

学位論文題名

Effect of a low-Ca environment on alkaline phosphatase activity in embryonic rat calvarial bone cells in culture

(培養ラット胎児頭蓋冠由来骨形成系細胞のアルカリ性ホスファターゼ活性に及ぼす低カルシウム環境の影響)

学位論文内容の要旨

緒言

低カルシウム(Ca)食により飼育されたラットでは、骨の形成障害、血清Ca濃度の低下、骨のCaの喪失などを生じることが報告されており、低Ca環境が骨吸収や骨の形成障害における重要な因子であることが示唆されている。また、低Ca培養液中で新生児ラットの大腿骨を8日間培養すると、その骨頭部が肥大化し、ALP活性、DNA量、コンドロイチン硫酸合成の増加、コラーゲン合成量の減少を報告している。従って、低Ca環境は新生児ラットの大腿骨の形態的、機能的変化を誘導する。これは、低Ca環境が骨形成系細胞に影響を及ぼす要因の一つであることを示唆する。

一方、アルカリ性ホスファターゼ(ALP)は、硬組織石灰化機構において重要な役割を有すると言われながらも、その生理的機能は不明な点が多い。低Ca食飼育ラットの骨や血清ALPが上昇するという報告からも、ALPの役割は単純ではない。

本実験は、骨形成系細胞とALPに及ぼす低Ca環境の影響について検索した。

材料と方法

ラット胎児頭蓋冠由来の骨形成系細胞は胎生18~21日のWistar系ラット頭蓋冠から採取した。培養はBGJ_bならびに α -MEMを用い通法に従い行った。両培養液のCa濃度は、正常培養液(正常)は1.87mM、中程度低Ca培養液(中程度)は1.20mM、低Ca培養液(低Ca)は0.34mMとした。ALP活性は細胞破碎後、測定した。

培養液交換実験は、正常培養液で10日間培養した細胞(対照群)、低Ca培養液で10日間培養した細胞(低Ca群)を基準とし、培養液を正常から低Caに換え培養した細胞群(正常→低Ca:8日→2日、6日→4日、4日→6日)と、低Caから正常に換え培養した細胞群(低Ca→正常:8日→2日、6日→4日、4日→6日)とした。

結果

ラット胎児頭蓋冠由来の骨形成系細胞におけるCa濃度の影響を調べるために、BGJ_b培養液の正常と低Caを用いて細胞を培養した。対照群ならびに低Ca群は培養10日目にconfluenceに達した。この培養期間において、対照群と低Ca群では細胞数、蛋白質量、DNA量に有意な差を認めなかった。

ALP活性に及ぼす培養液のCa濃度の影響を調べると、対照群に比べ中程度群、低Ca群と、培養液のCa濃度に反比例的に有意に高値を示した ($p < 0.001$)。

低Ca環境におけるALP活性の亢進が可逆的な反応か否かを調べるために、正常と低Caを用いて培養液交換実験を行った。培養液を正常から低Caに換えて行った場合、対照群に比べ低Ca環境に換えてからの日数の長さに応じてALP活性値が増大し、それぞれ有意な差が認められ ($p < 0.001$)、低Ca群の値に近づいた。また、培養液を低Caから正常に換えて行った場合、低Ca群に比べ正常環境に換えてからの日数の長さに応じてALP活性値が減少し、それぞれ有意な差が認められ ($p < 0.001$)、対照群の値に近づいた。

次に、ALP活性における低Ca環境の影響と培養日数との関連を調べた。ALP活性は、BGJ_bで培養した細胞において、細胞がconfluenceの時期にあたる培養8～12日目では、対照群に比べ低Ca群で有意に高値を示した ($p < 0.001$)。骨形成系細胞の培養に多く用いられる α -MEMを用いた場合においても同様の結果を示した。細胞の低Ca環境における影響は培養液の種類によらないことを示した。細胞が多層化する時期にあたる培養14日目では、BGJ_bと α -MEMの対照群でALP活性が上昇したが低Ca群では変動せず、両環境間で有意差は認められなくなった。その後、活性は低Ca群に比べ対照群で有意に高値を示した。confluenceの時期以降、細胞増殖は、対照群に比べ低Ca群で低下した。 α -MEMにおいては、培養16日目以降、対照群のALP活性の著しい上昇が認められ、その後、石灰化部位の出現が認められたが、低Ca群では、これらについて認められなかった。細胞をconfluenceの時期までの数日間、低Caで培養した後、正常に替えて培養した場合、ALP活性は対照のレベルまで上昇し、石灰化部位の出現が認められた。

