The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	3次元細胞培養モデルを用いた骨芽細胞から骨細胞への初期分化に関する研究
Author(s)	社領, 美紀
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72224
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　社領　美紀　）	
論文題名	３次元細胞培養モデルを用いた骨芽細胞から骨細胞への初期分化に関する研究

論文内容の要旨

【研究目的】

骨の全構成細胞の約90%を占める骨細胞は、骨内の至る所に骨細胞突起を伸ばして分布し、力学的負荷の感知、リン代謝調節、骨の形成・吸収の制御を司っている。この骨細胞は骨表層の骨芽細胞に由来し、骨芽細胞が骨基質中に埋入されて、類骨内で骨細胞へと分化し、石灰化骨内でさらに成熟骨細胞へと分化する。類骨内で起こる骨芽細胞から骨細胞への初期分化過程は、類骨がI型コラーゲン線維を主体とした未石灰化組織であるため、I型コラーゲンゲルを類骨に見立てた骨芽細胞の３次元細胞培養により、*in vitro*でも再現できると考えられる。

本研究では、類骨内で起こる骨芽細胞から骨細胞への初期分化の再現に適切な３次元細胞培養の条件を検討し、３次元細胞培養における培養骨芽細胞の分化を形態学的手法により検討した。

【材料と方法】

1. ３次元細胞培養

骨芽細胞から骨細胞への初期分化を再現する３次元細胞培養に適切なI型コラーゲンとβ-glycero-phosphate (GP) 濃度を検討した。

I型コラーゲンとして、天然Ｉ型コラーゲン(Cellmatrix® Type I-A ;新田ゼラチン)と、天然Ｉ型コラーゲンからtelopeptideを除去したアテロコラーゲン(AteloCell® IPC-50 ; KOKEN) を検討に用いた。各コラーゲンは、Millicell® 中に1.5 ml加えて、ゲル化させて、各コラーゲンゲル上に骨芽細胞様細胞株(MC3T3-E1細胞)を1 x 10^5 cells/ゲルとなるように播種した。

３次元細胞培養は、10% FBS含有α-MEM中に、10 mM β-GPと0.2mM ascorbic acidを添加した通常の石灰化誘導培地と、β-GP濃度だけを50 mMに変更した培地を使用して、1、2、3、4週間、細胞培養を行った。各々の３次元細胞培養実験は、少なくとも2回実施した。

2. 細胞培養サンプルと骨組織サンプルの作製

MC3T3-E1細胞を３次元細胞培養したMillicell®内のコラーゲンゲルは、4%パラホルムアルデヒド含有0.1 M リン酸緩衝液（PFA）にて、4°Cで一晩固定を行った。その後、Millicell®内のコラーゲンゲルをパラフィン包埋した。骨組織は、4週齢のWistar系ラットの脛骨を用いて、4% PFAにて固定し、10% EDTA脱灰後、パラフィン包埋した。これらのパラフィン包埋ブロックから切片を作製し、形態観察や免疫染色による蛋白質発現を検討した。

3. 免疫染色

Runx2、I型コラーゲン(propeptide)、E11/gp38、CD44、MT1-MMP、Dmp1、connexin 43、integrin αvβ3およびssDNAに対する抗体を一次抗体として用いた。切片上の各一次抗体の免疫反応は、LSAB法によるDAB発色と蛍光二重染色法による蛍光発色により検出した。

4. Phalloidinによる細胞骨格の観察

培養2日目と1週目のI型コラーゲンゲルを4% PFAにて固定後、OCT compoundに包埋して、凍結切片を作製し、蛍光標識phalloidinによりアクチン染色して、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

5. Integrin αvβ3阻害実験

50 mM β-GP添加培地を用いた３次元細胞培養において、integrin αvβ3の特異的阻害剤であるintegrin αvβ3 antagonist P11を1 μg/ml 濃度になるように添加し、1～5週間、細胞培養を行った。各阻害実験は、2回実施した。

6. 細胞数計測と統計処理

細胞数は、1標本あたり5か所を光学顕微鏡にて400倍の倍率で撮影した写真上で計測し、各視野の平均値を1視野の細胞数とした。同様の方法で、死細胞数と各免疫染色による陽性細胞数の計測を行った。統計処理は、スチューデントのt検定、あるいはTukey-Kramer法を行い、有意水準は $p<0.05$ とした。

