



顎骨骨膜由来細胞培養による骨芽様細胞の特性に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴木, 浩之 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/955

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 102号	学位授与年月日	平成 3年 3月26日
氏 名	鈴木 浩 之		
論文題目	顎骨骨膜由来細胞培養による骨芽様細胞の特性に関する研究		

論文の内容の要旨

顎骨、特に歯槽部は歯により常に咬合力が加わっているため生体の中で最も内部改造が活発な骨とされている。したがってin vitroで顎骨由来骨芽様細胞をえ、その細胞生物学的特性を明らかにすることは、骨代謝における骨芽細胞の機能の研究は勿論のこと、口腔外科学領域においては、骨欠損部の修復、人工関節などに用いられる様々な生体材料の生体適合性試験に、また歯科矯正学領域では歯牙移動の機構の細胞レベルでの検索に用いることができ、その応用範囲は広い。今回われわれは顎骨骨膜由来および顎骨骨肉腫由来骨芽様細胞の特性をヒト皮膚由来線維芽様細胞と併置し比較検討した。さらに、長期培養により形成される石灰化物の組成に、アスコルビン酸がどのような影響を及ぼすかを明らかにした。なお、アスコルビン酸は37℃の培養条件下では非常に不安定であるため、活性持続型のL-アスコルビン酸 2-リン酸 (P-Asc) を用いた。ヒト顎骨骨膜由来細胞 (KY-20, YT-48, SN-29)、顎骨骨肉腫由来細胞 (JOS)、ヒト皮膚由来線維芽様細胞 (HSF) は、P-Asc (0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0mM)、2mM α -glycerophosphate、penicillin/streptomycin (100unit/ml)、10%ウシ胎児血清を添加したD-MEM培地で培養した。

骨芽細胞は多分化能をもつ未分化間葉系細胞が様々な環境因子の影響を受け分化したものであり、in vitroでは、そのcriteriaを有することが重要である。骨芽細胞のcriteriaで最も重要なものはin vitroで石灰化能を有すること、オステオカルシンなどの非コラーゲン性タンパクを産生することであり、それに関連して高いアルカリフォスファターゼ活性をもっていること、およびtype I、IIコラーゲンを合成することである。

われわれが用いた5種類の細胞の細胞増殖はP-Ascの添加により、明らかに濃度依存的に促進された。cell sheetは、confluent後7日で上皮様細胞部と紡錘形細胞部から形成されるようになり、上皮様細胞部が石灰化へと移行した。また、これらの細胞は、type Iコラーゲンと少量のtype IIコラーゲンを産生していることがSDS PAGEにより明らかとなった。オステオカルシンの産生と、高いアルカリフォスファターゼ活性が認められ、石灰化能も有していた。石灰化物は、P-Asc 0.1~2.0mM添加ではカルシウムおよびリンから構成されていたが、P-Asc 3.0~5.0mM添加ではシュウ酸カルシウムであることが、エネルギー分散型X線解析法、顕微赤外分析法により明らかとなった。

また、ヒト線維芽様細胞 (HSF) も、これらと類似した特性を有していたが、その程度は骨芽様細胞に比較して低かった。このことは、異所性石灰化の機序と同様のものと考えられる。

以上の結果より、顎骨骨膜由来骨芽様細胞 (KY-20, YT-48, SN-29) は、in vitroで骨芽細胞の性格を有していることが明らかとなった。これらの細胞は、骨代謝における骨芽細胞の機能の研究、あるいは、歯科口腔外科領域等の基礎的研究においてたいへん有用である。

論文審査の結果の要旨

人工歯根、インプラント義歯などに用いられる生体材料の適合性に関する研究はマウス由来の骨芽様細胞株が使われており、ヒト由来のものはない。さらにまた、ヒト由来骨芽様細胞を使用した骨形成の基礎的研究も数少ない。

このような状況のもとに、申請者はヒト骨芽様細胞、骨肉腫細胞および対照としてヒト線維芽細胞をin vitroにおいて、主としてその石灰化現象、特に長期活性持続型L-アスコルビン酸 2-リン酸 (以下アスコルビン酸と略す) 添加による影響を中心にして検索した。

培養細胞は、下顎骨骨膜から外生した細胞群から単離した骨芽様細胞3種類とヒト骨肉腫由来細胞1種類、ヒト線維芽細胞1種類である。

これらの細胞を使用して種々の実験を行ったが、得られた結果の主なものは次の通りである。

1. 骨芽様細胞は播種後2週間でsemiconfluentの状態となり、その時の蛋白量は最高で383.3 μ gであっ

た。

2. アスコルビン酸を加えると、培養細胞は濃度依存性に成長が促進され、蛋白量として900 μ gを越えた。線維芽細胞では最も促進され約1,500 μ gにも達した。
3. アルカリフォスファターゼ染色では上皮様細胞に陽性所見を認めた。骨芽様細胞の陽性率は線維芽細胞より高かった。アルカリフォスファターゼ活性を経時的に測定すると、骨芽様細胞における活性は線維芽細胞より早く出現し、またより高かった。これはアスコルビン酸添加により促進された。
4. 石灰化物をvon Kossa染色で調べるとアスコルビン酸を添加したものはすべて陽性であった。
5. すべての骨芽様細胞は、type I コラーゲン及びオステオカルシンの高い産生能を有していた。
6. アスコルビン酸濃度により石灰化物の組成に変化が認められた。0.1～2 mMではヒドロキシアパタイト結晶、3～5 mMではシュウ酸カルシウム結晶であることを分光学的手法で確認した。

この発表に続いて次のような質疑、討論がなされた。

1. 細胞増殖を蛋白量で測定してあるが、その理由は何か。実際の細胞数の増加と一致するか
2. 骨芽様細胞による石灰化と線維芽細胞による異所性石灰化にいかなる差があるか
3. von Kossa染色で陽性となる物質はすべて石灰化といえるか
4. 選択した細胞（3つの骨芽様細胞と骨肉腫細胞）の間にあまり差がなかったが、その理由は何か
5. 石灰化の認識はvon Kossa染色以外にいかになされたか
6. 骨芽様細胞とする基準は何か
7. アスコルビン酸そのものよりも、これに結合しているリン酸が石灰化に関与している可能性はないか
8. アスコルビン酸添加による骨芽様細胞増殖促進の分子生物学的機構は何か

以上の質問に対する申請者の解答は概ね適切であり、研究内容も学位論文としての水準に達しているものと全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	喜 納	勇			
	副査	教授	井 上	哲 郎	副査	教授	白 澤 春 之
	副査	教授	橋 本	賢 二	副査	教授	藤 瀬 裕