

氏名 井上 美穂

授与した学位 博士

専攻分野の名称 学

学位授与の番号 博 乙 第 4 0 2 3 号

学位授与の日付 平成 1 7 年 3 月 2 5 日

学位授与の要件 博士の学位論文提出者(学位規則第4条第2項該当)

学位論文題名 In vitro response of osteoblast-like and odontoblast-like cells to unsubstituted and substituted apatites (微量元素(フッ素)置換合成アパタイトが象牙芽細胞様細胞株(MDPC23)および骨芽細胞様細胞株(MC3T3-E1)におよぼす影響)

論文審査委員 教授 鈴木 一臣 教授 山本 敏男 教授 永井 教之

## 学位論文内容の要旨

### 【研究目的】

ハイドロキシアパタイトを含むリン酸カルシウムは、医歯学領域において、骨伝導能の利点から骨補填材料として臨床応用されている。エナメル質、象牙質、骨に含まれる生体アパタイトには微量元素が含まれており、硬組織形成に関与する細胞の増殖、分化に影響を与えると報告されている。従って、このような微量元素を含む合成アパタイト(合成擬似生体アパタイト)による細胞との関わりが注目されている。特に、フッ素(F)イオンやF置換アパタイトは、*in vitro*で骨芽細胞の増殖促進、破骨細胞活性の抑制を示し、骨粗鬆症治療への臨床応用が期待されているが、歯科領域では、象牙芽細胞のような歯牙形成に関与する細胞への影響は明らかではない。また、近年 Hanks らによって、胎児マウス歯乳頭から、象牙芽細胞の特徴を有する細胞株(MDPC23)が樹立された。そこで、本研究では、MDPC23 を用い、微量元素(F)置換合成アパタイトの象牙芽細胞への影響を明らかにすることを目的として、骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 と比較検討を行った。

### 【材料と方法】

#### 合成擬似生体アパタイトの調整

材料は、湿式法にて、F置換合成アパタイト(FAp)として、低濃度FAp(L-FAp, 0.48 wt %)、中濃度FAp(M-FAp, 0.91 wt %)、高濃度FAp(H-FAp, 2.23 wt %)、および、未焼結合成アパタイト(AP)を合成し、ペレット(直径13mm、厚さ1mm)状に形成した。

#### 細胞培養

細胞は胎児マウス臼歯歯乳頭から樹立した象牙芽細胞様細胞株 MDPC23(Dr. Hanks, University of Michigan 供与)および、マウス頭蓋骨由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1(理化学研究所)を用いた。培養は、合成ペレット上に 5000cells / cm<sup>2</sup>の細胞を播種し、10%牛胎児血清、アスコルビン酸(50μg/mL)およびβ-グリセロリン酸(2mM)を含むα-Minimum Essential Medium 培地を用いて 37°C、5%CO<sub>2</sub>下で行った。

#### 形態学的観察

培養 7 日および 14 日後に、2%グルタルアルデヒド溶液を用いて細胞を固定し、走査型電子顕微鏡(SEM)にて、細胞形態および石灰化について観察を行った。

## 生化学的解析

培養7日後に細胞を回収し、PicoGreen dsDNA Quantitation Reagent and Kits (Molecular Probes, Inc. USA)を用いてトータル DNA 量を測定した。さらに、Sircol Collagen Assay (Biocolor, UK)によりコラーゲンタンパク量、また、ALP20 (Sigma, USA)キットを用いてアルカリフォスファターゼ(ALP)活性を測定した。

### 【結果】

#### 形態学的観察；

MCPC23は、培養7日後、AP、L-FAp、および、M-FApにおいて、細胞形態は球状で、放射状に多くの細胞質突起を出し、アパタイト上に接着していた。一方、H-FApにおいて、細胞質突起は観察されなかった。石灰化粒は、7日後に、AP、および、H-FApにおいて細胞表面に観察され、14日後に全てのアパタイトにおいて観察された。

