

未分化なヒト歯根膜細胞株の分化に及ぼすカルシウムの影響

郡, 勝明
九州大学大学院歯学府

<https://doi.org/10.15017/26328>

出版情報：九州大学, 2012, 博士（歯学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：

未分化なヒト歯根膜細胞株の分化に
及ぼすカルシウムの影響

2013 年

郡 勝明

九州大学大学院歯学研究院

口腔機能修復学講座

歯科保存学研究分野

指導教員 赤峰 昭文 教授

目次

1	要旨	1
2	諸言	3
3	材料と方法	6
3-1.	細胞培養	
3-1-1.	培養ヒト歯根膜細胞株	
3-1-2.	試薬	
3-2.	細胞増殖実験	
3-3.	定量的 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)法による遺伝子発現解析	7
3-4.	細胞/組織化学的染色	
3-4-1.	石灰化解析	
3-4-2.	免疫組織化学的染色	8
3-4-3.	免疫蛍光染色	
3-5.	ヒト歯根膜細胞株のラットへの移植	9
3-6.	細胞内カルシウム濃度測定	
3-7.	統計学的分析	
4	結果	12
4-1.	カルシウム刺激を行ったヒト歯根膜細胞株における細胞増殖	
4-2.	カルシウム刺激を行ったヒト歯根膜細胞株におけるセメント質/骨関連遺伝子の発現	
4-3.	カルシウム刺激を行ったヒト歯根膜細胞株における石灰化実験	

4-4. カルシウム刺激を行ったヒト歯根膜細胞株における CaSR 発現解析	16
4-5. ラット歯根膜組織における CaSR の発現解析	
4-6. ヒト歯根膜細胞株の骨内埋入による硬組織形成	
4-7. CaSR 拮抗薬がヒト歯根膜細胞株の骨/セメント質関連遺伝子発現に及ぼす影響	20
4-8. CaSR 拮抗薬がヒト歯根膜細胞株の石灰化に及ぼす影響	
4-9. L-VDCC の阻害薬がヒト歯根膜細胞株の石灰化および細胞内カルシウム濃度に及ぼす影響	
4-10. L-VDCC 阻害薬がヒト歯根膜細胞株の CaSR 遺伝子発現に及ぼす影響	21
5 考察	26
6 総括	30
7 謝辞	31
8 参考文献	32

本研究の一部は

K Koori, H Maeda, S Fujii, A Tomokiyo, N Wada, S Monnouchi, K Kono, N Yamamoto, Y Teramatsu, A Akamine (2012).

Effects of calcium on osteoblastic/cementoblastic differentiation of human periodontal ligament stem/progenitor cell lines

International Endodontic Journal に投稿し、審査中である。

1. 要旨

セメント質ならびに骨基質においてカルシウムは主要な構成成分であるが、一方で細胞外カルシウムは骨芽細胞に直接作用することによって、石灰化を増進させる働きがあることが報告されている。我々は近年、カルシウムによって刺激されたヒト歯根膜細胞が、セメント質/骨関連遺伝子の発現を促進することを報告した。しかしながら、カルシウムが未分化な歯根膜細胞の分化に及ぼす影響については不明であることから、本研究では、近年我々が報告した2種の分化段階の異なるヒト歯根膜前駆細胞株（1-11細胞株および1-17細胞株）を用いて、未分化な歯根膜細胞に与える増殖能、分化能および石灰化能に与える影響について検討した。

CaCl₂含有培地にて刺激を行った結果、両細胞株の細胞増殖は有意に促進された。さらにセメント質/骨関連遺伝子の発現が有意に上昇し、両細胞株とともに石灰化反応が認められた。またカルシウム含有の生体材料であるハイドロキシアパタイト（HAp）に両細胞株を付着させラット脛骨に移植を行った結果、HAp表面に両細胞株による石灰化物の形成が認められた。以上より、ヒト歯根膜細胞株はカルシウムによって細胞増殖および石灰化が促進されることが示された。

次に、カルシウム感知受容体（CaSR）が両細胞株の石灰化に与える影響について検討した。カルシウム刺激を行った両細胞株において、CaSR遺伝子の有意な発現の上昇を認め、ラットの歯根膜における抗CaSR抗体による免疫組織化学的染色の結果、歯槽骨側において顕著に局在を認めた。また、CaSRの拮抗薬であるNPS2143を用いてカルシウム刺激を行った結果、カルシウム単独刺激群

と比較して石灰化が増大し、セメント質/骨関連遺伝子発現が有意に増加した。一方、L型電位依存性 Ca^{2+} チャンネル (L-VDCC) の阻害薬であるニフェジピンを用いて実験を行った結果、両細胞株における *CaSR* 遺伝子の発現上昇を認め、カルシウム刺激群と比較して明らかな石灰化の抑制を認めた。

以上より、細胞外カルシウム刺激を受けた未分化なヒト歯根膜細胞株において、L-VDCC は石灰化を促進し、一方で *CaSR* は抑制的に働いていることが明らかになり、さらに L-VDCC は *CaSR* の発現に対して抑制的に働いていることが示された。これらの結果より、カルシウム刺激による未分化なヒト歯根膜細胞の石灰化は *CaSR* および L-VDCC を介して調節されている可能性が示唆された。

2. 緒言

カルシウムは骨やセメント質における主要な構成成分の1つであり、骨またはセメント質系統の細胞に作用し、これらの組織の維持に重要な働きを有していると考えられている。実際、細胞外カルシウムの上昇は、マウスの骨芽様細胞株の細胞増殖およびラットの頭蓋冠細胞における *OCN* および *OPN* の遺伝子発現を促進することが報告されている (1-3)。歯科領域において、カルシウムを含有した根管貼薬剤は、抗菌作用 (4) および根尖周囲組織の再生効果 (5) を有するという報告があり、中でも mineral trioxide aggregate (MTA) は、セメント質の伝導 (6) や、歯根膜組織の再生および骨形成 (7) において優れた効果を示すことが報告されている。近年、我々は、MTA が 14 日間で約 4 mM の濃度のカルシウムイオンを放出し、MTA ディスク上で培養したヒト歯根膜細胞 (HPDLCs) における骨/セメント質関連遺伝子発現を促進することを報告した (8)。また、5mM の CaCl_2 を含む培地にて HPDLCs を培養し石灰化実験を行った結果、コントロール群および MgCl_2 を添加した群において石灰化が認められなかったのに対して、有意に石灰化が亢進した (8)。これらの結果により、カルシウムが HPDLCs の骨またはセメント質形成において重要な役割を担っていることが示唆された。

歯根膜組織は歯槽骨およびセメント質間に位置する特異的な結合組織であり、歯根を歯槽骨内に繋ぎ留める役割を担っている。重度齲蝕や歯周組織の破壊は結果として歯の喪失を招き、現在に至るまで確固たる治療法は確立されていない。歯根膜組織は線維芽細胞、歯根膜前駆細胞 (periodontal ligament stem/progenitor cells, PDLSCs)、マラッセの上皮遺残ならびに血管系の細胞等を含むヘテロな細胞集団であり (9)、中でも PDLSCs は自己再生能および骨芽細胞

またはセメント芽細胞のような骨系細胞や線維芽細胞様細胞への分化能を有していることが報告されている(10-12)。しかしながら、歯根膜組織から採取できる PDLSCs の量は極めて微量であり、PDLSCs の骨芽細胞分化および歯根膜細胞分化の調節に関しては明らかにされていないのが現状である。そこで本研究ではまず、近年著者の研究グループが樹立した2種類の未分化なヒト歯根膜細胞株(13, 14)を用いて、細胞外カルシウムが増殖および分化に及ぼす影響について検討した。

また、骨芽細胞がカルシウムを受容し、分化を促進する経路としては受容体およびチャネルによる2種の経路が知られていることから、本研究では、代表的なものとしてそれぞれカルシウム感知受容体(CaSR)およびL型電位依存性Ca²⁺チャネル(L-VDCC)に着目して検討を行った。

CaSRは、7回膜貫通型のclass 3 G-protein-coupled receptor (GPCR)に分類され、ウシの上皮小体より同定された(15)。CaSRは、骨芽細胞のみならず他の細胞にも幅広く発現しており、Ca²⁺、Gd³⁺またはSr²⁺等の陽イオンをリガンドとして活性化し、細胞内カルシウムの恒常性や副甲状腺ホルモン濃度の調節等に関与することが知られている(16)。また、CaSRをノックアウトしたマウスは、上皮小体機能亢進症、高カルシウム血症、低リン酸血症、くる病、および骨の石灰化不全等の症状を呈することが報告されており、CaSRと骨代謝との関連性が強く示唆されている(17)。加えて、CaSRの活性により骨芽細胞の分化および石灰化を促進することが報告されている(18)。

一方、L-VDCCは多くの細胞に存在しており、細胞外のカルシウムイオンを細胞内へ取り込む役割を担っている(19)。近年、L-VDCCを介して上昇した細胞内カルシウムイオンは、骨芽細胞における分化を促進し(19)、また、間葉系幹細胞の骨芽細胞様分化を促進することが報告されている(20)。

以上のように、CaSR および L-VDCC は、細胞外カルシウムを介して骨芽細胞分化に働くことが報告されているが、ヒト歯根膜細胞の骨系細胞分化に及ぼす影響について調べた報告は少ない。また、CaSR および L-VDCC の両者に注目した研究は報告されていない。

以上より本研究では、細胞外カルシウムが未分化なヒト歯根膜細胞株の細胞増殖および石灰化に与える影響、ならびに石灰化における CaSR および L-VDCC の影響について検討した。