【結果と考察】

1. 天然Ｉ型コラーゲンとアテロコラーゲンをMC3T3-E1細胞の３次元細胞培養に用いて検討した。その結果、いずれのコラーゲンでも、形態学的にほぼ同様の細胞挙動を示したが、アテロコラーゲンより天然Ｉ型コラーゲンを使用した培養の方が、死細胞の割合が少なく、ssDNA検出によるアポトーシス細胞の出現も少ないため、本研究には長期培養に適すると考えられる天然Ｉ型コラーゲンを用いた。

2. ３次元細胞培養では、MC3T3-E1細胞はゲル内へ侵入し、アクチン染色にて骨細胞突起様の細胞突起を伸ばすのが観察された。また、細胞の核は、培養初期には紡錘形を示すが、2週目以降、経時的に卵円形の核を有する細胞が増加した。ゲル表層付近には好酸性基質として観察されるI型コラーゲン(propeptide)が分布し、細胞が自ら産生したI型コラーゲンに囲まれている事が分かり、３次元細胞培養により類骨内で起こる骨芽細胞から骨細胞への初期分化が再現できると考えられた。

3. 通常の石灰化誘導培地(10 mM β-GP添加)による３次元細胞培養では、骨細胞マーカー(E11/gp38, CD44, MT1-MMP) とconnexin 43の陽性反応が、2週目以降の全てのMC3T3-E1細胞に認められ、それらの陽性反応は経時的に増強する傾向があった。骨細胞マーカーDmp1の陽性反応は、2週目以降に出現する卵円形核を有する細胞にのみ認められ、この卵円形核を有するDmp1陽性細胞は常に骨芽細胞マーカーRunx2に陰性反応を示した。従って、卵円形核を有するDmp1陽性細胞は、骨細胞へと分化した細胞であり、他の骨細胞マーカーにも陽性反応を示すため、骨細胞の形質を備えた細胞であると考えられた。

４．高濃度の50 mM β-GP添加による３次元細胞培養では、HE染色による形態観察では基質産生の減少の他に明かな変化はみられなかった。骨細胞マーカー(E11/gp38, CD44, MT1-MMP) とCx43も、通常の石灰化誘導培地と同様に、2週目以降の全てのMC3T3-E1細胞に発現し、それらの陽性反応は経時的に増強する傾向があった。一方、骨芽細胞マーカーRunx2の陽性反応と骨細胞マーカーDmp1の陽性反応が、1週目で多数のMC3T3-E1細胞に認められたため、骨細胞分化の検討には通常の石灰化誘導培地が適切であると考えられた。

５．骨細胞突起の維持に関与するIntegrin αvβ3を、その発現が確認できる50 mM β-GP添加の３次元細培養でアンタゴニストにより阻害した。その結果、MC3T3-E1細胞の細胞突起の形態に変化はなかったが、細胞のゲル内への侵入が抑制され、Integrin αvβ3は細胞遊走に関与することが示唆された。

【結論】

天然I型コラーゲンゲルを用いたMC3T3-E1細胞の3次元細胞培養は、形態的変化や分化マーカーの検討から、類骨内で起こる骨芽細胞から骨細胞への初期分化を再現する*in vitro*モデルとして有用と考えられる。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　社　領　美　紀　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教　授	豊　澤　　悟
	副 査	教　授	阪　井　丘　芳
	副 査	准教授	伊　藤　祥　作
	副 査	講　師	黒　坂　　寛

論文審査の結果の要旨

本研究は、3次元細胞培養モデルを用いて、類骨内で起こる骨芽細胞から骨細胞への初期分化について検討したものである。

天然Ｉ型コラーゲンゲルを用いたMC3T3-E1細胞の3次元細胞培養は、形態的変化や分化マーカーの検討から、類骨内で起こる骨芽細胞から骨細胞への初期分化を再現する *in vitro* モデルとして有用であることが示唆された。

以上の結果は、骨芽細胞から骨細胞への分化過程を研究する上で有用な知見を与えるものと考えられ、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める。