

多方向重力負荷による骨細胞の力学応答

松田, 純平
九州産業大学大学院

藏田, 耕作
九州産業大学

福永, 鷹信
九州産業大学大学院

日垣, 秀彦
九州産業大学

<https://hdl.handle.net/2324/1955371>

出版情報 : バイオメカニズム. 18, pp.189-198, 2006. バイオメカニズム学会
バージョン :
権利関係 : ©バイオメカニズム学会



(16)

多方向重力負荷による骨細胞の力学応答

松田純平¹, 藏田耕作², 福永鷹信¹, 日垣秀彦²

¹九州産業大学大学院, ²九州産業大学

要旨 微小重力環境における長期滞在や高齢社会により増加傾向にある長期臥床患者では骨量減少による生活の質の低下が問題となっている。骨量減少を抑止するには骨量減少のメカニズムを解明することが必須である。骨は機械的刺激に応答してリモデリング（再構築）を行う組織であることから、解明には力学的側面からのアプローチが重要である。そこで本研究では、擬微小重力環境を発生させる多方向重力負荷培養システムを新たに開発した。骨組織の中で機械的刺激を感受する骨細胞を用いて、多方向重力環境が細胞の機能や分化に及ぼす影響を調査した。その結果、多方向重力環境にさらされた骨細胞は細胞増殖能および細胞間情報伝達能が有意に抑制されること、骨細胞の培養液上清を用いた骨髄細胞の培養において骨髄細胞から破骨細胞様細胞への分化を有意に増加させることが明らかになった。

キーワード：微小重力，多方向重力，骨細胞，骨リモデリング，細胞間ネットワーク

1. 緒 言

生体骨組織は、常に破骨細胞による骨の吸収と骨芽細胞による骨の形成を繰り返し行い、動的平衡を維持している。これら一連のサイクルを骨リモデリングと呼ぶ。骨リモデリングの主な役割は、古くなった組織を新しい組織に置き換えることによる骨強度の維持および血中 Ca^{2+} 濃度の保持である。この骨リモデリングにおける吸収と形成の動的平衡は、閉経に起因するエストロゲンの欠如等によるホルモンバランスの変化¹⁻³⁾、老化による複合的要因⁴⁾、宇宙空間における微小重力環境あるいは長期臥床等における機械的刺激負荷の低減⁵⁻⁷⁾等により破綻することがある。その結果、骨粗鬆症等の骨疾患が引き起こされる。しかしながら、これらのメカニズムの多くはなお不明である。

宇宙環境や長期臥床における急速な骨量の減少は力学的因子に大きな影響を受けている。地上では、骨組織は重力に抗して互いの重さを支え合っている。体幹の多くを支える下半身の骨が上半身の骨と比較し大きく形成されることから、重さが骨組織の形成に対し影響していることが分かる。さらに、*in vivo* および *in vitro* において機械的負荷が骨量増加を促すことは、実験的にも知られている。一方、微小重力環境では、重力が $10^{-6} \sim 10^{-4}\text{G}$ であり、連続的な自由落下状態といえる。このような条件では物体の重さが大きく減少する。長期臥床においても、体幹保持や歩行によって生じる機械的刺激が低減させられる。宇宙環境や長期臥床による骨量減少は臨床的に大きな問題となっており、その解決には力学的側面からのアプローチが必須である。

組織や細胞から重力を免ずる微小重力環境における従来の研究は、実際の宇宙環境や落下塔による急

降下で生じる微小重力を利用した実験系⁸⁾、クリノスタットによる擬似的微小重力環境を利用した実験系⁹⁾、下肢の吊り下げや頭部側を下に傾斜させるなど骨に荷重を与えないよう工夫した免荷動物モデル実験系^{10,11)}により行われてきた。しかしながら、実際の宇宙環境の利用に関しては、実験のコスト、機会、期間など多くの制限がある。落下塔を用いた自由落下実験では、微小重力を得られる時間が数秒と短く、組織や細胞を対象とした研究には不向きである。これらを考慮すると、*in vitro*における細胞培養実験にはクリノスタットを利用した系が最も適している。クリノスタットとは、対象試料を直交2軸まわりに回転させ、試料に働く重力加速度の方向を分散させるものである。時間平均として重力が相殺されるため、地上において擬微小重力環境を実現できる。あるいは、厳密に多方向重力環境と呼ばれることもある。現行のクリノスタットはスリップリングを含む複雑な機構を有し、試料の設置が容易ではない。さらに、実験に際しては大量の培養液を入れたフラスコやヴェセルの底部に細胞を播種し密閉して培養が行われている。これには、細胞に対して酸素供給が十分になされない、細胞から産生されるサイトカイン等のタンパク質が大量の培養液に希釈されてしまい細胞や組織に対し自己回帰的作用を示すオートクライン・パラクラインのような作用をなさない等の問題があり、生体内で生じる現象を再現できる *in vitro* 実験系とは言い難い。

骨に関する微小重力実験では、その対象として、骨芽細胞を用いた実験が多くを占めている。しかしながら、実際の骨組織において最大多数を占めるのは骨細胞である。さらに骨細胞は、骨基質の中で互いの細胞が三次元的に連結して細胞間ネットワークを形成しており、機械的刺激の受容や伝達に関与する細胞として知られている。宇宙環境や長期臥床に伴う骨量減少と力学的因子の関係を考える上では、微小重力環境における骨細胞の動態を明らかにすることが不可欠である。しかしながら、微小重力実験系において骨細胞を対象とした報告は渉猟し得た限りでは見受けられない。

