

培養ヒト歯根膜由来線維芽細胞の石灰化能に対する エストロゲンの作用に関する研究

山 村 辰 二

Effect of Estrogen on Calcification Ability of Human Periodontal Ligament Fibroblasts

Tatsuji Yamamura

(平成6年12月27日受付)

緒 言

歯根膜は歯根のセメント質と歯槽骨の間に存在する結合組織であり、その主機能は歯を歯槽骨に結合・固定するとともに咀嚼力を緩衝し、またセメント質や歯槽骨の形成、代謝、栄養供給及び感覚受容器などの役割を果たしている¹⁾。また歯根膜は歯周治療後の組織再生に重要な役割を果たす組織と考えられており、歯根膜細胞には新生セメント質形成を伴う新附着形成能があることが指摘されている²⁻⁵⁾。ヒト歯根膜由来線維芽細胞 (HPLF) は、石灰化の指標である ALPase 活性が高く⁶⁻⁹⁾、*in vitro* において石灰化物を形成することが知られている⁹⁻¹¹⁾。また、HPLF は高い I 型コラーゲン合成能を備え¹²⁾、HPLF を骨基質及び象牙質基質上で培養すると新生骨様組織が形成され、HPLF は骨芽細胞様線維芽細胞とも呼ばれている^{6,13,14)}。

歯周組織、特に歯肉は性ホルモンの標的組織と言われ、歯周疾患の進展・増悪に性ホルモンの関与が示唆されてきた¹⁵⁻²⁴⁾。しかし、正常な歯根膜の機能における性ホルモンの役割については、不明な点が多い。

一方、骨芽細胞にはエストロゲンレセプターの存在

が確認されており^{25,26)}、エストロゲンは骨芽細胞に対して直接的・間接的にその増殖や分化を調節することにより骨吸収を抑制し、骨形成を促進すると考えられている²⁷⁻³³⁾。骨芽細胞の石灰化に及ぼすエストロゲンの影響に関する研究は多いが²⁷⁻³³⁾、HPLF の石灰化機能とエストロゲンとの関係についての報告は数少ない³⁴⁻³⁶⁾。

そこで著者は、歯根膜の生理的機能に及ぼす性ホルモンの役割を解明する一環として、HPLF の石灰化能について検討すると共に性ホルモン、特にエストロゲンによる HPLF の石灰化能に及ぼす影響について追究した。

材料および方法

I. HPLF の培養及び細胞増殖に及ぼす性ホルモンの影響

1. HPLF の分離・調製

HPLF は44歳女性の上顎側切歯から得た歯根膜組織を分離・調製した。これらの試料を得るには、患者に対する説明を充分に行い、同意を得た後に行った。

抜去歯の歯根中央1/3相当部に附着している組織を #10 の替刃メスにて剝離し、I 型コラーゲンでコートした直径 35 mm のディッシュ (住友ベークライト) の底面に静置した。

培地は10%牛胎児血清含有の DMEM 培地を用い、5% CO₂/95% air, 37°C の条件下で培養した。数日後、各組織小片から増殖・遊走した細胞を HPLF とし、継代数が8-10世代となったものを本実験に使用した。

広島大学歯学部予防歯科学講座 (主任: 岩本義史教授) 本論文の要旨は平成3年9月の第67回広島大学歯学会例会, 平成3年9月の第34回秋季日本歯周病学会総会, 平成4年5月の第35回春季日本歯周病学会総会, 平成4年6月の第25回広島大学歯学会総会, 平成5年5月の第36回春季日本歯周病学会総会, 平成5年12月の第41回 JADR 総会において発表した。

2. HPLF の増殖と性ホルモンの影響

細胞増殖に対する性ホルモンの影響について検討する際には、HPLF を24穴マルチウェルプレートに 1.4×10^4 個/well となるように播き、3 時間後に培地を無血清培地 ASF-301 (コスモバイオ) に交換して実験を行った。ASF-301 の成分中には、血清の代替の主なものとしてアルブミン (100 mg/l)、インシュリン (1 mg/l) およびトランスフェリン (10 mg/l) などが含まれている。すなわち、HPLF を PBS で洗浄後、所定の濃度のエストラジオール、プロゲステロンおよびテストステロン (シグマ) を添加した培地を加え、5% $\text{CO}_2/95\%$ air, 37°C の条件下で培養した。培養時のエストラジオール濃度は 0.2, 2 及び 20 ng/ml, プロゲステロン濃度は 200 ng/ml, テストステロンは 5 ng/ml とした。また性ホルモン無添加のものをコントロールとした。性ホルモンはエタノールに溶解したものを培地に加え、エタノールの最終濃度は 0.01% となるようにした。培養開始後、エストラジオールについては 24, 48, 72 及び 96 時間後に、プロゲステロン及びテストステロンについては 96 時間後に、トリプシン処理によって細胞を剥離させ、血球算定板を用いて位相差顕微鏡下で細胞数をカウントした。

以下の実験において性ホルモンの影響について検討する際には、培地として既述の ASF-301 を用い、細胞増殖の時と同じ条件で細胞培養を行った。

II. HPLF におけるエストロゲンレセプター mRNA の発現

1. mRNA の抽出

0 および 20 ng/ml エストラジオール存在下で 5 日間培養した HPLF を PBS で洗浄後、セルスクレイパーを用いてフラスコより剥離し、遠心分離を行い細胞を回収した。続いてクイックブレップ (ファルマシア) を用いて、通法により mRNA の分離・精製を行った。

2. ノーザンプロット分析

ノーザンプロット分析は Maniatis³⁷⁾ らと酒井³⁸⁾ の方法により行った。即ち、抽出した mRNA のうち、 $1.5 \mu\text{g}$ を微量のエチジウムブロマイドと 0.66 M ホルムアルデヒドを含む 1% アガロースゲルで電気泳動を行った。続いて mRNA をナイロンメンブレン (エムイ・サービス) へ転写し、10 分間の紫外線照射によりメンブレンに固定した。プローブとして、Dr. Chambon より供与を受けたヒトエストロゲンレセプターの遺伝子を含むプラスミドを制限酵素で切断して得たヒトエストロゲンレセプター cDNA をを用いた。プローブはオリゴラベリングキット (ファルマシア)

を利用し、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ d-CTP で標識した後、ノーザンプロット分析を行った。

III. HPLF の石灰化能に対する性ホルモンの影響

1. ALPase 活性

直径 35 mm の 6 穴マルチウェルプレート (ファルコン) に 1 ウェルあたりに 3.0×10^5 個/well となるように HPLF を播き、所定期間培養した。次いで 6 穴マルチウェルプレートを PBS で 3 回洗浄した後、セルスクレイパーを用い、HPLF をプレートより剥離回収した。続いて氷冷下で超音波処理 (200W, 10 秒, 6 回) を行い、20 分、12000 g で遠心を行ない、得られた上清を ALPase 活性の試料液とした。測定は p -ニトロフェニールリン酸を基質とする Bessey-Lowry 法³⁹⁾ を改良した ALPase 活性測定キット (和光純薬) を用いた。すなわち酵素試料液 $50 \mu\text{l}$ に 250 μl の基質緩衝液 (0.1 M 炭酸緩衝液 pH 9.8, 2.0 mM 塩化マグネシウム, 6.7 mM p -ニトロフェニールリン酸二ナトリウム) を加え 37°C , 30 分間インキュベートし、2.5 ml の 0.22 N 水酸化ナトリウムを加えて反応を停止した後、波長 405 nm における吸光度を測定した。また同試料液について Lowry 法により蛋白質量を測定し、蛋白質量に対する ALPase 活性を求めた。

