

論文内容の要旨

Water-soluble factors eluted from surface pre-reacted glass-ionomer promote osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells

歯科材料からの溶出成分がヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞分化に与える影響

(Molecular Medicine Reports 平成 30 年掲載予定)

ねもと あきら
根本 章

I. 研究目的

歯科用コンポジットレジンに用いられている S-PRG フィラーはアルミニウム、ホウ素、フッ素、ナトリウム、ケイ素、ストロンチウムなどの元素を可溶性分として徐放することが知られている。しかし、これらのイオンが間葉系幹細胞 mesenchymal stem cell (MSC) に与える影響は不明である。本研究では、S-PRG フィラーから放出される可溶成分が MSC の細胞生存率や骨芽細胞分化に与える影響を調査した。

II. 研究方法

(a) S-PRG フィラーと細胞培地を混和後、ミキサーで 24 時間攪拌混合した。その後、遠心分離にてフィラーを沈殿させ、上清を取り出しフィルターでろ過を行い S-PRG-抽出培養液とした。

(b) (a)にて調整した S-PRG-抽出培養液を用いて培養したヒト骨髄由来 MSC の細胞生存率ならびに骨芽細胞分化の程度を Alamar Blue 法、qRT-PCR 法および Alizarin Red 染色法にて調査した。

(c) S-PRG フィラー含有レジンプレート上で MSC を培養後、骨芽細胞分化マーカーの発現を qRT-PCR を用いて調査した。

III. 研究成績

20 倍以下の希釈率で S-PRG-抽出培養液を与えた際の MSC 培養では、細胞生存率の低下が認められた。200、500 および 1000 倍の希釈率で S-PRG-抽出培養液を与えると、アルカリホスファターゼ (ALP) の発現が有意に促進された。また、500 および 1000 倍の希釈率で S-PRG-抽出培養液を与えると、細胞外マトリックスにおける顕著なカルシウムの沈着が認められた。レジンプレート上で MSC を培養した場合には、S-PRG フィラー含有率の増加に伴い MSC の ALP 発現が強く誘導された。

IV. 考察及び結論

S-PRG フィラーはホウ酸イオン、ケイ酸イオン、ストロンチウムイオン、フッ素イオンを徐放することが知られている。モバヘディらによるホウ酸イオンについての報告では 0.0001ppm のホウ酸イオンは MSC の ALPA を誘導し cell viability に影響を与えなかった(2)。一方、1ppm では cell viability の低下がみられた。本研究で用いた 500 倍に希釈した S-PRG-抽出液では 2.6ppm、1000 倍希釈では 1.3ppm のホウ酸イオンが含まれていた。これらはモバヘディらの報告した範囲に近似しているため 500、1000 倍希釈液のホウ酸イオンは骨形成を促進させることが示唆された。

バラナシらのケイ酸イオンについての報告では、11.2ppm のケイ酸イオンは骨芽前駆細胞の骨芽細胞分化を誘導し、細胞増殖能に影響を与えなかった(3)。本研究に用いた 500 倍に希釈した S-PRG-抽出液では 0.014ppm、1000 倍では 0.0072ppm のケイ酸イオンが含まれていた。これらはバラナシらの報告よりもはるかに低いため 500、1000 倍希釈液のケイ酸イオンは骨形成に関与していないことが示唆された。

バオらのストロンチウムイオンについての報告では、1.1ppmのストロンチウムイオンはマウスのセメント芽細胞の細胞増殖能に影響を与えず、骨形成遺伝子の発現を促進した(4)。本研究に用いた500倍に希釈したS-PRG抽出液では1.6ppm、1000倍では0.8ppmのストロンチウムイオンが含まれていた。これらはバオらの報告と同等のため500、1000倍希釈液のストロンチウムイオンは骨形成に関与していることが示唆された。

ナカデらのフッ素イオンについての報告では2.1~4.2ppmのフッ素イオンはヒト歯髄細胞の細胞増殖能と骨分化を促進した(5)。500倍に希釈したS-PRG抽出液では0.14ppm、1000倍では0.07ppmのフッ素イオンが含まれていた。これらはナカデらの報告より低いため500、1000倍希釈液のフッ素イオンは骨形成に関与していないことが示唆された。

S-PRGフィラーからの可溶性分がMSCにおける骨芽細胞分化マーカーALPの発現や細胞間マトリックスの石灰化を誘導することから、S-PRGフィラー含有レジンに覆髄材として用いた場合には、硬組織形成を誘導する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授	小笠原 正人 (薬理学講座 病態制御学分野)
副査 教授	石崎 明 (生化学講座 細胞情報科学分野)
副査 教授	野田 守 (歯科保存学講座 歯蝕治療学分野)

歯科用コンポジットレジンに用いられるS-PRGフィラーからはアルミニウム、ホウ素、フッ素、ナトリウム、ケイ素、ストロンチウムが可溶性分として徐放することが知られているが、これらのイオンが間葉系幹細胞に与える影響は未だ明らかにされていない。本研究ではS-PRGフィラーと細胞培養液をよく混和し、沈殿画分をフィルターで除きS-PRG抽出液を用いてヒト間葉系幹細胞の細胞生存率および骨芽細胞分化に与える影響を検討した。細胞生存率はalamarBlue assayを用いて検討した。また骨芽細胞分化はqRT-PCR法にて骨芽細胞分化マーカーの1つであるアルカリフォスファターゼ発現を検討した。また骨芽細胞としての硬組織形成能力についてはAlizarin Red染色法にて細胞外マトリックスのカルシウム沈着を検討した。また使用したS-PRG抽出液の元素分析はICP法にて行った。

20倍以下の希釈率では細胞生存率の低下が認められた。200、500、1000倍の希釈率ではアルカリフォスファターゼ発現の有意な増加が認められた。また500、1000倍希釈率では細胞外マトリックスのカルシウム沈着が認められた。2000~8000倍希釈率ではアルカリフォスファターゼの発現は低下した。

以上の結果から、S-PRG抽出液は骨形成を促進することが示された。先行研究の報告でホウ酸イオンの骨形成促進作用(0.00001~6ppm)が示され、本研究で使用したS-PRG抽出液500、1000倍希釈に含まれるホウ酸イオン濃度はそれぞれ2.6ppm、1.3ppmと骨形成促進作用を示す範囲内であり、含まれるホウ酸イオンは骨形成促進作用が示唆された。またストロンチウムイオンに関しては先行研究で1.1ppmのストロンチウムイオンを用いマウスセメント芽細胞の細胞増殖能に影響を与えず、骨形成遺伝子発現を促進した。本研究でもS-PRG抽出液希釈液中(500倍、1000倍)のストロンチウムイオンはそれぞれ1.6ppm、0.8ppmと骨形成に関与する濃度であり、骨形成促進に関与することが示唆された。一方、ケイ酸イオン、フッ素イオンに関しては先行研究で骨形成に関与する濃度より低い濃度であり、骨形成には関与していないことが示唆された。以上のことから、S-PRG抽出液のうちホウ酸イオン、ストロンチウムイオンは骨形成促進を誘導することが示唆された。したがって、S-PRGフィラー含有レジンに覆髄材として用いた場合、硬組織形成を誘導する可能性が示唆された。

試験・試問結果の要旨

本論文の概要について説明がなされた。研究背景、方法、結果の解釈ならびに臨床的意義、臨床応用について試問した結果、いずれも適切かつ明瞭な回答が得られた。また、う蝕治療の病態を踏まえ使用する材料の今後の研究の展望も積極的に述べており、研究に対する十分な意欲を感じられたことから、学位に値する学識と研究能力を有すものと判定した。

参考論文 なし