そこで本研究では、クリノスタットの問題点を解

決する新たな多方向重力負荷装置および細胞培養システムを開発し、骨細胞樹立株 MLO-Y4 細胞を用いた実験を行った。多方向重力環境に置かれた骨細胞の細胞増殖および細胞間情報伝達に関して調査した。さらに、骨細胞から産生された生理活性物質がマウス骨髄細胞の分化に与える影響について検討し、骨細胞を介した骨リモデリングの調節メカニズムについて考察を行った。

2. 実験装置

新たに製作した多方向重力環境下培養装置を図1に示す。本装置では、対象試料を直交2軸まわりに回転させ、試料に対して働く重力加速度を分散させる、つまり時間積分的に重力負荷を相殺することが可能である。中央に試料を取り付けるための球 (ϕ 100 mm) を設置し、ボールローラを用い3点支持した。球に対して互いに干渉しない位置にプーリを設置し、サーボモータにより制御した。球内部には、試料を球の中心に配置できる保持具を取り付け

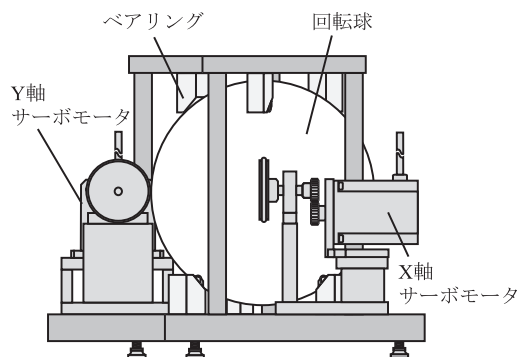


図1 多方向重力負荷培養装置

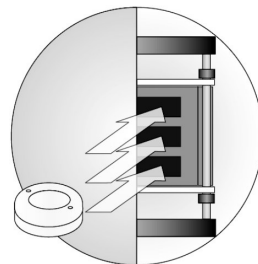


図2 回転球の内部構造

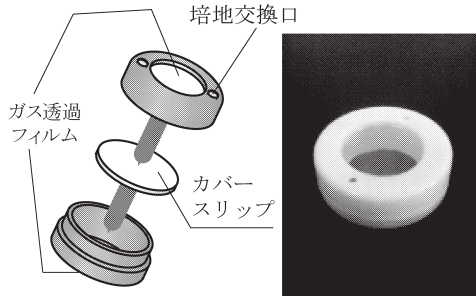


図3 回転培養用密閉型容器

表1 ガス透過フィルム

材 料	ポリテトラフルオロエチレン
ガス透過フィルム ($\text{cc}/\text{m}^2 \cdot 24\text{hr} \cdot \text{atm}$)	O_2 9000, CO_2 7000
厚 み (μm)	48
弾 性 率 (MPa)	231

た(図2)。なお、この実験装置はインキュベータ内(37°C, 5% CO_2)に設置することができるように設計した。球の内部に設置した試料に対して均一に分散した重力ベクトルを与えることができるよう2つのサーボモータの回転条件をそれぞれ10 rpm, 1.6 rpmに設定した。次に、細胞培養に適切な量の培養液を用いて、十分な酸素供給を行いながら細胞を培養することができる回転培養用密閉型容器を新たに開発した(図3)。密閉容器の蓋部および底部に、ガス透過性に優れたポリテトラフルオロエチレンフィルムを貼付した。ガス透過フィルムの特性を表1に示す。フィルムの貼付には、細胞毒性が極めて小さいシリコンゴム(World Precision Instruments, inc. SYLGARD 184 Silicone Elastomer kit)を用いた。カバースリッパ(Nalge Nunc International, Thermanox Cell Culture Coverslip ϕ 25 mm)上に播種した細胞を回転培養用密閉型容器内に入れて密封し、培養液4 mlで満たして多方向重力環境下培養に用いた。

3. 対象および方法

3.1 対 象

実験には、Katoら¹²⁾によって確立されたマウス長管骨由来骨細胞樹立株MLO-Y4細胞を用いた。MLO-Y4細胞は、(1)アルカリフォスファターゼの発現が非常に低い、(2)オステオカルシンを高く発現する、(3)樹状突起様の長い細胞突起を形成する、(4)ギャップ結合を介した細胞間情報伝達を行うなど、生体内の骨細胞と極めて類似した特性を有する樹立株である。MLO-Y4細胞の継代は、コラーゲンコートしたカルチャープレート(ϕ 100, Falcon, Becton Dickinson Biosciences)上で行い、コラーゲンのコーティングは、0.02 M 酢酸にラット尾腱由来I型コラーゲン(Rat tail collagen type I, Becton Dickinson Biosciences)を0.15 mg/ml濃度で希釈した溶液を用いて1時間浸漬することにより行った。培養液には、2.5% FBS(Fetal bovine serum, Gibco BRL), 2.5% iCS(Iron-supplemented calf serum, HyClone), 1% antibiotics(Penicillin & Streptomycin, Gibco BRL)を添加した α -MEM(α -minimum essential medium, Gibco BRL)を用いた。MLO-Y4細胞が細胞分化に与える影響を調べる実験において使用した骨髄細胞は、8~12週齢の雄Jc1:ICRマウスから単離した。マウスより上腕骨、大腿骨、脛骨を採取し、骨端を切離して骨髄を得た。培養液に分散させた骨髄をカルチャープレートに移し、インキュベータ内で2時間培養した後、非附着性細胞を骨髄細胞として分離した^{13,14)}。なお、骨髄細胞の培養液には、10% FBS, 1% antibioticsを添加した α -MEMを用いた。