2. 石灰化 nodule の形成

HPLF を直径 35 mm の 6 穴マルチウェルプレートに 2.8×10^5 個/well となるように播いた。培地には ASF-301 を用い、培地中に 10 mM β -グリセロリン酸を添加した。所定期間培養した後、Dahl⁴⁰⁾ の方法に準じてアリザリンレッド染色を施し、石灰化 nodule の組織化学的検討を行った。すなわち培養後の HPLF を PBS で 3 回洗浄し、95% エタノールで 20 分間固定した。次いで 1% アリザリンレッド S 液で 5 分間染色を施し、濃塩酸 0.1 ml 含有の 95% エタノールで処理した後、位相差顕微鏡下で観察した。石灰化 nodule 形成に及ぼす性ホルモンの影響について検討する際には、ウェル内に形成されたアリザリンレッドに濃染する nodule のうち、肉眼で確認できるものを石灰化 nodule とし、その数を算定した。

3. オステオカルシン産生

直径 35 mm の 6 穴マルチウェルプレートに 2.8×10^5 個/well となるように HPLF を播き、所定期間培養後、その上清を試料としてオステオカルシンを定量した。オステオカルシンの測定には、Gla 型オステオカルシン測定キット (宝酒造) を用いた。すなわち、ウシ Gla 型オステオカルシンに対するモノクロナール抗体を固相抗体およびペルオキシダーゼ標識抗体として用いたプレート固相サンドイッチ EIA により測

定した。抗体を配した96穴マルチウェルプレートに試料 100 μ l を加え、1 時間室温で反応させた後、ペロキシダーゼ標識抗体 100 μ l を加え、さらに1 時間室温で反応させた。続いてペロキシダーゼの発色基質を加え10分間室温で反応させた後、1 N 硫酸を 100 μ l 加え反応を停止し、波長 492 nm における吸光度を 96穴マルチウェルプレートリーダー (トウショウ) にて測定した。

IV. HPLF における石灰化 nodule の形成およびオステオカルシン産生の提供者間の比較

石灰化 nodule の形成およびオステオカルシン産生については、21歳男性、22歳男性、14歳女性、27歳女性より得た HPLF についても検索を行った。エストラジオール濃度は、いずれも 20 ng/ml とし20日間培養した後、エストラジオール無添加と比較した。

V. 統計処理

細胞増殖、ALPase 活性、石灰化 nodule の形成、およびオステオカルシン産生に関する統計学的分析は、Student-t 検定により行った。

結 果

I. HPLF の増殖に対する性ホルモンの影響

図1は0, 0.2, 2及び20 ng/ml のエストラジオール存在下での HPLF の増殖曲線を示す。48時間まではエストラジオールによる影響は認められなかった

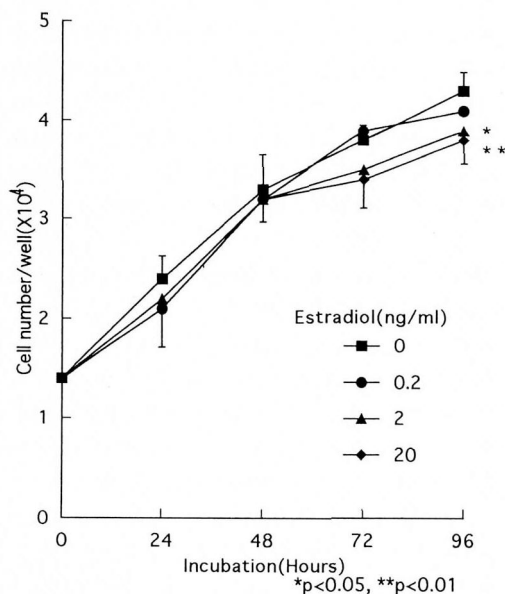


図1 HPLF の増殖に及ぼすエストラジオールの影響

が、72, 96時間後では2および20 ng/ml エストラジオールにより HPLF の増殖が有意に抑制された ($p < 0.01$)。同様にプロゲステロン (200 ng/ml) は96時間後に HPLF の増殖を抑制したが、テストステロン (5 ng/ml) は増殖に有意な影響を与えなかった (表1)。

表1 HPLF の増殖に及ぼす性ホルモンの影響 (96時間培養)

Sex hormone	Cell number ($\times 10^4$ cell/well)
Control	4.3 \pm 0.19
Estradiol (20 ng/ml)	3.8 \pm 0.24*
Progesterone (200 ng/ml)	3.8 \pm 0.15**
Testosterone (5 ng/ml)	4.0 \pm 0.28

(n=6)

Mean \pm S.D.

* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$

II. HPLF におけるエストロゲンレセプター mRNA の発現

図2はノーザンブロット分析の結果を示す。ヒトエストロゲンレセプター cDNA をプローブとして行ったノーザンブロット分析の結果、HPLF はエストラジオールの存在の有無に関わらず、6.2 kb のヒトエストロゲンレセプター mRNA を発現していることが確認された。

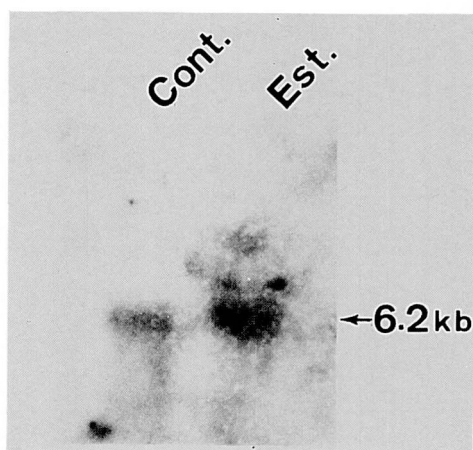


図2 ノーザンブロット分析
HPLF におけるエストロゲンレセプター mRNA の発現

III. HPLF の石灰化能に対する性ホルモンの影響

1. ALPase 活性

20 ng/ml エストラジオール存在下で培養した HPLF

が産生する ALPase 活性の変動を20日目まで追跡した。その結果, 20 ng/ml エストラジオール存在下で培養した HPLF は, 培養10日目でコントロールの ALPase 活性 8.89 ± 0.30 に比し, 10.42 ± 0.30 と上昇し, その差は有意であった ($p < 0.001$)。培養15日目, 20日目においてもエストラジオール存在下では有意に ALPase 活性の上昇がみられた (図3)。