考察

本実験では、ラット胎児頭蓋冠由来の骨形成系細胞とALPに及ぼす低Ca環境の影響について検索した。confluenceの時期までの低Ca環境は、細胞の増殖には重大な影響を与えなかった。この理由として、1) 培養10日目までの対照群と低Ca群において、細胞数、蛋白質量、DNA量に有意な差を認めず、2) 細胞をconfluenceの時期までの数日間、低Caで培養した後、正常に替えて培養した場合、ALP活性は対照群のレベルまで上昇し、石灰化部位の形成が認められることなどが考えられる。一方、低Ca環境下でconfluenceの時期以降も培養した場合、細胞は通常の細胞機能を喪失したように思われた。理由としては、1) 細胞増殖が低下し、2) ALP活性の上昇や、石灰化部位の形成が認められなかったことなどが考えられる。

ALP活性は、培養液のCa濃度に反比例的に有意に高値を示し、その変化は可逆的な反

応であった。これは、低Ca環境に対し、細胞機能を正常に維持するための応答の一つと推測される。

この低Ca環境におけるALP活性の増加は、*in vivo*ならびに*in vitro*の実験と一致している。低Ca食で4週間飼育した実験群ラットの体重が、対照群ラットと同様であるにもかかわらず、実験群ラットの頸骨と椎骨のALP活性と、血清のALP活性が有意に上昇したこと、また、低Ca培養液で培養した新生児ラットの大腿骨のALP活性が有意に上昇し、また、低Ca環境を中止することにより、ALP活性が減少し、対照群の値に近づくことなどの報告がある。しかし、これらの実験において、低CaによるALP活性上昇の機構については実験されていない。我々の実験は、低Ca環境が骨形成系細胞の機能に影響を及ぼし、ALP活性を上昇させたことを示唆している。

低Ca環境によるALPの応答以外の応答について、低Ca環境下培養骨形成系細胞において細胞内Ca量、IP₃量、PKC活性が減少すること、全細胞内Ca量、全ミトコンドリア内Ca量は減少するが、ミトコンドリア内遊離Ca量は減少しないことなどが報告されている。我々はCaがセカンドメッセンジャーとして作用したり、細胞のシグナル伝達を変化させていると推測している。

confluenceの時期以降、 α -MEM対照群において、ALP活性が著しく上昇し、石灰化結節が形成されたが、 α -MEM低Ca群では認められなかった。このことはALPが骨芽細胞様細胞のマーカー酵素であること、石灰化時にALP活性が上昇するという報告と一致する。本実験の結果は、低Ca環境により上昇したALPの役割と石灰化時に上昇したALPの役割が異なることを示唆する。前者は低Caという環境の異常に対し、細胞機能を正常に維持するための補償機構が働いており、後者は石灰化と関与しているかもしれない。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 本 章
副 査 教 授 渡 辺 継 男
副 査 教 授 雨 宮 璋

学 位 論 文 題 名

Effect of a low-Ca environment on alkaline phosphatase activity in embryonic rat calvarial bone cells in culture

(培養ラット胎児頭蓋冠由来骨形成系細胞のアルカリ性ホスファターゼ活性に及ぼす低カルシウム環境の影響)

