

細胞外カルシウム濃度が正常ヒト骨芽細胞に及ぼす影響(北海道医療大学博士論文の内容および審査の結果要旨(平成9年度))

著者名(日)	高橋 香苗
雑誌名	東日本歯学雑誌
巻	18
号	1
ページ	250-251
発行年	1999-06-30
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00008433/

果は、ヒト唾液腺の形態的特徴を良く表現し、ヒト唾液腺疾患の診断基準の構築のために有用であると考えられた。

以上の結果から、本論文は歯学に寄与するところが大きく、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと判定する。

氏名・(本籍)	高橋香苗(神奈川県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	乙第30号
学位授与の日付	平成9年9月26日
学位授与の要旨	学位規則第5条第2項該当(論文博士)
学位論文題目	細胞外カルシウム濃度が正常ヒト骨芽細胞に及ぼす影響
論文審査委員	主査 賀来 亨 副査 市田 篤郎 副査 武田 正子

論文内容の要旨

<目 的>

細胞外カルシウム濃度は生体の機能維持において重要な因子である。近年、*in vitro*における細胞外カルシウムの上昇はヒト骨芽細胞の増殖を促進させることが示され、その作用機序のひとつとしてIGF-IIの上昇が報告されているが、IGF-II以外の因子に及ぼす影響についてはほとんど解明されていない。一方、歯科領域においてハイドロキシアパタイトなどのりん酸カルシウム製剤は骨の補填材や人工歯根の材料として広く応用され、そのbioactiveな効果が指摘されているが、これらの効果に埋入されたりん酸カルシウムから溶出するカルシウムイオンが関わっている可能性が考えられる。本研究は*in vitro*における細胞外カルシウム濃度が正常骨芽細胞の細胞増殖、細胞分化、Type I collagen合成、化学走化性、Prostaglandin E₂ (PGE₂) 産生、Bone morphogenetic proteins (BMPs) の遺伝子発現に及ぼす影響を調べることを目的に行われた。

<方 法>

1. 細胞培養：細胞は継代3-6代のヒト下顎骨由来正常骨芽細胞(以下HOB-M)を用い、10% calf serum添加DMEMで培養した。

2. 細胞増殖：細胞外カルシウム濃度の上昇(0~1.2 mM)はCaCl₂をDMEM (CaCl₂ 1.8mM) に添加することによって行った。細胞外カルシウム濃度の上昇がHOB-Mの細胞増殖に及ぼす影響をXTTを用いた細胞増殖assayにより調べた。すなわち、96 wellのdishに細胞3000個/wellを播種し、10% calf serum添加DMEM (10% CS-DMEM)にて24時間培養した後、無血清培地(0.01% BSA-DMEM)に交換、さらに24時間培養した。再度、無血清培地に培地交換後、0~1.2mMのCaCl₂を添加し、24時間培養後、XTT assayを行った。

3. 細胞分化に及ぼす影響：細胞外カルシウム濃度の上昇はHOB-Mの細胞分化に及ぼす影響についてpNPPを気質とした細胞ALP assayにより、48時間作用後、濃度依存性に調べた。なお、細胞ALP活性は細胞蛋白量当りの値として算出した。

4. Type I collagen合成に及ぼす影響：細胞外カルシウム濃度の上昇がHOB-MのType I collagen合成に及ぼす影響はTakara PICP-EIA assay kitを用いたprocollagen type I collagen c-peptid (PICP) 産生を指標としたEIA assayにより、48時間作用後、濃度依存性に調べた。なお、PICPの濃度は細胞蛋白量当りの値として算出した。

5. 化学走化性(細胞遊走能)に及ぼす影響：同様に、

細胞外カルシウム濃度の上昇がHOB-Mの化学走化性に及ぼす影響をポイデンチャンバーを用いた化学走化性 assayにより検索した。

6. PGE₂産生に及ぼす影響；細胞外カルシウム濃度の上昇がHOB-MのPGE₂産生に及ぼす影響をPGE₂ EIA kit (Cayman Chemical社製)を用いて濃度依存性に短時間(10および30)作用および長時間(24時間)作用において調べた。

