

氏 名 (本 籍 地) 佐藤真理子(福島県)
学位記および番号 博士(歯学), 甲 第302号
学位授与の日付 平成24年1月10日
学 位 論 文 題 名 「ラット頭蓋骨を用いた骨細胞
の分離培養法の確立」
論 文 審 査 委 員 (主査) 廣瀬公治教授
(副査) 伊東博司教授
横瀬敏志教授

論文の内容および審査の要旨

骨組織を構成する細胞には、骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞が上げられる。骨にメカニカルストレスが加わると、骨細胞がメカノセンサーとして働き、骨芽細胞や骨髄の細胞にシグナルを送り、骨形成と骨吸収をコントロールしていると考えられている。しかし、現在のところ骨細胞のメカノセンサーとしての機能については不明な点が多い。その原因として骨細胞の培養系の確立の困難さが挙げられる。本研究の目的はラット頭蓋骨より骨細胞を分離し、これらの細胞が骨代謝研究に応用できるかを検討した。

生後5日目のラットの頭蓋骨を摘出し、軟組織および骨膜を丁寧に除去し、70%エタノールで骨表面の細胞を死滅させた。最初に骨片を細切し、コラゲナーゼを含む酵素液に浸漬し37℃で20分間振盪した。その後、上澄みを回収し遠沈操作にて細胞を採取した。この操作を4回繰り返した。次にEDTAを含む脱灰液で37℃、20分間振盪し、上澄みを回収し遠沈操作にて骨細胞を回収した。この後、同様に骨片を酵素液、脱灰液、酵素液と交互に変えて細胞を採取した。培地には10% CS, ペニシリン, ストレプトマイシンを含む α MEMを用い、37℃、5% CO₂の下で培養した。細胞の解析方法はalkaline phosphatase (ALP) 染色、sclerostinならびにDMP-1の免疫染色を行った。また、sclerostin, DMP-1, ALP, type I collagen (Col1), osteopontin (OPN), PTH/PTHrP receptorのmRNA発現をreal-time quantitative PCR法を用いて解析し培養骨芽細胞と比較した。

培養6日目において、細胞突起を伸ばした、骨細胞様の形状の細胞が数多く確認できた。これら

の細胞に対しALP染色を行うと明らかに染色性を示さない細胞が多く認められた。Sclerostin, DMP-1の免疫染色では、細胞突起を伸長させた培養細胞に発現が認められた。Real-time quantitative PCRの結果ではALPならびにCol1の発現は培養骨細胞ではほとんど発現せず、その値は培養骨芽細胞に比較して約10分の1だった。反対にsclerostinならびにDMP-1の発現は培養骨細胞では多く発現し、その値は骨芽細胞の約10倍だった。骨細胞ならびに骨芽細胞の両者において発現が認められるosteopontinおよびPTH/PTHrP receptorの発現は両者とも同じ位の発現が認められた。

実験結果によって、形態学的にも、分子生物学的にも、本培養系に存在する細胞は骨細胞の特徴を持った細胞が多くを占めていることが示唆され、骨細胞様細胞として実験に使用できることが示唆された。

本論文に関して審査委員会が平成23年12月26日に開催された。委員より、1) 酵素処理液にBSAを入れた理由、2) アルコール処理の理由、3) 培養液にcalf serumを添加した理由、4) 内因性ペルオキシダーゼへの対応方法についての質疑があり、いずれも申請者からの的確な回答が得られた。また、委員会での指摘にそって、1) 用語の統一、2) 誤字の修正、3) 緒言の追加・修正、4) 写真・グラフの修正がなされた。

本研究は歯科医学の発展に寄与するものと考えられ、申請者は学位授与に値すると判定した。

掲載雑誌

奥羽大学歯学誌 第39巻, 4号 211~218