

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25670812

研究課題名(和文)石灰化に影響する微量元素ホウ素の骨芽細胞増殖・分化にはCaイオンチャネル系が関与

研究課題名(英文) Boron accelerates cultured osteoblastic cell activity through calcium flux

研究代表者

林 善彦 (HAYASHI, Yoshihiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：20150477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：低濃度、0.1 mMのホウ素の培養骨芽細胞への影響を検討した。細胞の増殖・分化に関しては、マイクロアレイ、RT-PCRを使って検討し、確認した。次に、ホウ素の細胞膜への直接的な影響を証明するため、Caイオンの流入、排出に関与する、それぞれCaチャネル、Na⁺/K⁺-ATPaseに対する作用をCa結合蛍光色素を使って蛍光強度を相対的に比較した。その結果、いずれの場合も、ホウ素を添加することによって特異的な抑制剤の作用を減弱させることが明らかとなった。したがって、ホウ素は細胞膜を安定化することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the effects of 0.1 mM of boron (B) on the membrane function of osteoblastic cells in vitro. The Ca²⁺ flux was evaluated for the activation of L-type Ca²⁺ channel for the Ca²⁺ influx, and that of Na⁺/K⁺-ATPase for the Ca²⁺ efflux. A real-time PCR analysis revealed that the expression of four mineralization-related genes was increased with a B-supplemented medium. Using microarray analyses, five genes involved in cell proliferation and differentiation were up-regulated. Regarding the Ca²⁺ influx, in the nifedipine-pretreated group, the relative fluorescence intensity for one min after adding B solution did not increase compared with that for one min before addition. Regarding the Ca²⁺ efflux, in 0.1 mM of B-supplemented medium, the relative fluorescence intensity for 10-min after ouabain treatment revealed a significantly lower slope value. B promotes the proliferation and differentiation of mammalian osteoblastic cells in vitro.

研究分野：齶蝕学、細胞生物学

キーワード：Caイオンの移動 細胞増殖 細胞分化 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) ホウ素 (B) が高等動物の骨石灰化に有益であるということは、1981 年 Hunt と Nielsen によって報告されたのが初めてである。

(2) 骨代謝と密接に関係する Ca イオンのシグナリングと代謝におよぼす B の影響は、これまで植物に対して主に検討が加えられてきた。

2. 研究の目的

(1) 低濃度の B によって培養骨芽細胞の増殖と分化が促進される機序を明らかにする。

(2) この目的のため、骨芽細胞における Ca 代謝と関連する遺伝子の発現増強を確認後、細胞膜機能に注目して解析を加えた。

3. 研究の方法

(1) B は和光より購入し、 α -MEM 培地で溶解ののち、 $0.2 \mu\text{m}$ のフィルターにて濾過滅菌を行った。実験では、 0.1mM の B 濃度を用いた (引用文献)。

(2) 培養細胞の調整

NOS-1 細胞 (ヒト骨肉腫由来の株化骨芽細胞) を 60mm のシャーレに 5×10^5 個となるよう播種した。培地は 10% FBS 添加 α -MEM を使用し、細胞は 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培養器内で継代培養したものを使用した。

(3) RT-PCR とマイクロアレイのための全 RNA の抽出

60mm のシャーレに 5×10^5 個となるよう播種したのち、3 日間培養した。細胞は TRIzol 試薬を使って回収したのち、SV Total RNA 分離システムを使って RNA を抽出・精製した。

(4) 石灰化関連遺伝子発現の RT-PCR による確認

石灰化関連遺伝子として、アルカリフォスファターゼ (ALP)、オステオポンティン (OPN)、オステオカルシン (OCN)、骨シアロプロテイン (BSP) の 4 つに着目した。RT-PCR 実験は引用文献 に準じて実施した。

(5) 細胞の増殖と分化に関連する遺伝子のマイクロアレイによる解析

cRNA の増幅、ラベルは GeneChip[®] WT Terminal labeling and Control Kit (Affymetrix, USA) を使って行った。Affinity Human Genome U133 Plus 2.0 array ($47,000$ 転写産物) へのハイブリダイゼーションはメーカーの指示書どおりに実施した。反応後の相対的なハイブリダイゼーション強度は Affymetrix

