

氏名・(本籍)	八島明弘(北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲第57号
学位授与の日付	平成10年3月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(課程博士)
学位論文題目	ヒト正常骨由来骨芽細胞様株(SV-HFO)に与えるパルス電磁場刺激の影響 —Bone Morphogenetic ProteinのmRNAの遺伝子発現からの検討—
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 馬場久衛

論文内容の要旨

【目的】

パルス電磁場刺激法は難治性骨折や先天性偽関節における骨形成刺激療法の一つとして広く応用されている。その作用機序は未だに不明な点が多い。近年、パルス電磁場刺激によってchick embryonic calvariaで、Bone Morphogenetic protein(以下BMP)-2, -4のmRNAの発現が刺激されていることが報告されているが、その発現の刺激が骨芽細胞に起こっているものか、それとも他の間葉系細胞に起こっているのかについては不明である。本研究はヒト正常骨由来骨芽細胞様株を用い、パルス電磁場刺激がヒト骨芽細胞のBMPの遺伝子発現に及ぼす影響について調べることを目的としている。

【材料および方法】

1. 細胞培養

細胞はヒト正常骨から分離されたヒト正常骨由来骨芽細胞様細胞にsimian virus 40を用いて不死化させることで、株化されたヒト正常骨由来骨芽細胞様細胞株(以下SV-HFO)を用い、10%Fetal bovine serum添加 α -MEM(10%FBS- α -MEM)で培養した。

2. 細胞増殖に及ぼす影響

最も細胞増殖を促進する磁場強度を検討する目的で、パルス幅25 μ sec, 周波数100Hzを固定とし、磁場強度0~0.6mTの範囲で、パルス電磁場刺激がSV-HFOの細胞増殖に及ぼす影響をXTTを用いた細胞増殖assayより

検討した。XTT assayでは、96well-platesに細胞数 3.0×10^3 /wellを播種、10%FBS- α -MEMにて24時間培養した後、無血清培地(0.01%BSA- α -MEM)に交換、さらに24時間培養後、再度、新鮮な0.01%BSA- α -MEMに交換した。交換後、直ちに0~0.6mTのパルス電磁場刺激を開始して48時間作用後、XTT assayを行った。パルス電磁場刺激の細胞増殖刺激能はCell count法によっても検討した。35mm dishに細胞数 10^5 /dishを播種、10%FBS- α -MEMにて培養した。培養24時間後からパルス電磁場刺激を開始した。Cell countはパルス電磁場刺激開始時から9日間にわたり経日的に行った。すなわち、細胞を0.25%トリプシンで剝離し、0.15%トリパンブルー染色による死細胞を用いた細胞数をヘモサイトメーターにてcountした。

3. 細胞分化に及ぼす影響

パルス電磁場刺激が細胞分化に及ぼす影響は、XTT assayに準じた方法で、パルス電磁場刺激48時間作用についてpNPPを基質とした細胞ALP assayにより検討した。なお、細胞ALP活性は細胞蛋白量当たりの値として算出した。

4. BMP-1~7のmRNAの遺伝子発現に及ぼす影響

パルス電磁場刺激がSV-HFO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、1~48時間の範囲で経時的に半定量的に調べた。半定量法はOgoseらの方法に準じてPCRのcycle数を色々変化させ、バンドが検出される否かにより検討した。使用した

BMP-1~7のPCR primerはOgoseらの方法に従い製作した。またcDNAの均一性を見るために用いた内部標準としてのglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)のprimerはClone tech社製のものを用いた。

5. パルス電磁場刺激後のconditioning mediumがBMPsのmRNA遺伝子発現に及ぼす影響

パルス電磁場刺激のmRNAの遺伝子発現に及ぼす影響が直接的なものか、その他の因子を介した間接的なものを検討するために、パルス電磁場刺激6時間作用時のconditioning mediumを用いた新たに播種したSV-HFOに添加した。添加は無血清状態としたmedium吸収後行った。その後、conditioning medium 0.5~6時間作用後のBMP-2, -4, -5のmRNAの遺伝子発現に及ぼす影響について調べた。

