骨芽細胞様細胞の培養ステージによるチタンプレートへの細胞付着の変化

光 本 和 世

Changes in the attachment of osteoblastic cells to titanium plates at the different stages of culture

Kazuyo MITSUMOTO

Abstract: It is widely accepted that the ability of osteoblastic cells to attach to titanium plates is influenced by many factors. In this study, the author examined whether the initial attachment of osteoblastic cells (MC 3 T 3 -E 1 cells) to titanium plates was affected by the stage of cell differentiation and by pretreatment with transforming growth factor- β (TGF- β).

The cells were divided into four groups according to the stage of culture: stage I (proliferating stage), stage II (preconfluent stage), stage III (confluent stage), and stage IV (nodule-forming stage). Cell attachment was then estimated by crystal violet staining.

The results revealed that cell attachment increased with the advancement of stage. At the final stage (stage IV), however, cell attachment decreased. TGF- β increased cell attachment through de novo protein synthesis. When the effect of TGF- β was compared between stage II and stage III, the cells at stage II were more responsive to TGF- β than those at stage III. These results suggest that the affinity of MC 3 T 3 -E 1 cells to titanium plates may differ according to the stage of differentiation and that this affinity may be modulated by TGF- β .

Key words: osteoblastic cell (骨芽細胞様細胞), titanium plate (チタンプレート), cell attachment (細胞付着), cell differentiation (細胞分化), TGF- β (TGF- β)

緒 言

生体材料を患者に使用する際、材料の性質、形状、あるいは生体への為害性を考慮することは当然のことであるが、生体側の要因も考えなければならない。実際に、患者の年齢や使用部位によって生体材料の適合状態が異なることは日頃経験されるところである。

近年、骨組織中に分化状態の異なる複数の骨芽細胞群が存在することが明らかになってきた^{1, 2)}。また水野ら³⁾は、マウス頭蓋骨由来の MC 3 T 3 -E 1 細胞を培養し、骨芽細胞の分化マーカーの発現と培養状態と

の関連を検討した。その結果、培養ステージによってそれらの発現が異なり、分化状態の異なる骨芽細胞様細胞が培養日数の経過とともに出現することを報告している。これらの所見は、患者の年齢や部位によって骨芽細胞の状態や性状が異なる可能性があることを意味するものと考えられる。

一方、骨組織中には各種のサイトカインが存在し、これらが骨芽細胞の機能を調節しているといわれている⁴⁾。このうち Transforming growth factor- β (TGF- β) は成長因子の 1 つとして知られ、骨基質内に多量に存在する⁴⁾。このサイトカインは、骨組織由来の細胞であっても細胞によりその作用が異なることが知られている^{4, 5)}。したがって、培養ステージの異なる細胞の生体材料の組織適合性に対して、TGF- β がどのような効果をもつのか検討することは、生体材料の臨床応用を考える上で興味深い。

当教室では生体適合性の良いチタンプレートの開発

昭和大学歯学部第二口腔外科学教室

(主任：南雲正男教授)

Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Showa University (Chief: Prof. Masao Nagumo)

受付日：平成 7 年 12 月 20 日

を目指し, *in vitro* の系で骨芽細胞様細胞の適合性について検討してきた。その結果, 細胞はチタンプレートに早期に付着すること, そしてチタンプレート表面の性状により細胞付着率が異なることを明らかにした⁶⁾。そこで今回は, MC3T3-E1細胞を培養し, 培養ステージの異なる細胞を採取し, これらの細胞群の間でチタンプレートへの初期付着に違いがみられるか否かを検討した。さらに, 培養ステージの異なる細胞群に TGF- β を作用させた後細胞を採取し, TGF- β 処理によりプレートへの細胞付着がどのようにに変化するかをあわせて検討した。

実験方法

1. 実験材料と細胞の調製

骨芽細胞様細胞としては, Kodama ら^{7, 8)} が樹立したマウス頭蓋骨由来の MC3T3-E1細胞を, 10%FBS (胎児牛血清; Gibco 社製) を含む α -MEM (Gibco 社製) で継代して使用した。チタンプレートは昭和大学歯学部歯科理工学教室にて作成した $10 \times 10 \times 1$ mm の比較的表面が平滑な (凹凸 $3 \mu\text{m}$ 以内) プレートを使用した^{9, 10)}。