3.2 骨細胞の細胞増殖に与える影響

ラット尾腱由来I型コラーゲンによってコーティングしたカバースリッパにMLO-Y4細胞を播種し(25 cells/mm²)、インキュベータ内にて2時間培養して初期付着を行わせた。この初期付着のための培養は、6-wellプレート(Becton Dickinson Bio-

sciences, Falcon) 内で行った。その後、カバースリップを回転培養用密閉型容器の中に密閉し、インキュベータ内に設置した多方向重力負荷培養装置にセットして培養を行った。多方向重力環境下で培養した細胞群を μ G 細胞、密閉型容器 (図 3) を平常重力環境下で培養した細胞群を 1 G 細胞とした。培養開始より 2, 4, 6 日目に各細胞を trypsin/EDTA (Gibco BRL) でカバースリップから剥がし、血球計算盤を用いて細胞数の計測を行った。なお、培養液には 5 % FBS, 5 % iCS, 1 % antibiotics を添加した α -MEM を用いた。

3.3 骨細胞間ネットワークの情報伝達に与える影響

多方向重力環境下における培養が、骨細胞の細胞間ネットワークを介したイオンや ATP 等の低分子量物質の情報伝達に与える影響について、2 重蛍光染色を施した MLO-Y 4 細胞を用いて実験を行った。

6-well プレートに I 型コラーゲンによりコーティングを施したカバースリップをそれぞれ移し、MLO-Y 4 細胞を 20 cells/mm² の密度で播種した。インキュベータ内において、細胞が細胞突起を十分に伸ばし細胞間ネットワークを形成するまで培養した (図 4)。顕微鏡により十分細胞間ネットワークが形成されたことを確認後、カバースリップをそれぞれ回転培養用密閉型容器に移し、多方向重力環境下において 24 時間の培養を行った。

情報伝達を確認するため、別に MLO-Y 4 細胞を用意して 10 μ M 1, 1'-dioctadecyl 1-3, 3, 3'-

tetramethyl-indocarbocynine perchlorate (DiI, Molecular probes) と 10 μ M calcein acetoxyethyl ester (calcein AM, Molecular probes) による 2 重蛍光染色を施した。多方向重力環境下において 24 時間培養したカバースリップ上の MLO-Y 4 細胞に対して、この 2 重蛍光染色 MLO-Y 4 細胞を 4 cells/mm² の密度で播種した。DiI は、細胞膜脂質を赤色蛍光に染め、隣接細胞へ伝播することはない。一方、Calcein AM は、細胞質中で緑色蛍光を発しギャップ結合による細胞間情報伝達によって隣接細胞へ伝播する。2 重蛍光染色 MLO-Y 4 細胞を播種後、インキュベータ内にて 90 分間の培養を行い、蛍光顕微鏡により calcein 伝播の観察を行った。

3.4 骨髄細胞の分化に与える影響

前節と同様にコラーゲンコートしたカバースリップに対して 25 cells/mm² の密度で MLO-Y 4 細胞を播種し、細胞間ネットワークが形成されるまでインキュベータ内で培養した。その後、カバースリップを回転培養用密閉型容器に移し、インキュベータ内に設置された多方向重力環境下培養装置を用いて 24 時間培養を行った。多方向重力環境下で培養した細胞群を μ G 細胞、回転培養用密閉型容器に密閉したまま平常重力環境下において培養した細胞群を 1 G 細胞、密閉型容器を用いず従来からある 6-well プレート内で培養した細胞群を control 細胞とした。

24 時間の培養後、培養液上清を回収した。この上清を新鮮な培養液に対して 20 % 添加したものを調製培地とした。マウスより得た骨髄細胞を調製培地に懸濁して 24-well プレートに播種 (10⁶ cells/well, 底面積=190 mm²) し、1 週間培養を行った。培養 3 日目に同様の方法で新たに調製培地を作成し、それぞれ半量ずつ培地の交換を行った。培養後、ALP (Alkaline phosphatase, アルカリフォスファターゼ) を骨芽細胞の分化指標として、TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase, 酒石酸抵抗性産生フォスファターゼ) を破骨細胞様細胞の分化指標として用いて、培養後の骨髄細胞に対

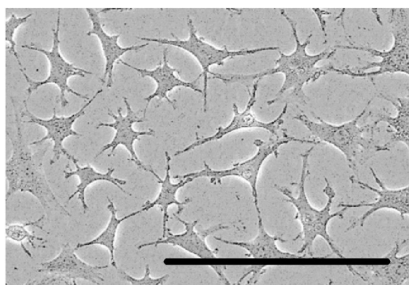


図 4 骨細胞樹立株 MLO-Y 4 の位相差顕微鏡像 [Bar: 100 μ m].