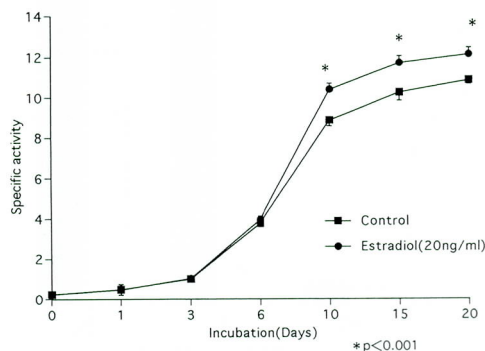


図3 ALPase 活性の経日的変化に及ぼすエストラジオールの影響

次に異なった濃度のエストラジオール存在下で10日間 HPLF を培養し ALPase 活性を測定したところ, 表2に示すようにエストラジオールは濃度依存的に ALPase 活性を上昇させることが判明した。即ち, 0.2 ng/ml のエストラジオール添加により, わずかであるが有意に ALPase 活性の上昇がみられ ($p < 0.01$), 2 ng/ml で ALPase 活性がさらに上昇した ($p < 0.001$)。一方, プロゲステロン (200 ng/ml) およびテストステロン (5 ng/ml) 存在下で10日間培養した HPLF についても ALPase 活性を調べたところ, いずれにおいてもコントロールより高い ALPase 活性を示した (表3)。20 ng/ml エストラジオールは, プロゲステロンおよびテストステロンに比べて, ALPase 活

表2 HPLF の ALPase 活性に及ぼすエストラジオール濃度の影響 (10日間培養)

Estradiol (ng/ml)	ALPase Protein (S.A.)
0	9.05 ± 0.22
0.2	$9.53 \pm 0.14^*$
2.0	$10.07 \pm 0.16^{**}$
20.0	$10.47 \pm 0.16^{**}$

(n=6)

Mean \pm S.D.

* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$

HPLF を破碎・遠心後, その上清を試料とした。

表3 ALPase 活性に及ぼす性ホルモンの影響 (10日間培養)

Sex hormone	ALPase Protein (S.A.)
Control	11.49 ± 0.89
Estradiol (20 ng/ml)	$15.48 \pm 1.57^{***}$
Progesterone (200 ng/ml)	$13.42 \pm 1.07^{**}$
Testosterone (5 ng/ml)	$12.63 \pm 0.54^{**}$

(n=6)

Mean \pm S.D.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

性を最も高いレベルまで上昇させた。

2. 石灰化 nodule の形成

HPLF をエストラジオールを含む培地にて20日間培養したところ, アリザリンレッドで濃染する石灰化 nodule が確認された。図4はその位相差顕微鏡像を示す。図5には石灰化 nodule 形成の経日的変化を検討した結果を示す。コントロールの HPLF は, 培養

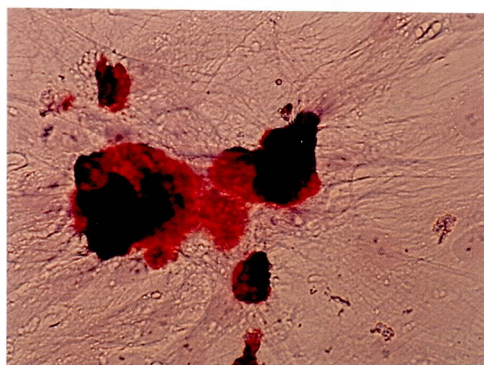


図4 HPLF が形成した石灰化 nodule
アリザリンレッド染色を施した位相差顕微鏡像 ($\times 100$)

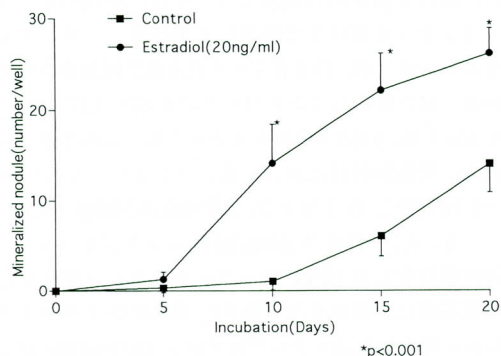


図5 石灰化 nodule 形成に及ぼすエストラジオールの影響

開始後10日目から石灰化 nodule の形成が観察され、石灰化 nodule 数は培養15日目で 6.08 ± 2.22 、20日目で 14.08 ± 3.17 と経日的に増加した。

一方、20 ng/ml エストラジオール存在下で培養した HPLF は、培養開始後5日目から石灰化 nodule の形成 (1.33 ± 0.82) がみられた。また10日目には 14.17 ± 4.25 と石灰化 nodule が増加し、15日目、 22.25 ± 4.03 、20日目、 26.25 ± 2.73 といずれもエストラジオールはコントロールに比べ有意により多数の石灰化 nodule の形成を誘導した。

また異なった濃度のエストラジオール存在下で20日間培養した後の石灰化 nodule 数を調べたところ、20 ng/ml エストラジオール存在下で培養した HPLF は、コントロールに比べ有意に多数の石灰化 nodule を形成した。しかし0.2および2 ng/ml エストラジオール存在下で培養した HPLF については、石灰化 nodule 数に有意差は認められなかった (表4)。

表4 石灰化 nodule の形成に及ぼすエストラジオール濃度の影響 (20日間培養)

Estradiol (ng/ml)	Mineralized nodule (number/well)
0	12.58 ± 3.34
0.2	13.42 ± 3.85
2.0	14.50 ± 2.61
20.0	$22.83 \pm 2.46^*$

(n=6) Mean ± S.D.
*p<0.001

3. オステオカルシン産生

HPLF を培養開始後10, 15, 20日におけるオステオカルシン産生を検討した結果を図6に示す。エストラジオール無添加のコントロールにおいてもオステオカルシンは、培養開始後10日目から産生が確認され、15日、20日と経日的に増加した。また、20 ng/ml エストラジオール存在下で培養した HPLF は、オステオカルシン産生が、10日目ですでに有意に増加がみられたが、15日目にはコントロールの 0.87 ± 0.17 に比し 8.37 ± 1.05 と約9.6倍のオステオカルシン産生がみられた。培養20日目においても、コントロールの 6.87 ± 0.64 に比し 12.13 ± 1.13 と著明な差が観察された。

一方、0.2、2及び20 ng/ml エストラジオールは、20日間培養した HPLF のオステオカルシン産生を濃度依存的に上昇させた (表5)。HPLF のオステオカルシン産生に及ぼすプロゲステロン (200 ng/ml) およびテストステロン (5 ng/ml) の影響について検討したところ、いずれもコントロールとの間に有意な差は認

