

〔原 著〕

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

高橋 香苗, 中出 修, 小山 宏樹, 賀来 亨

北海道医療大学歯学部口腔病理学講座

(主任: 賀来 亨教授)

Effects of extracellular calcium on normal human bone cells

Kanae TAKAHASHI, Osamu NAKADE, Hiroki KOYAMA and Tohru KAKU

Department of Oral Pathology, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

(Chief: Prof. Tohru KAKU)

Abstract

It has been demonstrated that elevated extracellular calcium can inhibit the formation of osteoclast-like cells and stimulate osteoblastic proliferation, indicating that extracellular calcium is very important for the process of bone remodeling. The current study was carried out to examine the effect of increased extracellular calcium on the cell proliferation, differentiation, chemotactic activity, prostaglandin E₂ (PGE₂) synthesis and mRNA levels of bone morphogenetic proteins (BMP), well-documented osteoinductive proteins, in normal human mandible-derived bone cells (HOB-M cells) *in vitro*.

The results are as follows.

1. An increase in extracellular calcium significantly increased cell proliferation with an optimal dose at 0.4mM (added CaCl₂), as assessed by XTT proliferation assay.
2. While elevated extracellular calcium failed to increase alkaline phosphatase (ALP) activity or osteocalcin secretion, it significantly increased procollagen type I carboxy-terminal peptide (PICP) production, a useful measure of type I collagen synthesis.
3. Increased extracellular calcium did not significantly affect the chemotactic activity of HOB-M cells.
4. Treatment with increased calcium (0.4-1.2mM; added CaCl₂) for 24 hrs significantly increased the PGE₂ synthesis into the media.

5. However, addition of indomethacin (10^{-5} M), an inhibitor of PGE₂ synthesis, did not block the increased cell proliferation by calcium.
6. Mild increases (0.1-0.4mM ; added CaCl₂) in extracellular calcium markedly increased the mRNA levels of BMP-2, -4 and -5, after 0.5- and 24-hour incubations as evaluated by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).
7. However, a severe increase (1.2mM ; added CaCl₂) in extracellular calcium failed to affect the mRNA levels of BMP, except for an increase in mRNA level of BMP-5 at 24 hr.

These results indicate that extracellular calcium is one of the potent regulatory factors of BMP, type I collagen as well as PGE₂ in human osteoblastic cells.

Key words : extracellular calcium, bone morphogenetic proteins (BMP), proliferation, differentiation.

I. 緒 言

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をはじめ, 種々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¹⁾や骨補填材²⁾として広く用いられており, その生体内での溶解性^{3,4)}が報告されているが, リン酸カルシウムセラミックの生体内溶解がもたらす生物学的意義はほとんど明らかにされていない。一方, 骨吸収窩の微小環境下ではカルシウム濃度が最高40mM程度まで上昇する⁵⁾ことが知られているが, 上昇したカルシウム濃度が骨芽細胞に及ぼす影響についても不明な点が少なくない。近年, *in vitro*における細胞外カルシウムの上昇はマウス⁶⁾およびヒト⁷⁾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-I⁸⁾あるいはIGF-II⁷⁾の上昇が報告されているが, IGF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。

本研究は, リン酸カルシウムセラミックを歯科臨床に応用する際の骨芽細胞の動態を解明する, また骨吸収された部位で骨形成が促進される機序を解明する目的で, 細胞外カルシウム濃度が骨芽細胞に及ぼす影響を検討した。

II. 材料および方法

1. 細胞培養

細胞は, 21歳, 女性の交通事故による下顎骨骨折の修復手術の際に生じた余剰骨から, コラゲナーゼ消化法により分離され, 骨芽細胞としての特性を備えたヒト下顎骨由来正常骨芽細胞(以下HOB-M細胞)で, 継代3-6代のものを用いた^{9,10)}。培養液は10%Iron-supplemented bovine calf serum (以下BCS; Lenexa, U. S. A.) 含有Dulbecco's modified Eagle's medium [以下DMEM; Gibco Laboratory (Grand Island, U. S. A.)] に抗生剤 [Penicillin G (Meiji Seika Kaisha-Ltd, Tokyo, Japan) 100IU/ml, Gentamicin (Sigma, St. Luis, U. S. A.) 50 μ g/ml, Fungizone (Bristol-Myers Squibb KK., Tokyo, Japan) 3 μ M/ml] を添加したものを用い, 100mm Tissue Culture Dish (Iwaki Glass, Funabashi, Japan) 内で培養した⁹⁾。培養条件は温度37°C, 湿度100%, 5%CO₂-95%空気の環境下で行い, 細胞の継代には0.5%Trypsin-5.3mM EDTA-(Gibco Laboratory) をPBSで10倍希釈したものを用い, confluentに達した時点で1:4の希釈率で継代培養した。

2. 細胞増殖に及ぼす影響

細胞外カルシウム濃度の上昇がHOB-M細胞の細胞増殖に及ぼす影響はmitochondrial dehydrogenase活性を指標としたXTT細胞増殖assay¹¹⁾により調べた。すなわち96well-platesに細胞数 3×10^3 /wellを播種、上記抗生剤血清添加培養液にて24時間培養した後、上記抗生剤添加0.01%BSA含有DMEM(以下0.01%-BSA-DMEM)に交換、さらに24時間培養後、再度、新鮮な0.01%-BSA-DMEMに交換した。交換後、直ちにCaCl₂(Kanto Chemical, Tokyo, Japan)を0.1-1.2mMの範囲で添加、さらに24時間培養後、mediumを吸引、XTT(Sigma)溶液を添加した。さらに4時間培養後、吸光度をMicroplate-reader(Corona, Tokyo, Japan)にて492nmで測定した。

