



日本口腔 インプラント学会誌

Journal of Japanese Society of Oral Implantology

日口腔インプラント誌

J. Jpn. Soc. Oral Implant.

<http://www.shika-implant.org/>

vol. **27** No. **3** / 2014.9

公益社団法人 日本口腔インプラント学会

易溶解性リン酸カルシウムによるヒト臍帯静脈内皮細胞の遊走と伸展の促進

黄 文敬¹⁾ 阿部 正明²⁾ 古澤 利武^{2,3)}
松嶋 雄太³⁾ 鷗沼 英郎^{2,3)}

Promotion of Migration and Extension of Human Umbilical Vein Endothelial Cells by Readily Soluble Calcium Phosphate

HUANG Wenjing¹⁾, ABE Masaaki²⁾, FURUSAWA Toshitake^{2,3)},
MATSUSHIMA Yuta³⁾ and UNUMA Hidero^{2,3)}

Poly(ethylene terephthalate) sheet coated with a double layer of gelatin and readily soluble calcium phosphate (CaP) has been proposed as a non-resorbable membrane in guided bone regeneration (GBR). This material promoted the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells *in vitro*, which was attributed to the readily soluble nature of the CaP layer providing Ca²⁺ ions to the MC3T3-E1 cells. On the other hand, the migration of endothelial cells is also known to be promoted by Ca²⁺ ion supply, which implies that the material may

also promote the migration of endothelial cells. The present study investigated the effect of the CaP layer on the migration and extension of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), which are responsible for angiogenesis. The experimental results showed that the CaP layer significantly promoted the migration and extension of HUVEC cells.

Key words : poly(ethylene terephthalate) sheet, readily soluble calcium phosphate, endothelial cell migration

緒 言

著者らは、ポリエチレンテレフタレート (poly(ethylene terephthalate), PET) にゼラチン層と易溶解性リン酸カルシウム層 (以下 CaP 層) をコートした材料を開発し、骨誘導再生 (Guided Bone Regeneration, GBR) のための非吸収性メンブレンとしての適用性を検討してきた^{1,2)}。この材料 (以下, PET/gel/

CaP と表記) は, *in vitro* において MC3T3-E1 細胞の増殖とカルシウム塩の産生を促し¹⁾, またビーグル犬を用いた *in vivo* 試験においては, 抜歯窩での骨形成と歯肉再生を著しく促進した²⁾。PET/gel/CaP にみられる骨と歯肉の再生促進効果は, チタンや高密度 PTFE などの従来の非吸収性メンブレンではみられないものである。

骨や歯肉の再生のためには, 血管の新生が必須である。もし PET/gel/CaP が従来の非吸収性メンブレン

¹⁾九州工業大学若手研究者フロンティア研究アカデミー

²⁾東北・北海道支部 (東北口腔インプラント研究会)

³⁾山形大学大学院理工学研究科物質化学工学分野

¹⁾Frontier Research Academy for Young Researchers, Kyushu Institute of Technology

²⁾Tohoku-Hokkaido Branch (Tohoku Society of Oral Implantology)

³⁾Department of Chemistry and Chemical Engineering, Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University
平成 25 年 12 月 26 日受付

にない組織再生促進機能を真に有しているならば、血管新生を促すような作用をも有していることが検証されるべきと考えられる。

PET/gel/CaP の CaP 層は、リン酸八カルシウム (Octacalcium phosphate, OCP) と低結晶性水酸アパタイト (hydroxyapatite, HA) から構成されており、周囲の水に対して迅速に溶解する性質を有する¹⁾。骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 に Ca^{2+} イオンが供給されると、その分化や石灰化が促されることが知られており^{3,4)}、PET/gel/CaP 上で培養した MC3T3-E1 も、おそらくは CaP 層の溶解によって供給される Ca^{2+} イオンの効果によって短時間でカルシウム塩の産生を開始したと考察されている¹⁾。一方、血管新生に関わる内皮細胞に関して、 Ca^{2+} イオンは細胞の増殖、分化および遊走のシグナルメッセンジャーとして作用することや⁵⁾、遊走に必須であること⁶⁾ などが報告されており、PET/gel/CaP の CaP 層は内皮細胞の遊走も促す可能性がある。