3. 材料と方法

3-1. 細胞培養

3-1-1. 培養ヒト歯根膜細胞株

2種の未分化なヒト歯根膜細胞株(1-11細胞株および1-17細胞株)(13, 14)を本実験に用いた。それぞれの細胞株は、37°C、5% CO₂、湿度100%条件下で、50μg/mL ストレプトマイシンならびに50units/mL ペニシリン(Gibco-BRL, Grand Island, NY)含有のalpha-minimum essential medium (α-MEM; Gibco-BRL)に10%ウシ胎児血清(FBS; Biowest, Nuaille France, USA または HyClone, Logan, USA)を添加した培地(10% FBS/α-MEM)で培養した。全ての実験は九州大学大学院歯学研究院倫理委員会承認のもと、それぞれの患者から同意を得た上で行った。

3-1-2. 試薬

塩化カルシウム(CaCl₂; Wako, Osaka, Japan) 5mM を培地に添加し、カルシウム刺激培地とした。CaSRの拮抗薬として、NPS2143(10μM, Ganolix lifescience Co., Ltd., Shanghai, China)を、またL-VDCCの阻害薬として、nifedipine(5μM, Wako)を、それぞれDimethyl sulfoxide(DMSO; Wako)に溶解し、培地に添加した。NPS2143またはニフェジピンは、カルシウム刺激の1日前にそれぞれ10または5μMの濃度で添加し、前処理を行った。

3-2. 細胞増殖実験

1-11細胞株または1-17細胞株(5×10³cells/well)を48-well cell culture plate(Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ)に播種し、250μlの10%FBS/α-MEM

またはカルシウム添加培地にて培養した。0、1 および 3 日間培養後、Cell Proliferation Assay kit (Millipore Corp., Billerica, MA) の WST-1 試薬 25 μ l をそれぞれのウェルに加え、30 分間培養後、上清液 110 μ l を 96-well cell culture plate (Becton Dickinson Labware) に移し、microplate reader (Immuno Mini NJ-2300; System Instruments Co., Ltd., Tokyo, Japan) にて、450nm における吸光度を測定した。

3-3. 定量的 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)法による遺伝子発現解析

First-strand cDNA は、total RNA に ExScript RT Reagent kit (Takara Bio Inc.) の反応液を添加し、42°C 15 分、次いで 99°C 2 分加熱し、逆転写反応を行った。PCR 解析は、First-strand cDNA を SYBR Green II (Takara Bio Inc.) 含有の反応液に加え、Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara Bio Inc.) を用いて解析した。95°C で 10 秒間加熱した後、95°C 5 秒、60°C 30 秒のサイクルで DNA の増幅を 40 サイクルまたは 50 サイクルにて行った。内部標準遺伝子である *Human beta-actin* (β -act) をコントロールとし、delta-delta C_t ($\Delta\Delta C_t$) 値にて目的遺伝子の発現量解析を行った (21, 22)。使用したプライマーの塩基配列、各 PCR 産物の塩基対数、ならびにサイクル数を table に示す。

3-4. 細胞/組織化学的染色

3-4-1. 石灰化解析

1-11 細胞株または 1-17 細胞株 (1×10^5 cells/well) を 24 well cell culture plate (Becton Dickinson Labware) にそれぞれ播種し、カルシウム刺激培地、NPS2143 またはニフェジピン添加培地にて 2 週間培養後、Alizalin red 染色および von

Kossa 染色を行った。Alizalin red 染色は、培養細胞を 10%ホルマリン液にて固定後、Alizarin Red (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA) にて染色した。また、von Kossa 染色は、培養細胞を 4% paraformaldehyde (PFA; Merck, Darmstadt, Germany) にて固定した後、2%硝酸銀 (Nacalai Tasque, Kyoto, Japan) にて染色を行った。

3-4-2. 免疫組織化学的染色

5 週齢の雄性 SD ラット (Kyudo Co. Ltd, Saga, Japan) を、4%PFA にて灌流固定を行い、上顎骨を摘出した。これを 10% EDTA (EDTA・2K; Wako) で 2 週間の脱灰後、パラフィンに包埋し、5 μ m 切片を作製した。2%BSA (Nakarai tesque Inc., Kyoto, Japan) にて非特異的反応性タンパクをブロッキング後、1 次抗体としてヤギ抗ヒト CaSR ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) を、2 次抗体としてビオチン化抗ヤギ抗体 (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan) を用いて、DAB 試薬 (Nichirei) にて染色を行った。さらに、1-11 細胞株または 1-17 細胞株におけるヒト vimentin の発現解析には、マウス抗ヒト vimentin モノクローナル抗体 (V9, Dako, Carpinteria, MA) ならびに Vector M.O.M. Immunodetection kit (Vector laboratories, Inc, Burlingame, CA, USA) を用いて行った (23)。

3-4-3. 免疫蛍光染色

1-11 細胞株または 1-17 細胞株 (1×10^4 cells/well) を 3.5cm cell culture plate (Becton Dickinson Labware) に播種し、10%FBS/ α -MEM、またはカルシウム刺激培地にて、それぞれ 5 日または 4 日間培養後、4%PFA にて固定を行った。2%BSA にてブロッキング後、1 次抗体としてヤギ抗ヒト CaSR 抗体を用い、2

次抗体として Alexa Fluor®488 標識抗ヤギ IgG 抗体 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて解析した。画像解析は、Biozero digital microscope (Keyence Corporation, Osaka, Japan) にて観察を行った。

3-5. ヒト歯根膜細胞株のラットへの移植

1-11 細胞株または 1-17 細胞株 (1×10^6 cells/well) を UpCell (6 Multi-well plate; Cellseed, Inc., Tokyo, Japan) に播種し、10% FBS/ α -MEM にて 4 日間培養し、細胞シートを作製した。ハイドロキシアパタイト (HAp) は径 1mm×高さ 2mm の円柱状に加工を施した二水石膏を 1000°C で 2 時間加熱処理し、リン酸アンモニウムを加え、さらに 200°C で 4 時間熱処理を加えて作製した。この HAp に細胞シートを付着させ、10% FBS/ α -MEM にて 24 時間培養後、6 週齢の雄性ラット (F344/Jcl, Nihoncrea, Tokyo, Japan) の脛骨近位骨端内に移植した。また、コントロール群には HAp のみを移植した。移植後 4 週で HAp を含む脛骨片を摘出し、10% EDTA で 2 週間の脱灰後、パラフィンに包埋し、5 μ m 切片を作製した。

3-6. 細胞内カルシウム濃度測定

1-11 細胞株または 1-17 細胞株 (1×10^4 cells/well) を 96-well cell culture plate に播種し、10% FBS/ α -MEM または 5 μ M ニフェジピンを添加した培地にて 24 時間培養後、Calcium Kit-Fluo 4 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いてカルシウムに特異的に結合する蛍光プローブを導入した。37°C 環境下における 180 秒間の細胞内カルシウム濃度の動態を Infinite 200 (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) を用いて測定した。測定開始より 10 秒後に、5mM の CaCl₂ (20 μ l/well) を添加するよう設定を行った。

3-7. 統計学的分析

全ての値において平均値±標準偏差にて示した。さらに統計学的解析は *Student's t-test* を用いて検定し、P 値は *Dunnet* の多重比較法を用いて補正した。

Table. Specific primer sequence, annealing temperature, cycle numbers, and product size for quantitative RT-PCR

Target gene (abbreviation)	Primer sequence forward/reverse	Annealing temperature (°C)	Cycle numbers	Size of products (bp)
bone morphogenetic protein 2 (BMP2)	5'- TCCACTAATCATGCCATTGTTTCAGA -3' 5'- GGGACACAGCATGCCTTAGGA -3'	60	40	74
calcium sensing receptor (CaSR)	5'- TCCACGGTCAGATTTGCTGTTC -3' 5'- TTGATGTCCCATCAGTCTGCAC -3'	60	50	89
osteocalcin (OCN)	5'- CCCAGGCGCTACCTGTATCAA -3' 5'- GGTCAGCCAACTCGTCACAGTC -3'	60	40	112
osteopontin (OPN)	5'- ACACATATGATGGCCGAGGTGA -3' 5'- TGTGAGGTGATGTCCTCGTCTGTAG -3'	60	40	115
runt-related transcription factor 2 (RUNX2)	5'- AACCTTAATTTGCACTGGGTCA -3' 5'- CAAATTCAGCAATGTTTGTGCTAC -3'	60	40	179
transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)	5'- AGCGACTCGCCAGAGTGGTTA -3' 5'- GCAGTGTGTTATCCCTGCTGTCA -3'	60	40	125
β -actin	5'- ATTGCCGACAGGATGCAGA -3' 5'- GAGTACTTGCCTCAGGAGGA -3'	60	40	89

4.結果

4-1. カルシウム刺激を行ったヒト歯根膜細胞株における細胞増殖

1-11細胞株または1-17細胞株を、それぞれ10%FBS/ α -MEMもしくは5mM CaCl₂を添加したカルシウム刺激培地にて0、1または3日間培養し、細胞増殖実験を行った。その結果、1-11細胞株および1-17細胞株ともに、3日後にコントロール群と比較して、有意に細胞増殖が促進した (Fig. 1A, B)。

4-2. カルシウム刺激を行ったヒト歯根膜細胞株における骨/セメント質関連遺伝子の発現

1-11 細胞株または 1-17 細胞株を、それぞれ 10%FBS/ α -MEM もしくはカルシウム刺激培地にて、3 日 (Fig. 2A, D)、7 日 (Fig. 2B, E) または 14 日間 (Fig. 2C, F) 培養後に、*BMP2*、*OCN*、*OPN*、*RUNX2*、および *TGF- β 1* の遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法にて測定した。カルシウム刺激後 7 日目には、1-11 細胞株では *OPN* の発現の上昇のみ認められ、1-17 細胞株においてはこれら全ての遺伝子の発現が有意に上昇した。カルシウム刺激後 14 日目には、1-11 細胞株において *BMP2* 以外の全ての遺伝子発現が上昇し、1-17 細胞株では *TGF- β 1*、*RUNX2* のみが有意に発現が上昇した。