3. ALP活性に及ぼす影響

細胞外カルシウム濃度の上昇がHOB-M細胞の細胞分化に及ぼす影響はp-nitrophenyl phosphate(以下pNPP; Sigma)を基質としたassayにより測定した。細胞ALP assay¹²⁾は、細胞増殖アッセイに準じた要領で調べた。すなわちHOB-Mを48well-platesに細胞数 10^4 /wellを播種、上記抗生剤血清添加培養液にて24時間培養した後、0.01%-BSA-DMEMに交換、さらに24時間培養後、再度、新鮮な0.01%-BSA-DMEMに交換した。交換後、直ちにCaCl₂を0.1-1.2mMの範囲で添加、さらに48時間培養後、PBS(-)で一回洗浄、PBS(-)吸引後各wellに300 μ lの0.1%Triton-X(Kanto Chemical)を添加後、各well、約1分間pipettingし細胞を可溶化した。細胞ALP活性および細胞蛋白量の計測には各々50 μ lづつ用いassayを行った。細胞蛋白量はWiechelmanら¹³⁾の方法に準じ計測した。なお、ここで用いた1Uは室温で1分間に1 μ MのpNPPを加水分解させる酵素量を指し¹²⁾、細胞ALP活性は細胞蛋白量で標準化し算出した。

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細胞のType I collagen合成に及ぼす影響はprocollagen type I collagen c-peptide (PICP)産生を指標としたPICP-EIA assay kit (Takara, Kusatsu, Japan)を用い、ALPアッセイと同様の要領で48時間作用後、調べた¹⁴⁾。なお、PICPの濃度は細胞蛋白量当りの値として算出した。

5. 化学走性に及ぼす影響

細胞外カルシウム濃度の上昇がHOB-M細胞の化学走性に及ぼす影響をボイデンチャンバーの原理を応用した化学走性assayにより検索した¹⁵⁾。Microchemotaxis chamberは6-wellでfilterのpore sizeが8.0 μ m (Becton Dickinson, Bedford, U. S. A.)のものをを用いた。chamber下室には種々のカルシウム濃度に調整された0.01%BSA含有DMEMを2ml、上室にはHOB-Mが 5×10^5 個/ml入った細胞-0.01%-BSA-DMEM懸濁液を5ml入れ、4時間培養した。100%エタノール溶液に10分間浸し細胞を固定、filter上面の非通過細胞を丹念に綿棒で除去した後、フィルターを移動通過し、フィルターの反対側下面に付着した細胞を0.4%トリパンブルー溶液により染色した。光学顕微鏡下200倍率で観察、10視野をランダムに選び細胞数を計測し、その平均値を1実験の値とし、各群各々、6実験を行い、平均値、SDを求めた。さらに、細胞外カルシウム濃度の上昇によって引き起こされる間接的因子の増減が化学走性に及ぼす影響を調べるため、0.01%-BSA-DMEMにおいて種々のカルシウム濃度で48時間培養された培養液を、4°Cで12時間、0.01%-BSA-DMEMにて透析し、細胞蛋白量当りで、各試料を補正したものを下室に置き、同様にその化学走性に及ぼす影響を調べた。

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細胞のPGE₂産生に及ぼす影響をPGE₂ EIA kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, U. S. A) を用いて短時間 (10および30分) 作用および長時間 (24時間) 作用において調べた¹⁶⁾.

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細胞の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Ogoseら¹⁷⁾の方法に準じ, 半定量的に調べた. なおtotal RNAの抽出はAcid-guanidium-thiocyanate-phenol-chloroform法¹⁸⁾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¹⁸⁾の方法に従い作製した. また内部標準として用いたGAPDHのprimerはClone Tech社製のものをを用いた. 各々のsequenceおよびPCR-product sizeはTable 1に示す.

Table 1 PCR primers

Primer	Sequence (5' to 3' orientation)	Product size (bp)
Human BMP-1 (3')	TCACAGCTGCACTTGTAGCTGCC	286
Human BMP-1 (5')	TTGAGATTGAGCGCCACGACAGC	
Human BMP-2 (3')	GCTGTACTAGCGACACCCAC	671
Human BMP-2 (5')	TCATAAAACCTGCAACAGCCAACCTCG	
Human BMP-3 (3')	TCAAATGAGTTCTTTGCCAGGTTATC	330
Human BMP-3 (5')	CGCCAGGAGATACCTCAAGGTAGA	
Human BMP-4 (3')	GCTGAAGTCCACATAGAGCGAGTG	346
Human BMP-4 (5')	ACTGGTCCACCACAATGTGACAC	
Human BMP-5 (3')	CCGAGATAACTGTATGCGACGAG	305
Human BMP-5 (5')	GGAGACAATCATGTTCACTCCAG	
Human BMP-6 (3')	CTGGGTAATAAGGCACTGGCATG	528
Human BMP-6 (5')	GTCGTAATCGCTCTACCCAGTCC	
Human BMP-7 (3')	AGGCCGTCTTTCAGTACCCAGG	277
Human BMP-7 (5')	TCCGATTCCCTGCCCAAGTG	
Human GAPDH (3')	TGAAGGTCCGAGTCAACGGATTTGGT	983
Human GAPDH (5')	CATGTGGCCATGAGGTCCACCAC	

8. 統計処理

各群間の有意差検定はone-way analysis of variance (ANOVA) およびFisher's protected least significant difference (Fisher's PLSD) によって行った. なお, 危険率が0.05以下の場合を有意差ありとした.

III. 結 果

1. 細胞増殖に及ぼす影響

Fig. 1に示すように0.1-1.2mMの細胞外カルシウム濃度の上昇はHOB-M細胞において, 細胞増殖を有意に増加させた ($p < 0.001$ by ANOVA). 最適濃度は約0.4mMであり, コントロール群の約145%の細胞増殖を示した.