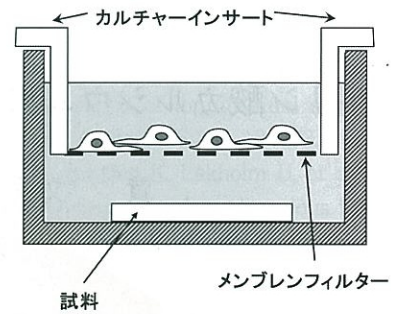
そこで本研究では、血管形成に関わる細胞であるヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC) を用いて、まずその遊走と伸展に対する CaP 層の影響を調べることを目的とした。比較対象として、未処理 PET およびゼラチン被覆のみを施した PET を用い、それぞれと PET/gel/CaP の 2 群間の対比を行った。

材料および方法

1. 材料の作製

用いた材料の作製は、既報の方法¹⁾ に従った。厚さ $250\ \mu\text{m}$ の PET シート (エステルフィルム E5100, 東洋紡, 大阪) を $25 \times 50\ \text{mm}$ の大きさに鋏で切断し、この片面に粘着テープ (P30ST31, 積水化学工業, 大阪) を張って保護したのち、 70°C に保った $3.0\ \text{mol/L}$ の NaOH 水溶液に 3 時間浸すことによって非保護面のエステル結合を加水分解して親水化処理を施した。純水で洗浄後、既報¹⁾ の手順に従って豚皮由来の低エンドトキシンゼラチン (RM-100B, ゼライス, 仙台) を PET の親水化面に化学結合させた。この段階の試料を PET/gel と表記する。次にその上にウレアーゼ (タチナタ豆由来, $5000\ \text{U/g}$, 関東化学, 東京) を固定化し、硝酸カルシウムを $10.0 \times 10^{-3}\ \text{mol/L}$ 、リ

(a) 培養開始時



(b) 遊走後



図1 HUVEC 遊走試験の概略図

ン酸二水素アンモニウムを $6.0 \times 10^{-3}\ \text{mol/L}$ 、尿素を $10.0 \times 10^{-3}\ \text{mol/L}$ の濃度で含む pH 5.70~5.75 の水溶液に入れて 37°C で 1 時間保持することにより、最表面に CaP 層を形成して PET/gel/CaP を作製した。この CaP 層は、OCP と低結晶性 HA からなっていることをエックス線回折 (Mini-Flex, 島津理化, 東京) で確認した。

2. HUVEC 遊走試験と評価

HUVEC は、既報⁷⁾ の方法を用いてトリプシン処理で採取し、20% のウシ胎児血清 (JRH Biosciences Inc., セントルイス, 米国) と $10\ \text{ng/mL}$ の塩基性線維芽細胞増殖因子 (Austral Biologicals, サンラモン, 米国) と 1% ペニシリン-ストレプトマイシン (Invitrogen, Life Technologies Corp., カールスバッド, 米国) を含む Medium 199 培地 (Invitrogen, Life Technologies Corp.) 中で、 37°C で培養した。実験プロトコルは、東北大学ヒトを対象とする研究に関する倫理委員会の承認を受けた (承認番号: 03B-2)。使用した HUVEC は継代数 4~7 のものである。

図1に HUVEC 遊走試験の概略図を示す。試験対象の試料は、未処理 PET, PET/gel および PET/gel/CaP の 3 種類である。試料を $25 \times 25\ \text{mm}$ の大きさに鋏で切り取り、6-ウェルの培養皿の底に置いた。次に培養皿にカルチャーインサートを置き、その上に目開き $3.0\ \mu\text{m}$ のメンブレンフィルターを置いた。メンブ

レンフィルター (No. 353091, BD Falcon, フランクリンレイクス, 米国) と試料上面との距離は $650\ \mu\text{m}$ になるようにした。メンブレンフィルターの上に、HUVEC を $1.5 \times 10^5\ \text{cells}/\text{cm}^2$ の密度で播種し、3時間および6時間培養した。細胞が遊走すると、図1 (b) に模式的に示すように、メンブレンフィルターの孔を通過して下面にも細胞が移動する。

