

〔原 著〕

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—

木村 和代, 廣瀬由紀人, 八島 明弘, 安彦 善裕\*, 賀来 亨\*

北海道医療大学歯学部歯科補綴学第二講座  
\*北海道医療大学歯学部口腔病理学講座

(主任: 越智 守生教授)  
\*(主任: 賀来 亨教授)

Effects of pulsing electromagnetic fields in osteoblasts and  
osteoblastic progenitor cells  
—Expression of extracellular protein mRNA in serum-free cultures—

Kazuyo KIMURA, Yukito HIROSE, Akihiro YAJIMA,  
Yoshihiro ABIKO\* and Tohru KAKU\*

Departments of Fixed Prosthodontics and \*Oral Pathology,  
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

(Chief : Prof. Morio OCHI)  
\*(Chief : Prof. Tohru KAKU)

**Abstract**

Pulsing electromagnetic fields (PEMF) are known to be effective in stimulation of nonunion fractures, however the mechanism of osteogenic action of PEMF has not been fully established. This study investigated the effects of PEMF on the gene expression in human osteoblastic and the human mesenchymal stem cells (hMSC). The cells were exposed to the PEMF in serum-free medium and the mRNA level of the expression of extracellular matrix associated proteins were examined by quantitative RT-PCR assay using a LightCycler. For the spreading osteoblastic cells on a type I collagen surface with PEMF stimulation, there was an approximately 2 fold increase compared with the expression in the control group for BMP-2 mRNA expression. The addition of 10 ng/ml of TGF beta-1 enhanced the BMP-2 mRNA expression

日本補綴歯科学会 平成14年10月14日  
受付: 平成15年3月31日

in the hMSC. However, PEMF exposure inhibited BMP-2 mRNA expression in hMSC under this condition.

The results indicate that the mechanism of osteogenic action of PEMF may be different in different cell types or in the degree of differentiating potency. Consequently, it is implied that PEMF has the ability to regulate BMP-2 mRNA expression directly in osteogenic cells.

**Key words :** Pulsing electromagnetic fields, Osteoblasts, Mesencymal stem cells, Serum-free, BMP-2.

## I. 緒 言

パルス電磁場刺激は、骨、軟部組織修復の促進をめざした電気刺激法の一つである<sup>1)</sup>。局所に直接電極を埋入する他の方法と違い、組織に侵襲を与えないことから幅広い臨床応用が期待されている<sup>2)</sup>。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、その効果については有効であるとの報告が多い<sup>3,4)</sup>。最近ではこれに加えインプラント治療後のより速やかな osseointegration の獲得をめざして、パルス電磁場を用いて動物実験での有用性も明らかになってきている<sup>5)</sup>。一方では、パルス電磁場単独では明らかな骨形成促進効果がみられないとするものもあり<sup>2)</sup>、効果は刺激時の患部の環境に左右されやすいとも考えられている<sup>1)</sup>。

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では、細胞や実験条件によって大きな違いが認められている<sup>6-8)</sup>。刺激により細胞増殖を促進するとの報告<sup>6)</sup>がある一方では、抑制するとの報告<sup>7)</sup>もある。さらに、アルカリホスファターゼ活性を促進するとの報告<sup>7)</sup>や促進しないとの報告<sup>8)</sup>などがある。最近では、bone morphogenetic protein (BMP)-2 と -4 mRNA の発現促進を示唆する報告<sup>9)</sup>もなされている。しかしながら、これら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。

骨組織の再生には、局所への前駆的細胞の動員とその骨芽細胞の分化が必須である。骨芽細胞の分化には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複雑に働きかけている<sup>10)</sup>。それらの成長因子の代表的なものの一つに transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) がある。TGF- $\beta$  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参与していると言われている<sup>10-14)</sup>。さらに、この TGF- $\beta$  ファミリーに属する BMP は、骨形成により特異的に関わっているものと考えられており骨芽細胞の分化マーカーの一つにもなっている<sup>15,16)</sup>。また、骨組織の基質蛋白の主たるものは type I collagen であるが、その他に骨芽細胞の分化過程で osteopontin (OPN), osteonectin (ON), osteocalcin (OCN) などの比較的、骨に特有な基質蛋白の発現のみられることが知られている<sup>10)</sup>。

本研究では、1) パルス電磁場の無血清培養条件下での骨芽細胞への直接的影響、2) パルス電磁場の骨芽細胞前駆細胞への影響および TGF- $\beta$  存在下での影響、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解明することを目的とした。

1) では一定の条件下で分化促進や石灰化能を有することの解っているヒト正常骨由来骨芽細胞様株SV-HFO<sup>17,18)</sup>を用いて、無血清培養条件下にBMP-2, OPN, ON, OCN, type I collagenのmRNAの発現変化を観察した。この際、無血清条件下ではSV-HFOが通常の培養皿に接着できないため、poly-L-lysine, およびtype I collagenでコートした培養皿を用いて、両者の比較検討も行った。2) では、一定の条件下で骨芽細胞へ分化することが解っている骨芽細胞前駆細胞であるヒト間葉性幹細胞hMSC<sup>19)</sup>を用いて、1)と同様のmRNAの発現変化について観察した。