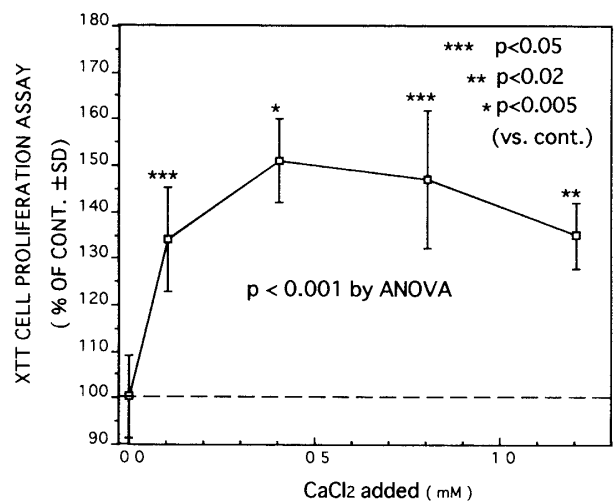


Fig. 1 Effects of elevated calcium concentrations on cell proliferation in normal human mandible-derived bone cells (HOB-M cells) *in vitro*. Either CaCl₂ or MgCl₂ was added to serum-free DMEM + 0.01% BSA, as indicated on the x-axis. Stimulation of proliferation is presented as percentage of the controls (mean ± SEM, n=6 for each) * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.05$; differences from the controls by Fisher's PLSD. The dotted line represents 100% of the control. Note: The control medium contained 1.8mM CaCl₂; thus, the final concentration of CaCl₂ is the added value (x-axis)+1.8mM.

2. ALP活性に及ぼす影響

Table 2 に示すように細胞外カルシウム濃度の上昇はHOB-M細胞においてわずかに細胞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ず、細胞外カルシウムの上昇は正常ヒト骨芽細胞において細胞分化に及ぼす効果はほとんど認められないことが示された。

Table. 2 Effect of extracellular calcium on ALP activity in HOB-M cells *in vitro*.

CaCl ₂ added (mM)	ALP activity (μU/mg protein ± S. D.)
0	32.2 ± 4.6
0.1	37.3 ± 4.0 NS
0.4	36.1 ± 3.8 NS
0.8	37.5 ± 3.7 NS
1.2	39.3 ± 5.1 NS

(NS: not significant vs. control)

3. Type I collagen合成に及ぼす影響

0.4-1.2mMの細胞外カルシウム濃度の上昇はHOB-M細胞においてtype I collagen合成の指標であるPICP産生を有意に増加させた (Fig. 2, p<0.001 by ANOVA)。この結果から細胞外カルシウムの上昇は下顎骨由来正常ヒト骨芽細胞においてtype I collagen合成を高めることが示された。

4. 化学走性 (細胞遊走能) に及ぼす影響

細胞外カルシウム濃度の上昇がHOB-M細胞の化学走性に対する直接的影響、すなわち種々のカルシウム濃度溶液をchamber下室に入れた場合 (Table 3 : non-treated media)、また間接的影響、すなわち種々のカルシウム濃度溶液でHOB-M細胞を48時間培養した後、その培養液をchamber下室に入れた場合の化学走性に及ぼす影響をみた (Table 3 ; 48h-treated media) 両方において、細胞外カルシウム濃度の上昇が化学走性を刺激する効果は認められなかった。

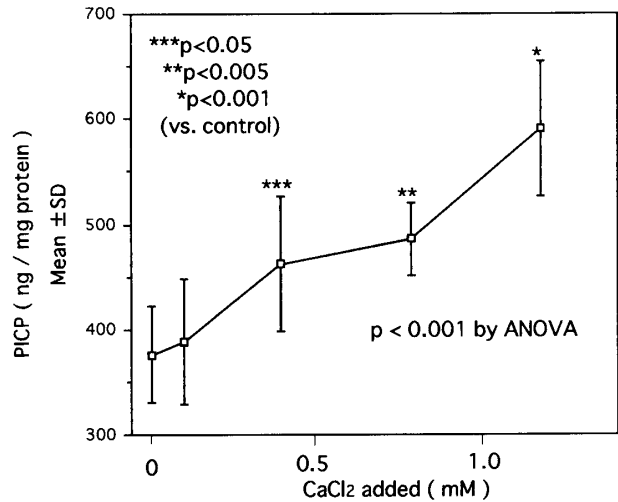


Fig. 2 Effects of elevated calcium on type I collagen synthesis in HOB-M cells. The cells were exposed to calcium for 48 hrs to examine the effects of calcium on PICP production, which represents cellular type I collagen synthesis. The amount of PICP was normalized against cellular protein. Stimulation of PICP production is presented as a percentage of the controls (mean ± SEM, n=6). *p<0.001, **p<0.01, and ***p<0.05; differences from the controls by Fisher's PLSD. The dotted line represents 100% of the control.

Table. 3 Effect of extracellular calcium on chemotactic response in HOB-M cells *in vitro*.

CaCl ₂ added (mM)	NUMBER OF CELLS/HIGH POWER FIELDS	
	non-treated media	48h-treated media
0	0	145.3 ± 12.8
0.1	0	138.9 ± 16.5 NS
0.4	0	154.2 ± 14.2 NS
0.8	0	144.3 ± 14.7 NS
1.2	0	145.6 ± 13.9 NS

(NS: not significant vs. cont.)

5. PGE₂合成に及ぼす影響

Table 4 に示すように10分および30分作用における細胞外カルシウム濃度の上昇はPGE₂の産生に有意な効果は認められなかったが、24時間作用 (Fig. 3) においては0.4-1.2mMの範囲で、PGE₂の産生を有意に増加させた (p<0.001 by ANOVA)。次に細胞外カルシウム濃度上昇にともなうPGE₂産生上昇が、細胞増殖促進に重要な役割を担っているかどうかを調べる目的

で, PGE合成阻害剤であるインドメタシン存在下においてカルシウム濃度を上昇させ, 細胞増殖に及ぼす効果をみたがFig. 4に示すように, 10^{-5} Mのインドメタシン添加により, すべての群で細胞増殖は抑制傾向を示したが, 細胞外カルシウムによる細胞増殖促進効果はblockされなかった。

Table 4 Short-term effect of extracellular calcium on PGE₂ production in HOB-M cells *in vitro*

CaCl ₂ added (mM)	PGE ₂ (pg/ml)	
	10 MIN	30 MIN
0	0	145.3 ± 12.8
0.1	0	138.9 ± 16.5 NS
0.4	0	154.2 ± 14.2 NS
0.8	0	144.3 ± 14.7 NS
1.2	0	145.6 ± 13.9 NS

(NS: not significant vs. cont.)