Expression Console[™] で計測した。

(6) マイクロアレイ後の RT-PCR
今回の方法(4)に準じて行った。

(7) Ca^{2+} イオンの細胞への出入実験における細胞培養

ガラスボトムカルチャーディッシュ (FluoroDish[™], Dish 35mm , Glass Thickness 0.17mm , World Precision Instruments, Inc., USA) に 3×10^5 個の細胞を播種し、血清なしの状態での 3 日間培養した。 Ca^{2+} の流入実験では、 $10 \mu\text{M}$ のニフェジピン (L 型 Ca^{2+} チャネル阻害剤) を Fluo 4-AM 負荷前に培地へ添加した。次に、 Ca^{2+} の排出実験 (細胞膜の Na^+/K^+ -ATPase に注目) では、 6×10^5 個の細胞を播種し、血清なしの状態での 3 日間培養した。

(8) Fluo 4-AM 負荷

細胞内 Ca イオンを観察のため、蛍光色素 Fluo 4-AM を低ナトリウム HEPES 緩衝液へ加え細胞を 15 分間培養した。

(9) 共焦点レーザー顕微鏡観察

共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS SL, ドイツ) 観察はすべて、顕微鏡ステージ上にセットされた Okolab S.r.l. 社製 (イタリア) の炭酸ガス培養器 (H301-TC1-HMTC) 内にて行った。 Ca^{2+} の流入実験では、 $10 \mu\text{M}$ のニフェジピンで事前処理群、非処理群とも、 0.1mM の B を滴下前後 1 分間の Ca 蛍光強度を記録した。 Ca^{2+} の排出実験では、 0.1mM の B を培地へ添加、非添加群とも 0.5mM の ouabain (Sigma, USA) を加えた HEPES 緩衝液での計測 10 分間の Ca 蛍光強度を連続して記録した。

(10) 統計処理

Ca 蛍光強度を比較するため、Ca の流入・排出実験群とも ($n=3$) 計測データに関して傾斜を最小二乗法にて求め、Student's t 検定を行った。

4. 研究成果

(1) 石灰化関連遺伝子についての RT-PCR 解析結果、ALP, OPN, OCN, BCP の発現はそれぞれ 7.1, 8.4, 1.7, 1.6 に増強された。

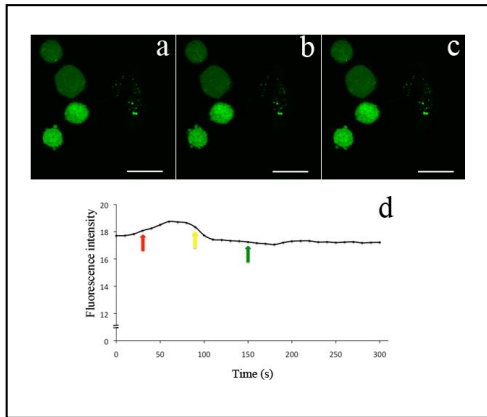
(2) 細胞の増殖と分化に関連した遺伝子の発現に関して、マイクロアレイと RT-PCR の結果、cranio-facial development protein 1 (CFDP), stromal cell-derived factor 4 (SDF4), mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAP2K), catenin alpha 1 isoform (CTNNA1), collagen type 1 alpha 1 (COL1A1) の 5 遺伝子の発現が増強していた。Z score, RT-PCR の数値

はそれぞれ、2.5, 3.5, 2.7, 2.1, 3.6 と 2.1, 1.5, 1.9, 1.8, 1.3 であった。

(3) Ca^{2+} の流入 (L型 Ca^{2+} チャネル) 実験で行った Ca 蛍光強度に関する結果は、以下のとおりである。

B 添加群

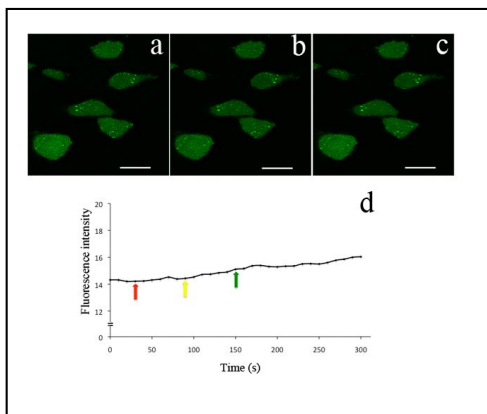
傾斜は、B 添加前後で差し引いた結果、マイナスとなり 0 表示となった。



代表例：B 添加 (黄矢印、上方の b 図に相当) 1 分前 (赤矢印、上方の a 図に相当) 1 分後 (緑矢印、c に相当)。スケールは $20\ \mu\text{m}$ 。