培養終了後に、カルチャーインサートを取り出し、4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液 (PBS) に入れて細胞を固定し、次いで0.1%ポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテル (商品名 Triton X-100, 和光純薬工業 (株), 大阪) を含む PBS に入れて透過性処理した。その後、Alexa Fluor 546 phalloidin (Invitrogen, Life Technologies Corp.) でアクチンフィラメントを、また4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen, Life Technologies Corp.) で細胞核を染色した。メンブレンフィルターの上面と下面に存在する細胞を、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Fluorview FV 1000, オリンパス, 東京) を用いて観察した。観察の際には、細胞の存在しないフィルターの上から下面まで、焦点距離を $0.5\ \mu\text{m}$ ずつずらしながら写真撮影し、細胞の数え落しがないようにした。画像解析には、ソフトウェア Image J (米国国立衛生研究所, ベセスダ, 米国) を用いた。細胞遊走率は、メンブレンフィルター下面で観察された細胞数を、上下の面に存在する全細胞数で除して求めた。同じ実験を3回繰り返した。

本研究では、PET/gel/CaP を実験群とし、これに対して未処理 PET と PET/gel を対照群とした。そのため、PET/gel/CaP と未処理 PET の間、および PET/gel/CaP と PET/gel の間で、Student の t 検定を行い、 $p < 0.025$ を有意とした (ボンフェローニの修正)。

3. HUVEC の細胞形態評価

未処理 PET, PET/gel, および PET/gel/CaP を培養皿の底におき、前節と同じ培地を入れ、HUVEC を試料上に $5.0 \times 10^4\ \text{cells}/\text{cm}^2$ の密度で播種して1および3時間培養した。培養終了後に前節と同様の手順で細胞を固定化および透過性処理し、Alexa Fluor 546 phalloidin でアクチンフィラメントを、DAPI で細胞核を染色した。細胞形態に関する評価項目は、平均細胞占有面積と固体性 (Solidity) である。

平均細胞占有面積は、アクチンフィラメントで囲まれた領域の面積をソフト上で計測し、細胞数で除したものである。固体性とは、細胞占有面積とその凸部面積の比で表わされる粒子形状パラメータであり、細胞の形態計測にも用いられる⁸⁾。例えば細胞が伸展せずに単純な球状であったとすればその固体性は1 (無次元) となり、細胞が仮足を伸ばして伸展すれば、細胞表面に凹面ができるので、固体性は1よりも小さくなる。どちらの評価項目も、60個以上の細胞にわたって計測した。前節と同じく、PET/gel/CaP と未処理 PET の間、および PET/gel/CaP と PET/gel の間で、Student の t 検定を行い、 $p < 0.025$ を有意とした。

結 果

図2に、播種後3時間および6時間における各試料の上方に設置したメンブレンフィルターの上下面の顕微鏡写真を示す。未処理 PET の上方 $650\ \mu\text{m}$ に設置したメンブレンフィルターに播種された細胞は、6時間経過してもほぼ全部が上面にとどまったままであり、下面に遊走した細胞はごくわずかであった (図2 (a) および (d))。それに対して、PET/gel の上方に設置したメンブレンフィルターに播種された細胞は、わずかずつ下方に遊走した (図2 (b) および (e))。さらに、PET/gel/CaP の上方に設置したメンブレンフィルター上の細胞は、著しく下面に遊走した。

播種後3時間および6時間後の細胞遊走率を図3に示す。どちらの時点においても、PET/gel/CaP は他の2者に比べて細胞遊走率が有意に高かった。

図4に、試料上に HUVEC を播種後1時間および3時間後の顕微鏡写真を示す。どちらの時点でも、未処理 PET 上の細胞は仮足を伸ばしておらず、PET/gel と PET/gel/CaP 上の細胞は仮足が伸びていた。

図4に示した細胞形態の差異を定量的に表すために、各試料上の細胞占有面積と固体性を算出し、それを図5および図6に示した。PET/gel/CaP は未処理 PET と比較して細胞占有面積が有意に大きかった。PET/gel と PET/gel/CaP との間には、細胞占有面積に関して有意な差はみられなかったが、固体性に関しては有意差が認められた。すなわち、PET/gel/CaP 上の細胞は、より複雑な形状に仮足を伸ばし、伸展し