## II. 材料と方法

### 1. 培養細胞

1) ヒト正常骨由来骨芽細胞様株 (Simian virus-human fetal osteoblastic cells ; SV-HFO)  
本細胞は、26週胎児頭頂骨から得られたosteoblastic cellをSimian virus(SV)40により不死化させ樹立、株化したものである<sup>20)</sup>。これまでに、 $1\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>により分化誘導<sup>17)</sup>と $10^{-6}$ M dexamethasone存在下で石灰化能が報告<sup>18)</sup>されている。本実験では、使用に先立ち石灰化能を確認した結果、 $10^{-6}$ M dexamethasone, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate存在下で、5週間培養後、von Kossa染色の反応が陽性を示した。細胞の培養は、10% fetal bovine serum (FBS ; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 含有alpha-minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM ; Invitrogen) に抗生剤として硫酸カナマイシン(明治製菓, 東京, 日本)60mg/mlを添加したものをを用い、37°C 5% CO<sub>2</sub>条件下で行った。実験時には、10% FBSを含まない無血清培地としたが、0.01% bovine serum albumin (Sigma, St. Louis, MO, USA) を添加し、 $\alpha$ -MEMには骨芽細胞のtype I collagen合成を促進するL-ascorbic acidが含まれている

ため<sup>21)</sup>, L-ascorbic acid 不含の Dulbecco's modified eagle medium (D-MEM ; Invitrogen)を用いた。パルス電磁場刺激の際には、細胞は無血清条件下に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 $10^6$ 個を播種した。

2) ヒト間葉性幹細胞 (human mesenchymal stem cell ; hMSC)

骨芽細胞前駆細胞として、正常ヒト骨髄より採取されたヒト間葉性幹細胞 (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) を用いた。本細胞は、フローサイトメトリーにより表面抗原であるCD105, CD166, CD29, CD44が陽性で、CD14, CD34, CD45が陰性であり、さらに脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞への分化能のあることが保証されているものである。細胞は、専用培地キット (Mesenchymal stem cell basal medium ; BioWhittaker) を用い、37°C 5% CO<sub>2</sub>条件下で培養し実験用とした。パルス電磁場刺激の際には、無血清培養条件下にpoly-L-lysineとtype I collagenをコートした60mm培養皿上に $10^6$ 個を播種した。

### 2. パルス電磁場発生装置

パルス電磁場は、Dateら<sup>22)</sup>により開発された理研式パルス電磁場発生装置 (理化学研究所, 埼玉, 日本) を用いた。刺激条件は、パルス電磁場刺激で骨原性細胞株MC3T3-E1の細胞増殖と分化を促進<sup>6)</sup>させた磁場強度0.3mT, パルス細胞播種 ( $10^6$ 個/dish)

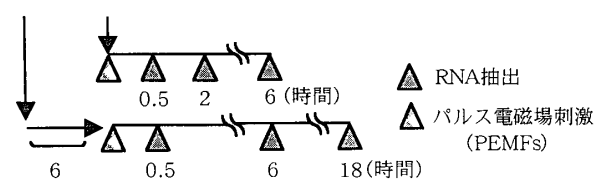


図1 タイムスケジュール

細胞播種直後から0.5, 2, 6時間パルス電磁場刺激を行った。また細胞播種6時間放置後0.5, 6, 18時間パルス電磁場刺激を行った。

表1 プライマー配列

Primer		sequence(5'to3'orientation)	Products size(bp)
GAPDH	(3')	CCAGTGGACTCCACGACGTAC	278
	(5')	AGTCAACGGATTTGGTCGTAT	
type I collagen	(3')	GCGAGAGCATGACCGATGGAT	272
	(5')	GACTCGTGCAGCCATCGACAG	
BMP-2	(3')	ACAAACAGCGGAAACGCCTTA	189
	(5')	ATTTAATTTTGCTGTA CTAGCGA	
OPN	(3')	GGACTCCATTGACTCGAACGA	239
	(5')	TGGATGTCAGGTCTGCGAAC	
ON	(3')	GGACTCTGAGCTGACCGAATT	279
	(5')	GTGGGAGAGGTACCCGTC AAT	
OCN	(3')	AAGCAGGAGGGCAGCGAGGTA	200
	(5')	CAGAGCGACACCCTAGACCGG	
TGF- $\beta$	(3')	TAGCCATTTCTCACCACGCGC	205
	(5')	TCCGGAACGTCTCATTGTCGA	

ス幅25 $\mu$ sec, 周波数100Hzとした。パルス電磁場は, 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(図1)。

### 3. 細胞伸展率

Poly-L-lysineとtype I collagen上の細胞の接着伸展率の違いを確認するため, Kaplanら<sup>23)</sup>の方法に準じた細胞伸展率を計測した。すなわち, poly-L-lysineとtype I collagenをコートした60mm培養皿のそれぞれに $2 \times 10^5$ 個/dishずつ細胞を播種し, 細胞播種後0.5, 2, 6, 24時間後の細胞伸展率を求めた。伸展率は, 位相差顕微鏡下においてランダムに選択した5視野で, 暗色細胞を伸展開始細胞, 明色細胞を非伸展細胞として, 計測全細胞数(500個以上)に対する暗色細胞の割合を求めた。

### 4. パルス電磁場刺激のSV-HFO mRNA発現への影響

遺伝子発現の変化は定量的reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法および半定量的RT-PCR法により行った。