6. PGE₂産生に及ぼす影響

パルス電磁場刺激がSV-HFOのPGE₂のmedium中へ産生に及ぼす影響をPGE₂ EIA kit (Cayman Chemical社製)を用いて1~6時間の範囲で調べた。なお、medium中のPGE₂産生量は細胞蛋白量当たりの値として算出した。

【結 果】

1. 細胞増殖に及ぼす影響

最も細胞増殖促進作用が有ったのは磁場強度0.3 mT, パルス幅25 μ sec, 周波数100Hzであった。よって以降のパルス電磁場刺激条件は磁場強度0.3mT, パルス幅25 μ sec, 周波数100Hzとし、パルス電磁場刺激を行う実験群と刺激を行わない対照群とにある細胞増殖促進効果の違いについて検討した。Cell count法による検討において、2日目では実験群が対照群に比べ1.2倍の増加を示

し、4日目では1.3倍の増加を示した。両者はいずれも統計学的に有意であった。

2. 細胞分化に与える影響

パルス電磁場刺激48時間作用は、細胞ALP活性に有意な効果を示さなかった。

3. BMP-1~7のmRNAの遺伝子発現に及ぼす影響

SV-HFOにおいてbasal condition下で、BMP-1~7の内mRNAの遺伝子発現を示すのはBMP-1, -2, -4, -5, -7であった。BMP-3と-6のmRNAの遺伝子発現は認められなかった。パルス電磁場刺激は、6~24時間の範囲においてBMP-2, -4, -5のmRNAの発現を増加させた。しかしながら、その他のBMPのmRNAの発現に及ぼす影響は認められなかった。

4. パルス電磁場刺激後のconditioning mediumがBMPsのmRNAの遺伝子発現に及ぼす影響

パルス電磁場刺激6時間作用のconditioning mediumはSV-HFOのいずれのBMPのmRNAの発現にも影響を及ぼさなかった。

5. PGE₂産生に及ぼす影響

パルス電磁場刺激は、1~6時間作用のいずれにおいてもPGE₂の産生は増加しなかった。

【結 論】

1. パルス電磁場刺激は6~24時間作用においてSV-HFOのBMP-2, -4, -5のmRNAの遺伝子発現を刺激した。

2. パルス電磁場刺激の骨形成促進作用の一部として、BMP-2, -4, -5の産生が関わっている可能性が示唆された。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

パルス電磁場刺激法は難治性骨折や先天性偽関節における骨形成刺激療法の一つとして広く応用されているが、その作用機序は未だに不明な点が多い。

本研究はヒト正常骨由来骨芽細胞様株 (SV-HFO) において、パルス電磁場刺激のヒト骨芽細胞の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) BMPのmRNAの遺伝子発現, 4) BMPのmRNAの遺伝子発現時のconditioning mediumでのBMPのmRNAの遺伝子発現, 5) プロスタグランジンE₂ (以下PGE₂) の産生に及ぼす影響についてin vitroで検討することを目的に行われ、本研究の結果から、1) 細胞増殖, 2) BMP-2, -4, -5産生, を促進させること

を明らかにし、パルス電磁場刺激は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、パルス電磁場刺激が、ヒト骨芽細胞に及ぼす影響に関して新たな概念をもたらす創造的研究と考えられる。

本研究は、臨床応用におけるパルス電磁場刺激の有用性を示唆する結果とも解釈され、インプラント治療における早期咬合の回復やGuided bone regeneration (GBR) 法, 歯周治療におけるGuided regeneration (GTR) 法などの骨の再生誘導が望まれる症例に有用である可能性が考えられ、歯科医学の発展に寄与するところ大と考えられる。よって博士 (歯学) に値すると判定した。