MC3T3-E1では、MDPC23と細胞形態は異なり、APにおいて、細胞は多くの細胞質突起を持つ形態を呈していたが、FApでは観察されなかった。石灰化粒は、7日後にH-FApにおいて観察され、14日後に全てのアパタイトで観察された。

#### 生化学的解析；

MDPC23のトータルDNA量は、APが最も高く、F濃度が高くなるにしたがって減少した。一方、MDPC23のコラーゲン量、ALP活性は、APが最も低く、F濃度が高くなるにしたがって増加した。MC3T3-E1も同様の傾向を示した。

### 【考察】

形態学的観察から、MDPC23において、APおよびL-FApが細胞形態の為害性が最も少なく、細胞質突起を出して合成アパタイトに接着していたが、MC3T3-E1において、FApへの接着が著しく減少していた。生化学的解析から、MDPC23では、FApのF濃度が高くなるにしたがって、細胞数は減少するが、機能分化は進んだ段階にあると考えられた。MC3T3-E1では同様の傾向を示したが、MDPC23と比較すると細胞動態の活性が低いことが示された。これらのことから、FApから溶出する微量元素の中でFがMDPC23に濃度依存的に影響を与え、高濃度では為害作用を示すが、低濃度では機能分化を促進させることを示唆していた。このように、生体材料として低濃度F置換合成アパタイトの開発は有意義であると考えられた。

### 【結論】

微量元素(F)置換合成アパタイトの象牙芽細胞様細胞株への影響は、F濃度の違いによって影響が異なることが明らかとなった。これらの合成アパタイトに含まれる微量元素は細胞分化を促進することから、合成擬似生体アパタイトは、生体材料としての応用が可能であると考えられた。

## 論文審査結果の要旨

ハイドロキシアパタイトを含むリン酸カルシウムは、医歯学領域において骨伝導能の利点から骨補填材料として臨床応用されている。エナメル質、象牙質および骨に含まれる生体アパタイトにはマグネシウム、亜鉛およびフッ素などの微量元素が含まれており、硬組織形成に関与する細胞の増殖、分化に影響を与えると報告されている。従って、このような微量元素を含む合成アパタイト(合成擬似生体アパタイト)による細胞との関わりが注目されている。特に、フッ素イオンやフッ素置換アパタイトは、*in vitro* で骨芽細胞の増殖促進、破骨細胞活性の抑制を示すことが報告されているが、歯科領域では象牙芽細胞のような歯牙形成に関与する細胞への影響は明らかではない。

本研究では、微量元素(フッ素)置換合成アパタイトの象牙芽細胞への影響を、象牙芽細胞様細胞株 MDPC23 を用いて骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 と比較検討し、フッ素濃度の違いにおいて調べたものである。

その結果、形態学的観察から、MDPC23 において低濃度フッ素置換合成アパタイトが細胞形態の有害性が最も少なく、細胞質突起を出して合成アパタイトに接着していたが、MC3T3-E1 においては、フッ素置換合成アパタイトへの接着が著しく減少していたという新たな知見が得られた。また FTIR 分析から、低・中濃度フッ素置換合成アパタイト上での細胞培養によって有機相のピークが確認されたことから、アパタイト表面上に細胞が存在するという裏付けも得られた。生化学的解析から、MDPC23 ではフッ素置換合成アパタイトのフッ素濃度依存的に細胞数は減少するが、機能分化は進んだ段階にあるという新たな知見が得られた。MC3T3-E1 では同様の傾向を示したが、MDPC23 と比較すると細胞動態の活性が低いことを明らかにした。加えて、低濃度フッ素置換合成アパタイトは生体材料としての応用が可能であるとことを示唆している。以上の点から、本研究によりフッ素置換合成アパタイトの細胞におよぼす影響に関する新たな知見を得ることができ、合成擬似生体アパタイトの開発が有意義であることを指摘している。

よって、本論文は博士(学術)の学位論文に値するものと認められた。