2. 細胞付着の評価

まず, チタンプレートを 10%FBS- α -MEM に浸し, 30 分間 CO_2 インキュベーター内で前処理した。ついで, チタンプレートを 24 穴マルチプルウェルプレート (Corning 社製) のウェルに入れ, 各ウェルに α -MEM で一定数の細胞数に調整した細胞浮遊液 1 ml を加え, 2 時間 CO_2 インキュベーター内に静置した。その後, チタンプレートを 2 ml のリン酸緩衝液 (PBS) で 2 回洗浄して非付着細胞を除去した後, 新しい 24 穴マルチプルウェルプレートのウェル内にチタンプレートを移して細胞付着を評価した。細胞付着の評価は, Zacharchuk らの方法¹¹⁾ に準じて行った。すなわち, チタンプレートを 2%エタノールに溶解した 0.2%クリスタルバイオレット (和光純薬) 0.5 ml で覆って 30 分間放置した後, 過剰のクリスタルバイオレットを PBS にて洗浄除去 (2 ml/ウェル 5 回) した。その後, 1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS, 和光純薬) 溶液を 1 ml 加えて軽く振動しながら室温に 1 時間放置し, 細胞を染めたクリスタルバイオレットを溶解し, 540 nm にて吸光度を測定して細胞付着を評価した。

3. TGF- β の効果の検討

$1 \times 10^5 / 4 \text{ ml}$ に調製した MC3T3-E1細胞を底面積 25 cm^2 のフラスコ (Falcon 社製) にまき, 培養液を 2 日おきに交換し, サブコンフルエントになった細胞に TGF- β を添加してその効果を検討した。すなわち, 細胞を α -MEM で洗浄した後, 2%FBS- α -MEM を加えて各種濃度の TGF- β (宝酒造株式会社) を添加した。24 時間および 48 時間後 0.25%trypsin-

図1 培養日数による細胞数の変化

0.02% EDTA (共に sigma 社製) 処理により細胞を回収し, α -MEM で細胞を懸濁してチタンプレート上にまいて細胞付着を検討した。また, TGF- β の作用が蛋白合成を介しているかどうかを確認するため, 一部の試験では TGF- β とともにシクロフォスアミド (sigma 社製) を添加した。

4. 細胞の培養ステージによる反応性の変化

$1 \times 10^5 / \text{ml}$ の細胞を底面積 25 cm^2 のフラスコにまき, 経時的に 0.25%trypsin-0.02% EDTA 処理して細胞を剥し, 細胞数をカウントして増殖曲線を作成した (図1)。増殖曲線から細胞の状態をステージ I (増殖期), ステージ II (コンフルエント直前の時期), ステージ III (コンフルエントの時期), ステージ IV (結節を形成し始める時期) に分けて, それぞれのステージの細胞を回収し, 細胞のチタンプレートへの付着を検討した。また, ステージ II および III については TGF- β を添加し, 細胞付着におよぼす TGF- β の効果についてあわせて検討した。

なお, 結果については t 検定処理を行い有意差を検定した。

結果

1. クリスタルバイオレットによる細胞付着の評価

サブコンフルエントの MC3T3-E1細胞のチタンプレートへの付着を, 反応時間を 1 時間から 6 時間と変えて検討したところ, 培養時間とともに細胞付着が増加した (図 2-a)。また, 反応時間を一定 (2 時間) にして細胞数を $1 \times 10^5 / \text{ml}$, $2 \times 10^5 / \text{ml}$, $4 \times 10^5 / \text{ml}$ と変えて検討したところ, 細胞数の増加とともに細胞付着が増加した (図 2-b)。そこで, 以下の実験では反応時間を 2 時間とし, プレートあたり $1 \times 10^5 / \text{ml}$ から $2 \times 10^5 / \text{ml}$ の細胞数を用いて行った。

2. 細胞の培養ステージによる細胞付着の変化

各ステージの細胞を採取してチタンプレートへの細胞付着について検討した。その結果, ステージが I か

図2 a. 反応時間による細胞付着の変化. 細胞数は 2×10^5 /ウェル/1 ml. 実験は $n=5$, 結果は Mean $\pm$ SD.

b. 細胞数による細胞付着の変化. プレートへの付着時間は2時間. 実験は $n=5$, 結果は Mean $\pm$ SD.

らⅢと進むにつれて細胞付着が増加した. しかし, ステージⅣになると細胞付着は減少した(図3).