#### 1) 定量的RT-PCR法

パルス電磁場刺激後, TRIzol Reagent (Invitrogen) を用いtotal RNAを抽出し, RNA量をSpectrophotometer BioSpec-1600 (SHIMAZU, Kyoto, Japan) にて測定の後, Oligo(dT)<sub>12-18</sub>Primer (Invitrogen) を用いて逆転写によりcDNAを作製した。その後, 骨形成過程あるいは骨芽細胞の分化過程で発現が変化するBMP-2, OPN, ON, OCN, type I collagenに対する特異的プライマーを用い, 定量的PCR法を行った(表1)。定量的PCRは2本鎖DNA特異的色素であるDNA Master SYBR Green I (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) を用い, LightCycler (Roche Molecular Biochemicals) にて行った。すなわち, 任意に選択した実験サンプルのcDNAをコントロールとして, 2.5, 2.0, 1.0, 0.5 $\mu$ lを定量時に同時に増幅することで, 検量線を作製した。発現量はいずれもpoly-L-lysine上でパルス電磁場無刺激群(PC), 刺激群(PP), type I collagen上で無刺激群(IC), 刺激群(IP)を定量的に比較検討した。この際, PCでの発現, 蛍光強度を基準値1として比較した。増幅産物はmelting curve解析によるシングルピークの確認を行い, さらに最終的な産物を0.003% ethidium bromideを含有した2%アガロースゲル

(BioWhittaker)で電気泳動し、シングルバンドの確認を行った。また、内部標準として glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) をプライマーに用いてPCR法を行った。標的プライマーで得られた値は、全て GAPDHの値で割り、逆転写時の誤差を解消した。

## 2) 半定量的RT-PCR法

半定量的PCR法では、定量的RT-PCR法と同様に作製されたcDNAを用い、AmpliTaq Gold (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA) のプロトコールに準じて、PCRサーマルサイクラー (Takara, Shiga, Japan) にて増幅を行った。PCRプライマーは、4.1.の結果にて有意な差を認めたBMP-2を用い39サイクル (94°C 30sec, 65°C 30sec, 72°C 30sec) 行い、PCR産物を2%アガロースゲル (BioWhittaker)で電気泳動後トランスイルミネーター (コスモバイオ, 東京, 日本) で観察した。

## 5. パルス電磁場刺激のTGF- $\beta$ 存在下でのhMSC mRNA発現への影響

SV-HFOとの特性の違いを比較するため、パルス電磁場無刺激時のBMP-2, OPN, ON, OCN, type I collagenのmRNAの発現をLight-Cyclerにて比較検討した。また、TGF- $\beta$ 添加に先立ち細胞自身が発現しているTGF- $\beta$  mRNAについても確認した。hMSCを上記のSV-HFOと同様に播種し、専用培地キットにて培養した。細胞播種6時間放置後、TGF- $\beta$  (BioSource 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 mRNA発現に与える影響を検討した。

## 6. 統計処理

統計処理はFisherのPLSDを用いて行った。

その時の有意差判定は危険率5%のレベル ( $p < 0.05$ ) で行った。

## III. 結 果

### 1. SV-HFOのpoly-L-lysineとtype I collagen培養皿上での細胞伸展率の違い

骨芽細胞としてSV-HFOを用いた。SV-HFOは無血清培養条件下で付着しないため、poly-L-lysine コートの培養皿とtype I collagenコートの培養皿を用いた。パルス電磁場刺激に先立ち、両者の接着伸展状態について比較検討したが、接着状態は両者とも良好であったため、伸展状態について定量的に評価した (図2)。細胞播種0.5時間後ではいずれの培養皿上の細胞も類円形を示し、伸展している細胞は認められなかった (図3)。細胞播種2時間後では、poly-L-lysine上の細胞には未だ伸展しているものがほとんどみられなかったのに対し、type I collagen上では細胞突起の伸長が始まっているものがところどころで認められた (図3)。細胞播種6時間後ではtype I collagen上においては、大半の細胞が伸展したのに対し、poly-L-lysine上で、伸展していたものは半分程度であった (図3)。細胞播種24時間の時点ではpoly-L-lysine上においてもtype I collagen上と同様のほぼ細胞伸展率80%に達した (図3)。

