

Title	マウス歯根膜由来細胞株の樹立およびその分化機構の解析
Author(s)	田坂, 祥平
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39820">https://hdl.handle.net/11094/39820</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。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏名	田 坂 祥 平
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 4 3 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 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	マウス歯根膜由来細胞株の樹立およびその分化機構の解析
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岡 田 宏  (副査) 教 授 伊 集 院 直 邦 講 師 岩 本 資 己 講 師 井 上 博 之

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【研究目的】

歯周疾患の進行により破壊された歯周組織を再生させることが歯周治療の最終目的である。臨床的発想から歯周組織再生療法の開発が試みられてはいるが、細胞生物学に基いた歯周組織の再生機構解明がされておらず、確実な歯周組織再生治療術式の完成をみていない。これは歯周組織再生に重要な役割を果たしている歯根膜細胞の分化機構に尚不明な点が多いためである。従来の歯根膜由来細胞の実験モデルには細胞自体が単一細胞集団でない可能性があることや年齢などによる活性の差が認められること、長期間の培養が困難であることなどの問題点が存在した。そこで本研究では、歯根膜細胞の歯周組織再生における役割を明らかにするために、*in vitro*での実験モデルに必要なマウス歯根膜由来細胞株の樹立とその機能特性および分化機構の解析を行った。材料として生後2.5週 BALB/c マウスより歯根完成直後の臼歯を抜去し、歯根表面より剥離した歯根膜組織を供した。24ウェルプレートを用い、歯根膜組織を10% ウシ胎仔血清 (FCS) 含有  $\alpha$ -MEM 培地中でカバーグラスにて固定、培養を行い増殖、遊走した細胞をマウス歯根膜由来細胞とした。歯根膜由来細胞を12代継代後、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) にて刺激したところ無刺激での培養条件に比して活発な増殖が認められた。そこで bFGF 存在下で限界希釈法にてクローニングを行い、29の細胞株を得た。得られた細胞株を bFGF 非存在下でのアルカリフォスファターゼ (ALPase) 活性によりスクリーニングし、最も高い活性を示した細胞株を MPDL-22 として以下の実験に供した。MPDL-22 は130代以上継代しても増殖し続け不死化した細胞株であることが確認できた。MPDL-22 の機能特性の検討のために、ALPase 活性および DNA 量の経時的変化をそれぞれ Bessay/Lowry 法および Labarca, Paigen らの方法を用いて測定した。また細胞形態の経時的変化を位相差顕微鏡下にて観察し、石灰化物の形成についてはアリザリンレッドによる染色法を用いて検討した。MPDL-22 は bFGF 存在下では、増殖活性が促進され ALPase 活性が抑制された。形態学的には、bFGF 存在下では線維芽細胞様の形態を保つが、bFGF を除去し10% FCS 含有  $\alpha$ -MEM 培地で培養を続けると ALPase 活性の上昇が認められ、線維芽細胞様からいわゆる敷石状へ形態変化がコンフルエント後に見られた。更に培養を続けると細胞層は結節を形成しその後アリザリンレッド染色陽性の部位が出現した。このアリザリンレッド染色陽性部位の出現には  $\beta$ -グリセロリン酸の添加は必要なかった。形成された石灰化物を走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察し、構成成分を SEM 付属の元素分析計 (EDS) にて検討した結果、アリザリンレッド染色陽性部位にはカルシウムとリンを主成分とするアパタイト状の結晶が確認された。次に、MPDL-22 の細胞特性および分化過

程に検討を加えるために、産生蛋白質を mRNA レベルで Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法およびノーザンハイブリダイゼーション法を用いて確認し、その経時的変化について検討を加えた。対照として骨芽細胞株 MC3T3, 歯肉由来線維芽細胞株 MG/B6 を用い、発現量, 時期の同異の比較を行った。今回 MPDL-22 における発現の検討を行った mRNA は、コラーゲン性蛋白質であるタイプ I コラーゲンおよび歯根膜組織に多く見られるタイプ III コラーゲン, タイプ XII コラーゲン, また骨基質蛋白質であるオステオカルシン, オステオネクチン, オステオポンチンである。MPDL-22 において, タイプ I, III, XII コラーゲンおよびオステオカルシン, オステオネクチン, オステオポンチンの mRNA の発現がすべて認められた。タイプ I, III, XII コラーゲン mRNA の発現量は MC3T3, MG/B6 より MPDL-22 において多く, 細胞層の機械的強度も対照の 2 つの細胞株よりも高かった。3 種のコラーゲンの mRNA 発現はともに MPDL-22 の結節形成期, 石灰化物形成期に一致して極大を迎えた。オステオカルシンの mRNA の発現量は MPDL-22 の石灰化物形成期以降上昇した。また, MC3T3 には発現が認められたが, MG/B6 には認められなかった。オステオネクチンの mRNA の発現量は結節形成期に極大を迎え, 対照細胞株と同様の傾向を示した。オステオポンチンの mRNA の発現量は対照の 2 細胞株に比して, 非常に微少であり, 発現時期は石灰化物形成開始後であった。

以上の結果より, 本研究において樹立された MPDL-22 は生理的状況下で石灰化物形成細胞に分化する歯根膜組織由来の初めての不死化単クローン細胞株であること, およびタイプ I, III, XII コラーゲンの産生量および細胞層の性状により歯根膜細胞としての形質を保持している細胞株でもあることが示された。したがって, この MPDL-22 は *in vitro* において歯根膜細胞の形質を検討する上で, また, 歯周組織再生における歯根膜細胞の役割を検討する上で有用な実験モデルとなると考えられる。さらに, MPDL-22 の分化過程の検討より, コラーゲン合成, ALPase 活性, オステオカルシン合成が結節形成期, 石灰化物形成期の分化過程の進行に伴っていることが明らかとなり, 歯根膜細胞の分化に関与している可能性が示唆された。今後さらに歯根膜細胞の分化機構および歯周組織再生機構が解明され, 確実な歯周組織再生療法が開発されることが期待される。

#### 論文審査の結果の要旨

本論文は歯根膜クローン細胞株の樹立を試み, その細胞特性および分化過程を検討したものである。その結果, 本細胞株は生理的条件下でタイプ I, III および XII コラーゲン, オステオカルシン, オステオネクチン等の基質蛋白の遺伝子を発現する石灰化物形成細胞に分化することを明らかにしたものである。

この業績は歯根膜細胞の特性および分化機構という再生歯周療法を構築する上で基本的な情報を与えるものであり, 博士(歯学)の学位請求に値するものと認められる。