4-3. カルシウム刺激を行ったヒト歯根膜細胞株における石灰化実験

1-11 細胞株または 1-17 細胞株をカルシウム刺激培地で培養し、4 週間後に von Kossa 染色を行った。24 穴プレート上に細胞を播種し、0、1 および 5mM の CaCl₂ にて刺激を行った (Fig. 3A-D)。両細胞株ともに 0 および 1mM CaCl₂ 添加群では von Kossa 陽性像は認められなかったが、5mM CaCl₂ 添加群において有意に高い

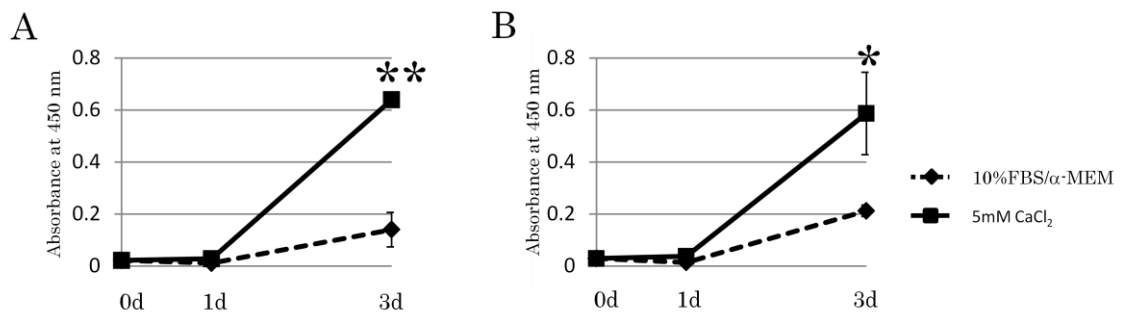


Figure 1. カルシウム刺激を行ったヒト歯根膜細胞株における細胞増殖

1-11 細胞株 (A) または 1-17 細胞株 (B) を 10%FBS/α-MEM またはカルシウム刺激培地にて、それぞれ 0 日、1 日および 3 日間の培養を行い、細胞増殖実験を行った。その結果、両細胞株ともに 3 日目においてコントロール群と比較して有意な細胞増殖が認められた。

n=4、*P<0.05、**P<0.01

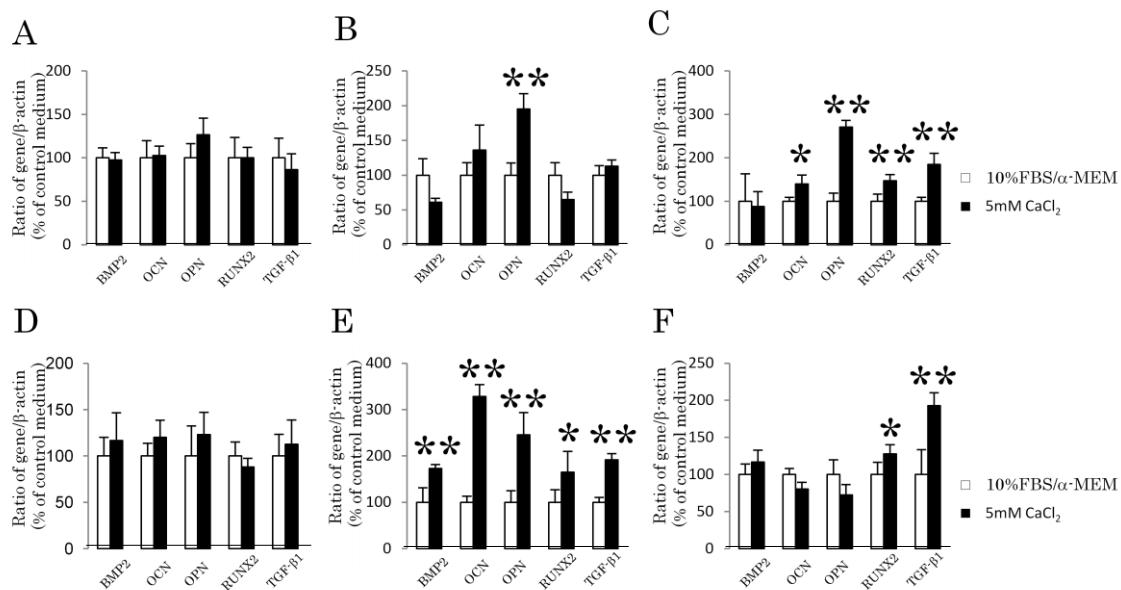


Figure 2. カルシウム刺激を行ったヒト歯根膜細胞株における骨/セメント質関連遺伝子の発現

1-11 細胞株 (A, B, C) または 1-17 細胞株 (D, E, F) をカルシウム刺激培地にて培養し、それぞれ 3 日 (A, D)、7 日 (B, E) および 14 日 (C, F) 後に、*BMP2*、*OCN*、*OPN*、*RUNX2* および *TGF-β1* の遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法にて測定した。

カルシウム刺激後 3 日目では、両細胞株ともに各々の遺伝子発現に有意差は認められなかった。カルシウム刺激後 7 日では、1-11 細胞株は *OPN* のみ発現が上昇し、1-17 細胞株は全ての遺伝子発現が有意に上昇した。カルシウム刺激後 14 日目では、1-11 細胞株は *BMP2* を除く全ての遺伝子発現の上昇が認められ、1-17 細胞株は *TGF-β1* および *RUNX2* においてのみ有意な発現の上昇が認められた。

n=4、*P<0.05、**P<0.01

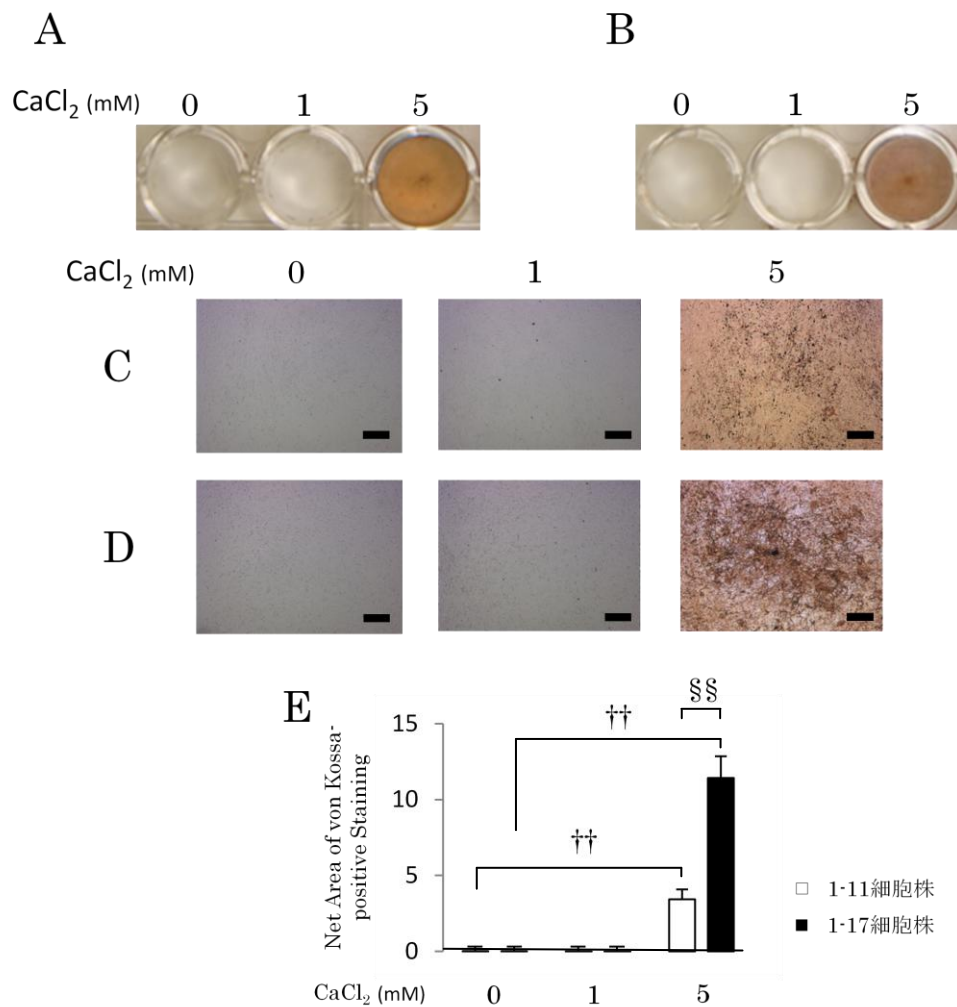


Figure 3. カルシウム刺激を行ったヒト歯根膜細胞株における石灰化実験

1-11 細胞株 (A, C) または 1-17 細胞株 (B, D) をカルシウム刺激培地で培養し、4 週間後に von Kossa 染色を行った。(C) (D) はそれぞれ (A) (B) の拡大像を示す。0、1 または 5mM の CaCl₂ にて刺激を行い、両細胞株の von Kossa 陽性部位は scion imaging software を用いて定量解析を行った (E)。両細胞株ともに、0 および 1mM 刺激群には陽性像を認めなかったが、5mM 刺激群において有意に高い von Kossa 陽性像が認められた。また、1-11 細胞株と比較して 1-17 細胞株は、強い von Kossa 陽性像を示した。

n=4、^{††} P<0.01 (vs. コントロール)、^{§§} P<0.01 (vs. 1-11 細胞株)、bars=100μm

von Kossa 陽性像が認められた (Fig. 3E)。

4-4. カルシウム刺激を行ったヒト歯根膜細胞株における CaSR 発現解析

1-11 細胞株または 1-17 細胞株をカルシウム刺激培地にて、3 日、4 日、5 日または 7 日間培養後の *CaSR* の遺伝子発現について定量的 RT-PCR 法にて解析した (Fig. 4A, B)。1-11 細胞株では、5 日間の刺激群においてのみ有意な発現の上昇が認められた (Fig. 4A)。また、1-17 細胞株では、培養 4 日および 5 日目において有意な発現の上昇が認められた (Fig. 4B)。次に、1-11 細胞株または 1-17 細胞株をカルシウム刺激培地にてそれぞれ 5 日および 4 日間培養した後、ヤギ抗ヒト CaSR 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。1 次抗体を除いた群 (Fig. 4C, F) およびコントロール群 (Fig. 4D, G) では発現が認められなかったのに対し、カルシウム刺激群 (Fig. 4E, H) においては両細胞株ともに顕著な陽性反応が認められた。