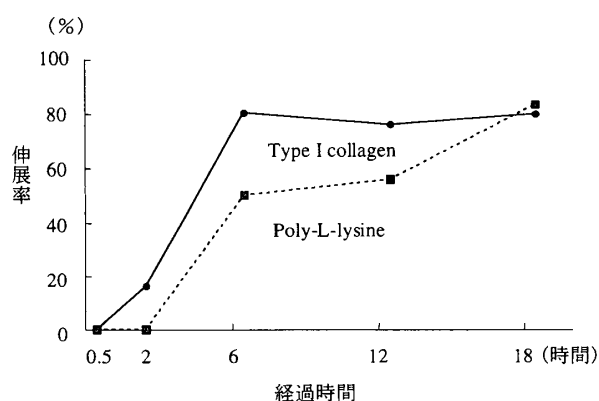


図2 細胞伸展率

細胞播種6時間後には、type I collagen上で、80%の細胞伸展率を示した。

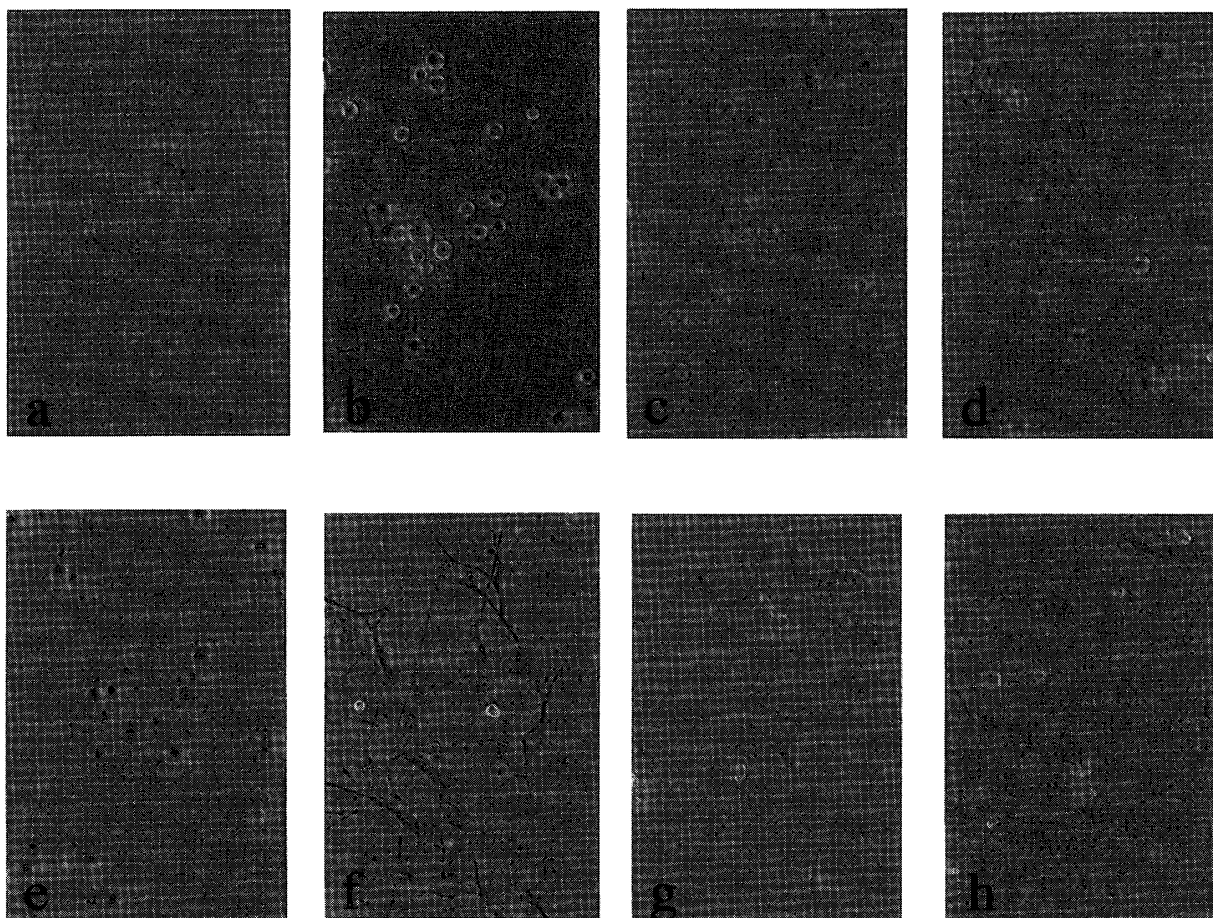


図3 SV-HFOのパルス電磁場無刺激下における位相差顕微鏡像

細胞播種0.5時間後(400倍率)において, poly-L-lysine培養皿上(a)とtype I collagen培養皿上(b), いずれの細胞も類円形を示し, 伸展している細胞は認められなかった. 細胞播種2時間後(400倍率)において, poly-L-lysine上(c)の細胞には未だ伸展しているものがほとんどみられなかったのに対し, type I collagen上(d)では細胞突起の伸長が始まっているものがところどころで認められた. 細胞播種6時間後(400倍率)において, type I collagen上(f)においては, 大半の細胞が伸展したのに対し, poly-L-lysine上(e)で, 伸展していたものは半分程度であった. 細胞播種24時間後(400倍率)において, poly-L-lysine上(g)においてもtype I collagen上(h)と同様のほぼ80%に達した.

## 2. パルス電磁場刺激のSV-HFO mRNA発現への影響

### 1) 細胞伸展過程でのパルス電磁場刺激による遺伝子発現変化

細胞伸展過程でのパルス電磁場刺激のSV-HFOへの影響を検索するために, type I collagen, poly-L-lysine培養皿で培養した細胞を細胞播種直後から0.5, 2, 6時間にパルス電磁場刺激を与え, 骨形成過程あるいは骨芽細胞の分化過程で発現の変化するBMP-2, OPN, ON, OCN, type I collagenのmRNA発現をLightCyclerを用い定量的に評価した. いずれのmRNA

もpoly-L-lysine上でパルス電磁場無刺激群(PC), 刺激群(PP), type I collagen上で無刺激群(IC), 刺激群(IP)での発現を比較検討した. いずれのmRNAも, poly-L-lysine上, 又はtype I collagen上においてもパルス電磁場刺激による発現の明らかな変化は認められなかった.