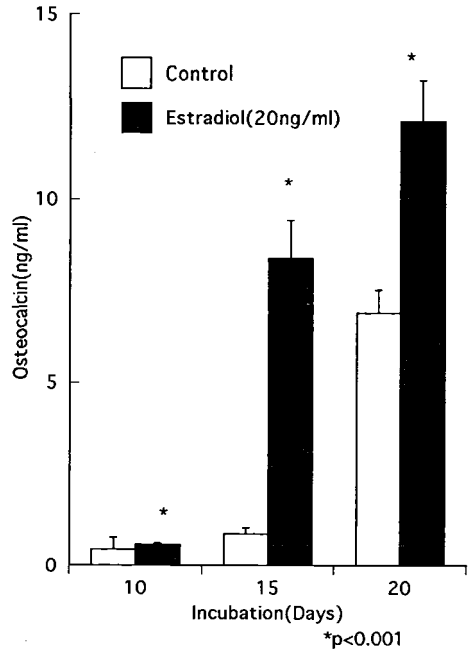


図6 オステオカルシン産生の経日的変化に及ぼすエストラジオールの影響

表5 オステオカルシン産生に及ぼすエストラジオール濃度の影響 (20日間培養)

Estradiol (ng/ml)	Osteocalcin (ng/ml)
0	2.94 ± 1.02
0.2	$4.86 \pm 1.24^*$
2.0	$9.86 \pm 1.54^{**}$
20.0	$10.50 \pm 0.26^{**}$

(n=6) Mean ± S.D.
*p<0.05, **p<0.001

HPLF を20日間培養後の培養上清を試料とした。

表6 オステオカルシン産生に及ぼす性ホルモンの影響 (20日間培養)

Sex hormone	Osteocalcin (ng/ml)
Control	2.94 ± 1.02
Estradiol (20 ng/ml)	$10.50 \pm 0.26^*$
Progesterone (200 ng/ml)	4.00 ± 0.77
Testosterone (5 ng/ml)	3.84 ± 1.15

(n=6) Mean ± S.D.
*p<0.001

められなかった (表6)。

IV. HPLF の提供者間での比較

1. 石灰化 nodule の形成

HPLF の石灰化 nodule の形成に及ぼすエストラジオールの影響について、5人の提供者から得た HPLF について調べた。今回用いた全ての HPLF 株において、20 ng/ml のエストラジオールは HPLF での石灰化 nodule の形成を促進した (表7)。

表7 石灰化 nodule の形成に及ぼすエストラジオールの影響
(提供者の異なる HPLF での比較)

HPLF	Mineralized nodule (number/well)	
	Control	20 ng/ml Estradiol
21♂	13.25±1.57	21.25±2.12*
22♂	8.08±1.88	17.50±2.00*
14♀	11.00±2.10	20.25±2.04*
27♀	11.67±1.78	20.75±2.21*
44♀	12.56±3.34	22.85±2.46*

(n=6) Mean±S.D. Mean±S.D.

*p<0.001

2. オステオカルシン産生

エストラジオールが HPLF のオステオカルシン産生に及ぼす影響について、提供者による差異について検討したところ、今回用いた全ての HPLF において 20 ng/ml エストラジオール存在下で培養した HPLF は、コントロールに比べて有意にオステオカルシン産生を上昇させることが判明した (表8)。

表8 オステオカルシン産生に及ぼすエストラジオールの影響
(提供者の異なる HPLF での比較)

HPLF	Osteocalcin (ng/ml)	
	Control	20 ng/ml Estradiol
21♂	3.43±0.23	6.40±0.56*
22♂	1.26±0.11	6.06±0.34*
27♀	3.54±0.23	6.40±0.11*
44♀	2.94±1.02	10.50±0.26*

(n=6) Mean±S.D. Mean±S.D.

*p<0.001

考 察

歯根膜は歯周組織の中でも最も動的な機能に富んだ組織であり、その主な生理的機能として歯の支持、知

覚、栄養供給および恒常性の維持などが挙げられている。生理的機能の低下につながる歯周疾患の発症とその伸展は、臨床的にも歯根膜の破壊に比例すると言っても過言ではない。

歯根膜の中でも細胞成分としての線維芽細胞 (HPLF) は、コラーゲンや基質を産生して歯根膜の構成にあずかるなど、重要な機能を有していると考えられる。したがって、HPLF の生理的機能を究明することは、歯周組織の維持および創傷治癒過程において非常に重要である。

Gottlow³⁾ ら、Nyman⁴⁾、及び Aukhil⁵⁾ は、歯周治療において新付着を得るには、新生セメント質形成を伴う新付着形成が必須であることを指摘し、HPLF にはその性質があることを報告している。また Nojima¹⁴⁾ は HPLF には、骨芽細胞の phenotype が存在することを報告しており、HPLF が骨芽細胞様の機能を有することを示唆している。

近年、HPLF の培養法が確立されたため、各種ホルモンや growth factor に対する反応性や、組織の恒常性を保つ機構を解明する研究が増えてきている⁴¹⁻⁴⁷⁾。HPLF の特徴は、形態的には紡錘形を呈する fibroblast であるが、蛋白合成レベルにおいては骨芽細胞の性質を備えていることが知られている。すなわち、骨系細胞のマーカーである ALPase 活性が高く⁶⁻⁹⁾、また骨芽細胞と同様に活性型ビタミン D₃ の添加により、ALPase 活性が上昇することが明らかにされている。これらのことなどから Kawase⁶⁾ は、HPLF を osteoblastic-fibroblast と命名するなど HPLF の骨芽細胞様線維芽細胞としての特徴が注目されている。

一方、エストロゲンと骨組織や骨芽細胞との関連についての研究は現在も盛んに行われている^{25,26-33,48-52)}。また、エストロゲンが歯周疾患の発症と進展に関わっていることは古くから言われてきたが、これらの研究のほとんどは歯肉組織に限局している¹⁵⁻²⁴⁾。歯根膜組織と性ホルモンの関係では Lewko³⁴⁾ により、培養歯根膜線維芽細胞にエストラジオールを作用させると、エストラジオールの濃度が増加するにつれて、DNA の合成が抑制を受けることが報告されている。また難波¹⁸⁾ は歯根膜線維芽細胞のコラーゲン合成は、エストラジオール及びプロゲステロンの作用により低下し、非コラーゲン性蛋白合成についてもエストラジオール及びプロゲステロンの作用により低下したと報告している。

しかしながら、歯根膜線維芽細胞とエストロゲンとの関連性については、依然数多くの不明な点が残されている。そこで、骨芽細胞様線維芽細胞である HPLF の石灰化機構に対するエストロゲンの作用について本

研究で検討した。

本研究では、女性ホルモンとしてエストラジオールとプロゲステロン、男性ホルモンとしてテストステロンを用いた。エストラジオールは17β位のOH基を持つ卵胞ホルモンであり、卵胞ホルモンの中では最も生理活性が強く⁵³⁾、その増減は様々の疾患と関連していると示唆されている⁵⁴⁾。また、培養系に添加する性ホルモンの濃度は、血清中の生理的範囲内とし、それぞれの最高値としてエストラジオールは20 ng/ml (妊娠後期のピーク時)、プロゲステロン200 ng/ml (妊娠後期のピーク時)、テストステロン5 ng/ml (思春期のピーク時)と設定した。性ホルモンは血清タンパクと結合すると生理的活性を示さないと考えられているため⁵⁵⁾、本研究においては無血清培地を使用した。

