

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

鳥居 亮太

論文題目

チタン上で培養した非肥満型2型糖尿病ラット骨髄
由来骨芽細胞様細胞の増殖、分化に関する研究

I. 緒言

歯科医療におけるインプラント治療は近年、適応症例の拡大や困難な症例での良好な予後が求められるようになってきた。糖尿病はインプラント治療のリスクファクターであり、インプラント治療が困難と言われている。そこで本研究では、日本人に多いとされる非肥満型 2 型糖尿病のモデルである Goto-Kakizaki (GK) ラット骨髄由来骨芽細胞様細胞を用いて、異なる表面処理を施したチタンディスク上で培養し、糖尿病患者へのインプラント治療の可能性について病理生化学的に検討した。

II. 材料および方法

1. チタンディスクと表面処理

チタンは厚さ 1 mm、直径 20 mm の第 2 種純チタンディスク (機械研磨) を使用した。機械研磨に 67% 硫酸を 120°C、75 秒間反応させ酸処理を行ったもの (硫酸処理) と、40% フッ化水素酸を室温、30 秒間反応させ酸処理を行ったもの (フッ化水素酸処理) を用いた。3 種類のチタンディスクの表面性状は、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察を行った。

2. 細胞培養

8 週齢雄性 GK ラット (糖尿病群)、および同週齢の雄性 Wistar/ST ラット (対照群) を用い、エーテル吸入麻酔下にて屠殺し、大腿骨から間葉系幹細胞を採取した。採取した細胞は低グルコースの α -MEM 分化誘導培地を用いて培養を行い、細胞を 1×10^4 cells/cm² の濃度で 3 種のチタン上に播

種して培養を行った。

3. 血糖値の測定

屠殺前に対照群と糖尿病群のラット尾静脈より血液を採取し、血糖値を測定した。

4. 細胞数

培養 1、3 日目に細胞数を計測した。

5. Alkaline Phosphatase (ALP) 染色

培養 3、7、14 日目に ALP 染色を行い、染色後のチタンディスクを撮影し、得られた画像データについて ImageJ を用いて解析し、染色された面積率をもって陽性率とした。

6. von Kossa 染色

培養 14、21、28 日目に von Kossa 染色を行った。染色後のチタンディスクを撮影し、得られた画像データについて ImageJ を用いて解析し、染色された面積率をもって陽性率とした。

7. SEM による石灰化結節の観察

培養 21、28 日目に SEM にて石灰化結節を観察した。

8. Real-time PCR による遺伝子解析

培養 1、3、7、14、21 日目に機械研磨、フッ化水素酸処理について Real-time PCR 法を用いて遺伝子発現の検索を行った。Alkaline Phosphatase、Collagen I、Osteopontin、Osteocalcin、Runx2、Osterix、

18S rRNA について Real-time PCR を行った。目的遺伝子の発現量は、18S rRNA の発現量により補正した。

9. 統計分析

結果により得られた各データは、統計学的解析として Student' s t-test を行い、有意水準を 5% とした。

III. 結果

1. チタンディスク表面像

機械研磨では平滑な面に切削溝がみられ、硫酸処理では微小な孔を形成した粗面となっており、フッ化水素酸処理ではくさび状の窪みがみられた。

2. 血糖値

屠殺前のラットの平均血糖値は、糖尿病群は対照群に比べて有意に高かった。

3. 細胞数

機械研磨における細胞数は、培養 1 日目では糖尿病群は対照群より少なく、有意な差を認めたが、培養 3 日目では糖尿病群は対照群より有意に多かった。

硫酸処理における細胞数は、培養 1、3 日目ともに糖尿病群と対照群で有意な差はなかった。

フッ化水素酸処理における細胞数は、培養 1、3 日目ともに糖尿病群と

対照群で有意な差はなかった。

また、表面処理の違いによる細胞数の比較を行ったところ、培養 1、3 日目それぞれにおいて、対照群、糖尿病群ともに機械研磨での細胞数は硫酸処理、フッ化水素酸処理よりも有意に多かった。

4. ALP 染色

機械研磨の ALP 染色陽性率は、培養 3 日目では糖尿病群は対照群より有意に低かった。培養 7 日目では糖尿病群は対照群より有意に低かった。しかし、培養 14 日目では糖尿病群は対照群より有意に高かった。

硫酸処理の ALP 染色陽性率は、実験期間を通して糖尿病群と対照群の陽性率に有意な差はみられなかった。

フッ化水素酸処理の ALP 染色陽性率は、実験期間を通して糖尿病群は対照群より有意に低かった。

培養 3 日目の ALP 染色における単位細胞当たりの ALP 活性は、機械研磨では糖尿病群は対照群より有意に低かった。硫酸処理では糖尿病群、対照群に有意差はみられなかった。フッ化水素酸処理では糖尿病群は対照群より有意に低かった。