### 2) 細胞伸展後のパルス電磁場刺激による遺伝子発現変化

また細胞伸展後におけるパルス電磁場刺激の影響を検索するために細胞播種6時間経過後にパルス電磁場で0.5, 6, 18時刺激した. その後

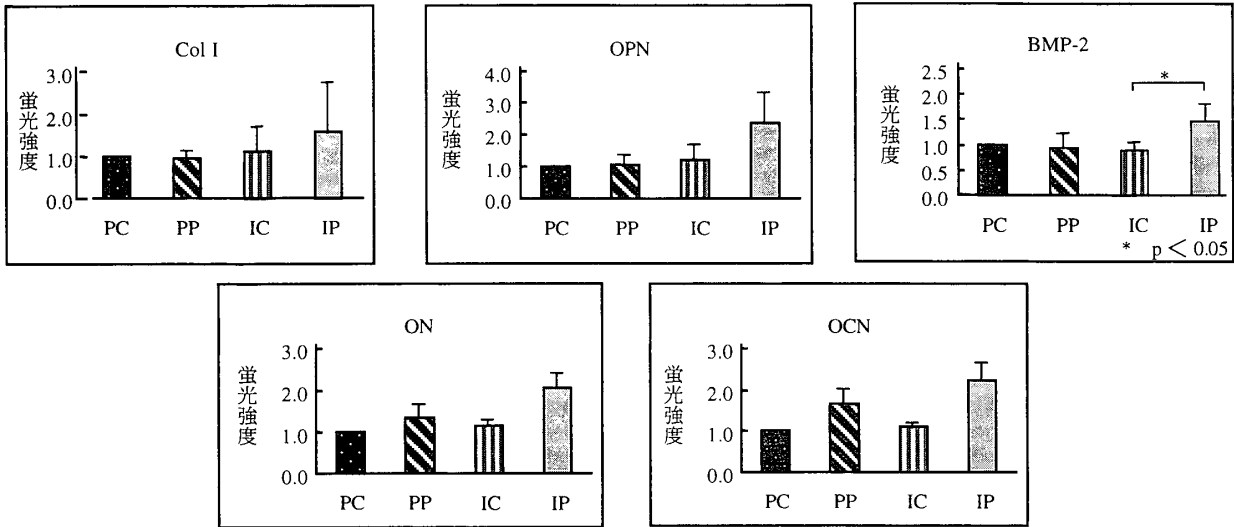


図4 細胞播種後6時間パルス電磁場刺激6時間後 N = 6

PC: poly-L-lysine上 パルス電磁場無刺激群 IC: type I collagen上 パルス電磁場無刺激群

PP: poly-L-lysine上 パルス電磁場刺激群 IP: type I collagen上 パルス電磁場刺激群

Type I collagen上で6時間パルス電磁場刺激を与えたものでBMP-2 mRNAの発現の明らかな上昇が認められた。Type I collagen, OPN, ON, OCN mRNA発現におけるパルス電磁場刺激による影響は認められなかった。

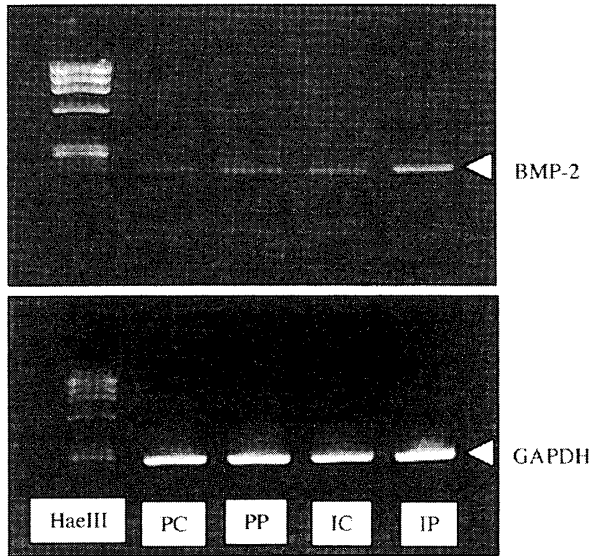


図5 半定量的RT-PCR法による細胞伸展後6時間パルス電磁場刺激下のSV-HFO BMP-2 mRNA発現

検索したBMP-2 mRNA発現において、パルス電磁場刺激群が無刺激群に比べ濃いバンドとして認められ、定量的RT-PCRの結果と一致していた。

mRNAの発現を2.1)と同様の方法で定量した。その結果、type I collagen上で6時間パルス電磁場刺激を与えたものでBMP-2 mRNAの発現の明らかな上昇が認められた(図4)。OPN, ON, OCN, type I collagen mRNA発現におけ

るパルス電磁場刺激による影響は認められなかった。発現の上昇がみられたBMP-2について半定量的RT-PCR法により検索すると、パルス電磁場刺激群が無刺激群に比べ濃いバンドとして認められ、定量的RT-PCRの結果と一致していた(図5)。

### 3. パルス電磁場刺激のhMSC mRNA発現への影響

パルス電磁場刺激の骨創傷部での影響を想定し、骨芽細胞前駆細胞への影響を観察した。この際、創傷部では様々な成長因子が放出されるが、その中で最も多いものの一つであるTGF-βに着目し、TGF-β存在下での影響について検索した。骨芽細胞前駆細胞としてヒト間葉性幹細胞hMSCを用いた。hMSCとSV-HFOの特性の違いを明らかにするため、BMP-2, OPN, ON, OCN, type I collagenおよびTGF-βそれぞれのmRNAの発現程度を比較検討した。今回検索したすべてのmRNA発現はhMSCで観察され、SV-HFOと比較するとTGF-β以外に検討したmRNA発現量ではいずれもhMSCが増加して

