

<その他>パルス電磁場刺激の骨芽細胞および骨芽細胞前駆細胞への影響：無血清培養条件下での細胞外基質タンパクmRNA発現変化(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14年度))

著者名(日)	木村 和代
雑誌名	東日本歯学雑誌
巻	22
号	1
ページ	75-77
発行年	2003-06-30
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00008784/

学位論文審査の要旨

歯科領域における欠損補綴に口腔インプラント法があるが、インプラント体の顎骨への固定期間を短縮することにより、上部構造体の早期装着、口腔機能の早期回復が可能となる。松果体からの分泌物であるメラトニンは、生体の日内リズムを司るホルモンとして注目されている他に様々な作用が報告されており、骨代謝との関係を示唆する報告もある。

本研究は、インプラント体埋入後、osseointegrationを獲得するまでの期間短縮化を目的としてメラトニン投与がウサギ大腿骨のインプラント体周囲の新生骨の形成に及ぼす影響について検討したところ、以下の結果を得た。

1. メラトニンのウサギへの1週間、2週間の腹腔内投与後、諸臓器重量の変化および病理組織学的変化はみられなかった。
2. 2週間投与群では対照群に比較してインプラント体周囲の活発な骨の新生が観察された。
3. メラトニン20mg/kg/dayの1週間投与における骨接触率は対照群に比較して有意に高い値を示した。また、20mg/kg/dayの2週間投与においては、骨接触率、骨面積率ともに、対照群に比較して有意に高い値を示した。
4. メラトニン20mg/kg/dayの1週間投与、2週間投与それぞれにおける、インプラント回転除去トルク値は、対照群に比較して有意に高い値を示した。

以上より、本実験におけるメラトニンの最適投与量は20mg/kg/dayであることが示唆された。また、メラトニン20mg/kg/dayの1週間投与における骨接触率および回転除去トルク値が有意に高い値を示したことから、本実験において、メラトニンの腹腔内投与は、インプラント体埋入後インプラント周囲の骨形成を早期に促進する可能性が示唆された。

氏名・(本籍)	木村和代(北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲第105号
学位授与の日付	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当(課程博士)
学位論文題目	パルス電磁場刺激の骨芽細胞および骨芽細胞前駆細胞への影響—無血清培養条件下での細胞外基質蛋白mRNA発現変化—
論文審査委員	主査 教授 坂口 邦彦 副査 教授 賀来 亨 副査 教授 田隈 泰信

論文内容の要旨

【緒言】

パルス電磁場刺激は、主として難治性骨折の治療などに臨床応用が試みられており、その有効性は一般に認められている。パルス電磁場刺激の骨形成促進機序を解明するために行われてきた培養細胞を用いた研究においては、いずれも培養時に細胞の増殖、分化に直接的に影響

を及ぼす血清含有条件下の結果であり、無血清でパルス電磁場の直接的な影響について検索した報告はみられない。パルス電磁場刺激を施す骨創傷部においては、局所への前駆的細胞の動員と分化を促す様々な成長因子や細胞外基質蛋白がパラクリンまたはオートクリンのに複雑に働いている。それらの成長因子の代表的なものの一つにtransforming growth factor-beta (TGF- β)がある。

TGF- β は、創傷部位において放出される成長因子の中でもっとも多いものの一つであり、骨再生時の骨芽細胞前駆細胞の活性化および骨芽細胞への分化のみならず、周囲の新生血管の成長、線維芽細胞の増殖など、創傷治癒全般にわたって様々な作用に関与していると言われてい。本研究では、パルス電磁場刺激による骨芽細胞への無血清条件での直接的な影響と、骨創傷部での影響を想定し、骨芽細胞前駆細胞へのTGF- β 存在下での影響を、骨芽細胞が分泌する細胞外基質蛋白mRNA発現の変化について検索し、パルス電磁場の骨形成促進機序について考察することを目的とした。

[材料と方法]

1. パルス電磁場刺激のSV-HFO mRNA発現への影響

骨芽細胞としてChibaraにより樹立されたヒト正常骨由来骨芽細胞株SV-HFOを用いた。SV-HFOをpoly-L-lysineとtype I collagenをコートした60mm培養皿 (Becton Dickinson Labware, Becton Drive Franklin Lakes, NJ, USA) 上に 10^6 個を播種し、0.01% bovine serum albumin (Sigma, St. Louis, MO, USA), 硫酸カナマイシン (明治製菓, 東京, 日本) 60mg/ml 添加 Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) にて培養した。パルス電磁場刺激 (磁場強度0.3mT, パルス幅25 μ sec, 周波数100 Hz) は、細胞伸展過程での影響を検索するため、細胞播種直後から0.5, 2, 6時間刺激し、さらに細胞伸展後の影響を検索するため、細胞播種6時間放置後0.5, 6, 18時間刺激を与えた。その後、各条件で、totalRNAを抽出し、Oligo (dt)₁₂₋₁₈ Primer (Invitrogen Corp.) を用いて逆転写によりcDNAを作製し、bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), osteopontin (OPN), osteonectin (ON), osteocalcin (OCN), type I collagen に対する特異的プライマーを用いた定量的PCR法を行った。定量的PCRはLightCycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) にて行い、標的プライマーで得られた値は全て、内部標準であるglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の値で割り、逆転写時の誤差を解消した。

2. パルス電磁場刺激のTGF- β 存在下でのhMSC mRNA発現への影響

骨芽細胞前駆細胞として、ヒト間葉性幹細胞hMSC (Bio Whittaker, Walkersville, MD, USA) を用いた。hMSCを上記のSV-HFOと同様に播種し、専用培地キット (Bio Whittaker) にて培養した。細胞播種6時間放置後、TGF- β (Bio Source International, Inc., Camarillo, CA, USA) を0.1, 1, 10ng/ml 添加し6時