4-5. ラット歯根膜組織における CaSR の発現解析

5 週齢の雄性ラットの水平断切片を、ヤギ抗ヒト CaSR 抗体を用いて免疫組織化学的染色を行った結果、歯根膜細胞、セメント芽細胞、および骨芽細胞にて強い陽性像が確認された (Fig. 5 B, D, F)。また、1 次抗体を除いたコントロール群では陽性反応が認められなかった (Fig. 5A, C, E)。

4-6. ヒト歯根膜細胞株の骨内埋入による硬組織形成

6 週齢雄性ラットの脛骨に 1-11 細胞株または 1-17 細胞株の細胞シートを付着させた HAp を埋入し、4 週後における切片を H-E 染色 (Fig. 6 A-C) またはマウス抗ヒト vimentin 抗体による免疫組織化学的染色 (Fig. 6D-F) にて評価した。

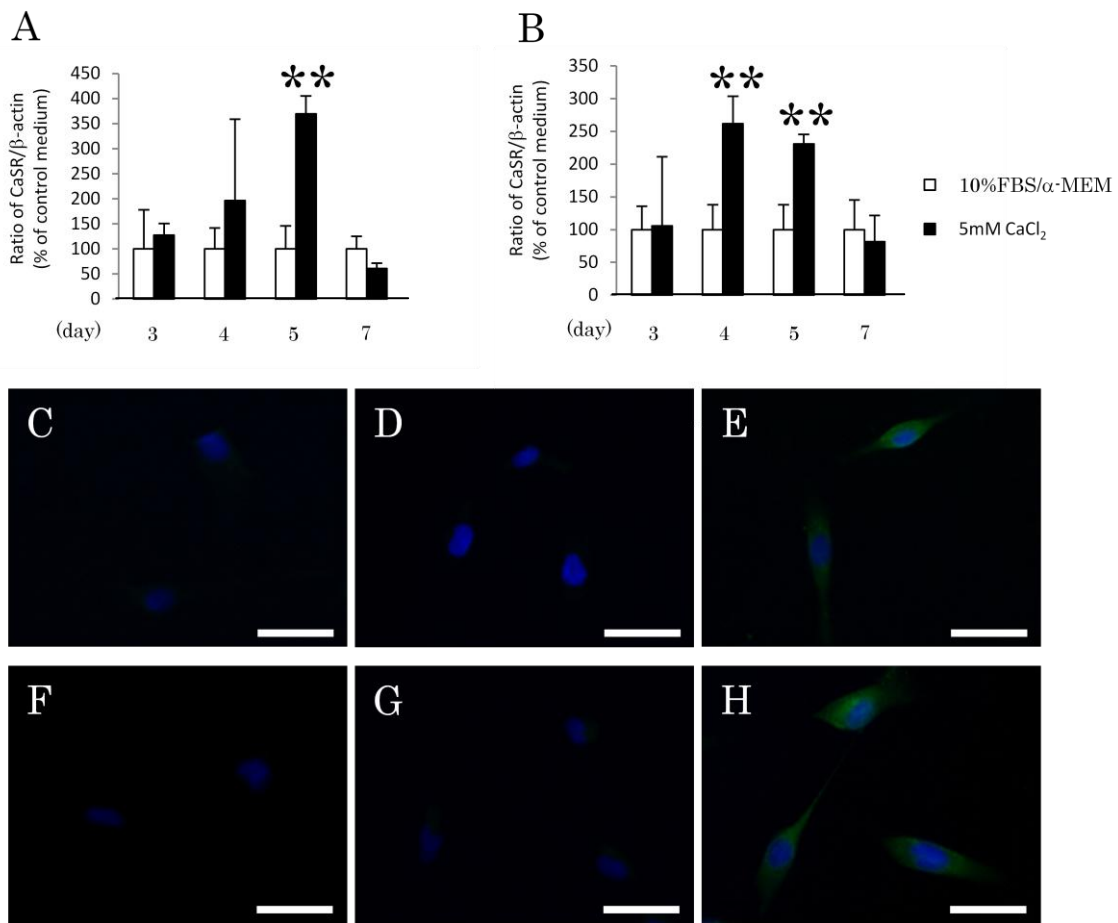


Figure 4. カルシウム刺激を行ったヒト歯根膜細胞株における *CaSR* 発現解析

1-11 細胞株 (A) または 1-17 細胞株 (B) をカルシウム刺激培地で培養し、3、4 日、5 日および 7 日目における *CaSR* 遺伝子の発現について定量的 RT-PCR 法にて解析を行った。1-11 細胞株では、3 日、4 日および 7 日目においてカルシウム刺激による発現の上昇は認められなかったが、5 日目に *CaSR* 遺伝子の発現が有意に上昇した。一方、1-17 細胞株は、3 日および 7 日目における発現は促進しなかったが、4 日および 5 日目において有意な発現の上昇が認められた。

また、1-11 細胞株 (C, D, E) および 1-17 細胞株 (F, G, H) を、それぞれ 5 日および 4 日間カルシウム刺激で培養後、抗ヒト *CaSR* 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。カルシウム刺激した両細胞株において明瞭な陽性反応 (緑) が認められた (E, H)。(C, F) : コントロール培地で培養した群。(D, G) : 一次抗体を除いたネガティブコントロール群。DAPI (青) にて核染色を行った。

n=4、**P<0.01、bars=50μm

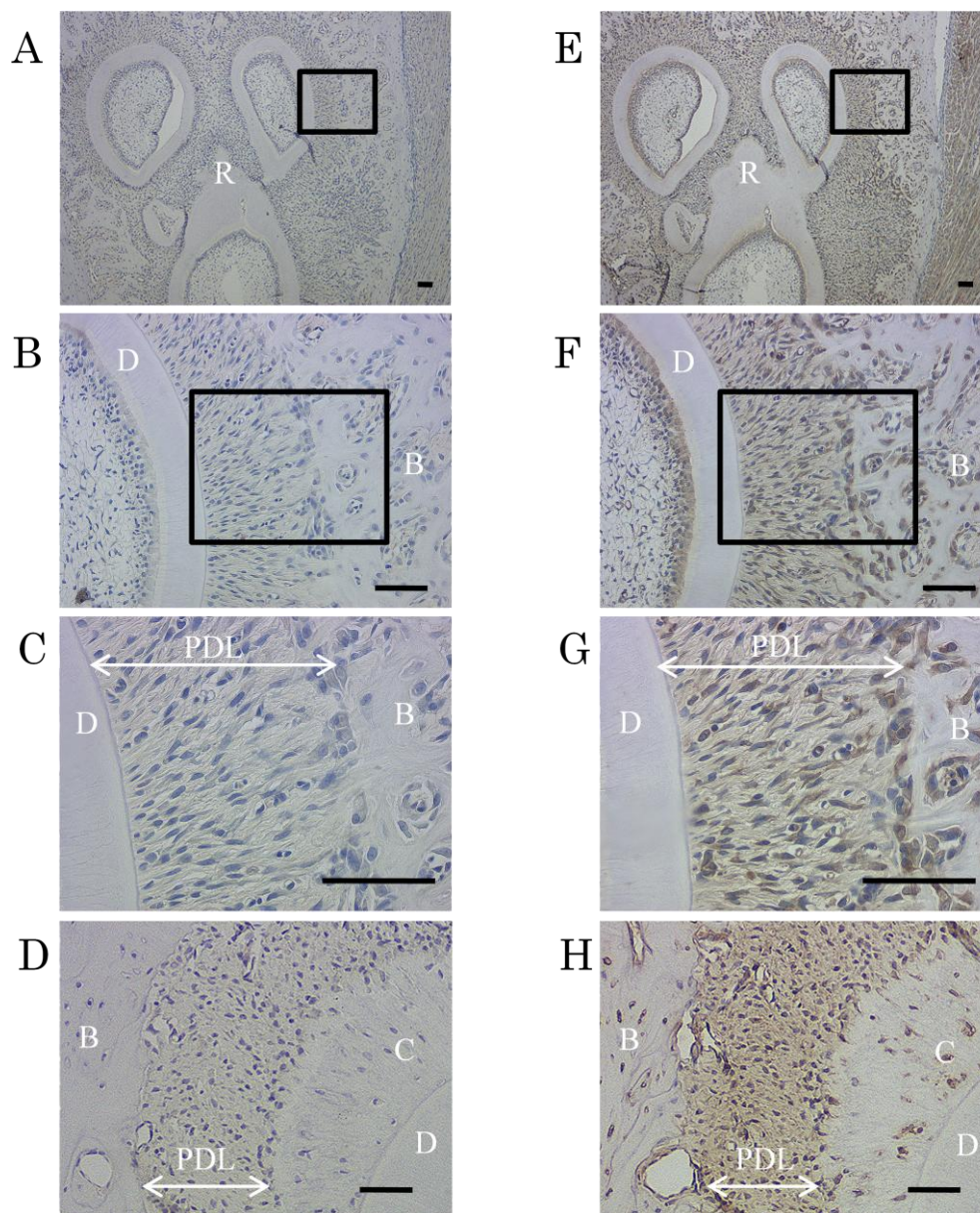


Figure 5. ラット歯根膜組織における CaSR の発現解析

5週齢の雄性ラットの下顎第一臼歯の水平断切片を、ヤギ抗ヒト CaSR 抗体を用いて免疫組織化学的染色を行った。(A-D)：一次抗体を除いたネガティブコントロール。(B, F)：(A, E) 中の枠内の拡大図。(C, G)：(B, F) 中の枠内の拡大図。(D, H)：根尖付近の歯根膜組織像。(G)において歯根膜細胞および骨芽細胞、(H)よりセメント芽細胞に明瞭な陽性像(茶)を認めた。核はヘマトキシリンにて染色(青)を行った。

