研 究 者：竹嶋麻衣子
（所属：北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系小児歯科学分野）

研究題目：培養マラッセ上皮様細胞が歯周疾患に与える影響

目　的：

ヘルトヴィッヒ上皮鞘は，歯根完成後にはマラッセ上皮遺残として歯根膜中のセメント質に隣接して存在する。最近になり，マラッセ上皮遺残はセメント質と骨とのアンキローシス抑制に関与していると報告されたが，そのメカニズムは明らかではない。

一方マラッセ上皮遺残は消失時にはセメント質に埋入されることから，セメント質や骨誘導への関与も示唆されているが，詳細は不明である。本研究では，単離したブタ・マラッセ上皮様細胞（ERM）と骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1），コントロールとして線維芽細胞を用いて共存培養することにより，マラッセ上皮様細胞が骨芽細胞様細胞の石灰化を促進するか，または抑制するかを検索し，骨やセメント質などの歯周組織に対する影響を検討することで，小児の歯周疾患への予防と治療に貢献することを目的とする。

対象および方法：

マラッセ上皮様細胞（ERM）と骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1）を 3 次元共存培養することにより骨芽細胞様細胞の変化を確認し，さらに石灰化促進培養液で 3 次元的共存培養した骨芽細胞様細胞を用い，ALP 活性およびアメロジェニン抗体との相互作用の検索を行うことによりそれが石灰化するかどうかを確認する。

＊マラッセ上皮様細胞（ERM）の単離

ブタ小臼歯根尖側 1/2 の歯根膜より outgrowth 法にて，マラッセ上皮様細胞を単離し，また同様の方法にてブタ歯肉角化細胞を単離培養する。培養条件は，Dulbecco Modified Eagle Medium に 15% fetal bovine serum および各種抗菌薬を添加し通法に従い培養する。

＊歯肉角化細胞，線維芽細胞，骨芽細胞様細胞の培養

マラッセ上皮細胞と同様の方法で，ブタ歯肉上皮から採取した歯肉角化細胞と，ブタ歯肉由来線維芽細胞を 10% FBS，2%ペニシリンストレプトマイシン含有 DMEM，骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1）は，I 型コラーゲンコート 100 mm tissue Culture dish を用い，10% FBS，L-glutamine，2%ペニシリンストレプトマイシン溶液含有 α -MEM にて培養する。

＊ 3 次元的共存培養

3 次元共存培養には，Bio Coat 6 Well Plate 8.0 micron pore size insert（BD Biosciences）を利用する。Chember は上下 2 層から構成されており，上層の insert は可撤式で，底面にポリエチレエレフタレート製のメンブレンを有する。メンブレン表面をコラーゲンコートした骨芽細胞様細胞を，下層にはマラッセ上皮様細胞を播種し，それぞれ共存培養することにより骨芽細胞様

細胞の変化を確認する。

＊ Total RNA 抽出から cDNA 合成

マラッセ上皮様細胞とともに 3 次元共存培養した骨芽細胞様細胞から Trizol Reagent（GIBCO BRL）を用いて Total RNA を抽出し，Oligo（dT）12-18Primer（GIBCO BRL）を用いて RT 処理し cDNA を合成する。

＊ Alkaline phosphatase（ALP）活性

石灰化促進培養液中で 3 次元的共存培養した骨芽細胞様細胞を用い，マイクロプレートリーダーにて吸光度 405nm で ALP 測定を行う。ALP 活性が上昇すれば石灰化促進，低下すれば石灰化抑制ということが予測される。

＊アメロジェニンの影響

メンブレン表面をコラーゲンコートした上層に骨芽細胞様細胞を，下層にはマラッセ上皮様細胞を播種し，石灰化促進培養液にて共存培養したのち Anti-amelogenin Rabbit serum（アメロジェニン抗体：ホクドー）を添加する。アメロジェニン抗体を添加により石灰化の促進または抑制に変化を与えることが予想される（図 1）

