

—速 報—

マウス新生仔頭蓋骨より分離・培養した 造骨細胞の石灰化能に関する研究

川 瀬 知 之 石 川 市 次 郎 鈴 木 暲 俊

新潟大学歯学部歯科薬理学教室

(主任：鈴木暲俊教授)

Studies on the osteogenicity of bone-forming cells derived
from newborn mouse calvaria

Tomoyuki KAWASE, Ichijiro ISHIKAWA and Akitoshi SUZUKI

Department of Dental Pharmacology,

Niigata University School of Dentistry

(Director : Prof. Akitoshi Suzuki)

Key Words : Bone-forming cells / Serial digestion / Alkaline phosphatase
/ Nodule

要 旨

我々は、マウス新生仔頭蓋骨より分離した骨細胞をアルカリホスファターゼ (ALP) 活性を維持した状態で6ヵ月以上35代まで継代培養できたことについて報告する。

造骨細胞は、マウス新生仔頭蓋骨より collagenase / dispase II 処理によって分離し、 α -MEM+15% FCS で5%CO₂, 37°C 条件下で培養した。継代数3-6代で増殖時間が最も長くなったが、それ以降は増殖率も高まると同時に形態的にも安定した。この細胞の ALP 活性は、コンフルエントシート形成後、経時的に上昇する傾向を持ち、それに伴い石灰化物の形成が観察された。また、insulin, prostaglandin E₂ (PGE₂), 血清に反応して ALP 活性の上昇が観察された。以上の結果から、我々の維持している細胞は骨芽細胞様であることが示唆された。

緒 言

骨細胞の分離・培養は1964年にPeckら¹⁾によって初めて試みられて以来、数々の報告がある²⁻⁶⁾。現在、最も繁用されている分離法は酵素処理法であるが、骨芽細胞だけを特異的に分離する条件の設定は極めて困難である⁷⁾。そのため、特殊な方法も試みられているが⁸⁾、実用に至っていない。

一方では、骨芽細胞のマーカーとしての性質を維持したクローン細胞がいくつか樹立され⁹⁻¹¹⁾、造骨機構を研究するうえで有用な材料となっている。その理由は、上記のような繁雑な分離作業を省くことができると共に、線維芽細胞等の混入、影響を考慮しなくてもよいからである。しかし、これらの細胞が無限増殖能を獲得する段階で、骨芽細胞として持っていたいくつかの性質を喪失する可能性も当然考えられる。

我々は、骨芽細胞のモデルとなりうる細胞を新

たに樹立することを目的とし、ALP 活性を維持した状態で35代まで継代培養ができたのでここに報告する。

材料と方法

骨細胞の分離と培養：

頭蓋骨はマウス新生仔15匹から無菌的に摘出し、200IU/ml ペニシリンG (明治製菓) と200mg/ml ストレプトマイシン (明治製菓) を含むDulbeccoのリン酸緩衝液 (PBS(-)) でよく洗浄後、附着軟組織を除去した。再度、上記 PBS(-) で洗浄後、頭蓋骨を細片化し、酵素処理を施した。酵素には collagenase (0.1IU/ml) と dispase II (0.8IU/ml) (Boehringer-Mannheim) を用い、低速マグネチックスターラーにて細胞分散を試みた。細胞は15分毎に収集し、頭蓋骨片は新鮮な酵素液を再度添加することによって継続的に処理した。その結果、細胞は処理時間にしたがって Group 1 から 4 までに分別された。

それぞれのグループとも60mmプラスチックディッシュ (Falcon) 中で、 α -MEM (Gibco) +15% 胎児血清 (FCS) (Hyclone) (50IU/ml ペニシリンG, 50 μ g/ml ストレプトマイシン含有) にて培養した。培養は、5% CO₂, 37°C 湿潤環境下で行ない、2あるいは3日毎に培地を交換した。継代は、4あるいは5日毎に行ない増殖曲線にプロットした。

