

Title	水酸化カルシウムが骨芽細胞の分化と石灰化に与える影響
Author(s)	成田, 寛子
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49231
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	成田寛子
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 21930 号
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学位論文名	水酸化カルシウムが骨芽細胞の分化と石灰化に与える影響
論文審査委員	(主査) 教授 恵比須繁之 (副査) 教授 豊澤 悟 准教授 寺岡 文雄 准教授 島袋 善夫

論文内容の要旨

【研究目的】

水酸化カルシウムは、日常臨床において根管治療の貼薬剤として頻繁に使用されている。水酸化カルシウムから放出される水酸化物イオンは細菌に対して抗菌性を示すことが明らかとされている。一方で、水酸化カルシウムを直接覆髄法に用いると象牙質橋が形成されることから、水酸化カルシウムは硬組織の形成に有利であるとも考えられている。これまでに、貼薬した水酸化カルシウムは水酸化物イオンとカルシウムイオンに解離して根尖孔外へ拡散することが確認されており、根尖周囲における硬組織の再生に対しても影響を及ぼすことが予測される。そこで、強塩基としての水酸化カルシウムが骨芽細胞に与える影響についてカルシウムイオンおよび pH の観点から明らかにすることを本研究の目的とした。

【材料および方法】

1. マウス骨芽細胞上のカルシウムセンシングレセプター (CaSR) の発現

生後一日齢のマウスの頭蓋冠より骨芽細胞を調整し、水酸化カルシウム非添加および 0.25 mg/ml 水酸化カルシウム含有培地 (pH 7.4 に調整したものと調整を行っていないもの) にて 14 日間培養後、RNA を抽出した。その後、逆転写反応をさせて cDNA を合成し、PCR を行った。

2. 水酸化カルシウムが骨芽細胞の増殖、分化および石灰化に及ぼす影響

マウス骨芽細胞を 0.025、0.25 あるいは 2.5 mg/ml の水酸化カルシウム含有培地にて培養し、MTT assay にて増殖能を評価した。また、0.025 および 0.25 mg/ml 水酸化カルシウム含有培地にて 14 および 21 日間培養した骨芽細胞を alizarin red S にて染色し、石灰化能を評価した。骨芽細胞の分化については、分化マーカーである Type I collagen、オステオポンチン、オステオカルシンおよびアルカリフォスファターゼのメッセンジャーRNA (mRNA) の発現量をリアルタイム PCR 法にて測定することにより評価した。

3. 水酸化物イオンが骨芽細胞に及ぼす影響

水酸化カリウムを用いて pH 8.5 に調整した塩基性培地にて骨芽細胞を培養し、上記 2 項と同様の方法で、骨芽細胞の増殖能および石灰化能について検討を行った。

4. 水酸化カルシウム誘導性骨芽細胞分化における MAPK の関与

水酸化カルシウムにて刺激した骨芽細胞を回収し、タンパクを抽出した。このタンパクを SDS page にて展開し、

骨芽細胞の分化過程に関与している ERK、p38 および JNK といった MAPK の活性化について、ウェスタンブロッティング法にて解析を行った。また、MAPK の阻害剤を添加した培地にて骨芽細胞を培養後、alizarin red S にて module を染色し、MAPK 抑制下における骨芽細胞の石灰化能の評価を行った。

【結果】

1. マウス骨芽細胞上のカルシウムセンシングレセプター (CaSR) の発現

培地への水酸化カルシウム添加の有無に関わらず、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞上に CaSR の発現が認められた。

2. 水酸化カルシウムが骨芽細胞の増殖、分化および石灰化に及ぼす影響

2.5 mg/ml 水酸化カルシウム含有培地にて培養した骨芽細胞は生存不可能であった。0.025 あるいは 0.25 mg/ml 水酸化カルシウム含有培地にて培養を行った細胞の増殖能はコントロールとの間に有意差はなく、水酸化カルシウムは骨芽細胞の増殖能に影響を与えなかった。0.25 mg/ml 水酸化カルシウムは骨芽細胞の石灰化を誘導し、特に pH 7.4 の中性条件下においてその効果は増強された。また、水酸化カルシウムは Type I collagen の発現を誘導しなかったが、オステオポンチン、オステオカルシンおよびアルカリフォスファターゼの発現を誘導した。

3. 水酸化物イオンが骨芽細胞に及ぼす影響

塩基性培地で培養した骨芽細胞の増殖能はコントロールとの間に有意差を認めなかった。また、塩基性培地で 21 日間培養を行っても石灰化物の形成は認められなかった。

4. 水酸化カルシウム誘導性骨芽細胞分化における MAPK の関与

ウェスタンブロッティング法による解析の結果、骨芽細胞における ERK、p38 および JNK は水酸化カルシウムの刺激により活性化することがわかった。また、中性条件下において p38 と JNK の活性化は遷延化していた。ERK、p38 および JNK のいずれにおいても、その阻害剤の添加により、骨芽細胞の石灰化は抑制された。

【考察および結論】

本研究により、水酸化カルシウムは骨芽細胞の石灰化を促進し、その効果は pH 7.4 の中性条件下において増強されることが分かった。これは MAPK の活性化が pH 7.4 において亢進しているためと考えられる。また、水酸化物イオンは骨芽細胞の増殖および石灰化には影響を与えないことから、水酸化カルシウムによる硬組織誘導はカルシウムイオンが担っていることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、水酸化カルシウムが骨芽細胞の分化と石灰化に与える影響について分子生物学的手法を用いて解析を行ったものである。

その結果、水酸化カルシウムは骨芽細胞の分化を誘導し、石灰化を促進することが明らかとなり、この過程に calcium sensing receptor が関与する可能性が考えられた。また、シグナル伝達経路の解析から、この石灰化促進は mitogen-activated protein kinase の活性化の亢進により生じていることが示唆された。

以上の研究成果は、水酸化カルシウムによる硬組織形成のメカニズム解明の一端を担うものであり、本研究は博士(歯学)の学位授与に値するものと認める。