

論文内容の要旨

論文提出者	(氏名) 陶山 大輝
論文題目	Differentiation of rat dermal mesenchymal cells and calcification in three-dimensional cultures
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>研究目的：三次元培養は生体環境に類似し、多様な細胞から構築される組織の機能を調べるのに適した方法である。これまでに、ラット真皮由来線維芽細胞の三次元培養で、内在性 TGF-β1 依存的に筋線維芽細胞 (α-SMA 陽性細胞) へ分化することが明らかにされてきた。他方で、平滑筋細胞や筋線維芽細胞は血管中膜の石灰化に関与するとの報告がある。そこで本研究は、三次元培養におけるラット真皮由来間葉系細胞 (線維芽細胞等) からの骨芽細胞様細胞への分化や石灰化物形成について調べ、それらに関わる因子を検討した。</p> <p>試料および方法：生後 2 日齢ラットの背部真皮から遊走した細胞を単離し、プレート上で継代した。2 週間後、細胞をコラーゲンゲル内に包埋し、三次元培養を行った。石灰化物形成の誘導因子として、無機リン酸 (Pi) あるいは β-glycerophosphate (βGP) を添加した。また Na^+ 依存性 Pi 共輸送体、アルカリホスファターゼ (ALP)、TGF-β1 受容体の関与を検討するために各種阻害薬を用いた。三次元培養 3 週間後に、アリザリンレッド (Aliz) 染色にて石灰化物の存在を検討し、ALP 染色、リアルタイム PCR 法ならびに蛍光免疫染色にて細胞の分化を評価した。</p> <p>結果および考察：①三次元培養初期の α-SMA と ALP の mRNA は、3 週間後の値を基準にすると、すでに 50~60% を発現しており、約 2 週間後には最大値に達した。また、培養初期の Runx2 と osteocalcin (OCN) は 30% 以下であり、培養期間中に徐々に増加した。このことから ALP 発現の時間経過は、Runx2 や OCN とは異なることが明らかとなった。② Pi あるいは βGP の添加で 2 週間後に Aliz 染色陽性像を認めた。Pi 共輸送体阻害薬は、Pi と βGP による石灰化物の形成の両方を抑制したが、ALP 阻害薬は βGP による効果のみを抑制した。さらに TGF-β1 受容体阻害薬は ALP mRNA 発現と βGP が関与する Aliz 染色を抑制した。以上により、石灰化物形成には Pi 共輸送が関与していることが示唆された。また、恒常的に産生された TGF-β1 が ALP の発現に促進的に働いて、βGP の分解とそれに続く石灰化物形成に寄与すると考えられた。③細胞密度の増加は ALP mRNA を変化させないが、Runx2 や OCN 発現を増加させたことから、細胞密度に依存的な細胞間シグナルが一部の細胞分化に対して関与することが示唆された。</p> <p>結論：三次元培養において、内在性の TGF-β1 や細胞密度が、異なる経路でラット真皮由来の間葉系細胞から骨芽細胞様細胞への分化に促進的に働くこと、また細胞外 Pi が Pi 共輸送体依存的に石灰化物の形成を促進することが明らかとなった。この三次元培養法を利用することによって、自家軟組織由来の細胞をもとにした硬組織の再生促進の可能性が期待される。</p>	

