

氏名 秋山 謙太郎

授与した学位 博士
専攻分野の名称 歯学

学位授与の番号 博 甲 第 2974 号

学位授与の日付 平成 17 年 3 月 25 日

学位授与の要件 医歯学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)

学位論文題名 骨芽細胞様細胞株(MC3T3-E1細胞)の細胞接着, 増殖, 分化および
遺伝子発現に対するチタンの影響

論文審査委員 教授 高柴 正悟 教授 鈴木 一臣 教授 窪木 拓男

学位論文内容の要旨

【目的】

インプラント治療は欠損補綴にはなくてはならない治療オプションとして認識されるようになった。また、その成功にはチタンと骨との結合が不可欠である。しかし、骨結合が得られるまでに必要とされる期間が3から5か月と長期にわたることや、骨量が少ない場合に骨結合の確実性が劣ることなどが問題点としてあげられる。インプラント治療の信頼性を向上させるためにはチタンの骨結合をより早く強固にする新たな方法の開発が望まれている。そこで、本研究では、チタンの骨結合の生物学的メカニズムを利用した骨結合促進法の開発を目指し、チタンが特異的に培養骨芽細胞に与える影響を培養細胞レベルで検討した。

【材料および方法】

実験1 チタンが培養骨芽細胞の細胞接着・増殖・分化に与える影響

1. チタンプレート

直径 33 mm の研磨ガラスに 400 Å の厚さで純チタンを蒸着（蒸着チタン）し、実験に使用した。また、参照条件に培養皿（プラスチック）を用いた。表面粗さは Surfcon 1500A を用いて測定し、算術平均粗さでプラスチック ($0.0141 \pm 0.0058 \mu\text{m}$) は蒸着チタン ($0.0073 \pm 0.0002 \mu\text{m}$) よりも大きい結果となった。ガラス表面へのチタン蒸着の確認として EDS にて表面元素分析を行い、表面にチタン元素が蒸着されていることを確認した。

2. 使用細胞株ならびに培養条件

マウス骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1 細胞) を、10%ウシ胎仔血清、200 mM L-グルタミン、50 $\mu\text{g/ml}$ アスコルビン酸、100 units/ml ペニシリン G カリウム、100 $\mu\text{g/ml}$ 硫酸ストレプトマイシン、および 0.25 $\mu\text{g/ml}$ アンホテリシン B を含む α 変法イーグル培地を使用し、37°C、5%CO₂ 気相下で培養した。

3. 蒸着チタンが培養骨芽細胞形態に与える影響

蒸着チタン及びプラスチックに細胞播種し、12、24 時間培養後の細胞形態を光学顕微鏡にて観察した。

4. 蒸着チタンが培養骨芽細胞の細胞接着、増殖、分化に与える影響

シリコンリングを用いて蒸着チタンを培養皿の底に固定し、細胞を 5×10^4 個/ウェルの濃度で播種し、1、2、3、5、7、10 時間後に材料に付着した細胞を評価した。参照条件では、シリコンリングのみをウェルに固定し、培養皿の表面が細胞と直接接するようにした。非付着細胞を除去後、接着細胞数を MTS 法にて評価した。細胞増殖においても、 5×10^4 個/ウェルの濃度で細胞播種後、1、2、3、4 日間培養し、細胞数を MTS 法で評価した。細胞分化の評価は、アルカリホスファターゼ活性の経時的な変化を 3、5、7、14、21 日間培養したもので比較検討した。

実験2 チタンの骨芽細胞分化過程の遺伝子発現に与える影響

1. 使用細胞株および培養

MC3T3-E1 細胞を 3×10^5 個の濃度で直径 100 mm の蒸着チタンプレートならびにプラスチック培養皿に播種し、1、3、5、10、15 日間培養した後、total RNA を抽出した。

2. 発現に差のある遺伝子の検出

蒸着チタンとプラスチックにおける、培養3日目と15日目の細胞の遺伝子発現の差を比較し、また、培養15日目における両材料間での遺伝子発現の差を subtractive hybridization (サブトラクション) 法によりスクリーニングした。

3. 発現に差のある個々の遺伝子の変動

サブトラクションにより得られた遺伝子の発現変動を、同様のサンプルを用いてリアルタイム PCR 法により検討した。

【結果】

実験1 骨芽細胞の細胞接着、増殖、分化に与える影響

1. 蒸着チタンが培養骨芽細胞形態に与える影響

両条件とも、不規則な紡錘形の細胞が観察され、プラスチック、蒸着チタン間で明らかな細胞形態の差は認められなかった。

2. 蒸着チタンが培養骨芽細胞の細胞接着、増殖、分化に与える影響

両条件とも、細胞播種後経時的に接着細胞数が増加したが、蒸着チタンへの細胞接着はプラスチックと比較して低い傾向があった。細胞増殖についても、経時的に細胞数が増加し、3日目には両条件ともコンフルエントに達したが、細胞播種後2日目までは、蒸着チタン上の細胞増殖が抑制されていた。骨芽細胞分化を示すアルカリホスファターゼ活性は、培養5日目より上昇し、14日目にピークに達し、その後下降した。蒸着チタンでは、プラスチックと比較してアルカリホスファターゼ活性が有意に低かった。