してそれぞれ ALP 染色および ALP アッセイ, さらに, TRAP 染色および TRAP アッセイを施し, 評価した. ALP 染色においては, 骨髓細胞の培養直後に 4% パラフォルムアルデヒド (paraformaldehyde) で細胞を固定した. その後, 各プレートに Alkaline phosphatase leukocyte kit (SIGMA, No. 86-R) を用いて染色した. ALP アッセイは, 培養後に ALP 溶解バッファ (50 mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100, 0.9% NaCl) で溶解した骨髓細胞に対して行った.

pNPP (p-nitrophenylphosphate) を発色基質として用いて溶解物と 45 分間反応 (室温) させた後, 405 nm の吸光度を計測することによって ALP 酵素量を定量した. さらに, 各 well における全細胞数の指標として, 細胞溶解物に含まれるタンパク質量を bradford 法により定量した. 一方, TRAP 染色については, ALP 染色と同様に固定を施し, Acid phosphatase leukocyte kit (SIGMA, No. 387-A) を用いて行った. TRAP アッセイにおいては, TRAP 溶解バッファ (10 mM Tris, 2 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.3% SDS, 1% protease inhibitor) で溶解した骨髓細胞を, 40 mM L(+)-tartrate を含む 0.1 M 酢酸ナトリウム溶液および pNPP と 40 分間反応 (37°C) させ, ALP アッセイと同様に 405 nm の吸光度を計測することによって定量した.

3.5 統計的解析による群間比較

得られた細胞増殖, calcein 伝播を受けた細胞数, ALP, TRAP 活性量, タンパク質量のデータに対して, それぞれ one-way ANOVA を用いた群間の有意差検定を行った. 有意差を示したデータについては, Student's t-test による群間比較を行った. なお, 有意水準は 5% とした.

4. 結果

多方向重力環境下において培養した MLO-Y 4 細胞の細胞増殖曲線を図 5 に示す. 多方向重力を与えた細胞である μ G 細胞に対して, 通常的环境で平面

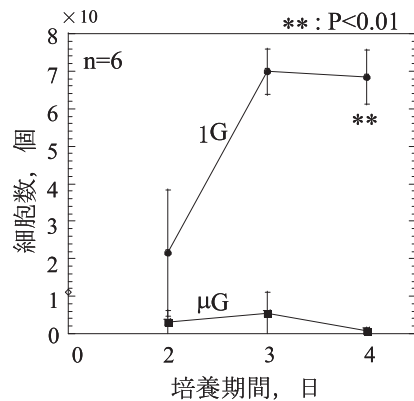


図 5 μ G 細胞と 1G 細胞の細胞増殖比較 (Mean $\pm$ S.D.).

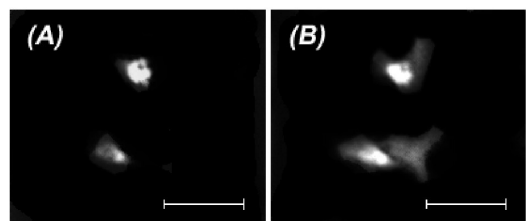


図 6 2 重蛍光染色による骨細胞間情報伝達像. (A) DiI 像 (B) Calcein AM 像 [Bar: 50 μ m].

培養した細胞である 1G 細胞では, 有意な細胞数の増加が認められた. 一方, μ G 細胞では, 培養期間を通して細胞数は増加せず, 培養 6 日目には有意な減少が認められた.

DiI, Calcein AM で 2 重蛍光染色した細胞を用いて, 細胞突起先端部におけるギャップ結合を介した細胞間情報伝達の様子を蛍光顕微鏡により観察した (図 6). DiI (図 6 A) と Calcein (図 6 B) の両方の蛍光を発する 2 重蛍光染色細胞から隣接する細胞に対して calcein が伝播していることが分かる (図 6 B). 2 重蛍光染色細胞より calcein 伝播を受けた隣接骨細胞の数を図 7 に示す. 1G 細胞と比較して, μ G 細胞では calcein 伝播を受けた細胞数が有意に減少していた.

MLO-Y 4 細胞の調製培地を用いて 1 週間の培養を行った骨髓細胞に対して, ALP 染色 (図 8(A) (B) (C)) および TRAP 染色 (図 8(D) (E) (F)) を施した結果を示す. 図 8(A) (B) (C) で, 濃い灰色に表れている領域が ALP 活性を有した細胞の染色像であ

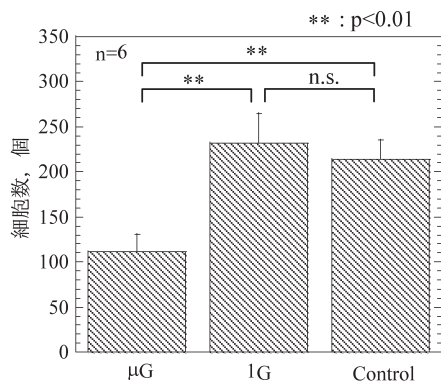


図7 2重蛍光染色細胞より calcein AM 伝播を受けた隣接骨細胞の数 (Mean ± S.D.)