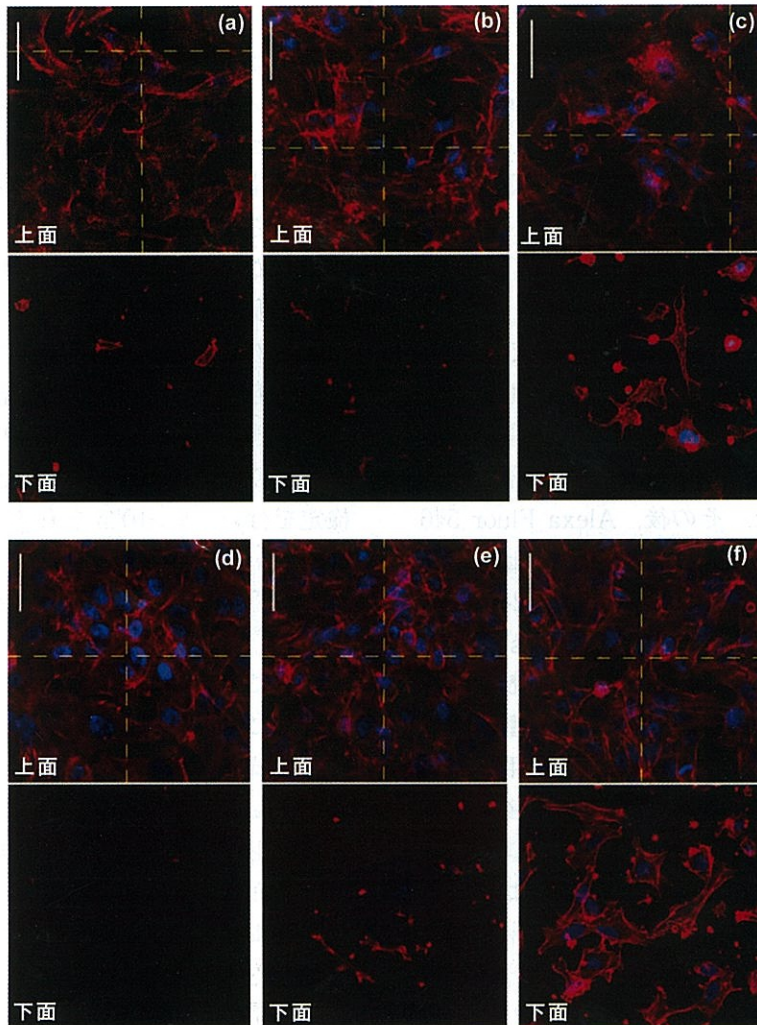


図2 播種後3時間および6時間における各試料の上方に設置したメンブレンフィルターの上下面の顕微鏡写真

(a)~(c) 播種後3時間, (d)~(f) 播種後6時間. (a), (d) PET, (b), (e) PET/gel, (c), (f) PET/gel/CaP. スケールは50 μ m.

たといえる。

考 察

図2および図3に示すように, HUVECはPET/gel/CaPが存在する方向, さらにいえばCaP層の存在する方向に対して遊走することが明らかとなった。CaP層から距離の隔たったメンブレンフィルター上の細胞に対して, CaP層の存在に関する情報が届けられるのは, CaP層の溶解物(Ca^{2+} イオンまたは HPO_4^{2-} イオン)の拡散を介してであると考えられる。中でも Ca^{2+} イオンは, 内皮細胞の遊走を促す重要なイオンであることが報告されている^{5,6)}。本研究のPET/gel/

CaPのCaP層は, 水に迅速に溶解することが明らかにされており¹⁾, CaP層から溶出した Ca^{2+} イオンが培地に供給され, 拡散によりHUVECに達することによって, PET/gel/CaPが存在する方向にHUVECを呼び寄せるような遊走を促したものと推測される。すなわち, 著者らが開発したPET/gel/CaPは, 組織再生において血管形成に必要な内皮細胞の遊走を促す効果をもつことが示唆された。

次に, 図4, 5に示したように, PET/gel/CaPに接触した内皮細胞は, CaP層をもたない他の材料に接触した場合よりも, より旺盛に進展し, 仮足を伸ばしていた。このことは, PET/gel/CaPが内皮細胞に対して好適な場を提供していたことを意味する。本研究