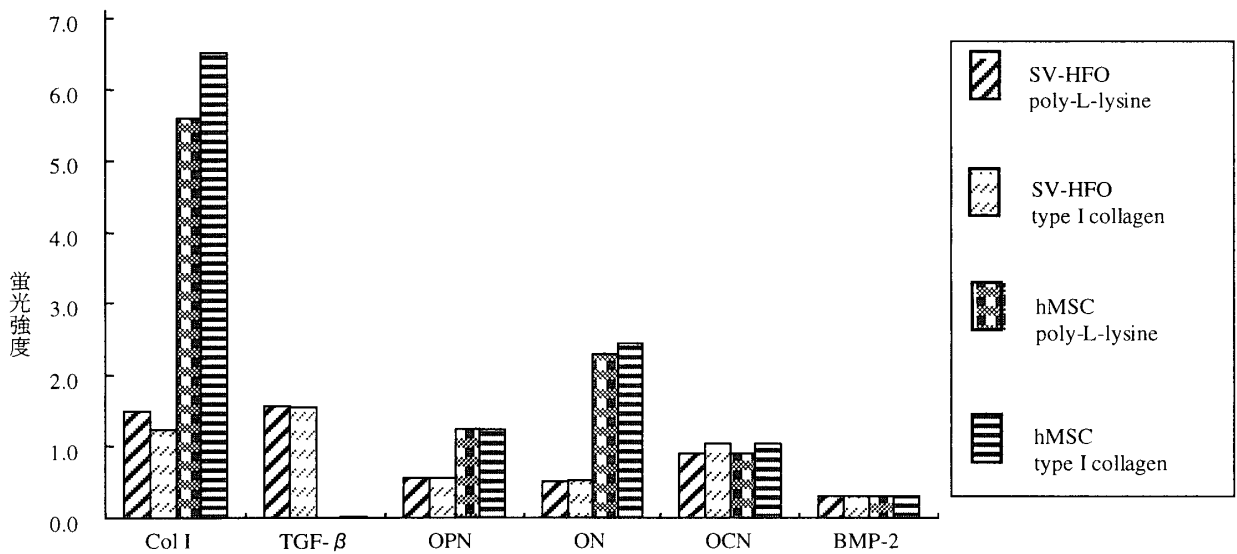


図6 SV-HFOとhMSCの定常状態時mRNA発現  
hMSCにおけるTGF-β mRNA発現は極めて微量の測定限界であった。

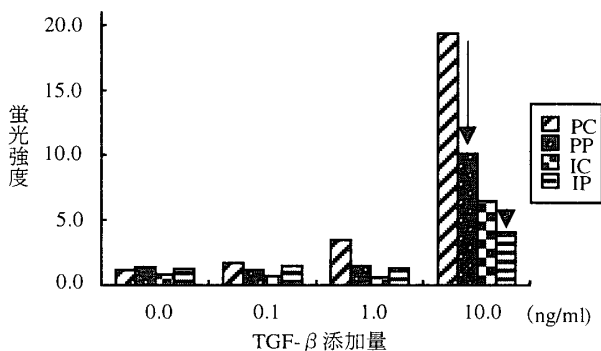


図7 TGF-β存在下のhMSC BMP-2 mRNA発現  
パルス電磁場無刺激群では、poly-L-lysine上、type I collagen培養皿上いずれにおいてもTGF-β0.1, 1 ng/ml添加で、BMP-2 mRNAに変化は認められなかったものの、10ng/ml添加では無添加時と比較して、発現量はpoly-L-lysine上で16倍、type I collagen上で約8倍になっていた。この条件で、パルス電磁場刺激を行うと前者は約9倍、後者は5倍となっており、いずれにおいても、パルス電磁場刺激によりBMP-2 mRNA発現上昇の抑制効果(↓)が認められた。

いた。しかし、hMSCのTGF-β mRNA発現量は極めて微量の測定限界であった(図6)。

TGF-β存在下でのパルス電磁場の影響は、BMP-2 mRNAの発現変化で観察した。パルス電磁場無刺激群では、poly-L-lysine上、type I collagen培養皿上いずれにおいてもTGF-β0.1, 1 ng/ml添加で、BMP-2 mRNAに変化は認められなかった。しかし、10ng/ml添加では無添加時と比較して、発現量はpoly-L-lysine上

で16倍、type I collagen上で約8倍になっていた。この条件で、パルス電磁場刺激を行うと前者は約9倍、後者は5倍となり、いずれにおいても、パルス電磁場刺激によりBMP-2 mRNA発現上昇の抑制効果が明らかであった(図7)。

#### IV. 考 察

##### 1. 細胞伸展について

骨芽細胞株SV-HFOは無血清状態において、type I collagen上でpoly-L-lysine上より早期に伸展を開始していた。Type I collagenは骨の有機質の中でもっとも多い蛋白であり、骨芽細胞からも多量に分泌されている。骨芽細胞の表面にはtype I collagenの受容体となる $\alpha_2\beta_1$ インテグリンが存在しており、type I collagenの情報を受け取って細胞内シグナルを活性化するとされている<sup>24)</sup>。本研究の結果から、type I collagenがSV-HFOの細胞伸展を促進することは明らかである。poly-L-lysineでの細胞の伸展はSV-HFOから分泌されたtype I collagenがオートクリン的に関与しているものと考えられた。

##### 2. パルス電磁場刺激のSV-HFO mRNA発現



### への影響について

本研究では、細胞伸展過程でのパルス電磁場の影響、伸展後のパルス電磁場の影響について検討した。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が、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、細胞が伸展したもののみに認められると考えられた。