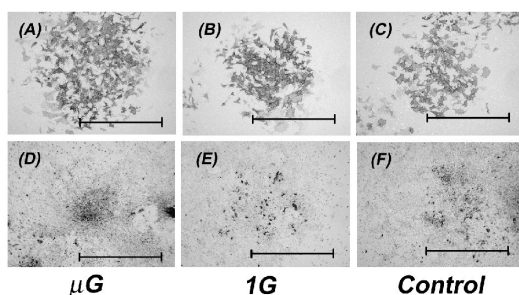


図8 実体顕微鏡による1週間培養後の骨髄細胞染色像。ALP陽性細胞(A)(B)(C), TRAP陽性細胞(D)(E)(F) [Bar: 1 mm]

る。μG, 1G, control いずれの群においても ALP 陽性細胞の分化が認められた。しかしながら、染色の強度や陽性細胞の分布に大きな違いは見られなかった。同様に、図8(D)(E)(F)で、濃い灰色に表れている領域が TRAP 活性を有した細胞の染色像である。μG, 1G, control いずれの群においても TRAP 陽性細胞の分化が認められた。特に、μG 細胞群 (図8(D)) では、TRAP 陽性細胞が大きなコロニー状に集まり、強い染色強度を呈していることが認められた。

1 well 当たりの細胞溶解物について含有タンパク質量を定量した結果を図9に示す。多方向重力を与えた μG 細胞と通常環境で平面培養した 1G 細胞や control 細胞群との比較において有意な差異は認められなかった。これは 1 well 中の細胞数に有意差がないことを示している。ALP 活性に関する定量アッセイの結果、有意な差異は認められなかった

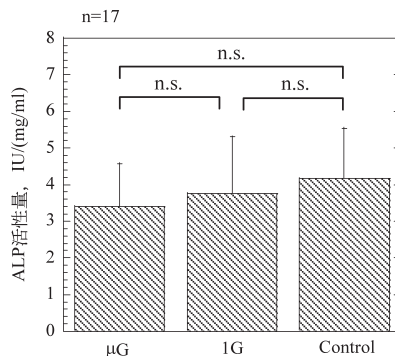


図9 1週間培養後の骨髄細胞における1well当たりのALP活性量 (Mean ± S.D.)

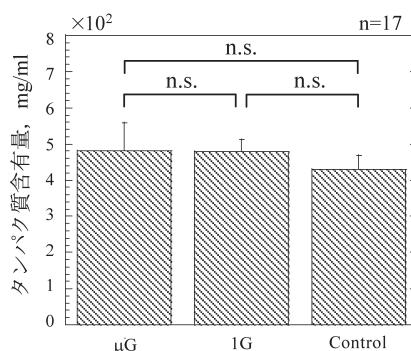


図10 1週間培養後の骨髄細胞における1well当たりのタンパク質量 (Mean ± S.D.)

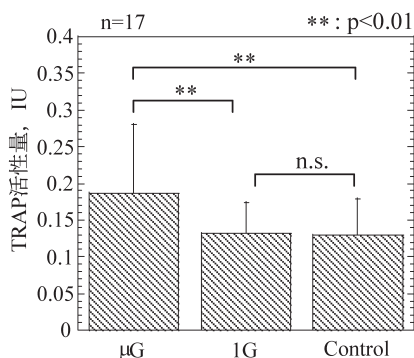


図11 1週間培養後の骨髄細胞における1well当たりのTRAP活性量 (Mean ± S.D.)

(図10)。一方、TRAP 陽性細胞への分化に関する定量アッセイの結果、1G 細胞もしくは control 細胞と比較して、μG 細胞では有意な TRAP 産生の増加を認めた (図11)。

5. 考 察

本研究では、メカノセンサとしての機能を有する骨細胞に着目し、多方向重力環境が骨細胞に与える影響を、骨細胞の細胞増殖、細胞間情報伝達、骨細胞産生物質によるマウス骨髄細胞の分化をそれぞれ調査することにより評価した。

本実験で用いた多方向重力負荷培養装置では、擬微小重力を発生させるために、細胞を回転培養することで、本来細胞が引力に従って一方向に受ける重力ベクトルを時間の変化と共に変更し細胞周りの全方向に力を分散させている。したがって、細胞に重力が作用していることには変わりがなく、厳密な意味での無重力とは言えない。しかしながら、重力ベクトルを時間平均すれば、細胞周りの全方向に力が分散され、働く力はゼロとなる。このようなことから、微小重力環境を地上で模擬する実験系として、本装置に類似したクリノスタットは多くの研究者によって使用され、その結果が報告されている^{15,16)}。これらは、本実験系の妥当性を示すものである。

多方向重力が骨細胞の細胞増殖に与える影響に関しては、多方向重力下で培養した μ G 細胞群は平常重力下で培養した 1G 細胞群に比べ細胞増殖が有意に減少する結果を得た。本実験では、播種から 2 時間の細胞初期付着を経て直ちに多方向重力を負荷した。このことを考慮すると、多方向重力が細胞播種直後の細胞増殖初期段階において、細胞の伸展や接着を阻害して増殖を抑制すると考えられる。微小重力環境で骨細胞の細胞増殖について研究した例は見当たらないが、骨芽細胞を用いた Guifnandon らは、微小重力が細胞の integrin 依存性の細胞接着を阻害することを示し、さらに細胞群の広がりや減少させるということを明らかにした¹⁷⁾。骨細胞が骨芽細胞由来の細胞であることを考慮すると、本実験で得た MLO-Y 4 細胞における増殖能の低下は細胞接着の阻害によるものと推察される。生体内の骨細胞は、骨芽細胞が分化の最終段階で骨基質中に埋没した細胞であり、一般的に細胞増殖能は低い。一方、本実験で用いた MLO-Y 4 細胞は細胞樹立株で