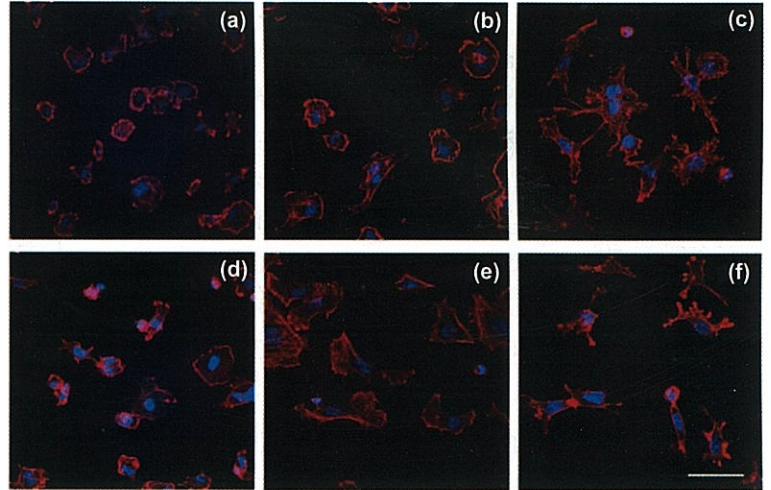
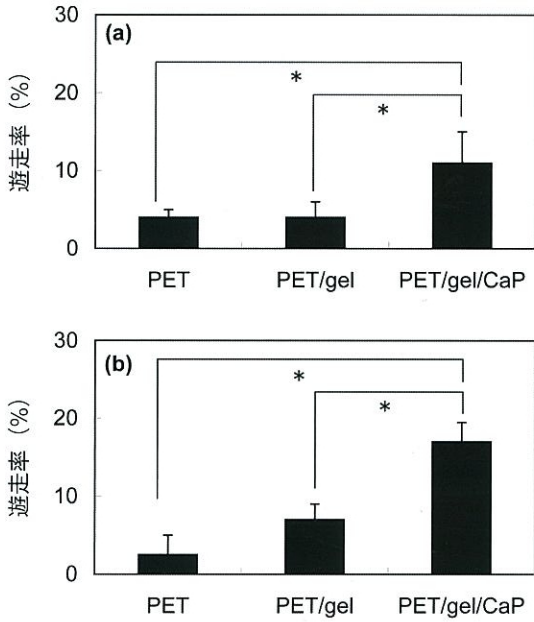


図4 各試料上に播種したHUVECの形態 (a)~(c) 播種後1時間, (d)~(f) 播種後3時間. (a), (d) PET, (b), (e) PET/gel, (c), (f) PET/gel/CaP. スケールは50 μm .

図3 播種後 (a) 3時間および (b) 6時間後における各試料の上方のHUVECの遊走率
N=3, * $p < 0.025$.

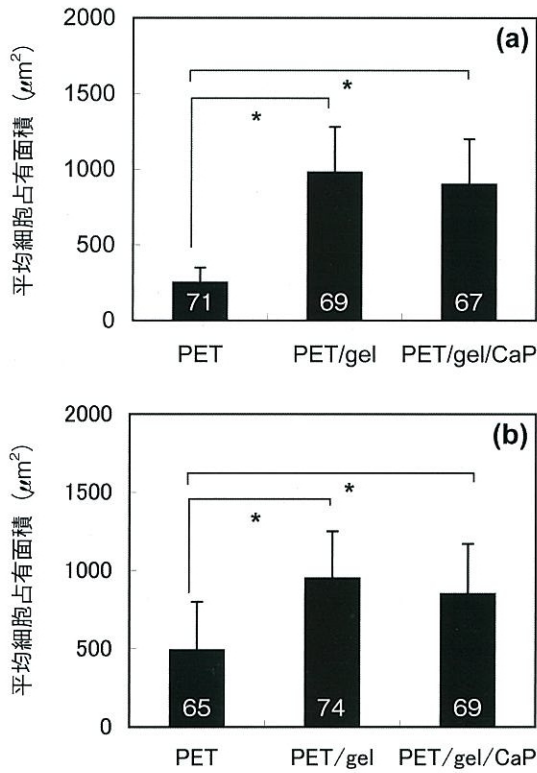


図5 播種後 (a) 1時間および (b) 3時間における平均細胞占有面積
図中の数字は計測した細胞数を表す. * $p < 0.025$.

