

研究者：趙 建鑫（所属：大阪歯科大学 歯科矯正学講座）

研究題目：硬組織模倣シートを応用した進行性下顎頭吸収に関連する細胞間ネットワーク解析システムの構築

目的：

進行性下顎頭吸収は下顎頭が進行性に形態吸収変化を行うと伴に、著明な同部の体積の減少が起こる疾患と定義されている。その機序は、顎矯正手術による一期的な下顎の前方移動に伴う下顎頭への負担過重などが発症原因として指摘されているが、未だ完全に解明されていない。一方、「関節円板・下顎頭軟骨・骨」に存在する細胞群が力学刺激を受けた際に相互作用しあうネットワークの解明は、進行性下顎頭吸収の発症・悪化機序の解明に道を開き得る。しかし、その特異的研究ツールは乏しく、研究遂行の大きい妨げとなっている。本研究は、独自開発を進める硬組織模倣シート（高分子膜上に硬組織成分同様のナノリン酸カルシウムを強固に固定した Nano-CaP/高分子膜）を応用し、in vitro で同時に多様な力学的刺激を付与可能な「関節円板・下顎頭軟骨・骨」構造を模倣した細胞培養システムの構築を目的とする。

対象および方法：

1. Nano-CaP/高分子膜シートを合成

品番名 Silpot184 と Silgard527 のポリジメチルシロキサン（以下 PDMS）を用いて質量比の異なる高分子材料を合成し、原子間力顕微鏡（AFM）にて強度測定。

得た多種類のシートに Nano - CaP を結合させ、細胞培養シートを作製する。

2. シートに播種する軟骨細胞のセルソースの用意

① ラット下顎頭線維軟骨より軟骨細胞を採取し、細胞ストックを作成する。

② 下顎頭から採取される細胞数には制限がある点や、機序解明を深化させるため多能性前駆細胞から誘導された軟骨細胞を作製する。具体的には、脂肪組織を採取後、天井培養法を用いて脱分化脂肪細胞（以下 DFAT）を作製する。（図 1）

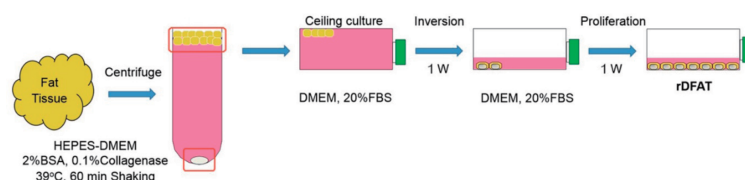


図 1 天井培養法を用いてラット DFAT の作製

- ③ iPS 細胞から iPS 由来の間葉系幹細胞様細胞を作製する。
iPS 細胞は、mTeSR1、DEF-CSD500、StemFit AK02N、Stemsure hPS 培地を使用し、フィーダーフリー化を行った後、10% FBS を含む DMEM low glucose に 10 ng/mL bFGF で 2 週間培養し、約 4 継代で iPS 由来の間葉系幹細胞様細胞（以下 iPSMSLC）に形態変化させる。
- ④ DFAT 細胞、iPS 由来の間葉系幹細胞様細胞への最適な軟骨誘導法の探索。

結果および考察：

- ・軟骨組織および骨組織の硬さを模倣できるシート作製のために、多種類の Nano-CaP/ 高分子膜シートを合成。原子間力顕微鏡（AFM）にて強度を測定済み。シートに Nano-CaP を結合させたシートを合成済み。

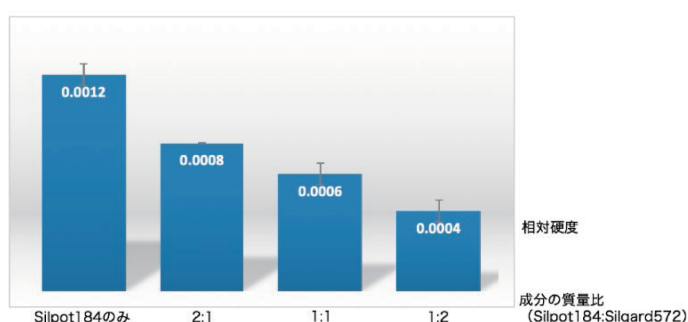


図2 AFMにてシート強度の測定結果

- ・シートに播種する軟骨細胞のセルソースとして、ラット下顎頭線維軟骨より軟骨細胞を採取し、細胞ストックを作製した。
- ・DFAT、iPSMSLC の細胞ストックを作製した。
- ・DFAT、iPSMSLC への最適な軟骨誘導法の予備的検討を終えている。

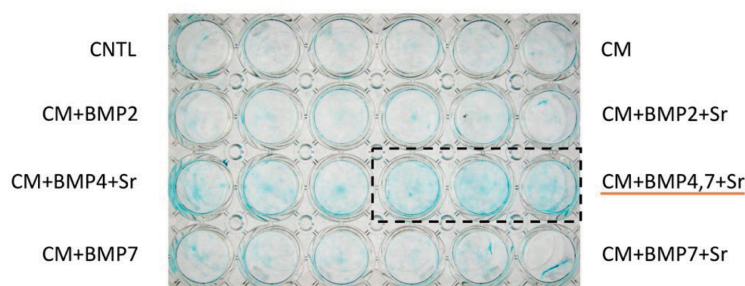


図3 24 ウェルプレートにて示された Alcian Blue 染色の結果

上記細胞への軟骨分化促進培地では Control Medium + Bone Morphogenetic protein 4, 7 + Strontium chloride のコンビネーション培地が最も軟骨分化促進するカクテル培地だと Alcian Blue 染色により確認した。

- ・予備実験として、ラット骨肉腫細胞（UMR-106）及びラット脂肪幹細胞（ADSC）を用い、コーティングしたシートにつき良好な細胞附着性を検証した。更に、伸展実験を行い、UMR-

106 と ADSC のシート上での形態変化は、免疫蛍光染色（Phalloidin + DAPI）により対照群と比べて顕著であることと確認した。骨細胞と軟骨細胞のセルソースをシート上に播種し本実験を行うことが可能になると予想される。今後、ストック済みの骨細胞と軟骨細胞のセルソースを用いて伸展実験を行う予定である。

成果発表：

暫くなし。