慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture.
Sub Title	単層及び3次元培養において、カルシウムイオン濃度が、骨芽細胞の生存・増殖・分化に与える影響
Author	前野, 晋一
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.4 (2005. 12) ,p.26-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20051202-0026

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture.

（単層及び３次元培養において、カルシウムイオン濃度が、骨芽細胞の生存・増殖・分化に与える影響）

前　野　　晋　一

内容の要旨

【緒言】軟骨損傷に対して現在行われている自家培養軟骨細胞移植術の様々な問題点を解決すべく、われわれは骨軟骨複合体の作製を試みている。まず軟骨の構成成分であるⅡ型コラーゲンゲルを用いて細胞を包埋する。骨との接触部に交互浸漬法を用いてアパタイトを沈着させて骨に適した環境を作り、母床との強固な骨性の癒合を得る。しかしアパタイトの沈着の際に用いるカルシウム（Ca^{2+}）溶液の、濃度による骨芽細胞に対する影響は明らかにされていない。そこで本研究では、各Ca^{2+}濃度における骨芽細胞の反応性を明らかにするため、生存率、増殖率、分化能、石灰化能の４つの観点から単層培養およびゲルによる３次元培養下で検討を行った。

【方法】骨芽細胞はマウス頭蓋骨から抽出し、継代した。単層培養ではtissue culture plateに１×10^4個/well、３次元培養では鋳型として既述のⅡ型コラーゲンゲルに１×10^7個/mlの濃度で細胞を含有させ、Ca^{2+}溶液は培養液、生理食塩水、塩化カルシウムなどを用いて各濃度に調整した。生存率はCa^{2+}溶液に細胞を４時間浸漬した後の生存細胞数を、増殖率はCa^{2+}溶液で細胞を培養した後の増殖細胞数を、WST-1法もしくはMTT法を用いて測定した。分化能として１週間培養後の細胞からmRNAを抽出し、リアルタイムRT-PCRを用いて骨芽細胞の最終分化マーカーであるオステオカルシン（OC）を定量し、またALP染色も行った。石灰化能として、やはり１週間培養後のplateもしくはゲルに沈着したCa量を定量し、von Kossa染色も行った。

【結果】生存率は単層・３次元培養とも低濃度のCa^{2+}、すなわちCa^{2+}2-6mMで細胞の生存率は良好であり、Ca^{2+}濃度が高くなるにつれて低下した。増殖率もCa^{2+}5mMでの培養で、いずれも良好な細胞増殖を示した。この際ゲルはCa^{2+}含有培養では基質沈着により２ヵ月間形態を維持したが、Ca^{2+}非存在下では形態維持が困難であった。分化能は、単層培養ではCa^{2+}6-15mM、３次元培養ではCa^{2+}2mM以上でOC mRNAの発現が亢進していた。石灰化能は、単層培養ではCa^{2+}10、15、5mMの順で、３次元培養ではCa^{2+}6mMでCa沈着量および沈着速度が亢進していたが、ゲル培養では細胞非包埋ゲルでも相当量のCa沈着が認められた。

【考察】骨芽細胞の骨形成において、基質産生および石灰化は重要な最終過程であるが、その詳細なメカニズムは分かっていない。本研究により単層培養およびコラーゲンゲルによる３次元培養系において、低濃度のCa^{2+}刺激は骨芽細胞の増殖・分化を亢進しうることが示された。低濃度のCa^{2+}負荷は、細胞活性および基質の石灰化を亢進させる有用な手技であり、今後のtissue engineeringの手技へ応用しうると考えられた。

論文審査の要旨

関節軟骨欠損に対する治療として、われわれはⅡ型コラーゲンゲルの深層を交互浸漬法によりアパタイト化し骨軟骨複合体を作製する試みを行っている。しかし、その際用いるCa溶液の濃度による細胞に対する影響は明らかでなく、本研究では２次元と３次元培養系において骨芽細胞培養に対するCa濃度の影響について検討した。マウス頭蓋骨由来の骨芽細胞を用い、単層培養およびⅡ型コラーゲンゲルによる３次元培養でCa濃度による増殖能、分化能、および石灰化能の３点を検討した。また、ゲルをヌードマウスの皮下に移植する実験も行った。その結果、骨芽細胞の単層培養系において、Ca濃度は2－4mMという低濃度で細胞の増殖・生存能が、6－8mMで分化能、10mM付近で石灰化能が良好であった。コラーゲンゲルによる三次元培養系においてもほぼ同様の傾向が見られたが、濃度による差は明らかでなかった。経時的なCaの沈着は、細胞存在下の方がそのスピードは速かった。マウスの皮下移植実験では、交互浸漬のCa濃度が10mM以下では濃度依存性にゲルの石灰化が見られた。骨の微小環境下では破骨細胞周囲で局所的にCa濃度が上がっている可能性もある。今回の実験で、生理的よりもやや高いCa濃度においても骨芽細胞の活性は低下せず、むしろ石灰化を促すことが明らかとなった。従って骨芽細胞の３次元培養系においてもCaを低濃度負荷することが有効と思われた。

審査では、まず軟骨基質であるⅡ型コラーゲンに骨芽細胞を包埋した理由を質問された。未分化間葉系幹細胞を包埋し、片側を軟骨細胞、対側を骨芽細胞に傾斜をかけて分化させる試み、もしくはコラーゲンに傾斜をかける試みも行ったが難しく、再生が難しい軟骨の基質を使用し、そこに骨を作ることが骨軟骨複合体を作る上で容易と判断したためと回答された。また、細胞の由来・定義についての質問がなされた。頭蓋骨由来の抽出細胞は文献的に70%は骨芽細胞であり、その形質はマーカーにより確認し、継代により均一化することは確認した。しかしcell lineとして確立されている骨芽細胞や長幹骨由来の軟骨内骨化を起こす細胞との相違や、ホルモンへの感受性などは検討しておらず、今後の課題であると回答された。また、石灰化したゲルの強度、病理組織所見について質問された。細胞を包埋しCa存在下で培養することで、Ca沈着量は増えゲルとして安定化して長期にわたり形態が維持される。しかし強度は硬くならず、また病理組織所見でも細胞の基質小胞周囲での石灰化や、細胞の再配列等も確認できなかったと回答された。

以上のように、本研究は未だ検討されるべき点を残しているものの、骨芽細胞のCa濃度による反応の違いを検討し、tissue engineeringに応用しうる可能性を示唆したという点で有意義であると評価された。

論文審査担当者　主査　整形外科学　戸山　芳昭
発生・分化生物学　須田　年生　　生理学　岡野　栄之
病理学　岡田　保典
学力確認担当者：北島　政樹、須田　年生
審査委員長：須田　年生

試問日：平成17年 6月27日