組織化学的検索：

1) ALP Burstoneら¹¹⁾のアゾ色素法を応用した。ホルムアルデヒドで固定した標本を濾過した反応液 (Naphtol AS-MX phosphate, Fast Garnet GBC Salt (Sigma) 含有) に浸漬した。約30分後、水洗して検鏡した。

2) 石灰化物 (非溶性カルシウム) Dahlの方法¹²⁾を応用した。純アルコールで固定した標本をアリザリンレッドS染色液 (Merk) にて染色した。水洗後、濃塩酸+アルコールで分別し、検鏡した。

Insulin, PGE₂の ALP 活性に対する影響：

継代の際に細胞を24穴プレート (Corning) に播種した。コンフルエントシート形成後、24時間血

清不含培地に交換し、starving な状態にした細胞に対して insulin, PGE₂ に対する感受性を検討した。指標として insulin, PGE₂ 添加24時間後の ALP 活性を測定した。すなわち、氷冷中、ラーボリスマンではがし取った細胞を Hanks 液 (HBSS) 0.4ml に懸濁し、これに 2 mM MgCl₂ 及び 0.3% Triton X-100 (最終濃度0.1%) を含む氷冷50mM Tris-HCl (pH 7.4) を加えた。次に、氷冷中で30秒間超音波処理をし、27,000×g, 4°C, 10分間遠心分離を行なった¹³⁾。上清を東城の方法¹⁴⁾で ALP 活性を測定した。試料100 μ l に50mM 炭酸-重炭酸緩衝液 (15mM p-Nitrophenylphosphate 含有, pH10.1) を加え、37°C, 30分間反応後、0.2M NaOH 0.5ml を添加することによって反応を停止させた。生成された p-Nitrophenol 量を分光光度計により405nm で測定した。

また、遠心分離後の上清について、Lowry らの方法¹⁵⁾で蛋白量を測定した。

結 果

酵素処理時間にしたがって分別された Group 1 ~ 4 をまず3代継代した。各々のグループに含まれる細胞の形態を比較すると、コンフルエント形成前ではいずれも紡錘形を呈していたが、コンフルエント形成後は Group 1 に圧倒的多数の線維芽細胞が観察されたのに対し、Group 2 ~ 4 では敷石状を呈する細胞が多数を占めていた。

Group 2 ~ 4 を引き続き継代培養していくと Group 3 に含まれる細胞は脱分化して線維芽細胞化した。Group 4 に含まれる細胞は、継代を繰り返すうちに著しく増殖力が低下したので培養を断念した。一方、Group 2 に含まれる細胞は、Fig. 1 に示すように継代数3代から6代にかけていったん増殖力が低下したが、継代数8代以後は増殖力を回復し、線維芽細胞化も認められなかった。以後、Group 2 だけ継代培養し、以下の実験に供した。

継代数10代の細胞は、継代後約4日でコンフルエントを形成したが、その後も培養を続けると nodule を形成するようになった (Fig. 2)。Nodule とは、それまで単層状態であった細胞が増殖を続

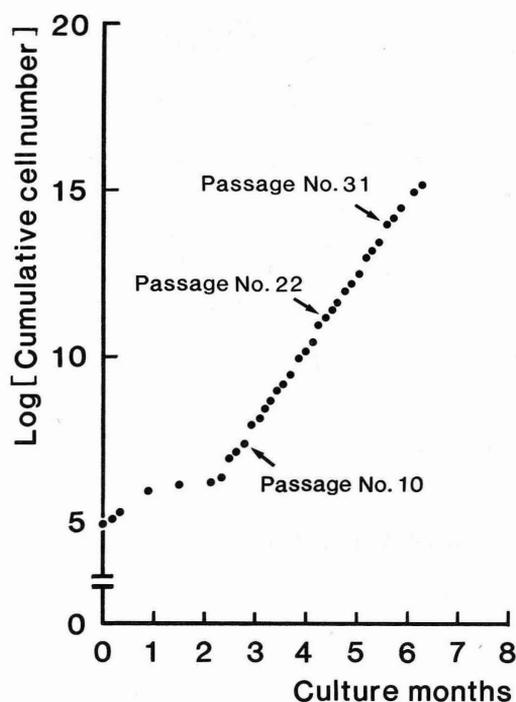


Fig. 1 Cumulative growth curve of Group 2 culture isolated from newborn mouse calvaria.