実験2 蒸着チタンが遺伝子発現に与える影響

1. サブトラクションによって得た遺伝子群

培養15日目と培養3日目の遺伝子発現の差を検索したところ、プラスチックでは、*sod1* と *galectin1* が、蒸着チタンでは、*sod1*, *riken cDNA 2210013021*, *ribosomal protein large P1*, *xab-2* が検出された。また、プラスチックとチタンの遺伝子発現の差を培養15日目で検索したところ、*sod-1* と *ribosomal protein L19* が得られた。

2. *sod-1*, *galectin-1*, *xab-2* の経時的変動

sod-1, *galectin-1*, *xab-2* の発現の変動を、サブトラクションに用いた同一のサンプルにおいてリアルタイム PCR にて検討したところ、いずれの遺伝子もプラスチックでは5日目に発現のピークがあり、チタンでは5日から10日目にかけてピークがあった。また、各々の遺伝子の発現量は蒸着チタンの方が、プラスチックよりも低い傾向があった。

【考察】

蒸着チタン上で骨芽細胞を培養すると、骨芽細胞の細胞接着、増殖がプラスチックに比べて抑制されており、チタンという材質そのものがこれらに抑制的に作用している可能性が示唆された。骨芽細胞分化の指標であるアルカリホスファターゼ活性の変動パターンにおいても、両条件共に、培養14日頃をピークとする一峰性のパターンを示したが、蒸着チタン上ではその活性は全般的に抑制されていた。サブトラクションによりスクリーニングされた、*sod-1*, *galectin-1*, *xab-2* の発現パターンはいずれもアルカリホスファターゼ活性の変動パターンに類似しており、骨芽細胞分化と関連がある可能性が示唆された。また、培養チタン上でこれらの遺伝子発現量が相対的に抑制されていることと、骨芽細胞の分化が培養チタン上で抑制されていることとよく一致していた。

【まとめ】

本研究の結果から、チタンはプラスチックに比較して、培養骨芽細胞である MC3T3-E1 細胞の細胞接着、増殖、分化に対して抑制的に作用する可能性が示唆された。また、チタン上での骨芽細胞の分化には、これまで報告されているような骨基質タンパクのみではなく、いまだ骨芽細胞における機能が十分解明されていない *sod-1*, *xab-2* などの遺伝子が関与している可能性が明らかになった。

論文審査結果の要旨

口腔インプラント治療の成功にはチタンと骨との結合（オッセオインテグレーション）が不可欠である。しかし、オッセオインテグレーションの獲得まで長期間を必要とする症例や獲得できない症例があることなどが問題視されている。そのため、口腔インプラント治療の信頼性を向上させるため、確実なオッセオインテグレーションを早期に達成する方法の開発が望まれている。本研究では、生物学的メカニズムを利用したチタンのオッセオインテグレーションの促進を目指し、チタンが特異的に培養骨芽細胞様細胞に与える影響を*in vitro*で検討したものである。

本研究では、ガラスにチタンを蒸着させて表面粗さをポリスチレン製培養皿と同程度かつ均質にすることによって表面粗さの影響を最小限にし、チタンという材質そのものの培養骨芽細胞様細胞への影響を、細胞の接着、増殖および分化という細胞動態について、さらに、この細胞からの遺伝子発現の変化について検討した。その結果、ポリスチレン製培養皿と比較して、細胞接着、増殖および分化の指標であるアルカリホスファターゼ活性がチタン上では抑制されている傾向にあった。また、発現量に差があった遺伝子を相補的DNAのサブトラクティブハイブリダイゼーションによってスクリーニングすると、チタン上で特異的に発現が抑制されている遺伝子として、*sod-1*、*xab-2*、および*galectin-1*を検出できた。

骨芽細胞に対するこれら遺伝子の機能は明確にされてはいない。しかし、これまでの報告では、SOD-1には抗酸化作用による間接的なアルカリホスファターゼ活性の改善作用があること、Xab-2には細胞傷害時のDNA修復に関与する作用があること、Galectin-1には、細胞外マトリックス中のラミニンや細胞表面のインテグリンと結合することで細胞接着、増殖、そしてアルカリホスファターゼ活性の促進作用があることなどが確認されている。これらの遺伝子がチタンのオッセオインテグレーションに直接的に関連するかどうかは本研究で明らかになっていない。本研究は、遺伝子発現への影響をチタンと他の金属間で比較することや、これら遺伝子の発現や遺伝子産物の分布などを歯槽骨内のチタン周囲で明らかにすることなどの研究への発展が期待できる。

本申請論文は、チタンの特異的な影響として、これまでに報告のない遺伝子の関与の可能性を導き、オッセオインテグレーション成立のメカニズムを解明するうえで、これまでにない遺伝子の関与を示して新たな研究の方向性を示したという点において、学位論文としての価値を認めた。