B：歯槽骨、C：セメント質、D：象牙質、PDL：歯根膜、R：歯根

bars=100 μ m

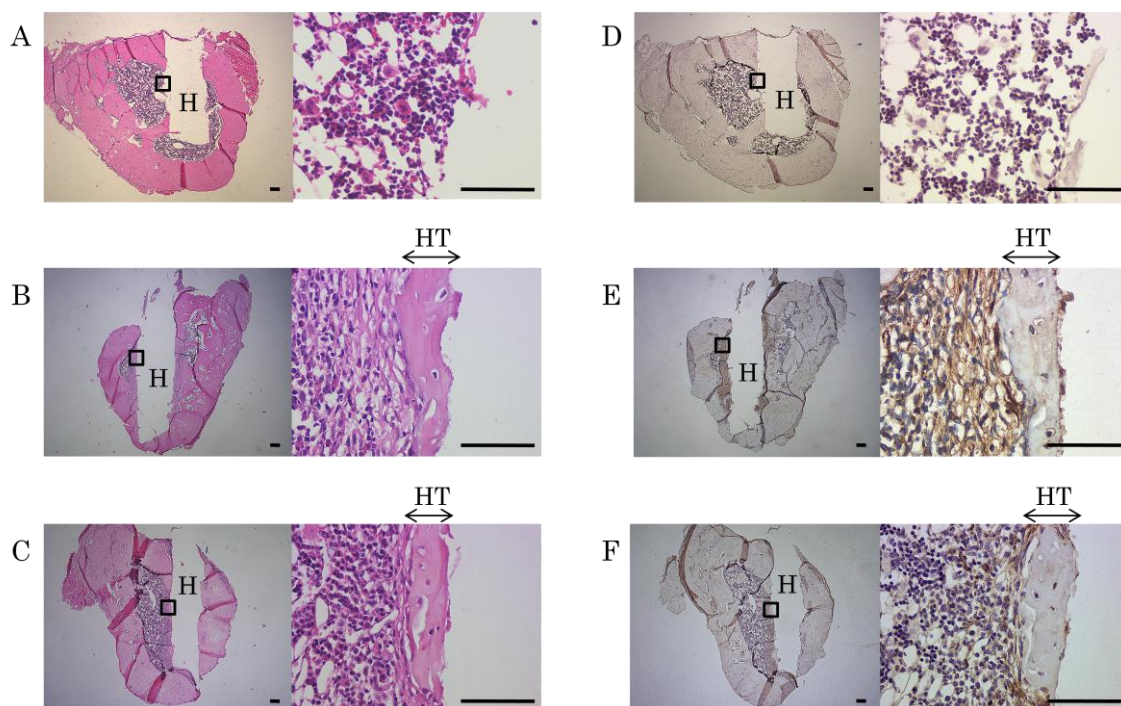


Figure 6. ヒト歯根膜前駆細胞株の骨内埋入による硬組織形成

1-11 細胞株 (B, E) 及び 1-17 細胞株 (C, F) の細胞シートを付着させた HAp を 6 週齢雄性ラットの脛骨内に埋入し、4 週後の組織切片 (長軸方向に垂直に切片を作製) において H-E 染色 (A-C) ならびに抗ヒト vimentin 抗体を用いた免疫染色 (D-F) を行った。(A, D) : 細胞を付着させていない HAp のみのコントロール群。(B, C) : HAp との境界部にエオジン陽性の線維層及び硬組織の形成 (HT) が認められた。(E, F) : 新生硬組織中及び表層の細胞に抗ヒト vimentin 抗体の陽性像 (茶) が認められた。

H : HAp 円柱 (脱灰によって全て溶解)、HT : 新生硬組織、それぞれの図の左は弱拡、右は枠内の拡大像。bars=100 μ m

1-11 細胞株または 1-17 細胞株の細胞シートを付着させた試料では、それぞれ HAp 表面にエオジン陽性の新生硬組織ならびにその周囲の線維層を認め (Fig. 6B, C)、さらにマウス抗ヒト vimentin 抗体に陽性の細胞が、新生硬組織中ならびにその周囲に認められた (Fig. 6E, F)。一方、HAp のみを埋入した群においては陽性像を認めなかった (Fig. 6A, D)。

4-7. CaSR 拮抗薬がヒト歯根膜細胞株の骨/セメント質関連遺伝子発現に及ぼす影響

1-11 細胞株または 1-17 細胞株における CaSR の骨/セメント質関連遺伝子発現に及ぼす影響を調べるために、CaSR の拮抗薬である NPS2143 を用いて、カルシウム刺激下における *OCN* および *OPN* の遺伝子発現を、定量的 RT-PCR 法によって解析した。1-11 細胞株および 1-17 細胞株はともに、カルシウム単独刺激群と比較して NPS2143 処理を施した群において *OCN* および *OPN* の遺伝子発現が有意に上昇した (Fig. 7A-D)。

4-8. CaSR 拮抗薬がヒト歯根膜細胞株の石灰化に及ぼす影響

1-11 細胞株または 1-17 細胞株における CaSR の石灰化に及ぼす影響を調べるために、カルシウム刺激培地、そしてカルシウム刺激培地に NPS2143 を 1、5 および 10 μ M 添加して培養し、2 週間後に Alizarin Red 染色 および von Kossa 染色法を用いて解析した。その結果、濃度依存的に Alizarin Red ならびに von Kossa 陽性反応が増大する傾向が観察された (Fig. 8A, B)。

4-9. L-VDCC の阻害薬がヒト歯根膜細胞株の石灰化および細胞内カルシウム濃

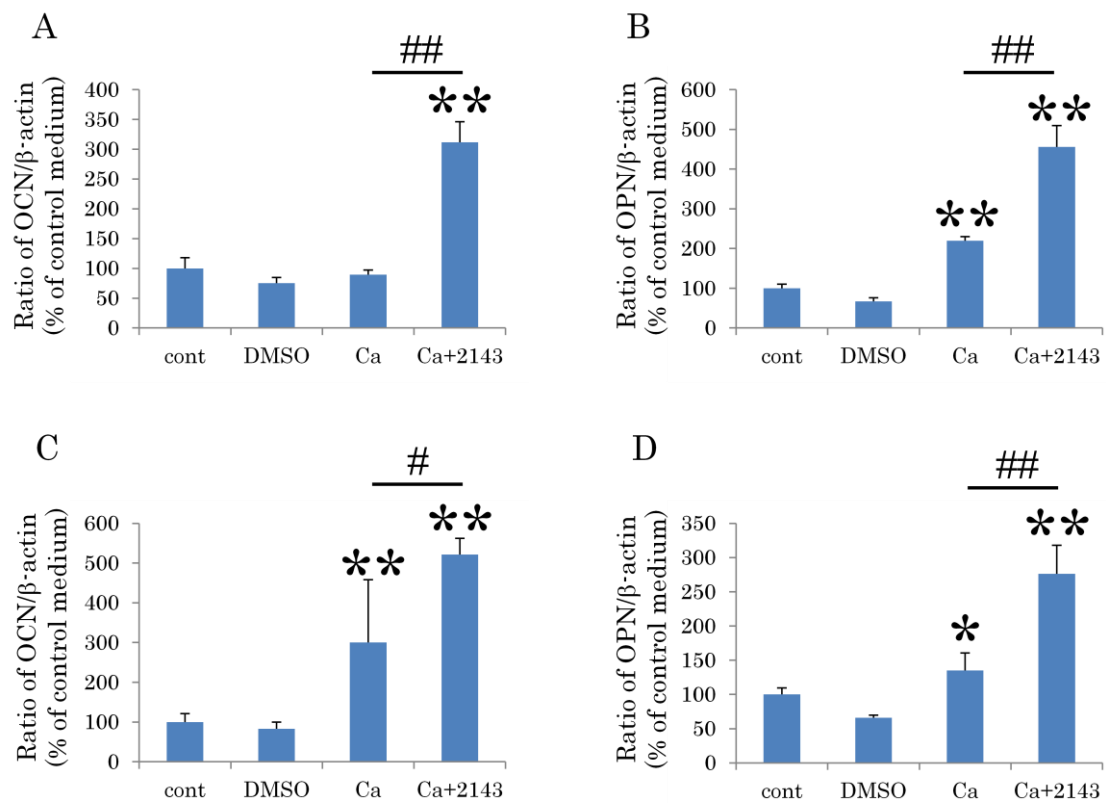


Figure 7. CaSR拮抗薬がヒト歯根膜細胞株の骨/セメント質関連遺伝子発現に及ぼす影響

1-11細胞株 (A, B) または 1-17細胞株 (C, D) を、10%FBS/α-MEM、DMSO入り 10%FBS/α-MEM、カルシウム刺激培地、そしてカルシウム刺激培地に 10μM NPS2143 (CaSR拮抗薬) を添加した、計4群に分けて培養した。培養7日後に *OCN* (A, C) 及び *OPN* (B, D) の遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法にて測定した。両細胞株ともに、NPS2143 処理を行うことで、カルシウム刺激群と比較して *OCN* および *OPN* の遺伝子発現が有意に上昇した。