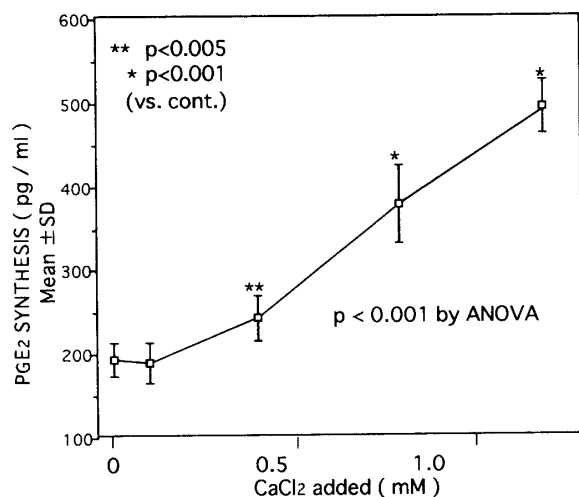


Fig. 3 Effect of long-term (24hr) exposure to CaCl₂ on PGE₂ synthesis into the media in HOB-M cells
Data are shown as mean ± SD

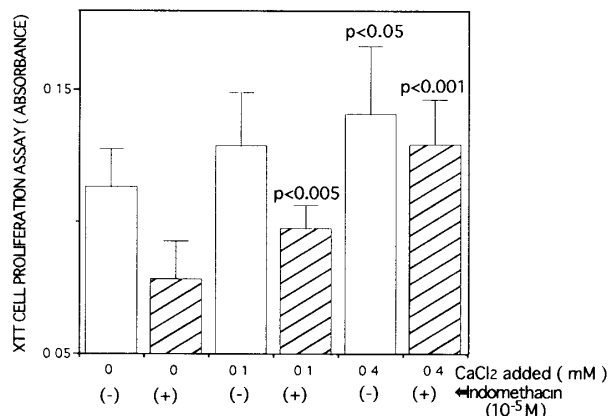


Fig 4 Indomethacin, an inhibitor of PGE₂ synthesis, did not block the calcium-stimulated cell proliferation in HOB-M cells. Indicated concentrations of CaCl₂ were added in the presence or absence of 10^{-5} M of indomethacin. Data are shown as mean ± SD. P value; difference between corresponding control group by Fisher's PLSD.

6. BMP-1-7のmRNAの遺伝子発現に及ぼす影響

HOB-M細胞はbasal conditionにおいて, BMP-1, 2, 4, 5の発現が認められたが, BMP-3, 6, 7についてはその発現が認められなかった (Table 5, 6). 短時間 (0.5時間) の0.1-0.4 mMの細胞外カルシウムの添加は, HOB-M細胞においてBMP-2, 4, 5のmRNAの遺伝子発現を増加させたが, 1.2mMと高濃度においてはBMP-2, 4, 5のmRNAの遺伝子発現を増加させる効果は認められなかった (Fig. 5 および Table 5). 24時間作用においても0.5時間作用と同様に0.1-0.4mMの細胞外カルシウムの上昇は, HOB-M細胞においてBMP-2, 4, 5のmRNAの遺伝子発現を増加させたが, 1.2mMにおいてはBMP-5のみmRNAの発現を増加させたが, BMP-2, 4のmRNAの遺伝子発現を増加させる効果は認められなかった (Fig. 6 および Table 6). また, 0.5および24時間作用の両方においてBMP-2, 4, 5以外のBMPの遺伝子発現に及ぼす効果は認められなかった (Table 5 および 6).