電気あるいは電磁場刺激による細胞の影響についてはこれまでいくつかの報告がある。電気刺激により、軟骨細胞や造血系細胞のDNA合成促進作用<sup>25,26)</sup>があること、電磁場刺激では骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1) のTGF- $\beta$ 産生能が上昇し、細胞内カルシウムイオンの上昇<sup>27)</sup>や、type I collagen産生の促進<sup>28)</sup>、insulin-like growth factor-I (IGF-I) の上昇<sup>29)</sup>、細胞増殖能の促進<sup>6)</sup>、アルカリホスファターゼ値を上昇させることなどが報告されている<sup>7)</sup>。さらに、最近になり、chicken embryonic calvariaからの骨芽細胞にパルス電磁場刺激を付与するとBMP-2, -4mRNAの発現の上昇することが報告されている<sup>9)</sup>。これらの報告はいずれも、細胞の増殖や分化に直接的に影響を及ぼす血清含有条件下での研究であり、本研究のように無血清条件下での報告はみられない。さらに、骨芽細胞のtype I collagen合成を促進すると言われていたL-ascorbic acidを含まない培養液を選択し、パルス電磁場の細胞へのより直接的な影響について検討した。本研究では、他の報告で発現上昇がみられたtype I collagen, TGF- $\beta$ mRNAの上昇は認められず、type I collagen培養皿で培養した細胞のBMP-2 mRNAの発現上昇のみであった。このことから、無血清条件下でもBodamyaliらの報告<sup>9)</sup>と同様に、パルス電磁場刺激によりBMP-2 mRNAの発現が上昇するが、その際にはtype I collagenの存在が必須であることが示唆された。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BMP-2 mRNAの発現上昇がみられなかったことから、ある程度のtype I collagen量が必要であるものと考えられた。BMPは、その名の通りに骨形成誘導因子として発見され、これまでに約30種類のBMPファミリー蛋白が報告されており、BMP-2は、その中でもBMP-4, -7, GDF-5とならび骨形成誘導により積極的に関わっているものと考えられている<sup>30)</sup>。パルス電磁場刺激により、無血清条件下でBMP-2 mRNAの発現上昇が認められたことより、パルス電磁場刺激の骨形成促進機序にBMP-2の発現上昇の関与していることが示唆された。

### 3. TGF- $\beta$ のhMSCへの作用について

骨折の治療時には、出血に伴って様々な成長因子が骨芽細胞前駆細胞に作用して骨芽細胞への分化がみられる<sup>13)</sup>。このことから、本研究では、骨芽細胞前駆細胞としてhMSCを用いて、創傷部位において放出される成長因子の中で最も多いものの一つであるTGF- $\beta$ 存在下でmRNA発現変化について検索した。

TGF- $\beta$ は血球や線維芽細胞など間葉系の細胞から広く分泌されており、それらの細胞に対してパラクリン、またはオートクリン的に作用していることが知られている<sup>31)</sup>。骨再生時は、骨芽細胞前駆細胞の活性化、骨芽細胞への分化、および新生血管の成長などに関与しているといわれている<sup>13,14)</sup>。今回用いたhMSCは、SV-HFOに比べてTGF- $\beta$  mRNAの発現が極めて弱かったため、骨芽細胞への分化に関わるとされる<sup>11)</sup>TGF- $\beta$ の分泌には、パラクリン的な作用が関与しているものと思われた。

実際にTGF- $\beta$ 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10ng/mlのTGF- $\beta$ 添加によりBMP-2 mRNA発現の上昇が認め

られた。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, 骨芽細胞でパルス電磁場刺激によるBMP-2 mRNAの上昇に必須であったtype I collagenの存在が, hMSCで抑制的に働いたものと考えられる。TGF- $\beta$ のもう一つの主たる作用に, 細胞外基質蛋白の合成促進<sup>11)</sup>と, その分解に働く基質分解酵素の合成および活性阻害<sup>32)</sup>により, 細胞外基質蛋白の蓄積を促進するものがある<sup>12)</sup>。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。

#### 4. パルス電磁場刺激のhMSC mRNA発現への影響について

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の発現上昇は認められなかった。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状態によって異なっていると考えられる。また, TGF- $\beta$ によるhMSCのBMP-2 mRNAの発現上昇に対して, パルス電磁場刺激は抑制的な効果を示していた。前述のようにTGF- $\beta$ には細胞外基質蛋白の蓄積促進作用があり<sup>12)</sup>, パルス電磁場刺激にはtype I collagen分泌促進作用が報告されている<sup>28)</sup>。さらに, TGF- $\beta$ 添加でのBMP-2 mRNAの発現が強いという本研究の結果を考えあわせると, hMSCにおけるパルス電磁場刺激の抑制的な効果には, Type I collagenの過剰な分泌, 蓄積が関与しているものと考えられた。

## V. 結 論

パルス電磁場刺激による骨芽細胞への無血清条件下での直接的な影響と, 骨芽細胞前駆細胞へのTGF- $\beta$ 存在下での影響を, 骨芽細胞が分泌する細胞外基質 mRNA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- $\beta$ 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- $\beta$ 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。

## 謝 辞

本稿を終わるにあたり, 終始, 本研究遂行と御校閲を賜りました北海道医療大学坂口邦彦名誉教授に感謝の意を表し, また貴重な御助言ならびに御校閲を賜った歯科補綴学第二講座越智守生教授に深謝いたします。さらに, 終始温かい御支援と御協力を頂きました本学歯学部歯科補綴学第二講座, 口腔病理学講座, 口腔生化学講座の諸先生方に心からお礼申し上げます。

## 文 献

1. 伊藤博元, 白井康正: PEMFs療法-Bassett法. 酒匂 崇, 井上四郎, 湯川佳宣編, 電気刺激による骨・軟部組織修復の促進—その基礎と応用—, 文光堂: 東京, 105-117, 1993.
2. 松永俊二, 酒匂 崇, 井尻幸成, 他: 理研式電磁