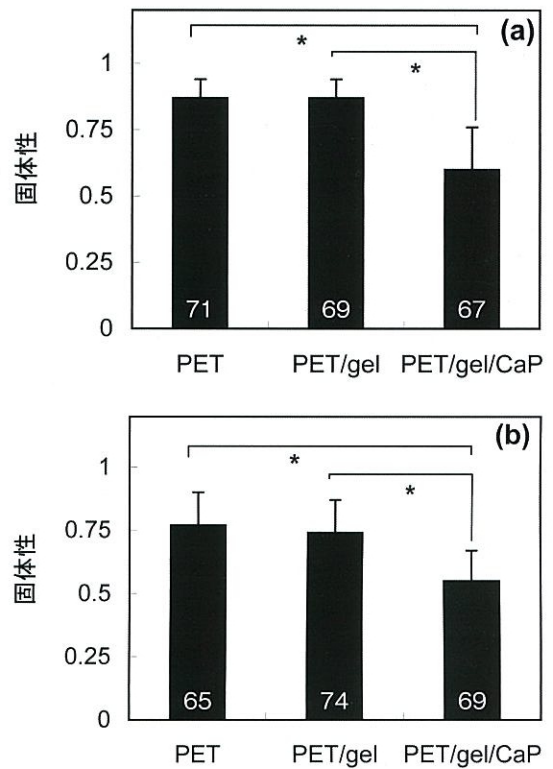


図6 播種後 (a) 1時間および (b) 3時間における固体性
図中の数字は計測した細胞数を表す. * $p < 0.025$.

で調査した HUVEC の遊走と伸展の結果だけでは、ただちに PET/gel/CaP が血管新生を促すことを示したことにはならないが、今後 HUVEC の接着能や増殖能などの評価を加えることにより、血管新生に対する CaP 層の影響が明らかになるものと思われる。また、細胞の伸展に対しては、単に細胞と接触している材料の材質だけでなく、表面形状や溶出イオン種なども影響するので、CaP 層の何が内皮細胞の伸展に影響しているかについては、さらに詳細に調査する余地がある。

既報¹⁾と本研究により、PET/gel/CaP は骨芽細胞と内皮細胞に対して好適な場を提供していることが示唆された。これらの作用は、従来の非吸収性メンブレンにはないものである。今後は、さらに多様な細胞との相互作用を調べ、PET/gel/CaP を非吸収性メンブレンとして用いた場合に組織再生に有効か否かを総合的に調べていく必要がある。

結 論

未処理 PET、ゼラチン被覆 PET、およびゼラチンと CaP で被覆した PET の 3 種類の材料について、ヒト臍帯静脈内皮細胞の遊走と伸展に及ぼす影響を比較した。表面に CaP 層をもつ材料は、他の 2 者に比べて有意に遊走を促進した。これは CaP 層の溶解に伴って Ca^{2+} イオンが供給されるためと考えられた。また、3 種の材料に接した内皮細胞の形態を比較したところ、表面に CaP 層をもつ材料が細胞の進展を最も良く促し、細胞にとって好適な場を提供していることが示唆された。

謝 辞

本研究実施の上で数々のご指導を下さった東北大学学際科学フロンティア研究所の佐藤正明教授、ヒト臍帯をご提供下さった仙台市桜ヒルズウイメンズクリニックの高橋郁夫、高橋真両医師に深謝申し上げます。また、PET シートをご提供下さった東洋紡株式会社様に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 古澤利武, 佐藤正明, 奥寺俊允, ほか. ゼラチンとリン酸カルシウムで表面修飾した PET 上での MC3T3-E1 細胞の増殖と石灰化. 日口腔インプラント会誌 2012; 25: 699-707.
- 2) 古澤利武, 奥寺俊允, 松嶋雄太, ほか. ゼラチンとリン酸カルシウムで表面修飾したポリエチレンテレフタレートによる骨形成の促進. 日口腔インプラント会誌 2013; 26: 236-241.
- 3) Jung GY, Park YJ, Han JS. Effects of HA released calcium ion on osteoblast differentiation. J Mater Sci Mater Med 2010; 21: 1649-1654.
- 4) Maeno S, Niki Y, Matsumoto H, et al. The effect of calcium ion on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. Biomaterials 2005; 26: 4847-4855.
- 5) Chakrabarti R, Chakrabarti R. Calcium signaling in non-excitable cells: Ca^{2+} release and influx are independent events linked to two plasma membrane Ca^{2+} entry channels. J Cellular Biochem 2006; 99: 1503-1516.
- 6) Martini A, Bruno R, Mazzulla S, et al. Angiotensin II regulates endothelial cell migration through calcium influx via T-type calcium channel in human umbilical vein endothelial cells. Acta Physiol 2010; 198: 449-455.
- 7) Sakamoto N, Ohashi T, Sato M. Effect of magnetic field on nitric oxide synthesis of cultured endothelial cells. Int J Appl Electromagnet Mech 2001; 14: 317-322.
- 8) Pereira AM, Tudor C, Kanger JS, et al. Integrin-dependent activation of the JNK signaling pathway by mechanical stress. Plos One 2011; 6: e26182.