

論文の内容の要旨

氏名：安 川 拓 也

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Osteogenic gene expression induced by mineral trioxide aggregate

via calcium-sensing receptor in murine MC3T3-E1 cells

（骨芽細胞における calcium-sensing receptor を介した mineral trioxide aggregate による骨形成遺伝子発現）

ケイ酸カルシウムを主成分とした歯内療法用セメント mineral trioxide aggregate (MTA) は、生体親和性、辺縁封鎖性および硬組織形成促進作用に優れた材料として知られている。そのため、本セメントの適応範囲は、逆根管充填、穿孔封鎖、直接覆髄およびアペキシフィケーションなど多岐にわたっており、近年では失活した根未完成歯に対する pulp revascularization への応用も試みられている。また、MTA の臨床的有用性を裏付ける基礎的研究が多数行われている。著者の所属する講座では、本セメントの生物学的作用の解明を目的とし、*in vitro* および *in vivo* における MTA の硬組織形成促進作用に関する研究を継続的に行っており、これまで、MTA から遊離するカルシウムイオン (Ca^{2+}) がヒト歯髄細胞の遊走と増殖を促進させること、未分化間葉系細胞においては L 型電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介して骨芽細胞への分化を促進させることなどを報告してきた。これらのことから、MTA から遊離する Ca^{2+} は本材の生物学的作用と深く関与していることが推察される。

カルシウム感受性受容体 (calcium-sensing receptor: CaSR) は、副甲状腺細胞膜や腎尿細管上皮に存在する 7 回膜貫通型 G タンパク共役受容体であり、細胞外 Ca^{2+} 濃度の変化を感知し血中 Ca^{2+} 濃度の恒常性維持を担っている。さらに、本受容体は骨芽細胞膜上にも発現しており、細胞外 Ca^{2+} 濃度の上昇を同様な機構で感知し、骨芽細胞の遊走、増殖および分化を促進させることが報告されている。

そこで著者は、MTA から遊離する Ca^{2+} が CaSR を介して骨芽細胞の分化に影響を及ぼすのではないかと考え、MTA 存在下で骨芽細胞を培養し、骨形成関連遺伝子と CaSR の発現について *in vitro* で解析した。

被験材料は MTA として Dentsply 社製の ProRoot MTA、細胞には骨芽細胞のモデルとしてマウス頭蓋冠由来株化骨芽細胞である MC3T3-E1 細胞を用いた。MTA は製造者指示通りに混和後、直径 9.0 mm、厚さ 3.0 mm のペレット状に調製し、37°C、湿度 100% の条件下で 24 時間硬化させた後、 α -minimum essential medium (α -MEM) 中に 3 日間浸漬した。MC3T3-E1 細胞は、10% fetal bovine serum を含む 1% penicillin-streptomycin solution 添加 α -MEM 中で、6 穴 plate (2×10^4 個/well) を用いて培養した。細胞が plate に生着後、メンブレンフィルター (pore size: 3.0 μm) 上に MTA ペレットが静置された cell culture insert を plate 上部に設置し、3 日間培養した。なお、MTA ペレットを静置せず cell culture insert のみ設置した MC3T3-E1 細胞を control とした。

本実験系における MTA の生体親和性は、培養 1, 2 および 3 日目における細胞数と alkaline phosphatase (ALP) の遺伝子発現にて検討した。細胞数の測定は Cell Counting Kit-8 (同仁化学) を用いて測定し、ALP の遺伝子発現は real-time PCR 法を用いて mRNA レベルで検索した。次に同様の培養条件下で runt-related transcription factor 2 (Runx2)、type I collagen および CaSR の遺伝子発現とタンパク発現について、real-time PCR 法と enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いてそれぞれ検索した。また、本培養系における MTA からの遊離 Ca^{2+} 濃度変化については、Calcium E-test Wako (和光純薬) を用いて測定した。さらに、MTA から遊離した Ca^{2+} の CaSR を介した骨形成遺伝子発現への影響について、MTA 存在下で Ca^{2+} キレート剤であるグリコールエーテルジアミン四酢酸 (EGTA) および CaSR アンタゴニストである NPS2143 を添加した α -MEM にて細胞培養し、同様の方法で解析した。

その結果、MTA を設置した MC3T3-E1 細胞の細胞数と ALP の遺伝子発現は、培養 1 および 2 日目において control と有意差は認められなかったが、培養 3 日目で有意に上昇し、本実験系における MTA

の高い生体親和性を確認した。また、Runx2, type I collagen および CaSR の遺伝子発現とタンパク発現は MTA 存在下で control より有意に増加した。また、本培養系における MTA からの遊離 Ca^{2+} 濃度は経時的に増加し、培養 3 日目で約 2.5 mM まで上昇した。さらに EGTA および NPS2143 を α -MEM に添加することによって、MTA 存在下で上昇した Runx2, type I collagen および CaSR の遺伝子発現は control レベルまで減少した。

以上のことから、MTA から遊離する Ca^{2+} は MC3T3-E1 細胞に存在する CaSR の発現を増強させながら本受容体を介して骨形成遺伝子発現を促進させることが示唆された。本研究より、MTA の生物学的作用の一端が明らかとなり、本セメントの高い臨床的有用性を裏付けるものと考えられた。