3. TGF- β の効果

500pg/ml および 5000pg/ml の濃度の TGF- β をそれぞれ24時間および48時間作用させた後 MC3T3-E1細胞を回収し, チタンプレートへの細胞付着を検討した. 24時間作用させた場合には明らかな TGF- β の効果はみられなかったが(図4-a), 48時間作用させた細胞においては濃度依存的にチタンプレートへの細胞付着が増加した(図4-b). とくに 5000pg/ml では, 24時間作用させた場合に比べて有意な増加を示した. このチタンプレートへの細胞付着の増加は, シクロホスファミドを作用させると濃度依存的に抑制された(図5).

図3 MC3T3-E1細胞の各培養ステージにおける細胞付着. 細胞数は 1×10^5 /ウェル/1 ml, プレートへの付着時間は2時間. 実験は $n=5$, 結果は Mean $\pm$ SD. * $P<0.05$ (ステージⅠに対して)

図4 TGF- β の細胞付着に対する効果. 細胞数は 1×10^5 /ウェル/1 ml.

a. TGF- β を24時間作用させた後の細胞付着.

b. TGF- β を48時間作用させた後の細胞付着. プレートへの付着時間は2時間. 実験は $n=5$, 結果は Mean $\pm$ SD. * $P<0.01$ (TGF- β 無添加に対して)

図5 シクロホスファミドの効果. TGF- β と同時に48時間シクロホスファミドを添加. 細胞数は 1×10^5 /ウェル/1 ml, プレートへの付着時間は2時間. 実験はn=4, 結果はMean $\pm$ SD. * $P < 0.01$ [TGF- β 5000pg/ml, シクロホスファミド (-) に対して]

次に細胞の培養ステージでTGF- β の効果が異なるかいないかを検討した. ステージIIのコンフルエント直前の時期ではTGF- β を作用させると細胞付着能が増加したが, ステージIIIのコンフルエントの時期ではこのような効果はみられなかった(図6). また, ステージIVでもステージIII同様にTGF- β の効果はみられなかった. なお, ステージIについては細胞は増殖期にあり, TGF- β の効果を検討するには細胞の収集率が悪く, かつ結果も一定でなかったので割愛した.

考 察

近年チタン材料は生体為害性がなく, 適合性が良いことから人工歯根材料, 骨接合材, および顎骨補填材として高頻度で使用されている. しかし, 症例によっては動揺あるいは感染などをきたし, 埋入したものを除去しなければならないことがある. 生体為害性がなく, 適合性が良いにもかかわらず, 満足な結果が得られない原因のひとつとして, 材料を受け入れる生体側に対する評価が十分にされていないことがあげられる. Chang ら¹²⁾は, 脱灰骨を年齢の異なるラットに移植して骨誘導能を検討したところ, 老齢化した動物では著しく骨誘導能が低下していることを明らかにした. さらに代田ら¹³⁾も, 加齢によりヒドロキシアパタイトと骨の結合が低下することを報告している. これらの結果は, 骨組織に存在する骨芽細胞の機能が加齢により変化し, 骨形成能および結合能が低下したことによるものと推測される. 山口^{1, 2)}は, 骨組織に分化状態が異なる多くの種類の骨芽細胞様細胞が存在すると述

図6 ステージIIおよびステージIIIの細胞に対するTGF- β の効果. 細胞数は 1×10^5 /ウェル/1 mlでTGF- β 2000pg/mlを48時間作用させた. プレートへの付着時間は2時間. 実験はn=6, 結果はMean $\pm$ SD. * $P < 0.05$ (TGF- β 無添加に対して)

べている. さらに腰原ら¹⁴⁾は, 外科処置時に採取した各種年齢層の骨組織から骨芽細胞様細胞を分離し, 骨芽細胞としての分化マーカーを検索したところ, 年齢層によりマーカーの反応性が異なることを示した. さらに角田ら¹⁵⁾も, 複数の骨芽細胞様細胞を用いて放射線の感受性を検討し, 細胞の種類により感受性が異なることを報告している. したがって, チタンの臨床応用を考える上で分化状態の異なる骨芽細胞様細胞とチタンプレートとの適合性を検討することは重要であると思われる.

