

氏名	佐々木 朗
学位の種類	歯学博士
学位授与番号	博乙第2189号
学位授与の日付	平成2年10月31日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者(学位規則第5条第2項該当)
学位論文題目	ラット成長軟骨細胞培養系における石灰化の誘導培養液ならびに デキサメサゾンの影響
論文審査委員	教授 松村智弘 教授 谷口茂彦 教授 永井教之

### 学位論文内容の要旨

#### [緒言]

軟骨内骨化機構の解析は、顎の成長発育、骨折、骨移植後の修復過程、種々の骨疾患を研究する上で重要な課題である。この骨化過程における軟骨細胞の肥大化、石灰化は、その後の骨形成過程において不可欠な要因である。軟骨石灰化ならびにその制御因子を研究するには、石灰化を誘導する軟骨細胞培養系が有効と考えられる。しかし、通常のプラスチックシャーレ上での培養条件では、高濃度の無機、有機リン酸、あるいはプロテオグリカン分解酵素を添加しないと石灰化の誘導は困難であった。そのため、軟骨細胞の石灰化の機構や局所制御因子に関しては、現在なお不明な点も多い。そこで本研究では、通常のプラスチックシャーレ上での培養条件下で成長軟骨細胞の石灰化を誘導することを目的に各種培養液の検討と並行して成長軟骨細胞の増殖、分化に影響を与えと考えられるデキサメゾン (Dex) の影響について検討を行った。その結果  $\alpha$ -MEM で石灰化の誘導が可能になり、Dex 添加により石灰化が促進することが明らかになったので報告した。

#### [材料および方法]

1. 成長軟骨細胞培養法ならびに培養液の検討：4週齢の雄性 S-D 系ラットの肋軟骨・骨移行部より、鈴木らの方法に準じ軟骨細胞を単離、培養した。培養液の検討は10%ウシ胎児血清 (FBS) 存在下で、Ham-F12, Dulbecco-MEM (D-MEM), Eagle's MEM (E-MEM),  $\alpha$ -MEM について、それぞれに  $5 \times 10^{-9}$ M の Dex を添加する場合としない場合について行った。
2. 石灰化の評価：アリザリン赤染色、コッサ染色ならびに X線元素分析を行った。
3. 形態学的観察：トルイジンブルー染色による光顕観察ならびに透過電顕による観察を行った。
4. ALPase 活性は Bessay らの方法に準じ、合成基質 *p*-nitrophenol-phosphate を用い

比色法にて、また、軟骨基質のプロテオグリカンの主成分であるウロン酸量を Bitter らの方法に従い硫酸・カルバゾール法にて、その経時的变化を測定した。

#### 5. Dex の成長軟骨細胞培養系に及ぼす影響

$\alpha$ -MEM を基礎培地とし FBS 存在下、非存在下における Dex ( $10^{-10}$ ~ $10^{-5}$ M) の影響を検討した。

- 1) DNA 合成能： $[^3\text{H}]$ -チミジンの細胞への取り込みより測定した。
- 2) グリコサミノグリカン (GAG) 合成能：GAG 合成の最終段階である硫酸エステル化を指標とし  $[^{35}\text{S}]$  硫酸の GAG への取り込みより測定した。
- 3) コラーゲン合成能： $[^3\text{H}]$ -プロリンのコラーゲンへの取り込みを指標とし測定した。
- 4) ALPase 活性：Bessay らの方法に準じた。

#### [結果]

培養条件の検討：培養 3 週目のコッサおよびアリザリン赤染色では、 $\alpha$ -MEM および Dex 添加 D-MEM で微陽性、Dex 添加  $\alpha$ -MEM で弱陽性を認め、石灰化の誘導が可能であった。明確な石灰化を認めた Dex 添加  $\alpha$ -MEM の条件下では、培養 2 週目では軟骨細胞の肥大と細胞の密な増殖を認め、培養 6 週目ではほとんどの細胞は肥大し、その周囲の軟骨基質の染色性は低下していた。また、一部に軟骨基質の染色性の著名な成熟軟骨細胞部分や石灰化部分を認めた。電顕所見では、石灰化部分の近傍に基質小胞を多量に認め、基質小胞において針状結晶構造を認めるものもあった。析出された結晶は X 線元素分析の結果、リン酸カルシウムであることが同定された。経時的变化では石灰化は培養 7—10 日目以降、徐々に亢進したが ALPase 活性は石灰化開始直前に急上昇し、6—8 日目で最高値に達し、その後減少した。ウロン酸は 7 日目まで上昇し、以後ほぼ一定値を示した。

デキサメサゾンの影響：FBS 非存在下では DNA、GAG、コラーゲン合成能はいずれも抑制された。一方、FBS 存在下では  $10^{-9}$ ~ $10^{-8}$ M の Dex において DNA 合成能は促進され、コラーゲン合成能は  $10^{-10}$ M で促進したが、それ以上の濃度では抑制を認めた。また ALPase 活性は FBS 存在下で Dex の濃度依存性に促進した。GAG 合成能は FBS 存在下でも Dex の濃度依存性に抑制された。

#### [考察および結論]

成長軟骨細胞培養系は培養液の種類により、その形態、分化機能発現に差を認め、10% FBS および  $5 \times 10^{-9}$ M Dex 添加  $\alpha$ -MEM で培養することにより通常のプラスチックシャーレ上で *in vitro* の軟骨石灰化を誘導することが可能となった。形態学的観察でも、従来の培養条件より、さらに成熟した形態を示し *in vivo* における肥大軟骨細胞層に類似した様相を示すことが確認された。電顕観察においては基質小胞を中心とした針状結晶を認め、*in vivo* に類似した石灰化過程の進行が示唆された。FBS 存在下での Dex の効果は  $5 \times 10^{-9}$ M において DNA 合成能の促進、初期石灰化に重要な役割を果たす ALPase 活性の上昇、石灰化の阻止因子と考えられているプロテオグリカンの GAG 合成能およびウロン酸量の抑制を認め、肥大化石灰化への分化促進因子として働いていることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

軟骨石灰化および制御因子を研究するには軟骨内骨化における軟骨細胞の肥大化、石灰化に至るまでの過程が軟骨細胞培養系で誘導されることが有用と考えられる。しかし、通常のプラスチックシャーレ上での培養条件下では高濃度の無機、有機リン酸、あるいはプロテオグリカン分解酵素などを加えた条件下でないと石灰化は起こらない。本研究は、通常のプラスチックシャーレ上での培養条件下において軟骨石灰化を誘導することを目的に、ラット成長軟骨細胞培養系を用い、各種培養液の検討を行った。さらに成長軟骨細胞の増殖、分化に影響を与えられとされるデキサメサゾンの影響について検討したものである。その結果、ラット成長軟骨細胞培養系は培養液の種類によりその形態、分化機能発現に差が認められ、 $\alpha$ -MEM で石灰化の誘導がプラスチックシャーレ上での培養細胞系で可能となった。さらにデキサメサゾン添加により軟骨細胞は、*in vivo* に類似の肥大軟骨細胞を中心とした一連の分化過程の様相を示し、血清存在下において石灰化促進因子として働くことが明らかにされた。

本研究で示された実験系は、軟骨石灰化機構の解明のみならず、その制御因子や薬剤の検討、また種々の骨疾患を研究する上で有意義であると同時にデキサメサゾンの役割に関して重要な知見を得た価値のある業績であり、本研究者は歯学博士の学位を得る資格があると認める。