- 場刺激の基礎と応用。酒匂 崇, 井上四郎, 湯川佳宣編, 電気刺激による骨・軟部組織修復の促進—その基礎と応用—, 文光堂:東京, 118-125, 1993.
3. Bassett, C. A., Mitchell, S. N., Gaston, S. R. : Treatment of ununited tibial diaphyseal fractures with pulsing electromagnetic fields. *J Bone Joint Surg* **63A** : 511-523, 1981.
  4. Ryaby, J. T. : Clinical effects of electromagnetic and electric fields on fracture healing. *Clin Orthop*, **355S** : S205-S215, 1998.
  5. Matsumoto, H., Ochi, M., Abiko, Y., et al : Pulsed electromagnetic fields promote bone formation around dental implants inserted into the femur of rabbits. *Clin Oral Impl Res*, **11** : 354-360, 2000.
  6. 越智守生 : 骨原性細胞株MC3T3-E1に与えるパルス電磁場刺激の影響。日口腔インプラント誌, **6** : 82-96, 1992.
  7. Lohmann, C. H., Schwartz, Z., Liu, Y., et al : Pulsed electromagnetic field stimulation of MG63 osteoblast-like cells affects differentiation and local factor production. *J Orthop Res*, **18** : 637-646, 2000.
  8. 八島明弘, 越智守生, 広瀬由紀人, 他 : 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。日口腔インプラント誌, **13** : 29-37, 2000.
  9. Bodamyali, T., Bhatt, B., Hughes, F. J., et al : Pulsed electromagnetic fields simultaneously induce osteogenesis and upregulate transcription of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in rat osteoblasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, **250** : 458-461, 1999.
  10. Jane, B. L., Gary, S. S., Ernesto, C., et al : Bone formation : osteoblast lineage cells, growth factors, matrix proteins, and the mineralization process. In : Murray, J. F. ed. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders*. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins : Philadelphia, 14-29, 1999.
  11. Roberts, A. B., Sporn, M. B. : Physiological action and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth factors*, **8** : 1-9, 1993.
  12. Miyazono, K., Dijke, P. T., Ichijo, H., et al : Receptors for transforming growth factor-beta. *Adv Immunol*, **55** : 181-220, 1994.
  13. Bostrom, M. P., Asnis, P. : Transforming growth factor beta in fracture repair. *Clin Orthop*, 355suppl : S124-131, 1998.
  14. Marx, R. E., Carlson, E. R., Eichstaedt, R. M., et al : Platelet-rich plasma growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, **85** : 638-646, 1998.
  15. Yamaguchi, A., Komori, T., Suda, T. : Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and cbfa1. *Endocrine Reviews*, **21** : 393-411, 2000.
  16. Eric, H., Monique, H., Anne-Marie, G., et al : Effects of bone morphogenetic protein-2 on human neonatal calvaria cell differentiation. *J Cell Biochem*, **72** : 81-93, 1999.
  17. Chiba, H., Sawada, N., Iba, K., et al : A new established cell line from normal human bone responds to  $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$ , retinoic acid and transforming growth factor- $\beta_1$ . *Tumor Res*, **28** : 41-50, 1993.
  18. Iba, K., Chiba, H., Sawada, N., Hirota, S., Ishii, S., Mori, M. : Glucocorticoids induce mineralization coupled with bone protein expression without influence on growth of a human osteoblastic cell line. *Cell Struct Funct*, **20** : 319-330, 1995.
  19. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., et al : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, **284** : 143-147, 1999.
  20. Chiba, H., Sawada, N., Ono, T., et al : Establishment and characterization of a simian virus 40-immortalized osteoblastic cell line from normal human bone. *Jpn J Cancer Res*, **84** : 290-297, 1993.
  21. Hata, R., Senoo, H. : L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensional tissue-like substance by skin fibroblasts. *J Cell Physiol*, **138** : 8-16, 1989.
  22. Date, M., Kaneko, I., Fukada, E. : Pulse magnetic stimulator for biological systems. *Sci Papers I P C R*, **80** : 11-16, 1986.
  23. Kaplan, K. B., Swedlow, J. R., Morgan, D. O., et al : c-Src enhances the spreading of src-/-fibroblasts on fibronectin by a kinase-independent mechanism. *Genes Dev*, **9** : 1505-1517, 1995.
  24. 竹内靖博, 田村康博, 福本誠二, 他 : 骨芽細胞に

- おける細胞・基質間相互作用：I型コラーゲンにより活性化される細胞内シグナルの骨芽細胞分化における役割。日骨代謝誌, **19**：13-16, 2001.
25. Rodan, G. A., Bourret, L. A., Norton, L. A. : DNA synthesis in cartilage cells is stimulated by oscillating electric fields. *Science*, **199**：690-692, 1987.
26. Matsunaga, S. : Histological and histochemical investigations of constant direct current stimulated intramedullary callus. *J Jpn Orthop Ass*, **60**：1293-1303, 1986.
27. 正田健次郎：骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1) の TGF- $\beta$ 産生能ならびに細胞内Ca<sup>++</sup>動態に対する変動電磁場刺激の影響。東医大誌, **55**：297-306, 1997.
28. 曾我 真：変動電磁場刺激が骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1) の細胞外基質に及ぼす影響。東医大誌, **55**：500-509, 1997.
29. 宮川直樹, 曾我 真, 正岡利紀, 他：骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1) に対する変動電磁場刺激のIGFに及ぼす影響。日生体電気刺激研究会誌, **14**：29, 2000.
30. 酒匂 崇, 石堂康弘：BMPの研究の進歩—オーバービュー。整・災外, **42**：913-918, 1999.
31. Sporn, M. B., Todaro, G. J. : Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N Eng J Med*, **303**：878-880, 1980.
32. Laiho, M., Keski-Oja, J. : Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis : a review. *Cancer Res*, **49**：2533-2553, 1989.