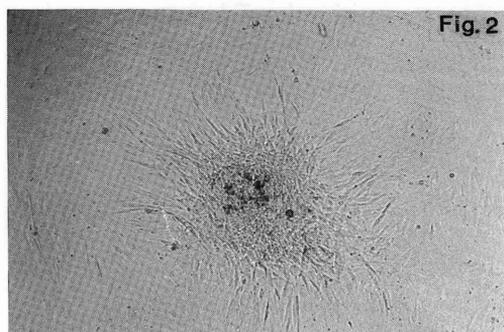


Fig. 2 A phase contrast photomicrograph illustrating a nodule in 4 day, passage No. 10 MOB 1/3 culture. Unstained, $\times 40$.

け多層に重なることによって形成する結節状の細胞塊である。この状態で固定後、アゾ色素法にて ALP 活性を組織化学的に検索した結果を Fig. 3 に示した。Noduleの部分, すなわち, 細胞密度の

高い部分が赤紫色に染色され ALP 活性が局在しているのが認められた。

Table 1 Time course of ALP activity in MOB 1/3 culture.

Culture days	ALP activity (nmol/ μ g cell protein/30 min)
3	N.D.*
6	0.949 \pm 0.097
8	1.351 \pm 0.169

Each value represents mean \pm S.E. (n=4)

*N.D. means not determined.

ところで, 培養 dish 中の細胞全体において細胞密度と ALP 活性との間には相関があるのだろうか。Table 1 には ALP 活性の経日的変化を示した。コンフルエント形成前の継代後 3 日目では ALP 活性は検出困難であったが, 4 日目にコンフルエントを形成してからは経日的に ALP 活性が上昇した。細胞密度はコンフルエント形成後の nodule 形成とあいまって上昇していく訳であるが, それにともなって ALP 活性が上昇することが確認された。

Table 2 Effect of various reagents on ALP activity in MOB 1/3 culture.

Addition	ALP activity (nmol/ μ g cell protein/30 min)	Stimulation (-fold)
Control	0.548 \pm 0.093	1.0
serum (15%, v/v)	0.855 \pm 0.040	1.56
insulin (10 μ g/ml)	0.648 \pm 0.062	1.18
PGE ₂ (10 μ g/ml)	0.866 \pm 0.048	1.58

Each value represents mean \pm S.E. (n=4)

次に, 各種ホルモン・成長因子に対する応答性について継代数 22 代の細胞を用いて検討した。Table 2 に示すように, ALP 活性は serum (15%, v/v), insulin (10 μ g/ml), PGE₂ (10 μ g/ml) に反

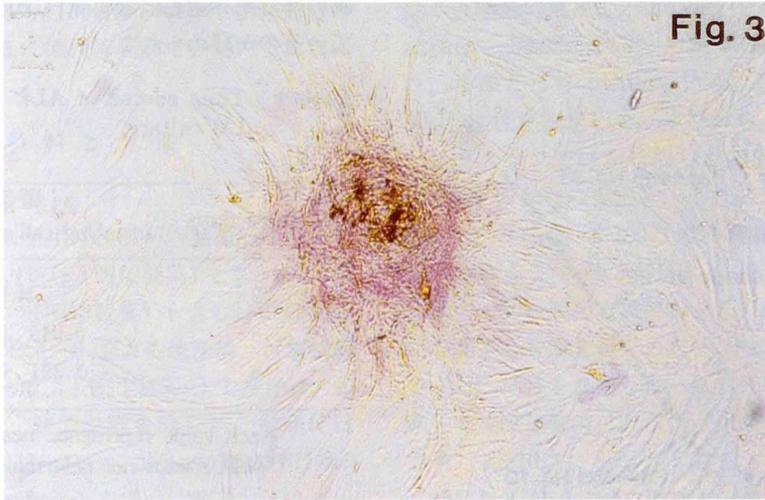


Fig. 3 A photomicrograph of azo dye-stained ALP in 4 day, passage No. 10 MOB 1/3 culture. $\times 40$