MC 3 T 3-E 1細胞は, マウス頭蓋骨より分離され, 培養を続けていくと骨芽細胞としての形質を発現する細胞株である⁷⁾. この細胞はコンフルエントに達するとコラーゲンやプロテオグリカンなどの骨基質を合成するとともに, アルカリフォスファターゼ (AL-pase) 活性を発現するようになる. MC 3 T 3-E 1細胞のAL-pase活性は, 培養日数の経過とともに上昇し, プラトーに達すると細胞周辺に石灰化がみられるようになり, 最終的には骨組織が形成される⁸⁾. そのほかの骨芽細胞としての分化マーカーの発現もステージにより異なることが報告されている³⁾. そこで著者は, MC 3 T 3-E 1細胞の培養ステージを4段階に分けて細胞を集め, チタンプレートへの付着能を検討した. その結果, ステージIIおよびステージIIIにおいて他のステージに比較して高い付着能を有することが判明した. これらの時期は, それぞれAL-pase活性の発現が認められる前の時期(ステージII)とその活性が発現し, 次第に上昇していく時期(ステージIII)に相当する. 一方, 細胞分裂の盛んな時期(ステージI)および結節が形成され石灰化が開始する時期(ステージIV)の細胞は, プレートへの付着能が低いことが示された. これらの結果は, 骨芽細胞の分化状態によりチタン

レートへの細胞付着能が異なることを示唆しているものと考えられる。

骨基質内に多量に存在する TGF- β は、骨代謝における局所の骨形成調節因子として注目されているサイトカインのひとつである。このサイトカインを *in vivo* で幼若動物に局所投与すると骨形成を促進するとの報告があるが^{16, 17)}、逆に骨吸収にも関与しているとの報告¹⁸⁾もある。そこで、TGF- β を骨芽細胞様細胞に作用させ、細胞付着がどのように変化するかを検討した。その結果、48時間 TGF- β を細胞に作用させたところ、濃度依存的にチタンプレートへの細胞付着能が上昇した。この TGF- β の効果は、シクロホスファミドにより完全に消失した。このことより、TGF- β による細胞付着能の増強には *de novo* の蛋白合成が必要であること、そのためには24時間以上の時間が必要とされることが推察された。この蛋白がどのようなものであるのかは今回の研究からは不明であるが、おそらくチタンプレートへの細胞付着に関与しているものと考えられる。

次に細胞の培養ステージにより、TGF- β への反応性に違いがみられるか否かを検討した。その結果、ステージⅡのコンフルエント直前の細胞は、TGF- β に反応して細胞付着能が上昇した。この結果は、培養ステージによって細胞の TGF- β への反応性が異なることを示している。何故コンフルエント直前の細胞が TGF- β に反応を示し、コンフルエントになると反応を示さなくなるかについては今回の実験からは明らかでない。竹内ら¹⁹⁾ は、MC3T3-E1細胞の分化と TGF- β の作用との関係について検討し、培養1週目すなわち AL-pase が上昇する前のステージの細胞では TGF- β に反応してプロテオグリカンの合成が促進するが、AL-pase 活性が上昇する時期ではその反応性がほとんどみられないことを明らかにした。そこで、TGF- β の受容体を検討したところ、培養初期では MC3T3-E1細胞の細胞膜に TGF- β の受容体が発現しているが、培養2週目に入るとそれが著明に減少することを示した。本研究でも AL-pase 活性が上昇するステージでは、TGF- β の効果がみられなかった。したがって、ステージⅢすなわちコンフルエントの状態の細胞で TGF- β 処理によりチタンプレートへの細胞付着の増加がみられなかったのは、TGF- β の受容体が減少したことによって TGF- β の反応性が低下したことによると推測されるが、これについては今後検討の必要がある。

近年、高齢化社会を迎えて骨粗鬆症患者数が増加している。これらの患者では骨形成の低下がみられるが、その理由として加齢に伴う骨成長因子の合成の低下、あるいは成長因子に対する骨芽細胞の反応性の低下、さらに骨基質蛋白の合成の低下が関与している可能性が示唆されている^{12, 20)}。このことと本研究の結果を考

え合わせると、今後生体材料の適合性を検討する際には、使用される生体側の条件を考慮して行うことが重要になってくるものと考えられる。

結 語

骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1細胞の培養ステージの違いによるチタンプレートへの初期付着の変化と細胞付着に対する TGF- β の効果について検討した。その結果、次のような所見が得られた。

1. MC3T3-E1細胞のチタンプレートへの付着は培養時間とともに、また細胞数が増すとともに増加した。

2. MC3T3-E1細胞の培養ステージをステージⅠ(増殖期)、ステージⅡ(コンフルエント直前の時期)、ステージⅢ(コンフルエントの時期)、ステージⅣ(結節を形成し始める時期)に分けてチタンプレートへの細胞付着能を検討したところ、細胞付着能はステージⅠからⅢに進むにつれて上昇したが、ステージⅣになると逆に低下した。