骨芽細胞においてエストロゲンは細胞の増殖速度を低下させ分化を促進し、I型コラーゲンなどの骨基質蛋白の合成を促進する作用がある。本研究においてエストラジオール及びプロゲステロンはHPLFの細胞増殖を抑制した。またAhsan¹⁵⁾の報告によると、エストラジオール及びプロゲステロンは、歯肉線維芽細胞の増殖を抑制すると共にI型コラーゲンの合成を促進した。従ってHPLFに対するエストロゲンの作用は、骨芽細胞や歯肉線維芽細胞での作用と類似していた。

以前、エストロゲンはパラソルモンやカルシトニン及び活性型ビタミンD₃などの骨代謝に関係したホルモンの作用を変化させると考えられていた。即ち、腎でのカルシウム排泄の減少、腸官からのカルシウム吸収の促進、パラソルモンに対する骨の感受性の低下、パラソルモン血中レベルの抑制、カルシトニン血中レベルの増加などを引き起こすことにより、全身的及び局所的に骨代謝に影響を与えてると推察されていた^{28,29,50,51)}。しかし1988年にラット及びヒト骨芽細胞にエストロゲンレセプターの存在が証明され^{25,26)}、エストロゲンが骨芽細胞に直接作用することが示唆された。さらに近年、エストロゲンは骨芽細胞のIGF, TGF-β及びI型コラーゲンの産生を促進し、また骨芽細胞に対してその増殖や分化に影響を及ぼすことが報告された。また骨吸収因子であるIL-1, IL-6及びTNFの産生を抑制することで、局所的・全身的にも骨代謝に影響することが示唆された^{27,30-32)}。

歯根膜組織におけるエストロゲンレセプターについては、エストロゲンに結合する蛋白が存在することは報告されているが³⁴⁾、それが特異的なレセプターであるか否かについては明確にはされていない。しかし本研究の一環として著者ら(1993)³⁶⁾は、RT-PCR法およびサザンハイブリダイゼーションにより、

HPLFにエストロゲンレセプター mRNAが存在することを報告した。今回行ったノーザンブロット分析によりHPLFにエストロゲンレセプター mRNAが発現することを確認した。従ってHPLFに対するエストロゲンの作用は、骨芽細胞と同様にエストロゲンレセプターを介する反応が関与しており、HPLFの石灰化機構に対するエストロゲンの影響においても骨芽細胞と類似しているのではないかと考えられる。

ALPase活性は骨系細胞のマーカーとして用いられており⁶⁻⁹⁾、その役割については、石灰化部位での有機リン酸エステルの加水分解による無機リンの濃度上昇から石灰化を促進するというRobinsonの説⁵⁶⁾と、結晶形成に阻害的に働くピロリン酸を分解除去することにより石灰化を促進するというFleischの説⁵⁷⁾がある。これらの説は、ハイドロキシアパタイトの結晶形成に密接に関係する機能を想定している。しかし腎臓、小腸、および肝臓等の石灰化に無関係な軟組織においてもALPaseが存在することが報告されており⁵⁸⁾、その生理的役割は現在のところ不明である。ALPaseは、肝・骨・腎型、小腸型及び胎盤型酵素の三種に分けられており^{59,60)}、ヒト歯根膜のALPase活性については肝・骨・腎型であることが明らかにされており^{6,61-63)}、さらにHPLFは骨芽細胞と同様に高いALPase活性を有することが報告されている⁶⁻⁹⁾。本研究においてもHPLFは高いALPase活性を示し、しかもエストラジオールを添加することによりHPLFのALPase活性はさらに上昇した。一方、Verhaarら(1994)³³⁾およびSchevenら(1992)⁶⁴⁾は、*in vitro*においてヒト骨芽細胞様細胞は、エストラジオールおよびプロゲステロンの作用により、ALPase活性が上昇したと報告している。従って、HPLFのALPase活性に対するエストロゲンの反応は、骨芽細胞と類似しており、歯周組織においてエストロゲンの減少は歯槽骨のみならず、歯根膜にも影響を及ぼすことが示唆された。また、エストラジオールはHPLFのALPase活性を濃度依存的に上昇させ、他の性ホルモン(プロゲステロン、テストステロン)との比較においても有意にALPase活性を上昇させた。即ち、骨組織の石灰化にエストロゲンが重要な物質であるように、歯根膜組織の石灰化、歯周組織の健康を維持するうえでもエストロゲンが他の多数の性ホルモンの中で特に重要な役割を果たしていることが示唆された。

HPLFが骨芽細胞線維芽細胞と言われる重要な細胞特性の一つに*in vitro*における石灰化物形成能がある⁹⁻¹¹⁾。Kodamaら⁶⁵⁾はマウス頭蓋冠由来のMC3T3-E1は、石灰化物形成能を有する骨芽細胞様細胞であり、石灰化物形成が認められた時期は、培養開始後30

日頃であると報告している。石灰化物形成の時期が一致しているものとして、ニワトリ胎児頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞を用いた Gerstenfeld ら^{66,67)} の報告、或いはヒト歯槽骨細胞を用いた鈴木ら⁶⁸⁾ の報告がある。また、柴⁶⁹⁾ および Shirakawa ら⁷⁰⁾ はヒト培養歯髄細胞は ALPase 活性が高く、石灰化物を形成することを報告している。

歯根膜細胞については、原田⁹⁾ がウサギの歯根膜細胞は *in vitro* において、培養開始後14日目に石灰化 nodule を形成したが、その数は歯槽骨細胞より少ないと報告している。また、及川ら¹⁰⁾ は同じくウサギの歯根膜細胞は ALPase 活性が高く、培養開始後10日目まで上昇し、培養開始後14日目に石灰化 nodule を形成すると報告している。本研究における ALPase 活性のピーク時および石灰化 nodule の形成時期は及川らの報告と類似していた。

また、20 ng/ml エストラジオールを添加すると培養開始後5日目から石灰化 nodule の形成が開始され、10日目においてコントロールに比べて約14倍の石灰化 nodule を形成した。これは、10日目にエストラジオールが ALPase 活性を上昇させたことと関連している。しかしながら、0.2及び2 ng/ml エストラジオール存在下で培養した HPLF においては、コントロールとの間に石灰化 nodule の形成に有意な変化は認められなかった。HPLF の ALPase 活性において、濃度依存性ではあるが全ての濃度のエストラジオールは、その活性を上昇させたが、石灰化 nodule の形成については高濃度についてのみ促進した。これは歯根膜の石灰化機構の維持には、一定のレベル以上のエストロゲンが必要であることを示唆している。

近年、石灰化に関する研究が急速に進み、以前から報告されてきたコラーゲンに加えて Ca^{2+} に対して強い結合能を持つ非コラーゲン性蛋白質が、石灰化の調節に重要な役割を担っていると考えられるようになってきた。これらの蛋白質は分子内に Ca^{2+} と結合する性質を備えており、その主なものとしてオステオカルシンが挙げられる⁷¹⁾。オステオカルシンは1975年に Price ら⁷²⁾ と Hauschka ら⁷³⁾ によって骨に見出された酸性蛋白質で、bone Gla protein (BGP) とも呼ばれ、骨の蛋白質の1~2%に相当し、非コラーゲン性蛋白質の15~20%を占める。49個のアミノ酸からなる分子量5,800の蛋白質で、その中央部(17, 21, 24残基)にビタミンK依存性 γ -carboxyglutamic acid (Gla) 残基を含有する。オステオカルシンは、この Gla 残基を介することにより Ca^{2+} 結合能やハイドロキシアパタイトに強い親和性を示し、石灰化期に骨芽細胞での合成促進が観察されている⁷⁴⁾。

