

Title	22 : 胎生期マウス口蓋帆張筋におけるDesmin と Vimentin の発現
Author(s)	北村, 啓; 小林, 史明; 山本, 将仁; 山根, 茂樹; 梅澤, 貴志; 井出, 吉信; 阿部, 伸一
Journal	歯科学報, 113(4): 433-433
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/3168">http://hdl.handle.net/10130/3168</a>
Right	

## No.21: ラジアルフロー型バイオリアクターを用いたヒト骨髄由来間葉系幹細胞の三次元培養 - 骨分化因子の影響 -

西村逸郎<sup>1)2)</sup>, 片山愛子<sup>1)2)</sup>, 佐藤 亨<sup>2)</sup>, 吉成正雄<sup>1)</sup> (東歯大・口科研)<sup>1)</sup>  
(東歯大・クラウンブリッジ補綴)<sup>2)</sup>

**目的:** ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) は自己複製能および多分化能を有し、骨前駆細胞へと分化誘導されることから骨再生における細胞源として注目されている。我々は、ラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) を用いた灌流培養により、スキャフォールドに播種した hMSC を均一に増殖させることが可能であることを報告したが、骨分化因子が hMSC に与える影響については明らかになっていない。そこで本研究は、RFB の灌流培養条件および骨分化因子添加が hMSC の動態に与える影響を検討することを目的とした。

**方法:** hMSC を DMEM 中で 1 週間通常培養後、コラーゲンシート (気孔径 70~110 $\mu$ m, 気孔率 80~95%, 直径 12mm, 厚さ 3mm) のスキャフォールドに細胞を  $2 \times 10^5$  個播種した。その後、hMSC を播種したコラーゲンシートを 3 枚重ねて RFB に取り込み、リアクターがスキャフォールドで満たされるようにして灌流培養した。骨分化因子としてアスコルビン酸 0.2mM,  $\beta$ -グリセロリン酸 10mM, デキサメタゾン 50nM を添加した培地を用いた。培養条件は

37 $^{\circ}$ C, pH7.4, DO 値 6.86ppm, 培養液交換量 100 ml/day, 培養液灌流速度 3 ml/min に設定し、培地交換は培養開始後 3 日目から毎日とした。1 週間および 2 週間後にスキャフォールドを回収し、HE 染色による形態観察と BMP-2 免疫組織学的観察, 細胞数, ALP 活性を評価した。コントロールには、培地灌流を行わずにプレート上で静置培養したものをを用いた。

**結果および考察:** 骨分化因子を添加した培地を用いて RFB による灌流培養を行った結果、細胞は均一にスキャフォールド内に分布しており、免疫染色により BMP-2 の発現が確認され、細胞数および ALP 活性値が静置培養より有意に高い値を示した。以上より、RFB による灌流培養時に骨分化因子を添加することにより、スキャフォールドに播種した hMSC を均一に増殖させ、さらに骨前駆細胞への分化を促進させることが明らかとなり、RFB を用いた細胞-スキャフォールド複合体の三次元構築は臨床応用に有用であることが示唆された。

## No.22: 胎生期マウス口蓋帆張筋における Desmin と Vimentin の発現

北村 啓, 小林史明, 山本将仁, 山根茂樹, 梅澤貴志, 井出吉信, 阿部伸一 (東歯大・解剖)

**目的:** 胎生期口蓋の発生の中で特に二次口蓋の形成には、口蓋棚の成長, 上昇, そして正中での癒合という複雑な過程が必要である。近年、口蓋腱膜で collagen type I ならびに periostin が特異的に発現することにより、軟口蓋が形成されていくことがわかってきた。しかしながら、軟口蓋の発達を、それを構成する骨格筋群と関連させた報告は少なく不明な点が多く残されている。そこで今回は、軟口蓋の筋の中で口蓋帆張筋に焦点をあて、筋特異的に発現する Desmin と間葉細胞の安定に必要な Vimentin を検索した。

**方法:** 試料として、胎生 12.5~15.5 日の ICR 系マウスを用いた。通法に従いパラフィン包埋を行い、5~10 $\mu$ m にて連続切片を作製した。形態学的観察のために H-E 染色を、タンパクの局在を検索するため、抗 Desmin 抗体, 抗 Vimentin 抗体を用いて免疫組織化学的染色を行った。

**結果:** 口蓋帆張筋において Desmin の発現は胎生 12.5 日に若干認められ、その後胎生 13.5 日から 16.5 日にかけてその発現量は増加していった。また胎生

12.5 日から筋腱接合部に Desmin の集積を認め、この傾向は胎生 15.5 日まで変わらなかった。一方 Vimentin の発現は胎生 12 日に口蓋帆張筋とその周囲組織においてすでに認められており、その発現量は胎生 15.5 日まで変わらなかった。

**考察:** 胎生期マウス口蓋の形成において、口蓋棚は胎生 13 日に上昇を開始し、胎生 15.5 日において左右の口蓋棚は融合するといわれている。今回の研究結果から口蓋帆張筋は胎生 12.5 日から筋腱接合部に Desmin の集積を認めた。よって口蓋棚の上昇開始と同時に口蓋帆張筋が機械的ストレスに対応する準備をしているのではないかと考えられた。また、口蓋棚の融合する胎生 15.5 日において Desmin は筋線維全体に強く発現していた。したがって胎生 15.5 日に口蓋帆張筋は機能し始め、軟口蓋に張力をかけているのではないかと考えられた。一方、Vimentin は胎生 12.5 日から胎生 15.5 日まで発現量に変化はなかった。したがって Vimentin が口蓋帆張筋発生初期より常に発現し、この筋が発達発育するにあたって細胞の安定を維持し続けていると考えられた。