3. TGF- β をサブコンフルエントの MC3T3-E1細胞に作用させたところ、24時間では明らかな効果は見られなかったが、48時間作用させた細胞ではチタンプレートへの細胞付着能が濃度依存的に上昇した。

4. TGF- β 効果による細胞付着能の上昇は、シクロホスファミドを作用させると完全に抑制された。

5. 細胞の各培養ステージで TGF- β の効果を検討したところ、ステージⅡでは TGF- β の効果が認められたが、ステージⅢではほとんど効果はみられなかった。

以上の結果から、骨芽細胞様細胞の培養ステージによりチタンプレートへの細胞の初期付着能に違いがあること、および細胞に TGF- β を作用をさせると細胞付着能が上昇することが明らかになった。さらに、細胞の培養ステージにより TGF- β の効果が異なることが判明した。

謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導および御校閲を賜った昭和大学歯学部第二口腔外科学教室南雲正男教授に深甚の謝意を表します。またご指導いただいた角田左武郎助教授ならびに第二口腔外科学教室各位に心よりお礼申し上げます。

引 用 文 献

- 1) 山口 朗: 骨芽細胞の起源と分化. *BIO-medica* 8: 23-27 1993.
- 2) Yamaguchi, A., Kahn, A.J.: Clonal osteogenic cell lines express myogenic and adipocytic developmental potential.

- Calcif Tissue Int 49: 221-225 1991.
- 3) 水野守道, 久保木芳徳: 骨芽細胞の分化における Osteocalcin, Osteonectin, そして Osteopontin 遺伝子の発現について. 日骨代謝誌 10: 21-29 1992.
 - 4) 野田政樹: TGF- β ファミリーと骨代謝. 実験医学 8: 345-350 1990.
 - 5) 山口 朗, 池田 通, 他: 骨芽細胞の培養. 組織培養 15: 155-159 1989.
 - 6) 小野寺滋也, 角田左武郎, 他: 骨芽細胞様細胞のチタンプレートへの初期附着について. 口科誌 44: 160-165 1995.
 - 7) Kodama, H., Amagi, Y., et al.: Establishment of a clonal osteogenic cell line from newbone mouse calvaria. Jpn J Oral Biol 23: 899-901 1981.
 - 8) Sudo, H., Kodama, H., et al.: In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newbone mouse calvaria. J Cell Biol 96: 191-198 1983.
 - 9) 稲用隆史: チタンの放電加工に関する研究. 歯科材料・器械 7: 606-621 1988.
 - 10) 鈴木利彦, 藤森伸也, 他: リン酸電解溶液中でのチタンの放電陽極酸化処理に関する研究. 昭歯誌 12: 134-146 1992.
 - 11) Zacharchuk, C.M., Drysdale, B., et al.: Macrophage-mediated cytotoxicity: Role of a soluble macrophage cytotoxic factor similar to lymphotoxin and tumor necrosis factor. Proc Natl Acad Sci 80: 6341-6345 1983.
 - 12) Chang, C., Gendler, E., et al.: Age dependence of bone matrix induced bone formation. Ornoy, A., Harell, A., et al.: Current advances in skeletogenesis. Elsevier Science Publishers, New York, 1985, P27-32.
 - 13) 代田達夫, 大野康亮, 他: 加齢がヒドロキシアパタイトと骨との結合に及ぼす影響について. 日口外誌 38: 41-47 1992.
 - 14) 腰原康子: ヒト骨芽細胞機能と老化. Gerontology 4: 413-419 1992.
 - 15) 角田左武郎, 濱崎美樹, 他: 骨芽細胞様細胞のチタンプレートへの初期附着におよぼす放射線の影響. 口科誌: 45: 136-142 1996.
 - 16) Joyce, M.e., Roberts, A.B., et al.: Transforming growth factor- β and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. J Biol Chem 110: 2195-2207 1990.
 - 17) Noda, M. and Camilliere, J.J.: In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor- β . Endocrinology 124: 2991-2994 1989.
 - 18) Tashjian, A.H., Voelkwl, E.F., et al.: α and β Transforming growth factors stimulate prostaglandin production and bone resorption in cultured mouse calvaria. Medical Sciences 82: 4535-4538 1985.
 - 19) 竹内靖博, 福本誠二, 他: 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の分化に伴う TGF- β 受容体および作用発現の減少に対する Collagen の役割. 日骨代謝誌 12: 92 1994.
 - 20) 松本俊夫: 骨代謝の調節機構と骨粗鬆症の病態生理に関する研究. 日骨代謝誌 12: 130-135 1994.