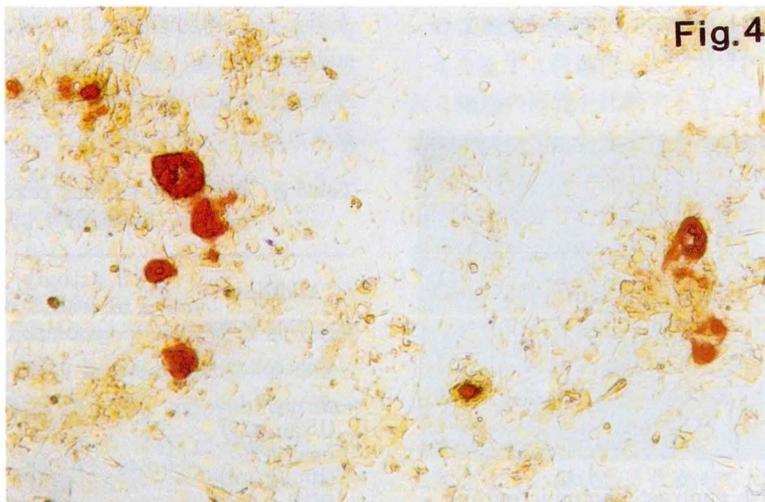


Fig. 4 A photomicrograph of alizarin red S-stained mineral deposits in 7 day, passage No. 31 MOB 1/3 culture. $\times 40$.

応して上昇した。

つづいて、上記の成長因子応答性を維持している継代数31代の細胞を用いて実際の石灰化物形成能を検討した。 β -glycerophosphate を添加しなかった状態では、光学顕微鏡レベルで石灰化物を認めることはできなかった。それに対して、5 mM β -glycerophosphate を添加した状態では、コンフルエント形成3日後くらい（継代後約7日目）から Fig. 4 に示すような石灰化物が観察されるようになった。すなわち、細胞密度の高い部分に赤燈色に染色された大小様々の大きさの不溶性 Ca 沈着物が局在するのが認められた。

考 察

一般に骨芽細胞 (in vivo) は、insulin や PGE_2 刺激で活性化されるといわれている¹⁶⁾。Group 2 の細胞 (以下 MOB 1/3 と呼ぶ) は、insulin 及び PGE_2 に応答して ALP 活性が上昇することが示されたが (Table 2), この結果は MOB 1/3 が insulin 及び PGE_2 の各々に対するリセプターを有しているということを示唆するものである。

また、Fig. 3 と Table 1 より MOB 1/3 は細胞密度の上昇に伴ない ALP 活性を上昇させることがわかったが、この結果は小玉らによって樹立された MC3T3-E1 の特徴と類似している¹⁰⁾。すなわち、MOB 1/3 も MC3T3-E1 同様にいわゆる増殖期と分化期を有し、コンフルエント形成後に分化期に入り ALP 活性を上昇させて石灰化に向けて準備するものと推察される。

Fig. 4 から上記の考えが支持される。コンフルエント形成前では、 β -glycerophosphate あるいは ascorbic acid の添加量の多少にかかわらず石灰物の形成は認められなかったのに対し、 β -glycerophosphate を添加することにより継代後7日目くらいから石灰化物の形成が認められるようになった。この石灰化物は、造骨細胞の機能維持の証拠となると同時に細胞分化の重要な指標になると思われる。ただし、この石灰化物の電顕所見 (分泌コラーゲン線維にそった Ca の沈着など) 及び、X線マイクロアナライザー分析による Ca/P 比の確認などが行なわれていないので、これが細胞性

のものとは今のところ断定できない。

以上の結果より、MOB 1/3 は骨芽細胞の有するいくつかの特征的性質を維持しているものと思われる。

また、MOB 1/3 は明確な変性期を経た訳ではないが、Fig. 1 に示すように継代数8代以後は安定した増殖力を示し、形態も安定均一化してきたことを考慮すると一步株化へ近づいたと受け取ってよいように思われる。