オステオカルシンの機能については不明な点が多いが、ハイドロキシアパタイト結晶の形成を抑制することなどから、過剰な石灰化を防止し、秩序正しい石灰化の維持に貢献していると推測されている。また歯根膜細胞において1990年に Nojima¹⁴⁾ らは、ウシの HPLF に BGP like protein が存在することを証明し、また $1\alpha, 25(OH)_2D_3$ を培地中に添加することにより HPLF の BGP like protein 産生が上昇したと報告している。

本研究では、HPLF の4種の異なる細胞株においてエストラジオールはオステオカルシンを産生すること、またエストラジオールの効果は他の性ホルモンよりも強力であることが示された。 $1\alpha, 25(OH)_2D_3$ とエストラジオールはステロイドホルモンであり、そのレセプターの構造も同じステロイドホルモンスーパーファミリーに属している。近年、オステオカルシン遺伝子の5'側上流の promoter 領域に、 $1, 25(OH)_2D_3$ に対する反応部分が存在することが明らかとされた⁷⁵⁾。21塩基よりなるこの部位の塩基配列は、甲状腺ホルモンやエストロゲンレセプターを介する遺伝子発現の調節部位と強い類似性を示しており、現在これらステロイドホルモンなどによる遺伝子発現の調節機構が解明されつつある^{75,76)}。今回の研究により HPLF にエストロゲンレセプター mRNA が存在すること、またエストラジオールにより HPLF のオステオカルシンの産生が上昇したことが解明されたが、エストロゲンとオステオカルシンの関連については不明な点が多く、今後の検討が必要である。

なお、今回培地として無血清培地を用いたが、その事由として既述の如く、添加する血清中の性ホルモンの影響を避けるためであった。しかし今回用いた無血清培地には、インシュリンなどのホルモンや、EGF などの growth factor が含まれており、これらの成分と HPLF の石灰化機構に対するエストロゲンの影響についても今後究明していくつもりである。

以上、本研究において明らかにされたように、HPLF が高い石灰化能を有することは、歯槽骨とセメント質の間に介在する歯根膜の機能のひとつとして、石灰化を通じての組織の恒常性維持に関与していることが推察されるものである。

さらに、性ホルモン、特にエストロゲンが HPLF の石灰化能への促進効果を持つことは、性ホルモンが歯肉のみならず歯根膜を標的組織として、重要な役割を果たしていることを伺わせるものである。

結 論

エストロゲンがヒト歯根膜由来線維芽細胞 (HPLF)

の石灰化能に及ぼす影響について無血清培地下で検索し、以下の結果を得た。

1. エストラジオールは HPLF の細胞増殖を抑制した。
2. HPLF にエストロゲンレセプター mRNA が発現することが確認された。
3. エストラジオールは HPLF の ALPase 活性を濃度依存的に上昇した。
4. エストラジオールは HPLF の石灰化 nodule 形成を促進した。
5. エストラジオールは HPLF のオステオカルシン産生を促進した。

以上の結果により、ヒト歯根膜由来線維芽細胞はエストロゲンレセプターを有し、エストラジオールはヒト歯根膜由来線維芽細胞の石灰化を促進することが示唆された。

また研究結果を通じて、歯根膜の生理的機能に果たすヒト歯根膜由来線維芽細胞の役割について考察した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の御指導および御校閲を賜った本学予防歯科学講座岩本義史教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究遂行上、御助言、御校閲を賜った本学歯科保存学第二講座岡本莫教授ならびに本学口腔生化学講座加藤幸夫教授に深謝致します。また本研究の遂行、まとめおよび論文の作成上、終始御指導、御助言を頂いた本学予防歯科学講座森下真行講師に感謝の意を表します。さらに、ヒトエストロゲンレセプター cDNA プローブを御供与頂いた Dr. Chambon (Institut de Chimie Biologique, Faculté de Médecine, France) に感謝致します。最後に本研究を進めるに際し、多大なる御支援を頂いた本学予防歯科学講座関係各位に心から感謝致します。

文 献

- 1) Ten Cate, A.R.: Ten Cate 口腔組織学, 第 2 版, 医歯薬出版, 東京, 215-255, 1987.
- 2) Gottlow, J., Nyman, S., Karring, T. and Lindhe, J.: New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J. Clin. Periodontol.* 11, 494-503, 1984.
- 3) Gottlow, J., Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T. and Wennstrom, J.: New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. *J. Clin. Periodontol.* 13, 604-616, 1986.
- 4) Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T. and Lindhe, J.: The regenerative potential of the periodontal ligament. *J. Clin. Periodontol.* 9, 257-265, 1982.
- 5) Aukhil, I., Simpson, D.M., Suggs, C. and Pettersson, E.: *In vivo* differentiation on progenitor cells of periodontal ligament. *J. Clin. Periodontol.* 13, 862-868, 1986.
- 6) Kawase, T., Sato, S., Miake, K and Saito, S.: Alkaline phosphatase of Human Periodontal ligament fibro-blast-like cells. *Adv. Dent. Res.* 2, 234-239, 1988.
- 7) Oshima, M., Kuwata, K., Otsuka, K., Saito, R., Sato, K., Shioji, S. and Suzuki, K.: Alkaline phosphatase activities of cultured human periodontal ligament cells. *J. Nihon Univ. Sch. Dent.* 30, 208-217, 1988.
- 8) Somerman, M.J., Archer, S.Y., Imm, G.R. and Foster, R.A.: A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts *in vitro*. *J. Dent. Res.* 67, 66-70, 1988.
- 9) 原田秀一郎: ウサギの歯根膜細胞の細胞特性 I. 石灰化物形成能およびアルカリホスファターゼ活性. 日大歯学, 66, 555-562, 1992.
- 10) 及川榮二, 鈴木直人, 大越哲也, 鈴木 誠, 田村嘉之, 長沼 清, 前野正夫, 大塚吉兵衛: ウサギの歯根膜細胞の石灰化 nodule 形成過程に伴うホスファターゼ活性の変動について. 日大歯学, 67, 944-953, 1993.
- 11) Arceo, N., Sauk, J.J., Moehring, J., Foster, R.A. and Somerman, M.J.: Human periodontal cells initiate mineral-like nodules *in vitro*. *J. Periodontol.* 62, 499-503, 1991.
- 12) 佐藤和貴: ウサギの歯根膜細胞の特性 III. [¹⁴C] proline 標識コラーゲン性タンパク質について. 日大歯学, 67, 364-372, 1993.
- 13) Piche, J.E., Carnes, D.R. Jr. and Graves, D.T.: Initial characterization of cells derived from human periodontia. *J. Dent. Res.* 65, 761-767, 1981.
- 14) Nojima, N., Kobayashi, M., Sionome, M., Takahashi, N., Suda, T. and Hasegawa, K.: Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligament have the phenotypes of osteoblasts. *J. Periodontol. Res.* 25, 179-185, 1990.
- 15) Ahsan, M.S.: Effect of sex hormones on the growth and collagen metabolism of human gingival fibroblasts. *J. Hiroshima Univ. Dent. Soc.* 24, 125-129, 1992.
- 16) Vittek, J., Rappaport, S.C., Gordon, G.C., Munnangi, P.R. and Southren, A.L.: Concentration of circulating hormones and metabolism of androgens by human gingiva. *J. Periodontol.* 50, 254-264, 1979.
- 17) 辻 康雄: 歯周ポケット浸出液中の Estradiol-17β量と臨床所見について. 日歯周誌, 30, 368-374, 1988.
- 18) 青山 旬: 思春期における歯肉炎に関する研究—唾液中の性ホルモンと歯肉状況並びに歯肉縁下細菌との関連性—. 広大歯誌, 19, 161-173,