あり、細胞分裂の速度は遅いが増殖能を持つ細胞である。この意味で MLO-Y 4 細胞の細胞増殖能を調査するという実験系に限界はあるが、多方向重力環境が骨由来付着性細胞の細胞接着を阻害し、integrin を介した情報伝達に影響を与えるという知見を得ることができた。

骨細胞の細胞間情報伝達に関して、多方向重力や微小重力環境下で検討した研究報告はないが、このような機械的刺激の小さい環境とは対照的に過剰な機械的刺激を与えたものは散見される。例えば、Jiang らは、MLO-Y 4 細胞に対して流体せん断による機械的刺激を加えると、せん断ストレスの強さに正比例した細胞突起の増加が引き起こされることを示している¹⁸⁾。Cheng らは、流体せん断が PGE₂ (prostaglandin E₂) の分泌および COX-2 (cyclooxygenase-2) の発現増加を誘導すること、分泌された PGE₂ が、ギャップ結合の数とギャップ結合タンパク質である Connexin 42 のタンパク質量を増加させる働きを持つことを示唆し、これらはオートクライン的相乗作用を持つことを報告した¹⁹⁾。この相乗作用は、COX-2 が prostaglandin の主たる合成要素であること²⁰⁻²²⁾を考慮すると理解できる。さらに、Cherian らは、流体せん断を負荷した MLO-Y 4 細胞において PGE₂ レセプター EP₂ の発現が増加し、EP₂ の活動の有無が流体せん断刺激によるギャップ結合の増減に深く関係していることを示した²³⁾。一方、Connexin 42 の発現を抑制したノックアウト・マウスによる動物モデルでは、極端に小さな骨格しか形成されないことが認められた²⁴⁾。これらの報告を総合すると、機械的刺激はギャップ結合の数を増やして細胞間情報伝達を円滑にし、骨量の維持や増強に深く影響を及ぼしていることを意味している。本実験では、過剰な機械的負荷とは反対に、負荷を免ずる多方向重力環境で細胞培養を行った。DiI, Calcein AM を用いて 2 重蛍光染色による MLO-Y 4 細胞間の情報伝達を評価したところ、多方向重力環境にさらされた μ G 細胞では calcein 伝播が阻害されるという結果を得た。この結果は、日常レベルにおける重力負荷の影響を緩和した環境、つまり多方向重力環境では、PGE₂

の発現や PGE₂ レセプター EP2 の発現が阻害され、細胞突起の伸展やギャップ結合により構成されている細胞間ネットワークの脆弱化を引き起こすという一つの経路を示唆するものである。この経路は、宇宙空間や長期臥床によって生じる骨量現象の一要因であると考えられる。最適な機械的刺激の負荷条件を見つけて細胞間情報伝達を維持することができれば、骨機能の維持や回復に繋がる可能性がある。

多方向重力環境下において、骨細胞が骨リモデリングにおける骨髄細胞の分化機能に与える影響を明らかにするため、骨芽細胞の活性指標である ALP と破骨細胞の活性指標である TRAP の産生を定量した。多方向重力環境下で 24 時間培養した MLO-Y4 細胞 (μ G 細胞) の培養液上清とともに骨髄細胞を 1 週間培養したところ、ALP 活性に有意差は認められなかった。骨髄細胞の骨芽細胞への分化能は多方向重力環境下においても平常の重力環境下と同様に維持されていることが分かる。一方、 μ G 細胞の培養液上清は 1G 細胞や control 細胞から得られた上清と比較して、破骨細胞の活性指標である TRAP 陽性反応を有意に上昇させた。骨細胞は骨リモデリングの調節に深く関与する細胞であり、臨床的にも実験的にも骨細胞の存在は破骨細胞の活性や骨吸収能を有意に抑制することが知られている。例えば、Heino らは MLO-Y4 細胞が大量の TGF- β を産生しており、これが破骨細胞の形成や活性を抑制していることを明らかにした²⁵⁾。一方、本実験では多方向重力環境が骨細胞の細胞間ネットワークによる calcein 伝播を抑制し、細胞機能の低下を誘引していることが明らかになった。この細胞機能の低下が TGF- β 等の骨吸収抑制因子の産生をも低下させ、その結果が TRAP 陽性細胞分化を有意に引き起こすことは十分に考えられる。

本研究では、多方向重力環境が骨細胞に影響を与え、骨量減少の原因となる破骨細胞様細胞の増加を引き起こすことを明らかにした。微小重力環境は筋骨格系に対して負の影響を持つものであるが、一方で、微小重力環境が傷ついた網膜組織の回復を亢進させた例や軟骨細胞からの組織再生を効率化した例

など、近年再生医工学分野において微小重力を積極的に利用した培養の有効性を示す研究報告が見受けられる^{26,27)}。これを踏まえると、再生医療においても微小重力環境を利用した培養方法の検討意義は大きい。本研究で確立した多方向重力負荷装置および細胞培養システムを用いて、多方向重力環境が骨系細胞の機能や分化能に与える影響をさらに詳細に評価する必要がある。

