじめ血管ならびに神経由来の細胞を含む heterogeneous な細胞集団から成る。これらのなかで、線維芽細胞様細胞は他の結合組織の線維芽細胞とは異なり、アルカリフォスファターゼ (ALP)、オステオポンチン (OPN)、Runx2 等の骨芽細胞が発現する遺伝子を発現する。歯根膜組織は、骨組織と異なり基質の石灰化は起こさない組織であるが、その機構の詳細は明らかではない。そこで、歯根膜細胞の機能を明らかにするために、歯根膜組織の特性を反映したクローン化した細胞株を樹立し、この細胞株を用いた研究が必要であると考えた。

近年、TERT (telomere reverse transcriptase) を利用して細胞の不死化を試みて良好な結果を得られている報告がある。TERT 遺伝子産物はテロメラーゼの活性を高め、細胞の分裂回数を規定するテロメア領域の長さを維持し、細胞の分裂回数の制限をなくすことにより不死化へと導く。

本研究は、クラウン系ミニブタより歯根膜由来細胞を分離培養し、ヒト TERT 遺伝子 (hTERT) を導入した stable transfectant を作製し、歯根膜由来細胞株の樹立を行うこと、および、複数の細胞株間でそれらの性質を比較検討することを目的とした。

【材料と方法】ミニブタの下顎より前臼歯を抜去し、Somerman らの方法により歯根膜組織を採取し培養した。この初代培養細胞にヒト TERT 遺伝子発現プラスミド (pCI-neohTERT) を導入し強制発現させ、テロメラーゼ活性を高めて不死化させ、クローン化した。これらの細胞株間の各種遺伝子発現等の特徴を調べた。

【結果】TeSPDL23, 31, および 32 細胞の形態を位相差顕微鏡により観察したところ、すべての細胞が線維芽細胞様の形態を示していた。また、各 TeSPDL 細胞の細胞増殖活性について調べたところ、TeSPDL23 細胞が最も高く、次いで TeSPDL32, TeSPDL31 細胞の順であった。

各細胞の $\alpha 1(I)$ collagen, OPN, オステオカルシン (OCN) および Runx2 の mRNA 発現は, TeSPDL23 細胞では $\alpha 1(I)$ collagen, OPN, OCN および Runx2 のいずれもが発現していた。一方, TeSPDL31 細胞は $\alpha 1(I)$ collagen が発現していたが, OPN, OCN および Runx2 の mRNA の発現は検出されなかった。また, TeSPDL32 細胞は $\alpha 1(I)$ collagen および OPN の発現が認められたが, Runx2 と OCN の発現は認められなかった。TeSPDL23 細胞は, 培養 1 週および 2 週後における ALP 活性が調べた各細胞のうち最も高かった。TeSPDL31 細胞は, 培養 1 週および 2 週後における ALP 活性が各細胞のうち最も弱く, TeSPDL32 細胞は TeSPDL31 と TeSPDL23 細胞の中間の活性を示していた。最も ALP 活性が高かった TeSPDL23 細胞とマウス線維芽細胞 NIH3T3 およびマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 の ALP 活性を比較検討したところ, TeSPDL23 細胞は MC3T3-E1 細胞と同程度の高い ALP 活性を示していた。この TeSPDL23 細胞と, NIH3T3 および MC3T3-E1 の細胞間基質石灰化能力をアリザリンレッド染色により調べたところ, MC3T3-E1 細胞では明らかに石灰化形成物が認められたが, TeSPDL23 細胞ではアリザリンレッド染色により染色されず石灰化は認められなかった。

【考察】調べた 3 種類の TeSPDL 細胞のうちで増殖活性の高い TeSPDL23 細胞は, $\alpha 1(I)$ collagen, OPN, OCN および Runx2 のすべての mRNA 発現が顕著に認められ, また, MC3T3-E1 細胞と同程度の高い ALP 活性を示したが, 細胞間基質石灰化能力は有さなかった。これらから, TeSPDL23 細胞は歯根膜細胞の性質を有していると考えられた。また, mRNA 発現の細胞株間による違いから, 歯根膜に存在する線維芽細胞様細胞に多様な subpopulation が存在している可能性が考えられた。

【結論】本研究において, クラウン系ミニプタの歯根膜組織より hTERT 遺伝子導入によって 27 種の細胞株を得た。調べた 3 種類の TeSPDL 細胞は, 増殖活性, 骨関連遺伝子の発現に違いが見られた。本研究で得られた歯根膜由来細胞株は, 歯根膜に存在する多様な subpopulation の細胞を反映している可能性が示唆され, 今後の歯根膜の機能の解明に有用であると考えられた。

以上の説明の後に以下の試問をした。

1. ミニプタを用いた根拠について
2. 歯根膜細胞の採取法について
3. 石灰化するか否かの違いが生じる機構について
4. 考えられる歯根膜の常態について
3. 樹立した細胞株をもちいた今後の研究の展開について

本研究は, 医用ミニプタの歯根膜細胞から多数の歯根膜由来細胞株を樹立し, そのうちの 3 つの細胞株を選択してその性質を検討したところ, 異なる性質を有することを明らかにしたものである。この成果は, これまで単一の性質を持つと考えられていた歯根膜細胞の中に, ささまざまな性質を持つものが存在していることを明らかにしたという点において, 今後, 新たな観点から歯根膜の研究が展開される可能性を見出した画期的な発見であると評価できる。またそれぞれの性質を持つ株化された細胞を得ていることは, その研究の発展に寄与するところは大きく, 今後の歯科医学の発展に多大な貢献をしたものと高く評価できる。加えて, 試問の結果から, 申請者は本研究に直接関係する事項のみならず, 関連分野における基礎的, 臨床的な広い学識を有していると認められた。よって, 申請者は博士 (歯学) の学位を授与される資格を有するものと認めた。