7. BMP-1~7のmRNAの遺伝子発現に及ぼす影響；同様に細胞外カルシウム濃度がHOB-MのBMP-1~7のmRNAの遺伝子発現に与える影響をRT-PCR法により、短時間作用(30分)および長時間作用(24時間)について半定量的に調べた。なおtotal RNAの抽出はAcid-guanidium-thiocyanate-phenol-chloroform法により行いRNAを逆転写酵素でcDNAに転換した後、PCRを行った。使用したBMP-1~7のPCR primerはOgoseらの方法に従い作製した。またcDNAの均一性をみるために用いたGAPDHのprimerはClone Tech社製のものを用いた。

〈結 果〉

1. 0.1~1.2mMの細胞外カルシウム濃度の上昇はHOB-Mにおいて細胞増殖を濃度依存性に有意に増加させた。

2. 0.1~1.2mMの細胞外カルシウム濃度の上昇がわ

ずかに細胞ALP活性を上昇させる傾向を示したが、コントロール群との有意差は認められなかった。

3. 0.4~1.2mMの細胞外カルシウム濃度の上昇はHOB-MにおいてType I collagenの産生の指標であるPICP産生を有意に増加させた。

4. 細胞外カルシウム濃度の上昇はHOB-Mにおいて化学走化性を刺激する効果は認められなかった。

5. 24時間作用の細胞外カルシウム濃度の上昇はHOB-Mにおいて0.4~1.2mMの範囲でPGE₂の産生を有意に増加させたが、PGE₂の産生抑制剤であるインドメタシン存在下においても細胞外カルシウム濃度の上昇による細胞増殖促進効果はブロックされなかった。

6. 0.5時間および24時間作用の0.1~0.4mMの細胞外カルシウム濃度の上昇はHOB-MにおいてBMP-2, 4, 5のmRNAの発現を増加させたが、1.2mMにおいては24時間作用で、BMP-5のmRNAの発現を増加させた以外、特に効果は認められなかった。

〈考 察〉

本研究はチタンインプラントへのハイドロキシアパタイトコーティングの臨床的有用性が、ハイドロキシアパタイト埋入後の周囲のカルシウム濃度上昇に起因する可能性を示唆するものとも解釈することができ、新しいハイドロキシアパタイトの開発など歯科医学の発展に有用な研究と考えられた。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

細胞外カルシウム濃度は生体細胞組織の機能維持においてきわめて重要な因子である。ハイドロキシアパタイト、トリカルシウムフォスフェイト、オクタカルシウムフォスフェイトなどのリン酸カルシウムセラミックは歯科インプラント材料や骨補填材として広く用いられており、その生体内での溶解性が報告されているが、その生物学的意義はこれまでほとんど明らかにされていなかった。

本研究はin vitroにおける細胞外カルシウム濃度がヒト正常骨芽細胞の1)細胞増殖、2)細胞分化特にアルカリホスファターゼ(以下ALP)活性、3)細胞外基質合成、特にType I collagen合成、4)化学走化性、5) Prostaglandin E₂(PGE₂)合成、6) Bone morphogenetic proteins (BMPs)の遺伝子発現に及ぼす影響を調べるこ

とを目的に行われ、本研究の結果から、骨吸収や埋入リン酸カルシウムセラミックの溶解に伴う骨芽細胞周囲のカルシウム濃度上昇は、骨芽細胞の1)細胞増殖、2) collagen、3) PGE₂産生、4) BMP産生を促進させることを明らかにし、骨芽細胞周囲のカルシウム濃度上昇はその後の骨芽細胞における骨形成を促進させる可能性が考えられた。本研究は骨芽細胞周囲のカルシウム濃度上昇が、骨芽細胞に及ぼす影響に関して新たな概念をもたらした創造的研究と考えられる。

本研究はチタンインプラントにおけるハイドロキシアパタイトコーティングの有用性を示唆する結果とも解釈され、新しい骨形成促進性リン酸カルシウムセラミックの開発など歯科医学の発展に寄与するところ大と考えられ、よって博士(歯学)に値すると判定した。