n=4、*P<0.05、**P<0.01、#P<0.05、##P<0.01

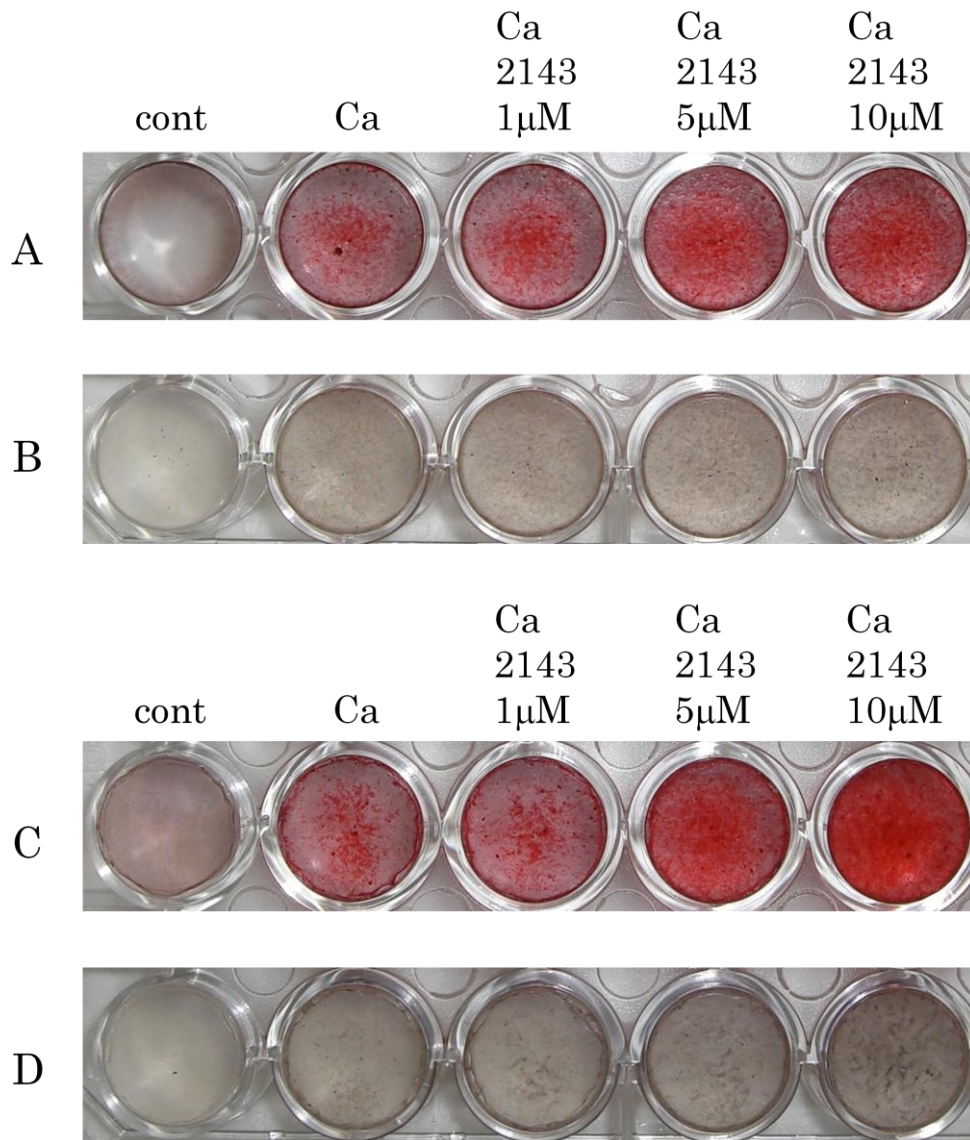


Figure 8. CaSR拮抗薬がヒト歯根膜細胞株の石灰化に及ぼす影響

1-11細胞株 (A, B) または 1-17細胞株 (C, D) を、10%FBS/ α -MEM、カルシウム刺激培地、そしてカルシウム刺激培地に NPS2143 を 1、5 および 10 μ M 添加し、培養を行った。14日後、それぞれの細胞について Alizarin Red 染色 (A, C) および von Kossa 染色 (B, D) を行った。両細胞株ともに、NPS2143 の濃度依存的に亢進した陽性像が認められた。

n=4

度に及ぼす影響

カルシウム刺激した 1-11 細胞株または 1-17 細胞株の石灰化への L-VDCC の影響について検討するために、L-VDCC の阻害薬であるニフェジピンを 5 μ M 添加したカルシウム刺激培地にて培養し、2 週間後に Alizarin Red 染色 (Fig. 9A, C) および von Kossa 染色法 (Fig. 9B, D) を行った。その結果、カルシウム単独刺激群と比較して、ニフェジピン処理群では、両細胞株の石灰化が顕著に抑制された (Fig. 9A, B)。次に、ニフェジピンにて前処理を施した 1-11 細胞株または 1-17 細胞株に 5mM の CaCl₂ を滴下し、細胞内カルシウム濃度を測定した。コントロール群では両細胞株ともに細胞内カルシウム濃度が上昇したのに対し、ニフェジピン処理群では、それが抑制される傾向が観察された。(Fig. 9C, D)。

4-10. L-VDCC 阻害薬がヒト歯根膜細胞株の *CaSR* 遺伝子発現に及ぼす影響

カルシウム刺激した 1-11 細胞株または 1-17 細胞株の石灰化において、L-VDCC と CaSR との間の関連性について検討した。カルシウム単独で刺激した後、カルシウムと同時に 5 μ M ニフェジピンで処理を施した両細胞株における *CaSR* 遺伝子の発現を定量的 RT-PCR 法にて解析を行った。その結果、ニフェジピン処理群において両細胞株ともに 4 日目にて、カルシウム単独刺激群と比較して有意に *CaSR* 遺伝子発現が上昇した (Fig. 10A, B)。

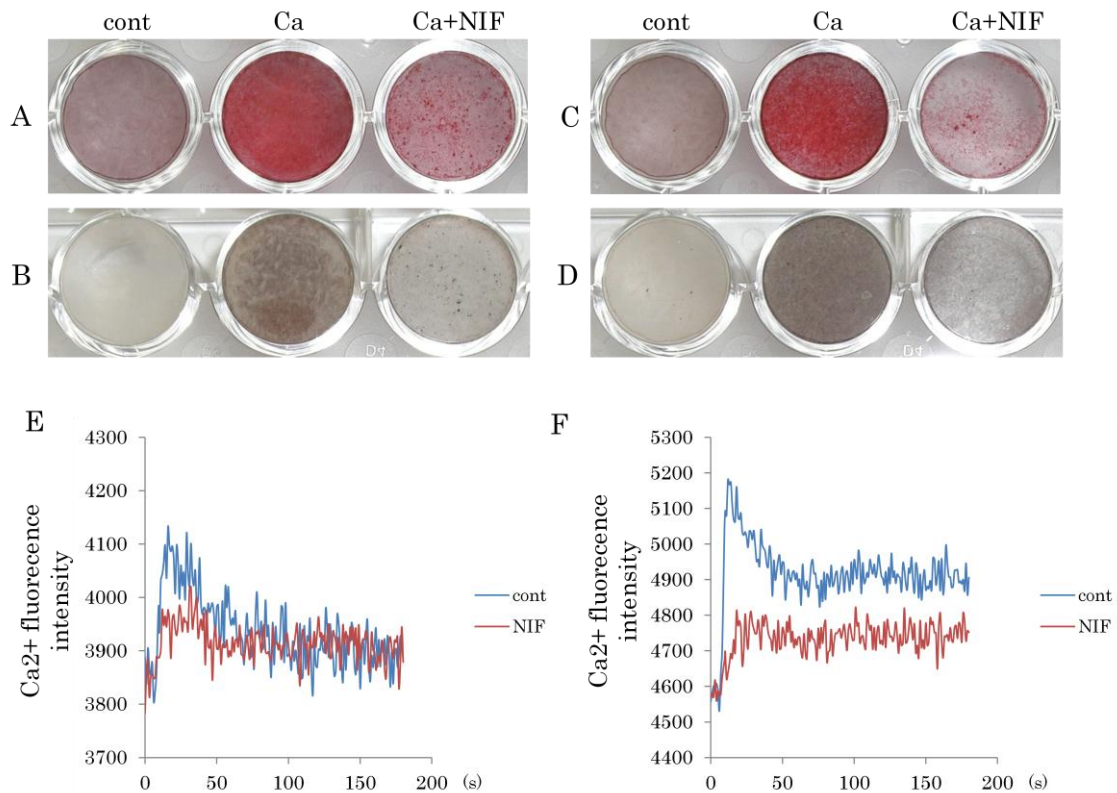
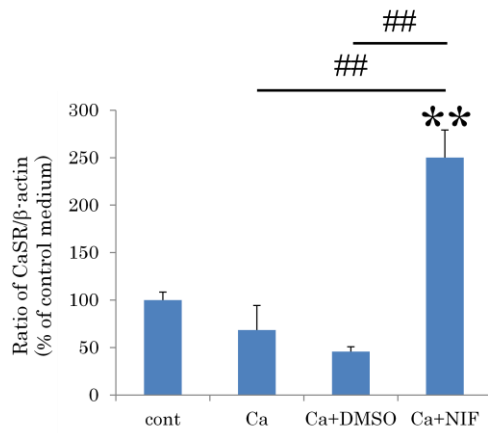