B 非添加群

傾斜は、B 添加前後で差し引いた結果、 3 ± 1.7 となった。



代表例：B 添加 (黄矢印、上方の b 図に相当) 1 分前 (赤矢印、上方の a 図に相当) 1 分後 (緑矢印、c に相当)。スケールは $20\ \mu\text{m}$ 。

統計処理の結果、対照群が有意に大きかった ($P < 0.05$)。これらのことから、B の Ca^{2+} チャネル賦活効果が示唆された。

(4) Ca^{2+} の排出実験 (Na^+/K^+ -ATPase)で行った Ca 蛍光強度に関する結果は、以下のとおりである。

B 添加群

ウワバイン添加培養 10 分間の蛍光強度の変

化を示している。傾斜の平均は 3.3 ± 0.6 であった。

B 非添加群

10 分間の傾斜の平均は 5.3 ± 0.6 であった。統計処理の結果、B 非添加群の方が、有意に大きかった ($P < 0.01$)。これらのことから、B の細胞膜賦活効果が示唆された。

< 引用文献 >

Kawasaki A, Hayashi Y, Yanagiguchi K, Yamada S, Syudo M, Igawa K, Ikeda T, Kubo S, Fujiwara M, Effects of eluted components from 4-META/MMA-TBB adhesive resin sealer on osteoblastic cell proliferation. Journal of Dental Sciences, 7, 2012, 94-98

Yamada S, Yoshizawa Y, Kawakubo A, Ikeda T, Yanagiguchi Y, Hayashi Y, Early gene and protein expression associated with osteoblast differentiation in response to fish collagen peptides powder. Dental Materials Journal, 査読有, 32, 2013, 233-240

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Capati MLF, Nakazono A, Igawa K, Ookubo K, Yamamoto K, Yanagiguchi K, Kubo S, Yamada S, Hayashi Y, Boron accelerates cultured osteoblastic cell activity through calcium flux. Biological Trace Element Research, 査読有, 174, 2016, 1161-1165
DOI: 10.1007/s12011-016-0719-y

Capati MLF, Nakazono A, Yamamoto K, Sugimoto K, Yanagiguchi K, Yamada S, Hayashi Y, Fish collagen promotes the expression of genes related to osteoblastic activity. International Journal of Polymer Science, 査読有, 2016, Article ID 5785819, 7 pages,
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/5785819>

[学会発表] (計 4 件)

林 善彦、井川一成、キャパティ MLF、山本裕也、山田志津香、大久保賢亮、培養骨芽細胞 Ca チャネル活性化への必須微量元素ホウ素の至誠添加濃度、第 143 回日本歯科保存学会 2015 年度秋季学術大会、平成 27 年 11 月 13 日、文京シビックホール (東京都、文京区)

大久保賢亮、井川一成、山本裕也、山田志津香、林 善彦、必須微量元素ホウ素添加によって培養骨芽細胞 Ca チャネルへの影響、第 142 回日本歯科保存学会 2015 年度春季学術大会、平成 27 年 6 月 26 日、北九州国際会議場 (福岡県・北九州市)

大久保賢亮、井川一成、山本裕也、山田志津香、林善彦、必須微量元素ホウ素添加による培養骨芽細胞必須微量元素ホウ素添加による培養骨芽細胞細胞膜への影響、第141回日本歯科保存学会2014年度秋季学術大会、平成26年10月31日、山形テルサ(山形県・山形市)
林善彦、山田志津香、井川一成、山本裕也、必須微量元素ホウ素添加による培養骨芽細胞中で発現が増強する遺伝子、第140回日本歯科保存学会2014年度春季学術大会、平成26年6月20日、びわ湖ホール(滋賀県・大津市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林善彦(HAYASHI, Yoshihiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
教授

研究者番号:20150477

(2) 研究分担者

山田志津香(YAMADA, Shizuka)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
准教授

研究者番号:00363458

藤原守(FUJIWARA, Mamoru)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
助授

研究者番号:40336178

(平成26年9月まで)

井川一成(IGAWA, Kazunari)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
(歯学系)・助授

研究者番号:80584739

(平成26年9月から)