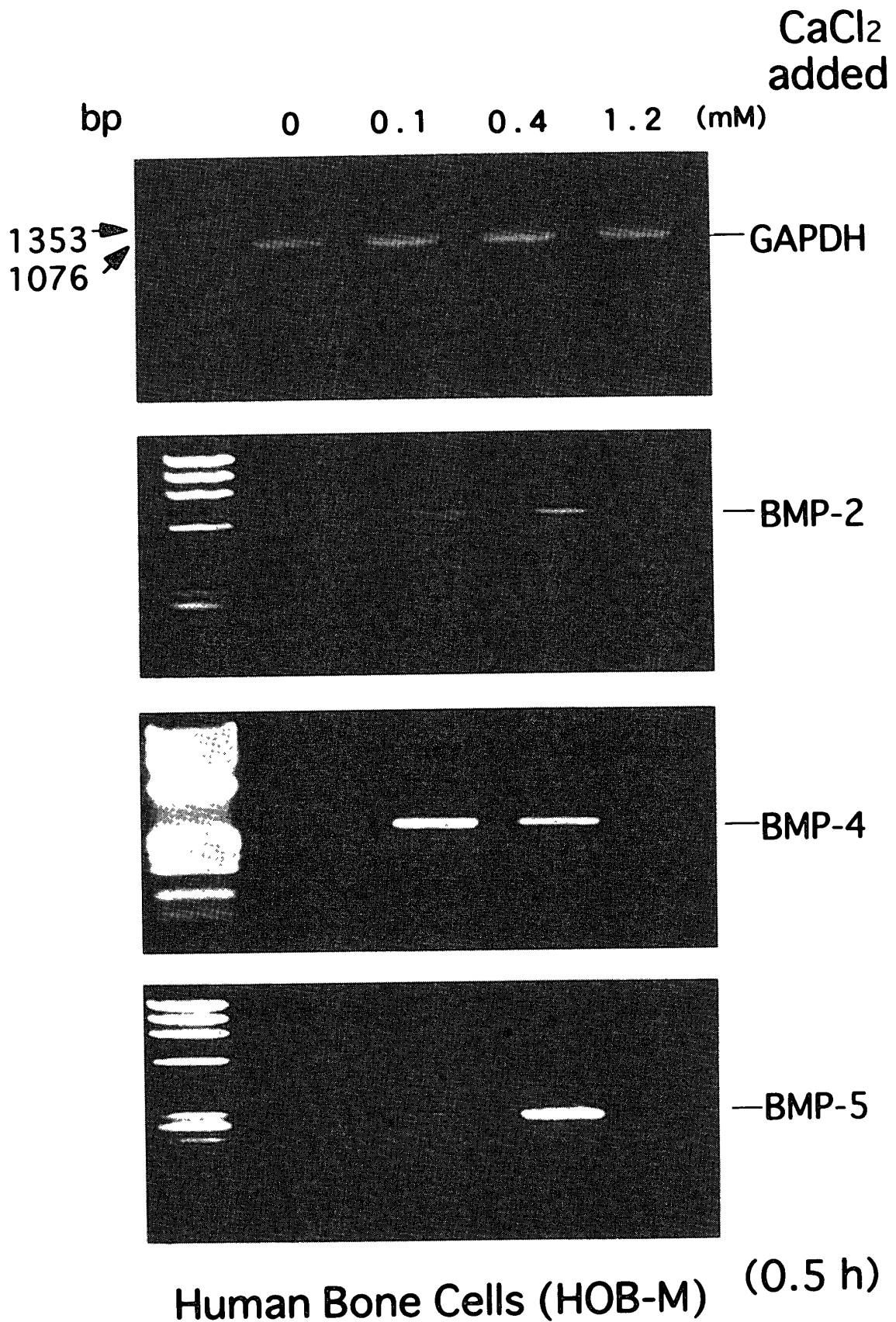


Fig. 5 RT-PCR analyses of the effects of short-term (0.5h) exposure to CaCl₂ on the BMP-2, 4 and 5 mRNA levels. A photo shows a representative agarose electrophoresis; 25 cycle PCR for BMP-2, 4 and GAPDH, 30 cycle PCR for BMP-5.

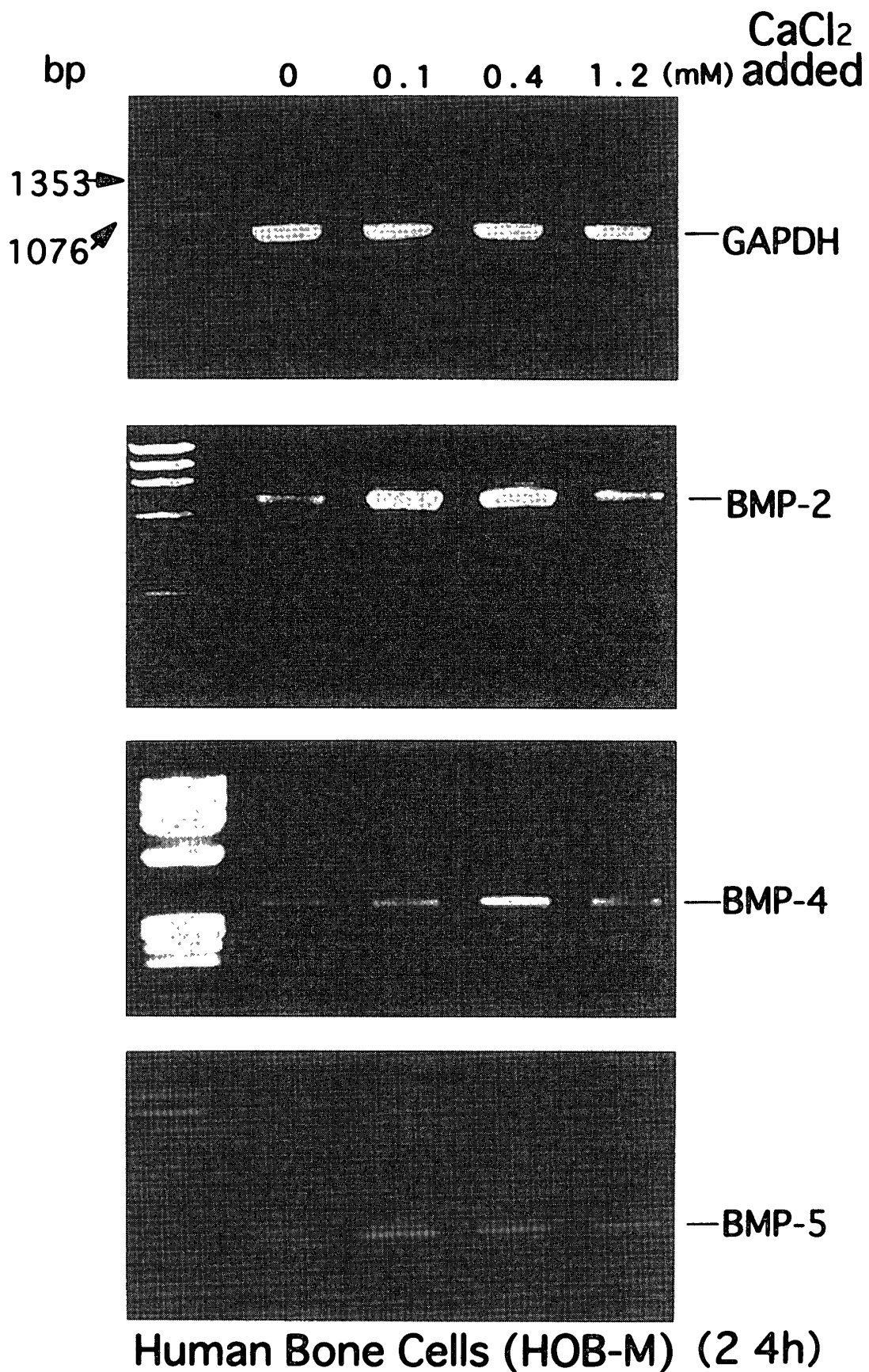


Fig. 6 RT-PCR analyses of the effects of long-term (24h) exposure of CaCl₂ on the BMP-2, 4 and 5 mRNA levels. A photo shows a representative agarose electrophoresis, 25 cycle PCR for GAPDH, 30 cycle PCR for BMP-2, 4 and 5