- 1987.
- 19) 鶴田圭伊子：思春期における歯肉炎の細菌学的研究。 *廣大歯誌*, 23, 249-260, 1991.
 - 20) 岩本義史, 岩崎姫佐子, 森下真行, 河村 誠, 土田和範, 宮城昌治, 青山 旬：学校における歯科保健に関する研究—中学生の歯周疾患実態調査—。 *口腔衛生会誌* 36, 96-102, 1986.
 - 21) Glickman, I.: *Clinical periodontology* 4th ed. W.B. Saunders company, Philadelphia, 275-289, 1972.
 - 22) Matsson, L. and Goldberg, P.: Gingival inflammatory reaction in children at different age. *J. Clin. Periodontol.* 12, 98-103, 1985.
 - 23) 岡本 莫, 谷川昌生, 小川哲次, 新堀 浩, 中西恵浩, 東 富恵, 白川正治：広島地区における中学生の歯周疾患罹患状態実態調査。第1報 第一次健診報告 *廣大歯誌*, 19, 261-266, 1987.
 - 24) Payne, J.B., Reinhardt, R.A., Masada, M.P., DuBois, L.M. and Allison, A.C.: Gingival crevicular fluid IL-8 corelation with local IL-1 β levels and patient estrogen status. *J. Periodont. Res.* 28, 451-453, 1993.
 - 25) Komm, B.S., Terpening, C.M., Benz, D.J., Graeme, K.A., Gallegos, A., Korc, M., Greene, G.L., O'malley, B.W. and Haussler, M.R.: Estrogen binding receptor mRNA and biologic response in osteoblast-like cells. *Science* 241, 84-85, 1988.
 - 26) Eriksen, E.F., Colvard, D.S., Bergv, N.J., Graham, M.L., Mann, K.G., Spersberg, T.C. and Riggs, B.L.: Evidence of estrogen receptor in normal human osteoblast-like cells. *Science* 241, 85-86, 1988.
 - 27) Rickard, D.J., Gowen, M. and MacDonald, B.R.: Proliferative responses to estradiol, IL-1 α and TGF- β by cells expressing alkaline phosphatase in human osteoblast-like cell cultures. *Calcif. Tissue Int.* 52, 227-233, 1993.
 - 28) van Paassen, H.C., Poortman, J., Borgart-Creutzburg, I.H.C., Thijssen, J.H.H. and Duursma, S.A.: Oestrogen binding proteins in bone cell cytosol. *Calcif. Tiss. Res.* 25, 249-254, 1978.
 - 29) Yoshida, T., Sato, B., Matsumoto, K. and Ono, K.: Steroid receptors in osteoblasts. *Clin. Orthop.* 148, 297-303, 1980.
 - 30) Votta, B.J. and Bertolini, D.R.: Cytokine suppressive anti-inflammatory compounds inhibit bone resorption *in vitro*. *Bone* 15, 533-538, 1994.
 - 31) Ray, A., Prefontaine, K.E. and Ray, P.: Down-modulation of interleukin-6 gene expression by 17 β -estradiol in the absence of high affinity DNA binding by the estrogen receptor. *J. Biol. Chem.* 269, 12940-12946, 1994.
 - 32) Horowitz, M.C.: Cytokines and estrogen anti-osteoporotic effects. *Science* 260, 626-627, 1993.
 - 33) Verhaar, H.J.J., Damen, C.A., Duursma, S.A. and Scheven, B.A.A.: A comparison of the action of progestins and estrogen on the growth and differentiation of normal adult human osteo-blast-like cells *in vitro*. *Bone* 15, 307-311, 1994.
 - 34) Lewko, W.M. and Anderson, A.: Estrogen receptor and growth response in cultured human periodontal ligament cells. *Life Science* 39, 1201-1206, 1986.
 - 35) 難波秀樹, 野村慶雄, 木下正彦, 清水秀樹, 小野耕資, 後藤弘幸, 新井英雄, 滝川雅之, 村山洋二：歯周組織と性ホルモン—歯根膜由来線維芽細胞の代謝に及ぼす性ホルモンの影響—。 *日歯周誌*, 31, 166-175, 1989.
 - 36) 山村辰二, 森下真行, 辻村紀代子, 福永真佐美, 岩本義史：培養ヒト歯肉および歯根膜由来線維芽細胞のエストロゲンレセプターに関する研究。 *廣大歯誌* 25, 415-418, 1993.
 - 37) Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.: *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold spring harbor laboratory. 1982.
 - 38) 酒井正春：ノーザンブロットとドットブロット分析, *バイオテクノロジー実験法シリーズ*, 遺伝子工学総集編；実験医学 (村井正実編)。5, 羊土社, 東京, 81-87, 1987.
 - 39) Bessey, O.A., Lowry, O.H. and Brock, M.J.: A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* 164, 321-329, 1964.
 - 40) Dahl, L.K.: A simple and sensitive histochemical method for calcium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 80, 474-479, 1952.
 - 41) Saito, S., Saito, M., Ngan, P., Lanese, R., Shanfeld, J. and Davidvitch, Z.: Effect of parathyroid hormone and cytokines on prostaglandin E synthesis and bone resorption by periodontal ligament fibroblasts. *Archs oral Biol.* 35, 845-855, 1990.
 - 42) 牛 忠英, 花澤重正, 竹下 玲, 村上幸生, 片山伊九右衛門, 北野繁雄：ヒト歯根膜由来の機能と遺伝子発現に関する研究—Transforming growth factor- β の作用。 *歯基礎誌*, 33, 133-140, 1991.
 - 43) Matsuda, N., Lin, W.L., Kumer, M., Cho, M.I. and Genko, R.J.: Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factor *in vitro*. *J. Periodontol.* 63, 515-525, 1992.
 - 44) Ishikawa, O., LeRoy, E.C., and Trojanowska, M.: Mitogenic effect of transforming growth factor β 1 on human fibroblasts involves the induction of platelet-derived growth factor α receptor. *J. Cell Physiol.* 145, 181-186, 1990.
 - 45) Dennison, D.K., Vallone, D.R., Pinero, G.J., Rittman, B. and Caffesse, R.G.: Differential effect of TGF- β 1 and PDGF on proliferation of periodontal