Figure 9. L-VDCC の阻害薬がヒト歯根膜細胞株の石灰化および細胞内カルシウム濃度に及ぼす影響

1-11 細胞株 (A, B) または 1-17 細胞株 (C, D) を、10%FBS/ α -MEM、カルシウム刺激培地、そしてカルシウム刺激培地に 5mM ニフェジピン (L-VDCC の阻害薬) を添加した培地にて培養した。培養 2 週間後に、Alizarin red 染色 (A, C) 及び von Kossa 染色 (B, D) を行った。両細胞株ともに、カルシウム単独刺激群と比較して、ニフェジピンを添加した群の石灰化が明瞭に抑制された。

また、ニフェジピン処理を行った細胞に 5mM の CaCl_2 を添加した際の細胞内カルシウム濃度の動態を、カルシウムイオン特異的蛍光プローブ (Calcium Kit-Fluo 4) を用いて測定した。1-11 細胞株 (E) および 1-17 細胞株 (F) とともに、ニフェジピン処理によって、カルシウム添加後の細胞内カルシウム濃度の上昇は、未処理の場合と比較して抑制される傾向が観察された。

A



B

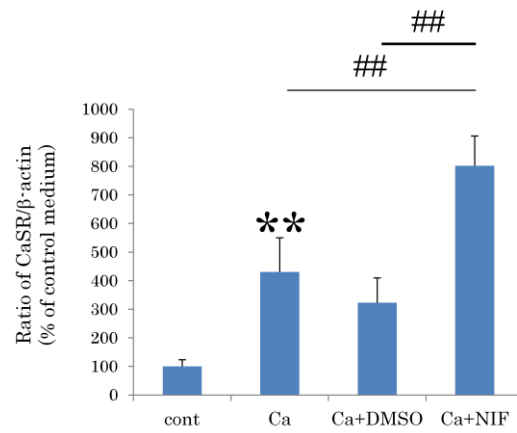


Figure 10. L-VDCC 阻害薬がヒト歯根膜前駆細胞株の *CaSR* 遺伝子発現に及ぼす影響

1-11 細胞株 (A) または 1-17 細胞株 (B) に、2 日間カルシウム刺激を行った後、さらに 5 μ M のニフェジピンを添加したカルシウム刺激培地で 2 日間培養し、両細胞株における *CaSR* 遺伝子の発現を定量的 RT-PCR 法にて測定した。その結果、両細胞株ともにニフェジピンを加えた群において、カルシウム単独刺激群と比較して有意な *CaSR* 遺伝子の発現上昇を認めた。

n=4、*P<0.05、**P<0.01 (vs.コントロール)、##P<0.01 (vs.ニフェジピン添加カルシウム刺激培地)

5. 考察

本研究において、著者は、細胞外カルシウム濃度の上昇が未分化なヒト歯根膜細胞株の細胞増殖、骨/セメント質関連遺伝子発現および石灰化に与える影響、ならびに石灰化に及ぼす CaSR および L-VDCC の作用について解析を行った。

1-11 細胞株または 1-17 細胞株にカルシウム刺激を行うことにより、1-11 細胞株では 14 日刺激にて、1-17 細胞株においては 7 日刺激にて骨/セメント質関連遺伝子の発現が有意に上昇した。*OCN* および *OPN* は骨芽細胞分化の過程で発現上昇してくる遺伝子として知られている (24)。また、BMP-2 および TGF- β 1 は TGF β スーパーファミリーに含まれ、骨芽細胞分化初期のマーカーとして知られる RUNX2 転写因子により調節されている (25, 26)。BMP-2 は間葉系幹細胞を骨芽細胞様細胞へと分化を促進する成長因子として (25)、また、TGF- β 1 は骨芽細胞の分化の早期に関与する因子として知られている (27)。本研究での石灰化実験においても細胞外カルシウム刺激を行うことにより両細胞株の石灰化が促進し、*in vivo* においても HAp 表面に、1-11 細胞株または 1-17 細胞株に関連した石灰化像が認められた。これらの結果により、細胞外カルシウムによって、未分化なヒト歯根膜細胞株の石灰化が促進されることが明らかとなった。しかしながら、両細胞株の骨/セメント質関連遺伝子発現および石灰化組織形成量を比較した結果、1-17 細胞株の方がより細胞外カルシウムによる石灰化が促進する傾向が認められた。著者らは、これまでに 1-17 細胞株は 1-11 細胞株と比較して、より未分化な細胞であることを示唆する報告を行っており (28-30)、より未分化な状態の細胞に対して、細胞外カルシウムは、骨系細胞分化を促進する可能性が示唆された。

細胞外カルシウム刺激により、両細胞株における *CaSR* の遺伝子発現が上昇した。また、ラット水平断切片における抗 *CaSR* 抗体による免疫染色の結果、歯根膜細胞、骨芽細胞およびセメント芽細胞に明瞭な陽性像が認められた。近年の報告では、*CaSR* を活性化させることで骨芽細胞における分化および成熟を促進したことが示されている (31)。しかしながら、本研究にて *CaSR* の拮抗薬である NPS2143 によって、1-11 細胞株または 1-17 細胞株における骨/セメント質関連遺伝子の発現および石灰化が促進した。これらの結果により、未分化なヒト歯根膜細胞株において、カルシウム刺激によって活性化した *CaSR* は、石灰化を抑制する働きを示すことが示唆された。活性化した *CaSR* が石灰化に抑制的に働くことは、未だ報告されておらず、ヒト歯根膜細胞において特異的である可能性が推察された。

L-VDCC は細胞外カルシウムを細胞内へと取り込む働きを有し、細胞内カルシウム濃度の調節を行っていることが知られている。本研究においても、L-VDCC の阻害剤であるニフェジピンにて処理を施した 1-11 細胞株および 1-17 細胞株は、細胞内カルシウム濃度測定により、細胞内カルシウム濃度の抑制が認められた。一方、石灰化に対しては、促進的に働く可能性が考えられた。L-VDCC と細胞の石灰化との関連性については、ニフェジピン処理による軟骨形成および軟骨の石灰化の抑制や、血管の石灰化抑制についての報告がある (32, 33)。さらに近年、間葉系幹細胞の骨芽細胞分化において、ニフェジピン処理により OCN および RUNX2 等の骨関連マーカーの発現が減少した報告もある (34)。一方で、細胞内カルシウム濃度を上昇させることで骨芽細胞分化が促進することが報告されている (20)。以上より、細胞外カルシウムは、L-VDCC を通じて細胞内カルシウム濃度の上昇に働き、結果として、未分化なヒト歯根膜細胞の骨系細胞分化を促した可能性が示唆された。

さらに、CaSR と L-VDCC との相互作用については、カルシウム刺激に加え、ニフェジピン処理を行った 1-11 細胞株および 1-17 細胞株において、有意に *CaSR* 遺伝子発現が上昇した。これより、上昇した細胞外カルシウムは、L-VDCC を介して CaSR の発現に対して抑制に働いており、両者はヒト歯根膜細胞株における石灰化を互いに調節している可能性が示唆された。最近の報告では、細胞外カルシウム刺激を行った骨髄由来の間葉系幹細胞における BMP-2 発現が、CaSR 経路ではなく、L-VDCC 経路によって上昇することが示されている (35)。

これまでに、細胞外カルシウムにより活性化された CaSR は、MEK/ERK 経路を活性化することが報告されている (36, 37)。また、L-VDCC についても、細胞内カルシウム濃度の上昇とともに、MEK/ERK 経路の活性化を行うことが報告されている (38)。MEK/ERK 経路の活性化は、細胞の生存および細胞増殖促進に働くことが知られている (39)。近年、 Sr^{2+} 刺激で活性化された CaSR における MEK/ERK 経路の活性化に関連して骨芽細胞の細胞増殖を促進することが示されている (18)。しかしながら、本研究の細胞増殖実験に関しては、*CaSR* 遺伝子の発現上昇が細胞増殖時では確認できなかったため、両細胞株の細胞増殖が CaSR を介したかどうかについては明確にできなかった。細胞外カルシウムがヒト歯根膜細胞株における細胞増殖に及ぼす影響に関しては、CaSR を介したものであるか、あるいは L-VDCC を介したものであるか、さらなる解析が必要と思われる。

近年、歯髓細胞において細胞外カルシウムにより活性化された L-VDCC 由来の MEK/ERK 経路活性により *BMP-2* の遺伝子発現が上昇したことが報告されている (40)。従って、骨芽細胞様細胞分化および石灰化への影響に CaSR および L-VDCC が MEK/ERK の同一の経路を介してヒト歯根膜細胞株の分化に影響を与えている可能性が示唆され、CaSR のシグナル経路を検討する際に L-VDCC に

よる影響についても考慮する必要があると考えられた。さらに、CaSR または L-VDCC を介した MEK/ERK 経路の活性についての検討は、ヒト歯根膜細胞株における骨形成のメカニズムの解明に繋がることが推察された。

今後は CaSR および L-VDCC のヒト PDLSCs における働きおよびシグナル経路の解明を進め、歯根膜による歯周組織再生の足がかりとなるべく研究を続けていく計画である。

6.総括

本研究では、未分化なヒト歯根膜細胞株におけるカルシウムの影響を検討した。以下のように総括する。

1. 5mM の CaCl_2 にて刺激された未分化なヒト歯根膜細胞株は、細胞増殖および石灰化を亢進し、*CaSR* 遺伝子の発現を促進する。
2. *CaSR* 活性は未分化なヒト歯根膜細胞株における石灰化を抑制する。
3. L-VDCC 活性は未分化なヒト歯根膜細胞株における石灰化を促進する。
4. L-VDCC の阻害は、未分化なヒト歯根膜細胞株の *CaSR* 遺伝子の発現を促進する。