Table. 5 Summary of effect of 0.5h-treatment of CaCl₂ on gene expression of BMP-1-7 in HOB-M cells

CaCl ₂ added (mM)	0	0.1	0.4	1.2
BMP-1	+	+	+	+
BMP-2	++	+++	+++	++
BMP-3	-	-	-	-
BMP-4	++	+++	+++	++
BMP-5	+	++	+++	+
BMP-6	-	-	-	-
BMP-7	-	-	-	-

+ ; products were detected by 35 cycles of PCR
 ++ ; products were detected by 30 cycles of PCR
 +++ ; products were detected by 25 cycles of PCR

Table. 6 Summary of effect of 24h-treatment of CaCl₂ on gene expression of BMP-1-7 in HOB-M cells

CaCl ₂ added (mM)	0	0.1	0.4	1.2
BMP-1	+	+	+	+
BMP-2	++	+++	+++	++
BMP-3	-	-	-	-
BMP-4	++	++	+++	++
BMP-5	++	++	+++	+++
BMP-6	-	-	-	-
BMP-7	-	-	-	-

+ ; products were detected by 35 cycles of PCR
 ++ ; products were detected by 30 cycles of PCR
 +++ ; products were detected by 25 cycles of PCR

IV. 考 察

1. 細胞増殖に及ぼす影響

細胞外カルシウム濃度の上昇が、骨芽細胞の細胞増殖に及ぼす影響を調べた報告は、本研究他にマウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株であるMC-3T3E1細胞を用いたもの^{6,10)}と種々のヒト骨芽細胞を用いたHondaらの報告⁷⁾があり、いずれの場合においても、細胞外カルシウム濃度上昇による細胞増殖促進効果が認められている。それぞれ用いた培地、BCA濃度および添加CaCl₂の濃度範囲が異なり、それぞれのイオン化カルシウム濃度など種々の条件が異なっている可能性が考えられ、単純な比較は困難だが、MC-3T3E1細胞を用いたものでは、最小有効添加CaCl₂濃度が1.2mM (総CaCl₂濃度: 3.0mM)であるのに対し、ヒト骨芽細胞を用いた本実験やHondaらの報告⁷⁾では0.4mM以下の

CaCl₂添加 (総CaCl₂濃度: 1.9mM以下) においても細胞増殖を刺激する効果が認められ、有効濃度について、種差あるいは細胞差が存在する可能性が考えられる。細胞外カルシウム濃度上昇による細胞増殖促進効果のメカニズムに関しても、細胞あるいは種による違いがいられている。すなわち、MC-3T3E1細胞ではIGF-Iのup-regulationが重要な要素である⁸⁾のに対し、ヒト骨芽細胞においては、IGF-IIのup-regulationが重要である⁷⁾と報告されている。

Sugimotoら⁸⁾はMC-3T3E1細胞を用い、高濃度の24時間作用の細胞外カルシウム濃度上昇によりPGE₂の産生上昇が起こるが、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blockされなかったと報告している。本研究では正常ヒト骨芽細胞(HOB-M細胞)を用いて同様な実験を行い、この現象がマウス骨芽細胞様細胞のみならず正常ヒト骨芽細胞でも起こることを示した。さらに、本実験では10-30分の短時間作用における影響についても調べ、PGE₂の産生上昇は30分以内の短時間では起こらないことを明らかにしたが、24時間作用の細胞外カルシウム濃度上昇による骨芽細胞におけるPGE₂の産生上昇の意義については今回の研究では明らかにできなかった。これは今後の課題と考えられる。

2. ALP活性に及ぼす影響

細胞外カルシウム濃度の上昇が骨芽細胞のALP活性に及ぼす影響をみた報告にはMC-3T3E1細胞を用いたSugimotoら¹⁰⁾報告があるが、1.8mM以下の濃度のCaCl₂添加においては、有意な効果は認められず、3.2mM以上のCaCl₂添加は抑制的に働くとして報告している。本研究では0.1-1.2mMの範囲でCaCl₂を添加し、細胞外カルシウム濃度の上昇が正常ヒト骨芽細胞のALP活性に及ぼす影響をみたが、CaCl₂無添加のコントロール群との有意差は認められず、

Sugimotoら¹⁶⁾とほぼ一致した結果であり, 細胞分化に及ぼす効果はほとんど認められないと考えられたが, さらなる高濃度のカルシウム濃度の上昇が及ぼす影響については, 今後の検討課題と思われる。

3. 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骨芽細胞のtype I collagen合成に及ぼす影響を観察した過去の報告は, 文献を検索した範囲においては, 皆無である。本研究は細胞外カルシウム濃度の上昇が正常ヒト骨芽細胞のtype I collagen合成を有意に増加させることを示し, その結果骨形成を増加させる一要因である可能性を示した最初の研究であると思われる, 興味深い結果と考えられた。しかしながら, 細胞増殖を刺激する最適添加濃度が0.4mMであるのに対し, type I collagen合成やPGE₂合成においては1.2mMとより高濃度であり, このdiscrepancyに関しては, 今回の研究からは明らかにすることは出来なかった。細胞増殖アッセイとtype I collagen合成やPGE₂合成における細胞密度の違いにより, 至適カルシウム濃度に違いが出た可能性あるいは, HOB-M細胞はクローン化されていない細胞のため, いろいろな性格を有した細胞集団からなり, 各々で細胞増殖やtype I collagen合成に対する至適カルシウム濃度の違いがあり, その影響による可能性などが考えられたが, さらに検討が必要と思われる。

4. 化学走性に及ぼす影響

細胞外カルシウム濃度の上昇が骨芽細胞の化学走性に及ぼす影響をみた報告にはMC-3T3E1細胞を用いたSugimotoら¹⁶⁾の報告があるが, 1.2mM以上の濃度のCaCl₂添加は, MC-3T3E1細胞の化学走性を有意に増加させると報告している。本研究では細胞外カルシウム濃度の上昇が0.1-1.2mMの範囲で正常ヒト骨芽細胞,