6. 結 言

骨細胞樹立株 MLO-Y4 に対し多方向重力を負荷する培養システムの開発を行い、多方向重力環境が骨細胞の細胞増殖能や細胞間情報伝達能に与える影響および多方向重力環境下の骨細胞から産生された生理活性物質によるマウス骨髄細胞の分化に与える影響を調査した。その結果、細胞増殖および細胞間情報伝達は有意に抑制されること、多方向重力環境下の骨細胞から得た培養液上清は骨髄細胞の ALP 活性を維持するが、一方で TRAP の有意な産生増加をもたらすことが明らかとなった。

これらの結果から、多方向重力環境は骨細胞の活動を低下させ、液性因子を介して骨吸収を亢進させることにより骨量減少を誘引することが推察された。

参 考 文 献

- 1) Smith, E.P., Boyd, J., Frank, G.R., Takahashi, H., Cohen, R.M., Specker, B., Williams, T.C., Lubahn, D. B., Korach, K.S.: Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man, *N. Engl. J. Med.*, 331: 1056-1061, (1994).
- 2) Korach, K.S.: Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science*, 266(5190): 1524-1527, (1994).
- 3) Kobayashi, S., Inoue, S., Hosoi, T., Ouchi, Y., Shiraki, M., Orimo, H.: Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. *J. Bone Miner. Res.*, 11(3), 306-311, (1996).
- 4) Khosla, S., Melton, M.L.J., Ringgs, B.L.: *Clinical spectrum. Osteoporosis*, 205-223, Raven Press, New York, (1995).
- 5) Smith, S.M., Wastney, M.E., Morukov, B.V., Larina, I. M., Nyquist, L.E., Abrems, S.A., Taran, E.N., Shih, C.