5. von Kossa 染色

機械研磨の von Kossa 染色陽性率は、培養 14 日目において糖尿病群では対照群より有意に低かったが、培養 21、28 日目において対照群とほぼ同等を示した。

硫酸処理の von Kossa 染色陽性率は、培養 14、21、28 日目のいずれにおいても糖尿病群、対照群に有意差はなかった。

フッ化水素酸処理の von Kossa 染色陽性率は、培養 14、21、28 日目のいずれにおいても糖尿病群は対照群より有意に低かった。

6. SEM による石灰化結節の観察

培養 21 日目における石灰化結節数は、機械研磨において糖尿病群では対照群よりわずかに少ない程度であった。硫酸処理では、糖尿病群は対照群に比べて小さかった。フッ化水素酸処理では、糖尿病群は対照群に比べて少なく、小さかった。培養 28 日目における石灰化結節数は、機械研磨では糖尿病群は対照群とほぼ同等であった。硫酸処理、フッ化水素酸処理では、糖尿病群は対照群に比べて少なく、小さかった。

7. Real-time PCR による遺伝子解析

1) Alkaline Phosphatase

機械研磨での相対発現量は、培養 1、3 日目において糖尿病群は対照群より有意に低く、培養 14 日目において糖尿病群は対照群より有意に高かった。

フッ化水素酸処理での相対発現量は、培養 1、3、7、14 日目において糖尿病群は対照群より有意に低かった。

2) Collagen I

機械研磨での相対発現量は、培養 1、3 日目において糖尿病群は対照群

より有意に低く、培養 14 日目において糖尿病群は対照群より有意に高かった。

フッ化水素酸処理での相対発現量は、培養 1、3、7、14 日目において糖尿病群は対照群より有意に低かった。

3) Osteopontin

機械研磨での相対発現量は、培養 1、3、7、14 日目において、糖尿病群は対照群より有意に高かった。

フッ化水素酸処理での相対発現量は、培養 1、3 日目で糖尿病群は対照群より有意に高く、培養 14 日目になると糖尿病群は対照群より有意に低かった。

4) Osteocalcin

機械研磨での相対発現量は、培養 7 日目において糖尿病群は対照群より有意に低く、培養 14 日目において糖尿病群は対照群より有意に高かった。

フッ化水素酸処理での相対発現量は、培養 7、14、21 日目において糖尿病群は対照群より有意に低かった。

5) Runx2

機械研磨での相対発現量は、培養 1、3 日目において糖尿病群は対照群より有意に低く、培養 14 日目において糖尿病群は対照群より有意に高かった。

フッ化水素酸処理での相対発現量は、培養 1、3、21 日目において糖尿

病群は対照群より有意に低かった。

6) Osterix

機械研磨での相対発現量は、培養 1、3 日目において糖尿病群は対照群より有意に低く、培養 7、14 日目において糖尿病群は対照群より有意に高かった。

フッ化水素酸処理での相対発現量は、培養 1、7、14 日目において糖尿病群は対照群より有意に低かった。

IV. 考察

機械研磨における細胞数は、培養 1 日目において糖尿病群は対照群より有意に少なかったが、培養 3 日目において有意に多くなった。これは、培養 3 日目では低グルコース培養液で培養することによって増殖抑制が軽減し、細胞増殖能が高くなったと考えられた。

培養 1、3 日目において機械研磨での対照群における細胞数は、硫酸処理、フッ化水素酸処理よりも多かった。これは、チタン上での骨芽細胞様細胞における *in vitro* の実験系では機械研磨において増殖能は促進されるものと考えられた。

ALP 染色、von Kossa 染色の結果は、実験期間を通して糖尿病群、対照群ともに機械研磨における陽性率が硫酸処理、フッ化水素酸処理と比べて高かった。これは、*in vitro* における実験では機械研磨において酸処理を施した表面よりも骨芽細胞様細胞の分化、石灰化が促進されるものと考えら

れた。

機械研磨における ALP 染色および遺伝子発現は、培養 14 日目で糖尿病群は対照群よりも高かった。これは、本実験では低グルコースの培養液を使用していることから、糖尿病における分化抑制の影響が弱くなっているためと考えられた。

糖尿病群の ALP 染色および遺伝子発現と石灰化の関係については、Runx2 の分化抑制作用により、培養 14 日目において石灰化は対照群とほぼ同等になったものと考えられた。

酸処理での分化能については、すべての実験で糖尿病群は対照群よりも陽性率、発現量は低かった。このことは糖尿病群ではチタンの表面性状によって骨芽細胞の増殖能および分化能が異なっているものと考えられた。

V. まとめ

GK ラット骨髄由来骨芽細胞様細胞は、チタンの表面処理方法の選択や低グルコースの培養液を使用することによって増殖、分化を促進させることが可能であると考えられた。