HOB-M細胞において, 化学走性に対する直接的影響および間接的影響について調べたが, ともに化学走性を刺激する効果は認めらず (Table 3), Sugimotoら¹⁶⁾の報告と一致しない結果が得られた。その要因として, 細胞差あるいは種差などが考えらるが, 正確な理由づけに関してはさらなる検討が必要と思われる。

5. BMP-1-7のmRNAの遺伝子発現に及ぼす影響

種々のBMPは, 未分化間葉系細胞から骨芽細胞への分化を強力に促進する因子であることが知られ¹⁹⁻²²⁾, in vivoにおいては骨に局所投与すると骨形成を促進させる¹⁹⁾ことから, 骨形成促進剤としての臨床応用が期待されている蛋白である。細胞外カルシウム濃度が骨芽細胞に及ぼす影響を調べることは, 歯科臨床で頻用されているリン酸カルシウムセラミックの作用を理解する上で重要であると考えられるが, 細胞外カルシウム濃度の上昇が骨芽細胞のBMPのmRNAの遺伝子発現に及ぼす影響をみた過去の報告はなく, 本研究が最初の報告といえる。Yamasaki²³⁾は犬の皮下に多孔質のハイドロキアパタイトを埋入し, 一ヵ月後に異所性の骨化を認めたと報告している。この報告について, 現在明らかにされている異所性の骨化を誘導する物質はBMPのみであることから, ハイドロキアパタイトから遊離したカルシウムが, 皮下組織中の未分化間葉系細胞に働き, BMPの産生を上昇させ, パラクリンあるいはオートクリンとして周囲の未分化間葉系細胞に働き, 骨芽細胞への分化を促し, 異所性の骨化を引き起こしたのではないかと想定した。本研究では細胞外カルシウム濃度の上昇が間葉系細胞においてBMPの産生を上昇させるとの仮説の下, 細胞外カルシウムの上昇が正常ヒト骨芽細胞のBMPのmRNAの発現に及ぼす影響について調べることにした。その結果, 本研究では短時間およ

び長時間作用の0.1-0.4mMの細胞外カルシウムの上昇は正常ヒト骨芽細胞においてBMP-2, 4, 5のmRNAの発現を増加させることを明らかにした。この結果からハイドロキシアパタイト埋入後あるいは骨吸収窩におけるカルシウム濃度の上昇による骨形成促進にBMP-2, 4, 5の産生上昇が関与している可能性を示唆するものと思われた。またその際の細胞外カルシウム濃度は非常に重要な因子であり、濃度が高すぎる場合はBMP-2, 4, 5の産生上昇が起こらない可能性が示され、ハイドロキシアパタイトを歯科インプラント材料や骨補填剤として応用する場合は、その生体内での溶解性をコントロールすることが、重要であることが示唆された。24時間作用においてBMP-5のみが1.2mMにおいてmRNAの発現を増加させることが認められたが、この結果はBMP-5がBMP-2, 4と異なった様式で遺伝子発現が調節されていることを示唆しているのかもしれない。

また本研究においては細胞外カルシウム濃度の上昇は、骨芽細胞の分化促進因子であるBMPsの遺伝子発現の上昇をもたらしたが、骨芽細胞の分化の指標であるtype I collagenの合成は促進したもののALP活性、オステオカルシン分泌は刺激しなかった。この結果の理由に関しては、今回の研究からは明らかにできな

かったが、われわれは、次の二つの可能性を考えている。1. 細胞外カルシウム濃度の上昇はBMPsの産生上昇をもたらしたが、骨芽細胞の分化を刺激するに十分な濃度に達していなかった可能性。2. 細胞外カルシウム濃度の上昇はBMPsの産生上昇の他に、細胞増殖を刺激する因子(例えばIGFs)を刺激し、結果としてBMPsの分化促進作用が、発揮されなかった可能性である。しかし、これらに関しては今後、さらなる検討を要する。

本研究の結果から、Fig. 7に示すような細胞外カルシウム濃度の上昇がヒト正常骨芽細胞に及ぼす影響に関するmodelを提唱したい。すなわち、ハイドロキシアパタイト埋入後あるいは骨吸収窩におけるカルシウム濃度の上昇により周囲の骨芽細胞において、細胞増殖促進やtype I collagenなどの基質合成促進が起こり、結果として骨形成促進に働く可能性が考えられ、それらの作用にIGF-IIの上昇のみならず、BMP-2, 4, 5の産生上昇、あるいはPGE₂産生上昇などが関与する可能性も考えられるというものである。本研究では細胞外カルシウム濃度の上昇が骨芽細胞のBMPsの蛋白レベルに及ぼす影響については行うことが出来なかったが、in vivoでの検索も含め、今後の課題と思われる。

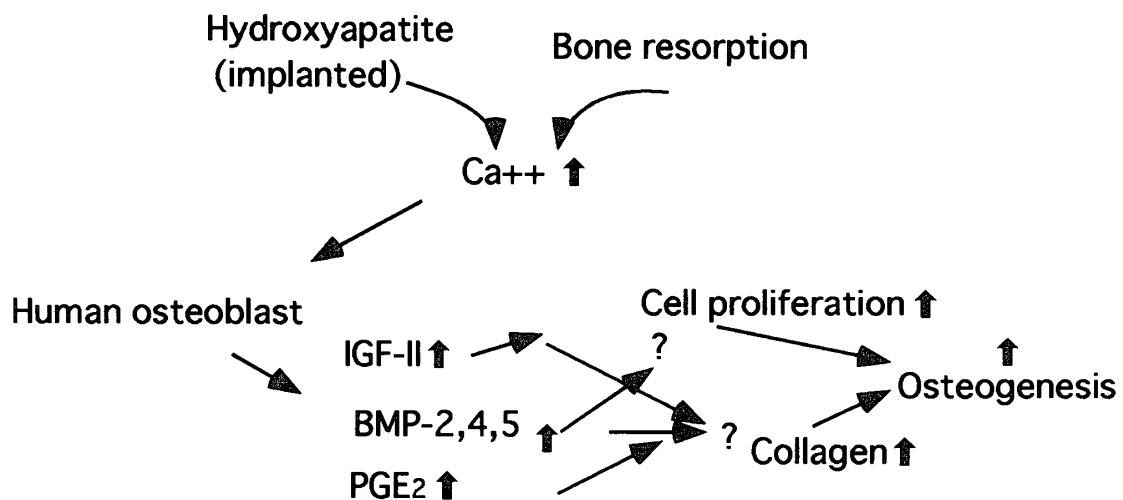


Fig. 7 A proposed model about the osteogenic effect of calcium on human osteoblasts.

