

Title	4 : PLGA プレート上でのマウスiPS 細胞からの骨芽細胞様細胞への分化誘導
Author(s)	戸木田, 怜子; Akram, Wahabi; Tungalag, Ser-Od; 井上, 健児; 小林, 史卓; 中島, 啓; 橋本, 和彦; 村上, 聡; 松坂, 賢一; 井上, 孝
Journal	歯科学報, 115(3): 273-273
URL	http://hdl.handle.net/10130/3672
Right	

No.3 : 胎生期マウス蝶形骨翼状突起の骨化における免疫組織化学的研究

北村 啓, 山本将仁, 梅澤貴志, 芹川雅光, 山内真人, 奈良倫之, 森田純晴, 阿部伸一
(東歯大・解剖)

目的：蝶形骨は骨体部, 大翼, 小翼, 翼状突起から構成されている。発生過程においてそれらは, 軟骨内骨化, 膜性骨化の複合体により骨化をしていく。なかでも翼状突起の軟骨細胞は蝶形骨体部の軟骨細胞よりも遅れて発生するが, 骨化は早期に起こる。

近年, 胎生期マウスの下顎頭では, 胎生15日において各軟骨細胞層に特異的なII型コラーゲン, 軟骨肥大細胞層にのみ特異的なX型コラーゲンが発現することが報告された。しかしながら, 翼状突起に発現するコラーゲンについては, 未だ不明な点が残されている。

そこで今回我々は翼状突起におけるColII, ColXの発現を観察した。また同時にその周囲の形態形成についても同時に検索を行った。

方法：試料として, 胎生13.5~18日のICR系マウス6匹を用いた。通法に従いパラフィン包埋をした後, 連続切片を作製した。

翼状突起軟骨におけるタンパクの局在を解明するために軟骨細胞に特異的な抗ColII, ColX抗体を,

翼状突起周囲筋である口蓋帆張筋を観察するために筋特異的マーカーである, 抗デスミン抗体を用い, 免疫組織化学的染色を行った。

結果および考察：ColIIの発現は胎生14.5日に初めて認められ, 胎生16日において翼状突起全体に広がった。また胎生17日以降は翼状突起下部のみに発現を認めた。ColXの発現は胎生14.5日の幼若な軟骨細胞において認められなかったが, 胎生16日の軟骨肥大細胞, 胎生17日以降の幼若な海綿骨では認められた。

以上の結果から, 翼状突起において幼若な軟骨細胞は胎生14.5日に発生し, 胎生16日までの短期間で軟骨細胞が肥大細胞まで成長したと考えられた。この様に急速な軟骨細胞の発生と成長は, 長管骨の軟骨内骨化とは異なり細胞層を作らず, 軟骨細胞塊が一塊として骨化することが示唆された。一方, デスミンは胎生15日において翼状突起内側板と外側板の間に集積していた。したがってこの部位は, 将来の口蓋帆張筋が付着する舟状窩になると考えられた。

No.4 : PLGA プレート上でのマウス iPS 細胞からの骨芽細胞様細胞への分化誘導

戸木田怜子, Akram Wahabi, Tungalag Ser-Od, 井上健児, 小林史卓, 中島 啓, 橋本和彦,
村上 聡, 松坂賢一, 井上 孝 (東歯大・臨検病理)

目的：本研究の目的は, マウス iPS 細胞を PLGA プレート上で骨芽細胞様細胞へ分化誘導が可能か検討することである。

方法：Scaffold は GC[®]社の直径13mm の PLGA (DL-乳酸-グリコール酸共重合体, LA:GA=75:25) プレート (以下, 実験群) およびポリスチレンプレートにゼラチンコートをしたもの (以下, 対照群) を用いた。培地には骨分化誘導培地 (α -MEM, 10%FBS, デキサメタゾン100nM, β グリセリン酸10mM, アスコルビン酸50 μ g/mL) を使用した。実験群は70%エタノールに浸漬し滅菌水及び使用培地による洗浄という親水処理を行った。細胞は iPS-MEF-Ng-20D-17 (理研) を使用し, 胚様体を形成し, その遊走細胞を継代したものをを用いた。遊走細胞はマウス iPS 細胞よりスクラッチ法にて胚様体を形成し, 5日間浮遊培養を行った後, 約5日間接着培地で培養し, その遊走細胞を6回継代した。実験群, 対照群ともに 35×10^4 の胚葉体遊走細胞を播種し, 37°C, CO₂5%のインキュベーターにて培養

を行った。培地は2日に一回交換した。14日目に評価を行った。骨芽細胞の分化マーカーである ALP の活性を調べ, Real time RT-PCR 法にて骨芽細胞の転写因子である Runx2 と骨形成マーカーである Bglap を継時的に定量し, 蛍光免疫染色にて骨形成マーカーである osteocalcin のタンパク発現を確認し, Ca の形成をアリザリン染色にて定性的に評価した。

結果および考察：Real time RT-PCR 法では, Runx2 が実験群において継時的に強く発現していた。Bglap は, 対照群において早期に強く発現し, 実験群では発現はしているものの継時的変化は少なかった。蛍光免疫染色では, 実験群, 対照群ともに Osteocalcin の発現が確認された。アリザリン染色では程度は違うが, 両群ともに陽性が確認できた。以上の結果より, PLGA プレート上でもマウス iPS 細胞から骨芽細胞様細胞へ分化誘導できることが確認でき, 臨床的に骨欠損の修復に応用できる可能性が示唆された。