7.謝辞

本研究は、九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯科保存学研究分野 赤峰昭文教授の御指導のもとに行われたものであり、先生の懇篤な御指導、御助言、ならびに御校閲に深く感謝致します。また、本研究を遂行するにあたり終始御指導を賜りました九州大学病院歯内治療科 前田英史診療准教授に深甚なる謝意を表します。さらに実験手法の御指導および御助言を賜りました九州大学病院歯内治療科 和田尚久講師ならびに歯科保存学研究分野 門野内聡助教に厚く感謝致します。最後に、九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯科保存学研究分野、ならびに九州大学病院歯内治療科教員の皆様に心より御礼申し上げます。

8.参考文献

1. Eklou-Kalonji E, Denis I, Lieberherr M, Pointillart A (1998). Effects of extracellular calcium on the proliferation and differentiation of porcine osteoblasts in vitro. *Cell Tissue Res.* 29:163-171.
2. Yamaguchi T, Chattopadhyay N, Kifor O, Butters RR Jr, Sugimoto T, Brown EM. (1998). Mouse osteoblastic cell line (MC3T3-E1) expresses extracellular calcium (Ca^{2+})-sensing receptor and its agonists stimulate chemotaxis and proliferation of MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res.* 13:1530-1538.
3. Dvorak MM, Siddiqua A, Ward DT, Carter DH, Dallas SL, Nemeth EF, Riccardi D (2004). Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:5140-5145.
4. Sinan A, Adou AJ, Rochd T, Calas P (2007). Determination of the bactericidal activity of different calcium hydroxide presentations on a dentin model. *Odontostomatol Trop* 30:5-10.
5. Paula-Silva FW, Ghosh A, Arzate H, Kapila S, da Silva LA, Kapila YL (2010). Calcium hydroxide promotes cementogenesis and induces cementoblastic differentiation of mesenchymal periodontal ligament cells in a CEMP1- and ERK-dependent manner. *Calcif Tissue Int* 87:144-157.
6. Hakki SS, Bozkurt SB, Hakki EE, Belli S (2009). Effects of mineral trioxide aggregate on cell survival, gene expression associated with mineralized tissue, and biomineralization of cementoblasts. *J Endod* 35:513-519.

7. do Nascimento C, Issa JP, Iyomasa MM, Regalo SC, Siéssere S, Pitol DL, de Oliveira Wolga N, Pedrazzi V (2007). Bone repair using mineral trioxide aggregate combined to a material carrier, associated or not with calcium hydroxide in bone defects. *Micron* 39:868-874.
8. Maeda H, Nakano T, Tomokiyo A, Fujii S, Wada N, Monnouchi S, Hori K, Akamine A (2010). Mineral trioxide aggregate induces bone morphogenetic protein-2 expression and calcification in human periodontal ligament cells. *J Endod* 36:647-652.
9. Freeman E (1994) Periodontium. In: Ten Cate, A.R. ed. *Oral histology: development, structure, and function*. Mosby, St. Louis, pp. 276-312.
10. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364:149-155.
11. Nohutcu RM, McCauley LK, Koh AJ, Somerman MJ (1997). Expression of extracellular matrix proteins in human periodontal ligament cells during mineralization in vitro. *J Periodontol* 68:320-327.
12. Kobayashi M, Takiguchi T, Suzuki R, Yamaguchi A, Deguchi K, Shionome M, Miyazawa Y, Nishihara T, Nagumo M, Hasegawa K (1999). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic differentiation in cells isolated from human periodontal ligament. *J Dent Res*.78:1624-1633.
13. Fujii S, Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Saito M, Akamine A (2008). Investigating a clonal human periodontal ligament progenitor/stem cell line in vitro and in vivo. *J Cell Physiol*.215:743-749.
14. Tomokiyo A, Maeda H, Fujii S, Wada N, Shima K, Akamine A (2008).Development

of a multipotent clonal human periodontal ligament cell line. Differentiation. 76:337-347.

15. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC (1993). Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. Nature 366:575-580.
16. Sharan K, Siddiqui JA, Swarnkar G, Chattopadhyay N (2008). Role of calcium-sensing receptor in bone biology. Indian J Med Res 127:274-286.
17. Garner SC, Pi M, Tu Q, Quarles LD (2001). Rickets in cation-sensing receptor-deficient mice: an unexpected skeletal phenotype. Endocrinology 142:3996-4005.
18. Takaoka S, Yamaguchi T, Yano S, Yamauchi M, Sugimoto T (2010). The calcium-sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast differentiation and mineralization. Horm Metab Res 42:627-631.
19. Triggle DJ (1990). Calcium, calcium channels, and calcium channel antagonists. Can J Physiol Pharmacol 68:1474-1481.
20. Zayzafoon M (2006). Calcium/calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation. J Cell Biochem 97:56-70.
21. Monnouchi S, Maeda H, Fujii S, Tomokiyo A, Kono K, Akamine A (2011) The roles of angiotensin II in stretched periodontal ligament cells. J Dent Res 90:181-185.
22. Wada N, Maeda H, Yoshimine Y, Akamine A (2004) Lipopolysaccharide stimulates expression of osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappa B ligand in periodontal ligament fibroblasts through the induction of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. Bone 35:629-635.

23. Fujii S, Maeda H, Wada N, Kano Y, Akamine A (2006). Establishing and characterizing human periodontal ligament fibroblasts immortalized by SV40T-antigen and hTERT gene transfer. *Cell Tissue Res.* 324:117-125.
24. Rodan GA, Noda M (1991). Gene expression in osteoblastic cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1:85-98.
25. Kyeong-Sook Lee, Hyun-Jung Kim, Qing-Lin Li, Xin-Zi Chi, Chisato Ueta, Toshihisa Komori, John M. Wozney, Eung-Gook Kim, Je-Young Choi, Hyun-Mo Ryoo, and Suk-Chul Bae (2000). Runx2 Is a Common Target of Transforming Growth Factor β 1 and Bone Morphogenetic Protein 2, and Cooperation between Runx2 and Smad5 Induces Osteoblast-Specific Gene Expression in the Pluripotent Mesenchymal Precursor Cell Line C2C12. *Mol Cell Biol* 20:8783-8792.
26. Tseng PC, Hou SM, Chen RJ, Peng HW, Hsieh CF, Kuo ML, Yen ML (2011). Resveratrol promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells by upregulating RUNX2 gene expression via the SIRT1/FOXO3A axis. *J Bone Miner Res.* 26:2552-2563.
27. Wang MK, Sun HQ, Xiang YC, Jiang F, Su YP, Zou ZM (2012) . Different roles of TGF- β in the multi-lineage differentiation of stem cells. *World J Stem Cells.* 2012 4:28-34.
28. Tomokiyo A, Maeda H, Fujii S, Monnouchi S, Wada N, Kono K, Yamamoto N, Koori K, Teramatsu Y, Akamine A (2012). A multipotent clonal human periodontal ligament cell line with neural crest cell phenotypes promotes neurocytic differentiation, migration, and survival. *J Cell Physiol.* 227:2040-50.
29. Maeda H, Wada N, Fujii S et al (2011). Periodontal Ligament Stem Cells. In: *Stem Cells in Clinic and Research*, ed Gholamrezanezhad A, pp. 619-36, In Tech:Croatia.

30. Maeda H, Fujii S, Tomokiyo A, Wada N, Akamine A (2011). Periodontal Tissue Engineering: Defining the Triad, ed Ole T. Jensen, pp.289-299, Oral & Craniofacial Tissue Engineering:USA.
31. Chattopadhyay N, Yano S, Tfelt-Hansen J, Rooney P, Kanuparthi D, Bandyopadhyay S, Ren X, Terwilliger E, Brown EM (2004) Mitogenic action of calcium-sensing receptor on rat calvarial osteoblasts. *Endocrinology* 145:3451-3462.
32. Zimmermann B, Lange K, Mertens P, Bernimoulin JP (1994). Inhibition of chondrogenesis and endochondral mineralization in vitro by different calcium channel blockers. *Eur J Cell Biol.* 63:114-121.
33. Yamagishi S, Matsui T, Nakamura K (2007). Prevention of diabetic vascular calcification by nifedipine, a dihydropyridine-based calcium channel blocker. *Med Hypotheses*.68:1096-1098.
34. Wen L, Wang Y, Wang H, Kong L, Zhang L, Chen X, Ding Y (2012). L-type calcium channels play a crucial role in the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 424:439-445.
35. Barradas AM, Fernandes HA, Groen N, Chai YC, Schrooten J, van de Peppel J, van Leeuwen JP, van Blitterswijk CA, de Boer J (2012). A calcium-induced signaling cascade leading to osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Biomaterials*. 2012 33:3205-3215.
36. Cervantes D, Crosby C, Xiang Y (2010) Arrestin orchestrates crosstalk between G protein-coupled receptors to modulate the spatiotemporal activation of ERK MAPK. *Circ Res* 106:79-88.

37. Lorch G, Viatchenko-Karpinski S, Ho HT, Dirksen WP, Toribio RE, Foley J, Györke S, Rosol TJ (2011) The calcium-sensing receptor is necessary for the rapid development of hypercalcemia in human lung squamous cell carcinoma. *Neoplasia* 13:428-438.
38. Selway J, Rigatti R, Storey N, Lu J, Willars GB, Herbert TP (2012). Evidence that Ca^{2+} within the microdomain of the L-type voltage gated Ca^{2+} channel activates ERK in MIN6 cells in response to glucagon-like peptide-1. *PLoS One* 7:e33004.
39. Chen J, Fujii K, Zhang L, Roberts T, Fu H (2001). Raf-1 promotes cell survival by antagonizing apoptosis signal-regulating kinase 1 through a MEK-ERK independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:7783-7788.
40. Tada H, Nemoto E, Kanaya S, Hamaji N, Sato H, Shimauchi H (2010). Elevated extracellular calcium increases expression of bone morphogenetic protein-2 gene via a calcium channel and ERK pathway in human dental pulp cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 16;394:1093-1097.