



Title	骨形成因子に応答して軟骨細胞へ分化する軟骨前駆細胞株の樹立
Author(s)	相川, 友直
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38880">https://hdl.handle.net/11094/38880</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	相 川 友 直 あ い か わ と も なお
博士の専攻分野の名称	博 士 ( 歯 学 )
学 位 記 番 号	第 1 1 3 2 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 6 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学 位 論 文 名	骨形成因子に应答して軟骨細胞へ分化する軟骨前駆細胞株の樹立
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松 矢 篤 三 (副査) 教 授 伊 集 院 直 邦    講 師 開   祐 司    講 師 岩 本 容 泰

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

長管の形成にみられる内軟骨性骨化は未分化間葉細胞の凝集、軟骨細胞への分化、軟骨細胞の成熟・石灰化を経て骨組織へと置換される一連の細胞分化である。軟骨細胞や骨芽細胞の細胞分化についての研究は広く行われているものの、内軟骨性骨化の初期の変化である未分化間葉細胞から軟骨細胞への分化に関する研究は少ない。この研究の進展には *in vitro* で軟骨細胞への分化能を有する安定した細胞株の樹立が期待される。

一方、骨基質中から分離された骨形成因子 (Bone Morphogenetic Protein: BMP) は、筋組織内に埋入すると内軟骨性骨化に類似した軟骨・骨形成を誘導する生物活性を有した蛋白である。BMP は胎生期の軟骨・骨形成過程や骨折治癒過程にもその発現が認められることから、軟骨・骨形成に深く関与しているとされている。これらのことから、軟骨細胞分化誘導の機序を明らかにするのに、BMP は適した分化誘導剤と考えられる。

そこで、本研究では内軟骨性骨化の理解を深めるために、BMP に応答して軟骨細胞へ分化する過程を詳細に検討し得る軟骨前駆細胞の培養系を確立することを目的とした。

#### 【研究方法】

1) 軟骨細胞に分化する間葉細胞の分離：ラット胎児筋組織より酵素消化法によって分離された間葉細胞を限界希釈法によりクローニングした。得られた各クローン細胞を寒天培地中で recombinanthuman BMP-2 (rhBMP-2) を添加して2週間培養後、トルイジンブルー (pH 2.5) 染色による異染色性により、軟骨細胞への分化を評価した。その結果、最も高い分化能を有するクローンを RMD-1 細胞と名付けて以下の実験に用いた。さらに、軟骨細胞への分化を細胞の超微形態およびグルコサミノグリカン (GAG) 合成量ならびにそのプロテオグリカンモノマー分子量の変化で評価した。また未分化な本細胞についてはその超微形態を観察し、 $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) の発現を検討した。

2) 単層培養系での培養法の確立と軟骨細胞への分化過程の検討：軟寒天培養よりも簡便かつ詳細に分化過程が検討できる単層培養系での培養条件を検定するために、rhBMP-2 濃度、I 型コラーゲン基質、細胞播種密度および血清濃度について検討した。また細胞分化過程におけるグリコサミノグリカン (GAG) 合成量、DNA 合成およびオートラジオグラムとイムノプロット法による II 型コラーゲン産生について検討した。さらに軟骨細胞分化過程のマーカーである Aggrecan, II 型コラーゲンおよびアルカリホスファターゼ (ALPase) の mRNA の発現をノーザンプロット法

で検討した。

#### 【結果】

- 1) RMD-1 細胞は未分化な超微形態を示し、SMA を発現していた。
- 2) 本細胞の軟寒天培養において、100 ng/ml の rhBMP-2 添加ではトルイジンブルー染色で異染色性を示す小コロニーが形成された。この条件で、本細胞の GAG 合成は対照の10倍まで増大し、平均分子量約2000kDa のいわゆる軟骨型プロテオグリカンを産生していた。
- 3) 単層培養系における軟骨細胞分化に適した本細胞の培養条件は I 型コラーゲン基質上で  $2.5 \times 10^5$  個/cm<sup>2</sup> 以上の細胞密度で播種し100ng/ml の rhBMP-2 を添加して0.5~2%の低血清濃度で培養することであった。本条件下の培養では RMD-1 細胞は rhBMP-2 の12時間から24時間の作用で軟骨細胞へと誘導され、8 日目には培養皿全面の細胞が軟骨細胞に分化した。この分化過程において合成されるコラーゲンは I 型から II 型へと変化した。
- 4) この単層高密度培養で、本細胞の DNA 合成は rhBMP-2 により 2 日目まで促進され、その後は逆に抑制された。この DNA 合成を完全に阻害しても軟骨細胞分化がみられたことから、本細胞は rhBMP-2 によって軟骨細胞分化の方向づけを受けた後に細胞増殖することが示唆された。
- 5) この単層高密度培養で、本細胞は 2 日目には Aggrecan, II 型コラーゲン mRNA を発現し、6 日目以後にその発現量は増大した。一方、ALPase mRNA は培養 2 週間頃より発現量が増大した。さらに、低密度培養に比べて高密度培養では  $\beta$ -アクチンの発現量は大きく減少し、軟骨細胞への分化がすすむにつれ、さらにその発現は減少した。
- 6) 本細胞は軟骨細胞分化能を有したまま、25代以上の継代培養が可能であった。

#### 【結論】

RMD-1 細胞はその細胞表現形から、rhBMP-2 に応答して 1 日以内に軟骨細胞への分化の方向づけを受けて分化を開始する軟骨前駆細胞であることが示唆された。また、rhBMP-2 の作用による本細胞の増殖は細胞高密度条件を一層促進することとなり、この条件がアクチンの発現をより抑制して、軟骨細胞分化を促進することが示唆された。RMD-1 細胞の軟骨細胞分化過程は内軟骨性骨化に類似しており、本細胞を用いた単層高密度培養実験系は内軟骨性骨化の初期の軟骨細胞分化を検討するための有用な実験系であると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は軟骨内骨化機構を理解する目的で、骨形成因子 2 (rhBMP-2) の作用によって軟骨細胞へ分化する未分化間葉細胞株の樹立を試み、得られた細胞の軟骨細胞への分化過程について検討したものである。

その結果、ラット胎児筋肉組織から分離された未分化間葉細胞株;RMD-1 細胞は、I 型コラーゲン基質上で高密度に培養すると、rhBMP-2 に応答して軟骨細胞に分化する軟骨前駆細胞であることが明らかとなった。さらに、rhBMP-2 の作用による RMD-1 細胞の増殖・分化過程は軟骨内骨化にみられる軟骨細胞の分化・成熟に類似したものであることが示唆された。

この業績は未分化間葉細胞が軟骨細胞に分化する初期の過程を検討し得る有用な実験系を確立したものであり、軟骨内骨化を理解する上で有益かつ多くの新しい示唆を与えるものである。よって、本研究者は博士(歯学)の学位を得るに十分な資格があるものと認める。