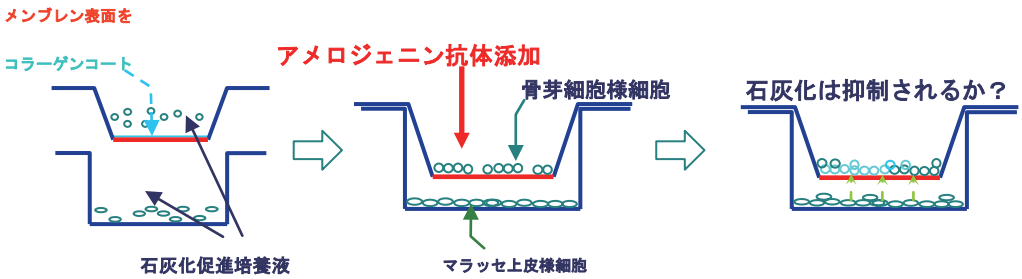


図 1　石灰化誘導能の検索

結果および考察：

これまでの研究で，単離したブタ・マラッセ上皮様細胞（ERM）と 3 次元的共存培養した骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1）は，線維芽細胞と 3 次元的共存培養したものに比べて，培養開始から 48 時間以降，有意に細胞の増殖率の増加が認められ（図 2），更に細胞誘導能も上昇した（図 3）。これらの結果から，共存培養したブタ・マラッセ上皮様細胞の存在が骨芽細胞用細胞に何らかの影響を与えていることが示唆されたため，ブタ・マラッセ上皮様細胞および，コントロールとしてブタ歯肉角化細胞を用い，エナメルマトリックスの発現についても検討し，定量的 RT-PCR 法にて，アメロジェニンおよびエナメリンの mRNA の発現を確認した（図 4）。今後も，マラッセ上皮様培養細胞の骨やセメント質などに対する影響を更に検索することで，小児の歯周疾患との関連性を明らかにしていく予定である。

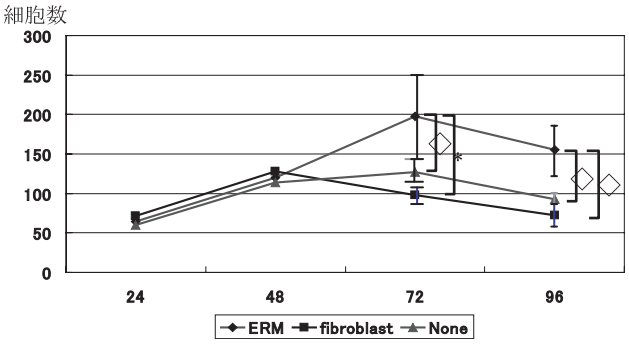


図２　各細胞と共存培養した骨芽細胞様細胞の細胞数の変化
＊Ｐ＜0.05
◇Ｐ＜0.01

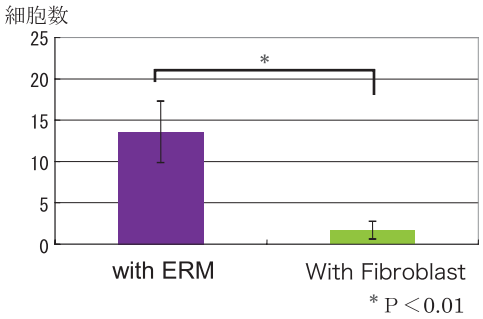


図３　骨芽細胞様細胞の遊走率
ERM と共存培養したものは細胞数が多く，遊走率が高い。

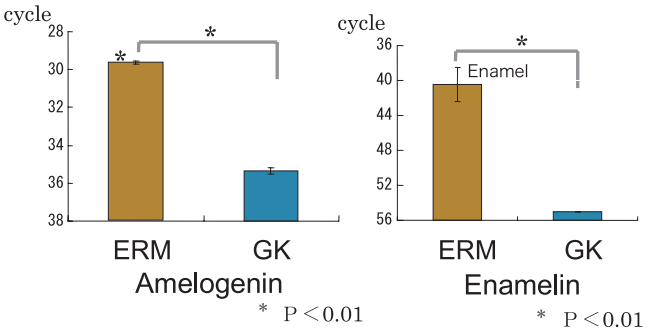


図４　定量的 RT-PCR による ERM のエナメルマトリックス発現量
ERM：マラッセ上皮様細胞，GK：ブタ歯肉角化細胞

成果発表：（予定を含めて口頭発表，学術雑誌など）

第 29 回　日本小児歯科学会北日本地方会にて発表予定。