審査は、審査担当者全員が一同に会し、口頭で行われた。まず論文提出者に研究の概要の説明を求めた。

ラット胎児頭蓋冠由来骨形成系細胞（以下細胞と略す）のアルカリホスファターゼ（ALP）活性に及ぼす低カルシウム（Ca）環境の影響について調べた。細胞を、BGJ_bならびに α -MEMを用いて培養した。両培養液のCa濃度は正常培養液（正常）で1.87mM、中程度低Ca培養液（中程度）で1.20mM、低Ca培養液（低Ca）で0.34mMとした。ALP活性は細胞破碎後、測定した。培養液交換実験は、正常培養液で10日間培養した細胞（対照群）、低Ca培養液で10日間培養した細胞（低Ca群）を基準とし、培養液を正常から低Caに換え培養した細胞群と、低Caから正常に換え培養した細胞群で行った。

その結果、細胞数、蛋白質量、DNA量については対照群と低Ca群の間に有意な差を認めなかった。ALP活性は対照群に比べ、培養液のCa濃度に反比例して有意に高値を示した。培養液交換実験では培養液を正常から低Caに換えて行った場合、対照群に比べ低Caで、また培養液を低Caから正常に換えて行った場合、低Ca群で日数の長さに応じてALP活性値が増大あるいは減少し、それぞれ有意な差が認められた。

細胞がconfluenceの時期にあたる培養8～12日目では、ALP活性は、BGJ_bおよび α -MEMで培養した細胞において、対照群に比べ低Ca群で有意に高値を示した。細胞が多層化する培養14日目では、BGJ_bと α -MEM対照群でALP活性が上昇したが低Ca群では変動せず、両環境間で有意差は認められなくなり、その後、その活性は低Ca群に比べ対照群で有意に高値を示し、両群のALP活性値は逆転した。 α -MEMにおいては、培養16日目以降、対照群のALP活性の著しい上昇が認められ、その後、石灰化結節の形成が認められたが、低Ca群ではそれは認められなかった。

細胞をconfluenceの時期までの数日間、低Caで培養した後、正常に換えて培養した場合、ALP活性は対照値近くまで上昇し、石灰化結節の形成が認められた。

以上考察すると、confluenceの時期まで低Ca環境は、細胞の増殖には重大な影響を与えなかったが、この理由として、1) 培養10日目までの対照群と低Ca群間においては細胞数、蛋白質量、DNA量に有意な差を認められなかったこと、2) 細胞をconfluenceの時期までの数日間、低Caで培養後、正常に換えて培養し続けた場合、ALP活性は対照群のレベルまで上昇し、石灰化結節の形成も認められたことなどが考えられる。一方、低Ca環境下でconfluenceの時期以降も培養した場合、細胞は通常の細胞機能を喪失したように思われたが、理由としては、1) 細胞増殖能が低下したこと、2) ALP活性が上昇しなかったこと、3) 石灰化結節の形成が認められなかったことなどが考えられる。

Confluenceの時期におけるALP活性値は、培養液のCa濃度に反比例的に有意に高値を示し、その変化は可逆的な反応であった。これは、低Ca環境に対し、細胞機能を正常に維持するための応答の一つと推測される。Confluenceの時期以降、 α -MEM対照群において、ALP活性が著しく上昇し、石灰化結節が形成されたが、 α -MEM低Ca群では認められなかった。このことはALPが骨芽細胞のマーカー酵素であること、石灰化時にALP活性が上昇するという報告と一致する。

以上が研究の概要である。

論文提出者の説明に続いて、審査担当者より論文中の記述や各図表に基づき、低Ca環境下における細胞のALP活性亢進の理由、細胞の石灰化する時期になると、 α -MEM対照群ではALP活性は上昇し続け、石灰化結節が認められるが、低Ca群ではそれが上昇せずこの時点でALP活性が両群で逆転した理由、BGJ_b培養液でも、その時期にALP活性値が両群で逆転するが、BGJ_b対照群でALP活性の著明な上昇が認められず、石灰化結節も形成されず、 α -MEMの場合と異なる理由、また細胞内Ca濃度のことなど、本論文内容およびその関連事項、本研究の今後の発展性などについて質問された。

これらの質問に対して論文提出者よりそれぞれ明快かつ適切な解答が得られ、本論文提出者が本研究内容及びその関連分野について十分な理解ならびに知識のあることが確認された。

以上より、本論文提出者は博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。