- ligament cells and gingival fibroblasts. *J. Periodontol.* **65**, 641-648, 1994.
- 46) Kawase, T., Sato, S., Deguchi, S., Kato, Y. and Saito, S.: Character of osteoblastic-fibroblast derived from human periodontal ligament *in vitro*. *Bull. of Kanagawa Dent. Coll.* **18**, 135-141, 1990.
- 47) Noda, M. and Rodan, G.A.: Type β transforming growth factor inhibits proliferation and expression of alkaline phosphatase in murine osteo-blast-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **140**, 56-65, 1986.
- 48) 江澤郁子: 骨粗鬆症. *化学と生物* **30**, 642-648, 1992.
- 49) Berestijn, E., Laarhoven, J. and Smals, A.: Body weight and/or endogenous estradiol as determinants of cortical bone mass and bone loss in healthy early postmenopausal woman. *Acta Endocrinol.* **127**, 226-230, 1992.
- 50) Capto, C.B., Meadows, D. and Raisz, L.G.: Failure of estrogens and androgens to inhibit bone resorption in tissue culture. *Endocrinol.* **98**, 1065-1068, 1976.
- 51) Horsman, A., Gallagher, J.C., Simpson, M. and Nordin, B.E.C.: Prospective trial of oestrogen and calcium in postmenopausal women. *B.M.J.* **2**, 789-792, 1977.
- 52) Chen, T. and Feldman, D.: Distinction between alphafetoprotein and intracellular estrogen receptors: evidence against the presence of estradiol receptors in rat bone. *Endocrinol.* **102**, 236-244, 1978.
- 53) 二宮一弥編: 生体成分の科学. 南江堂, 東京, 261-264. 1985.
- 54) 吉利 和監訳: ハリソン内科学; 第9版. 廣川書店, 東京, 2870, 1981.
- 55) 小島元子: ステロイドの存在様式と代謝. *臨床病理臨増*, **52**, 30-33, 1982.
- 56) Robinson, R. and Soames, K.M.: The possible signification of hexosephosphoric ester in ossification. *J. Biochem.* **18**, 740-745, 1924.
- 57) Fleisch, H. and Neuman, W.F.: Mechanism of calcification role of collagen, polyphosphates and phosphatase. *Am. J. Physiol.* **200**, 1296-1300, 1961.
- 58) Fishman, W.H.: Perspectives on alkaline phosphatase isoenzymes. *Am. J. Med.* **56**, 617-650, 1974.
- 59) Badger, K.S. and Sussman, H.H.: Structural evidence that human liver and placental alkaline phosphatase isoenzymes are coded by different genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 2201-2205, 1976.
- 60) Seargeant, L.E. and Stinson, R.A.: Evidence that three structural genes code for human alkaline phosphatases. *Nature* **281**, 152-154, 1979.
- 61) Somerman, M.J., Young, M.F., Foster, R.A., Moehring, J.M., Imm, G.R. and Sauk, J.J.: Characteristics of human periodontal ligament cell-sin vitro. *Archs. oral Biol.* **35**, 241-247, 1990.
- 62) 片山一郎: 培養ヒト歯根膜細胞のアルカリホスファターゼアインザイムに関する研究. *日大歯学*, **66**, 563-570, 1992.
- 63) 吉田栄泉: 培養ヒト歯根膜細胞および歯肉線維芽細胞のアルカリホスファターゼおよび酸性ホスファターゼ. *日大歯学*, **65**, 824-831, 1991.
- 64) Scheven, B.A.A., Damen, C.A., Hamilton, N.J., Verhaar, H.J.J. and Duursma, S.A.: Stimulatory effects of estrogen and progesterone on proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **186**, 54-60, 1992.
- 65) Kodama, H., Amagi, Y., Sudo, H., Kasai, S. and Yamamoto, S.: Establishment of clonal osteogenic cell line from new bone mouse calvalia. *Jpn. J. oral Biol.* **23**, 899-901, 1981.
- 66) Gerstenfeld, L.C., Chipman, S.D., Kelly, C.M., Hodgens, K.J., Lee, D.D. and Landis, W.J.: Collagen expression, ultrastructural assembly, and mineralization in cultures of chicken embryo osteoblasts. *J. cell Biol.* **106**, 979-989, 1988.
- 67) Gerstenfeld, L.C., Lian, J.B., Gotoh, Y., Lee, D.D., Landis, W.J., McKee, M.D., Nanci, A. and Glimcher, M.J.: Use of cultured embryonic chicken osteo-blasts as a model of cellular differentiation and bone mineralization. *Connect. Tissue Res.* **21**, 215-225, 1989.
- 68) 鈴木邦治, 秋山浩教, 加藤 孝, 小管一弘, 村井正大, 鈴木直人, 前野正夫, 大塚吉兵衛, 鈴木貫太郎: ヒト歯槽骨由来細胞の細胞特性 第3報 石灰化物形成過程とホスファターゼ活性の経日的変動について. *日歯周誌*, **33**, 101-109, 1991.
- 69) 柴 秀樹: ヒト培養歯髓細胞の石灰化能に関する研究. *広歯誌*, **25**, 58-71, 1993.
- 70) Shirakawa, M., Shiba, H., Nakanishi, K., Ogawa, T., Okamoto, H., Nakashima, K., Noshiro, M. and Kato, Y.: Transforming growth factor-beta-1 reduces alkaline phosphatase mRNA and activity and stimulates cell proliferation in cultures of human pulp cells. *J. Dent. Res.* **73**, 1509-1514, 1994.
- 71) 佐々木哲: 骨の非コラーゲン性蛋白質—オステオカルシンとオステオネクチン. *歯基礎誌*, **25**, 847-856, 1983.
- 72) Price, P.A., Otsuka, A.S., Poser, J.W., Kristaponis, J. and Raman, N.: Characterization of γ -carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 1447-1451, 1976.
- 73) Hauschka, P.V., Lian, J.B. and Gallop, P.M.: Direct identification of the calcium binding amino

- acid γ -carboxyglutamate in mineralized tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3925-3929, 1975.
- 74) Price, P.A., Poser, J.W. and Raman, N.: Primary structure of the γ -carboxyglutamic acid-containing proteins from bovine bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 3374-3375, 1976.
- 75) Morrison, N.A., Shine, J., Fragonas, J.C., Verkest, V., MacMenemy, M.L. and Eisman, J.A.: 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃-responsive element and glucocorticoid repression in the osteocalcin gene. *Science* **246**, 1158-1161, 1989.
- 76) Fraser, J.D., Otawara, Y. and Price, P.A.: 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ stimulates the synthesis of matrix γ -carboxyglutamic acid protein by osteosarcoma cells. Mutually exclusive expression of vitamin K-dependent bone proteins by clonal osteoblastic cell lines. *J. Biol. Chem.* **263**, 911-916, 1988.