間のパルス電磁場刺激を与えた条件でBMP-2遺伝子発現に与える影響を検討した。

[結果と考察]

1. パルス電磁場刺激のSV-HFO mRNA発現への影響

細胞伸展過程では、パルス電磁場刺激による明らかなmRNAの変化は認められなかったものの、伸展した後はBMP-2 mRNAの有意な発現上昇が認められた。パルス電磁場の骨芽細胞への影響は、細胞が完全に伸展したのものみにみられるものと考えられた。本研究では、他の報告で発現上昇がみられたtype I collagen, TGF- β の上昇はみられず、type I collagen培養皿で培養された細胞のBMP-2 mRNAの発現上昇のみであった。骨芽細胞はそれ自身からもtype I collagenを分泌しているが、poly-L-lysine上では発現上昇がみられなかったことから、ある程度の量が必要であるものと考えられた。また、パルス電磁場刺激が骨形成促進機序にBMP-2 mRNAの発現上昇の関与していることも示唆された。

2. パルス電磁場刺激によるhMSC mRNA発現への影響

TGF- β を添加してhMSCのBMP-2 mRNAの発現を観察すると、poly-L-lysine上でもtype I collagen上でも濃度依存的に発現の上昇が認められた。しかし、両者の発現量を比較すると、poly-L-lysine上での発現が高くなっており、パルス電磁場刺激によるBMP-2 mRNAの上昇には必須と考えられたtype I collagenの存在が、この場合は抑制的に働いたものと考えられる。type I collagenの存在が抑制的に作用した原因に、このような細胞外基質の過剰な蓄積へのtype I collagenの関与が一つの可能性として考えられるが、その詳細については不明であり、この点に関してはさらなる検索が必要である。また、hMSCでは、パルス電磁場刺激によって、SV-HFOで認められたBMP-2 mRNAの発現上昇はみられなかった。このことから、パルス電磁場の影響は細胞の種類や細胞の分化によって異なっていると考えられる。

[結論]

1. ヒト正常骨由来骨芽細胞株SV-HFOの伸展過程では、パルス電磁場刺激によるmRNAに変化は認められなかった。
2. SV-HFOの伸展後ではパルス電磁場刺激を付与すると、type I collagen基質上の細胞でBMP-2 mRNAの発現上昇が観察された。
3. 骨芽細胞前駆細胞であるヒト間葉性幹細胞hMSCはTGF- β によりBMP-2 mRNAの発現上昇が認められたが、これはpoly-L-lysine基質上の細胞の方がtype I

collagen基質上の細胞よりも高い値を示した。

4. hMSCのTGF- β によるBMP-2 mRNAの発現上昇は、パルス電磁場刺激によって抑制されていた。

以上の結果より、パルス電磁場刺激のin vitroでの造骨

系細胞への影響は、その細胞の種類や分化の程度、type I collagenの存在やその量などによって変化するが、骨芽細胞に関わるパルス電磁場刺激の骨形成促進機序にはBMP-2の発現上昇に関与していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

パルス電磁場刺激は、主として難治性骨折の治療などに臨床応用が試みられており、その有効性は一般に認められている。パルス電磁場刺激の骨形成促進機序を解明するために行われてきた培養細胞を用いた研究においては、いずれも培養時に細胞の増殖、分化に直接的に影響を及ぼす血清含有条件下の結果であり、無血清でパルス電磁場の直接的な影響について検索した報告はみられない。パルス電磁場刺激を施す骨創傷部においては、局所への前駆的細胞の動員と分化を促す様々な成長因子や細胞外基質蛋白がパラクリンまたはオートクリン的に複雑に働いている。その成長因子の代表的なものの一つにtransforming growth factor-beta (TGF- β)がある。TGF- β は、創傷部位において放出される成長因子の中でもっとも多いもの一つであり、骨再生時の骨芽細胞前駆細胞の活性化および骨芽細胞への分化のみならず、周囲の新生血管の成長、線維芽細胞の増殖など、創傷治癒全般にわたって様々な作用に関与していると言われている。本研究では、パルス電磁場刺激による骨芽細胞への無血清条件での直接的な影響と、骨芽細胞前駆細胞への

TGF- β 存在下での影響を、骨芽細胞が分泌する細胞外基質蛋白mRNA発現の変化について検索し、以下に示す結果を得た。1) ヒト正常骨由来骨芽細胞様株SV-HFOの伸展過程では、パルス電磁場刺激によるmRNAの変化は認められなかった。2) SV-HFOが伸展した後にパルス電磁場刺激を付与すると、type I collagen基質上の細胞でBMP-2 mRNAの発現上昇が観察された。3) 骨芽細胞前駆細胞であるヒト間葉性幹細胞hMSCはTGF- β によりBMP-2 mRNAの発現上昇が認められたが、これはpoly-L-lysine基質上の細胞の方がtype I collagen基質上の細胞よりも高い値を示した。4) hMSCのTGF- β によるBMP-2 mRNAの発現上昇は、パルス電磁場刺激によって抑制されていた。

以上の結果より、パルス電磁場刺激のin vitroでの造骨系細胞への影響は、その細胞の種類や分化の程度、type I collagenの存在やその量などによって変化するが、骨芽細胞に関わるパルス電磁場刺激の骨形成促進機序にはBMP-2の発現上昇の関与していることが示唆された。