今後は、ALP 活性の高い細胞の選別と株化により、骨形成機構解明のための新たなモデルとして役立てたい。

結 論

マウス新生仔頭蓋骨より分離した造骨細胞を35代まで培養した。この細胞の性格を組織化学的・生化学的手法を用いて研究した結果次のようなことが判明した。

1. この細胞 (MOB 1/3) は、いわゆる増殖期と分化期を有し、増殖期では不規則な紡錘形を呈しているが、分化期に入ると敷石状を呈するようになった。
2. MOB 1/3 の ALP 活性は、増殖期には検出困難であったが、分化期に入ると顕著に上昇しはじめた。
3. 培養10日目頃から、 β -glycerophosphate 添加により石灰化物の形成が観察された。
4. MOB 1/3 は、insulin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), PGE_2 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) に応答して ALP 活性を上昇させた。

文 献

- 1) Peck, W.A., Bringe, S.J. and Fedak, S.A. : Bone cells, biochemical and biological studies after enzymatic isolation. Science 146 : 1467-1477, 1964.
- 2) Smith, D.M., Johnston, C.C. and Severson, A.A. : Studies of the metabolism of separated bone cells. Calcif. Tissue Int. 11 : 56-59, 1973.
- 3) Luben, R.A., Wong, G.L. and Cohen, D.V. : Biochemical characterization with parathor-

- mone and calcitonin of isolated bone cells : Provisional identification of osteoclasts and osteoblasts. *Endocrinology* **99** : 526-534, 1976.
- 4) Wong, G.L. and Cohen, D.V. : Separation of parathroid hormone and calcitonin-sensitive cells from non-responsive bone cells. *Nature* **252** : 713-715, 1974.
 - 5) Dziak, R. and Brand, J.S. : Calcium transport in isolated bone cells : bone cell isolation procedures. *J. Cell. Physiol.* **84** : 75-84, 1974.
 - 6) Heflex, T., Cushing, J. and Brand, J.S. : Enzymatic isolation of cells from bone : Cytotoxic enzymes of bacterial collagenase. *Am. J. Physiol.* **240** : C234-238, 1981.
 - 7) Nijeide, P.J., van der Plas, A. and Scherft, J.P. : Biochemical and histological studies on various bone cell population. *Calcif. Tissue Int.* **33** : 529-540, 1981.
 - 8) Puzas, J.E., Vignery, A. and Rasmussen, H. : Isolation of specific bone cell types by free-flow electrophoresis. *Calcif. Tissue Int.* **27** : 263-268, 1979.
 - 9) Patridge, N.C., Alcorn, O., Michelangeli, V.P., Kemp, B.E., Ryan, G.B., and Martin, T.J. : Functional properties of hormonal responsive culture normal and malignant rat osteoblastic cells. *Endocrinology* **108** : 213-219, 1981.
 - 10) Kodama, H., Amagai, Y., Sudo, H., Kasai, S. and Yamamoto, S. : Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Jpn. J. Oral Biol.* **23** : 899-901, 1981.
 - 11) Sudo, H., Kodama, H., Amagai, Y., Yamamoto, S. and Kasai, S. : In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J. Cell Biol.* **96** : 191-198, 1983.
 - 12) Dahl, L.K. : A simple and sensitive histochemical method for calcium. *Proc. Soc. Exp. Biol.* **80** : 474-479, 1952.
 - 13) Anderson, T.R. and Tovernd, S.U. : Purification and partial characterization of two acid phosphate from rat bone. *Calcif. Tissue Int.* **27** : 219-226, 1979.
 - 14) Tojyo, Y. : A comparison of the alkaline phosphatase of rat dental pulp, bone, kidney, liver and intestine. *Arch. Oral Biol.* **28** : 103-107, 1983.
 - 15) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** : 265-275, 1951.
 - 16) Canalis, E. : Effect of growth factors on bone cell replication and differentiation. *Clin. Oth. Related Res.* **193** : 246-263, 1985.