V. 結 論

本研究はin vitroにおいて細胞外カルシウムの上昇が正常ヒト下顎骨由来骨芽細胞の動態に及ぼす影響を調べるために行われ、細胞外カルシウムの上昇は、正常ヒト下顎骨由来骨芽細胞の細胞増殖, type I collagen合成, PGE₂の合成およびBMP-2, -4, -5のmRNAレベルを増加させることを示した。

これらの結果から細胞外カルシウムはヒト骨芽細胞様細胞においてPGE₂はもちろんのこと, BMPsやtype I collagenの調節因子の一つであることが示唆された。

VI. 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始懇切なご指導を賜りました北海道医療大学歯学部口腔解剖学第二講座、武田正子教授ならびに同口腔生化学講座、市田篤郎元教授に心より感謝申し上げます。本研究の要旨は、第19回米国骨代謝学会 (Cincinnati, OH, U. S. A., 1997, abstract# F346)にて報告された。

VII. 文 献

- Jarcho MJ Biomaterial aspects of calcium phosphates, *Dent Clin Nor Am*, **30** : 25-47, 1986.
- Callan DP, and Rohrer MD Use of bovine-derived hydroxyapatite in the treatment of edentulous ridge defects: a human clinical and histologic case report, *J Periodontol*, **64** : 575-582, 1993.
- Moreno EC, Gregory TM, and Brown WE: Preparation and solubility of hydroxyapatite, *J Res National Bureau Standards-A physics Chemistry*, **72** : 773-782, 1968.
- Cheung and Tofe AJ: Mechanism of cell growth on calcium phosphate particles: role of cell-mediated dissolution of calcium phosphate matrix., *S T P. Pharma Sciences*, **3** : 51-55, 1993.
- Silver IA, Murrills RJ, and Etherington DJ: Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res* **175** : 266-276, 1988.
- Kanatani M, Sugimoto T, Fukase M, et al : Effect of elevated calcium on the proliferation of osteoblastic MC3T3-E1 cells: its direct and indirect effects via monocytes, *Biochem Biophys Res Commun*, **181** : 1425-1430, 1991.
- Honda Y, Fitzsimmons R, Baylink DJ, et al. : Effects of extracellular calcium on insulin-like growth factor II in human bone cells., *J Bone Miner Res*, **10** : 1660-1665, 1995.
- Sugimoto T, Kanatani M, Kano J, et al : IGF-I mediates the stimulatory effect of high calcium concentration on osteoblastic cell proliferation., *Am J Physiol*, **266** : E709-716, 1994.
- Wergedal JE, and Baylink DJ Characterization of cells isolated and cultured from human bone, *Proc Soc Exp Biol Med*, **176** : 60-69, 1984.
- Nakade O, Baylink DJ, and Lau K-HW: Phenytoin at micromolar concentrations is an osteogenic agent for human mandible-derived bone cells in vitro, *J Dent Res*, **74** : 331-337, 1995.
- Roem NW, Rodgers GH, Hatfield SM, et al : An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT., *J Immunol Methods*, **142** : 257-265, 1991.
- Farley JR and Jorch UM: Differential effects of phospholipids on skeletal alkaline phosphatase activity in extracts, in situ, and circulation, *Arch Biochem Acta*, **840** : 56-68, 1983.
- Wiechelman K, Braun R and Fitzpatrick J: Investigation of bicinchonin acid protein assay, identification of the groups responsible for color formation, *Anal Biochem*, **175** : 231-237, 1988.
- Suzuki R, Kobayashi M, Takiguchi T, et al : Bone morphogenetic protein-2 enhances the expression of the osteoblast phenotypes in human periodontal ligament fibroblasts and osteoblasts (abstract). *J Bone Miner Res* **10** (suppl 1) : T216, 1995.
- Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, et al. : Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors *in vitro.*, *J Per-*

- iodontol, **63** : 515-525, 1992.
16. Sugimoto T, Kanatani M, Kano J, et al.: Effects of high calcium concentration on the functions and interactions of osteoblastic cells and monocytes and on the formation of osteoclast-like cells., *J Bone Miner Res*, **8** : 1445-1452, 1993.
17. Ogose A, Motoyama T, Hotta T, et al.: Expression of bone morphogenetic proteins in human osteogenic and epithelial tumor cells., *Pathol Int*, **46** : 9-14, 1996.
18. Chomczynski P, and Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction., *Anal Biochem*, **162** : 156-159, 1987.
19. Wozney JM, Rosen V Celeste AJ, et al : Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities., *Science*, **242** : 1528-1533, 1988.
20. Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, et al.: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro., *J Cell Biol*, **113** : 681-687, 1991.
21. Rickard DJ, Sullivan TA, Shenker BJ, et al.: Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2., *Dev Biol*, **161** : 218-228, 1994.
22. Hiraki Y, Inoue H, Shigeno C, et al.: Bone morphogenetic proteins (BMP-2 and BMP-3) promote growth and expression of the differentiated phenotype of rabbit chondrocytes and osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro., *J Bone Miner Res*, **6** : 1373-1385, 1991.
23. Yamasaki H: Heterotopic bone formation around porous hydroxyapatite ceramics in the subcutis of dogs., *Jpn J Oral Biol*, **32** : 190-192, 1990.