- Y., Nillen, J.L., Davis-Street, J.E., Rice, B.L., Lane H. W.: Bone mineral and lean tissue loss after long duration space flight. *J. Musculoskelet Neuronal Interact*, 1(2): 157-160, (2000).
- 6) Smith, S.M., Wastney, M.E., Morukov, B.V., Larina, I. M., Nyquist, L.E., Adrams, S.A., Taran, E.N., Shih, C. Y., Nillen, J.L., Davis-Street, J.E., Rice, B.L., Lane, H. W.: Calcium metabolism before, during, and after a 3 -mo spaceflight: Kinetic and biochemical changes, *Am. J. Physiol.*, 277, R 1-R 10, (1999).
- 7) Watanabe, Y., Ohshima, H., Mizuno, K., Sekiguchi, C., Fukunaga, M., Kohri, K., Rittweger, J., Felsenberg, D., Matsumoto, T., Nakamura, T.: Intravenous pamidronate prevents femoral bone loss and renal stone formation during 90-day bed rest, *J. Bone Miner. Res.*, 19, 1771-1778, (2004).
- 8) Morita, H., Fujiki, N., Gotoh, T., Matsuda, T., Shuang, G., Tanaka, K.: Relationship between transmural pressure and aortic diameter during free drop-induced microgravity in anesthetized rats. *Jpn J Physiol.*, 53(2), 151-155, (2003).
- 9) Nakamura, H., Kumei, Y., Morita, S., Shimokawa, H., Ohya, K., Shinomya, K.: Suppression of osteoblastic phenotypes and modulation of pro and anti-apoptotic features in normal human osteoblastic cells under a vector-averaged gravity condition, *J. Med. Dent. Sci.* 50(2), 167-176, (2003).
- 10) Carmeliet, G., Vico, L., Bouillon, R.: Space flight: a challenge for normal bone homeostasis. *Crit Rev Eukaryot, Gene Expr.*, 11(1-3), 131-144, (2001).
- 11) Koscheyev, V.S., Leon, G.R., Coca, A., List, N.: Enhancing circulation to lower limbs during head-down tilt by warming upper body and thighs. *Aviat Space Environ. Med.* 75(7), 596-602, (2004).
- 12) Kato, Y., Windle, J.J., Koop, B.A., Mundy, G.R., Bonewald LF, Establishment of an osteocyte-like cell line, MLO-Y 4, *J. Bone Miner. Res.*, 12(12), 2014-2023, (1997).
- 13) Takahashi, N., Yamana, H., Yoshiki, S., Roodman, G. D., Mundy, G.R., John S.J., Boyde, A., Suda, T.: Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures, *Endocrinology*, 122, 1373-1382, (1988).
- 14) Hentunen, T.A., Reddy, S.V., Boyce, B.F., Devlin, R., Park, H.R., Chang, H., Selander, K.S., Dallas, M., Kurihara, N., Galsen, D.L., Goldring, S.R., Koop, B.A., Windle, J.J., Roodman, G.D.: Immortalization of osteoclast precursors by targeting Bcl-XL and Simian virus 40 large T antigen to the osteoclast lineage in transgenic mice, *J. Clin. Invest.*, 102, 88-97, (1998).
- 15) Sarkar, D, Nagoya, T, Koga, K, Nomura, Y, Gruener, R., Seo, H.: Culture in vector-averaged gravity under clinostat rotation results in apoptosis of osteoblastic ROS 17/2.8 cells, *J Bone Miner. Res.*, 15, 489-498, (2000).
- 16) Klaus, D.M., Todd, P., Schats, A.: Functional weightlessness during clinorotation of cell suspensions., *Advances in Space Res.*, 21(8/9), 1315-1328, (1998).
- 17) Guignandon, A., Lafage-Proust, M.H., Usson, Y., Laroche, N., Caillot-Augusseau, A., Alexandre, C., Vico, L.: Cell cycling determines integrin-mediated adhesion in osteoblastic ROS 17/2.8 cells exposed to space-related conditions, *FASEB J*, 15 (11), 2036-2038, (2001).
- 18) Jiang, J.X., Cheng, B.: Mechanical stimulation of gap junctions in bone osteocytes is mediated by prostaglandin E 2, *Cell Commun. Adhes.*, 8(4-6), 283-288, (2001).
- 19) Cheng, B., Lato, Y., Zhao, S., Luo, J., Sprague, E., Bonewald, L.F., Jiang, J.X.: PGE(2) is essential for gap junction-mediated intercellular communication between osteocyte-like MLO-Y 4 cells in response to mechanical strain, *Endocrinology*, 143(8), 3464-3473, (2001).
- 20) Pilbeam, C.C., Kawaguchi, H., Hakeda, Y., Voznesensky, O., Alander, C.B., Raisz, L.G.: Differential regulation of inducible and constitutive prostaglandin endoperoxide synthase in osteoblastic MC 3 T 3-E 1 cells, *J. Biol. Chem.*, 268(34), 25643-25649, (1993).
- 21) Kawaguchi, H., Raisz, L.G., Voznesensky, O.S., Alander, C.B., Hakeda, Y., Pilbeam, C.C.: Regulation of the two prostaglandin G/H synthases by parathyroid hormone, interleukin-1, cortisol, and prostaglandin E 2 in cultured neonatal mouse calvariae, *Endocrinology*, 135(3), 1157-1164, (1994).
- 22) Kawaguchi, H., Pilbeam, C.C., Gronowicz, G., Abreu, C., Fletcher, B.S., Herschman, H.R., Raisz, L.G., Hurley, M.M.: Transcriptional induction of prostaglandin G/H synthase-2 by basic fibroblast growth factor, *J. Clin. Invest.*, 96(2), 923-930, (1995).
- 23) Cherian PP, Cheng B, Gu S, Sprague E, Bonewald, L. F., Jiang, J.X.: Effects of mechanical strain on the function of gap junctions in osteocytes are mediated through the prostaglandin EP 2 receptor., *J Biol Chem.*, 278(44), 43146-43156, (2003).
- 24) Ilvesaro, J., Tuullanen, J.: Gap junctional regulation of osteoclast function, *Crit., Rev. Eukaryot. Expr.*, 13(2-4), 133-146, (2003).
- 25) Heino, T.J., Hentunen, T.A., Vaananen, H.K.: Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor-beta: enhancement by estrogen, *J Cell Biochem.*, 85(1), 185-197, (2002).
- 26) Gorti, G.K., Lo, J., Falsafi, S., Kosek, J., Quan, S.Y., Khuu, D.T., Koch, R.J.: Cartilage tissue engineering using cryogenic chondrocytes. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, 129(8), 889-893, (2003).
- 27) Grigoryan, E.N., Anton, H.J., Mitashov, V.I.: Microgravity effects on neural retina regeneration in the newt, *Adv. Space Res.*, 22(2), 293-301, (1998).

Mechanical Response of Osteocyte to Multi-Dimensional Gravity

Junpei MATSUDA¹, Kosaku KURATA², Takanobu FUKUNAGA¹
Hidehiko HIGAKI²

¹Graduate School of Kyushu Sangyo University, ²Kyushu Sangyo University

Abstract Microgravity induces osteoporosis. Osteocytes are considered to act as a mechanosensor in bone tissue. They are the most abundant cells in bone and are distributed throughout the bone matrix. However, very little is known about the detailed mechanism of osteoporosis occurred under microgravity. Therefore, the aim of this study was to examine the effects of multi-dimensional gravity on osteocytes and bone marrow cell differentiation. We developed a newly experimental apparatus, by which osteocyte-like cell line MLO-Y 4 cells can be cultured under multi-dimensional gravity on the ground. When osteocytes were cultured on coverslips for 2, 4 and 6 days, cell proliferation was significantly inhibited in the cells exposed to multi-dimensional gravity compared with control cells. Moreover, MLO-Y 4 cells forming cell-to-cell networks were cultured for 24 hours in multi-dimensional gravity. Double fluorescence staining technique revealed that cell-to-cell communications via the gap junction were significantly decreased in multi-dimensional gravity. Bone marrow cells were cultured for a week using a conditioned medium (CM) obtained from osteocyte culture under multi-dimensional gravity. There were no significant differences in relative ALP (alkaline phosphatase) activity, on the other hand, TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) activity was significantly increased by adding CM from osteocyte culture exposed to multi-dimensional gravity. Those results suggest that the initial stage of bone resorption under multi-dimensional gravity would be regulated by osteocyte, possibly by soluble factors secreted by osteocytes.

Key Words: Microgravity, Multi-dimensional gravity, Osteocyte, Bone remodeling, Cell-to-cell communication