

骨代謝細胞の新規低酸素・閉鎖系培養技術の開発(第一報) —破骨細胞分化誘導系での解析結果—

古賀 慎太郎*1 石川 智之*1 金沢 英一*1 緒方 貴宏*2 坂井 孝則*2 朴 晶淑*2

Development of Hypoxic and Closed Culture System Optimized for Bone-metabolizing Cells - Analysis of Osteoclastogenesis -

Shintaro Koga, Tomoyuki Ishikawa, Eiichi Kanazawa, Takahiro Ogata, Takanori Sakai and Piao Jingshu

生体内に近い環境で細胞培養や機能解析を行う技術が、骨代謝細胞の研究や骨再生医療において求められている。しかし通常の細胞培養では、生体内に比べて高酸素、また開放系であり、骨代謝細胞が存在する骨髓環境とは大きく異なっている。そこで、骨代謝細胞をより生体内に近い環境で培養・解析を行うため、低酸素・閉鎖系培養を取り入れた骨代謝細胞の新たな培養法の確立と、当該培養法による細胞の機能解析を行った。RAW264.7細胞を用いて解析した結果、低酸素依存的な細胞増殖の低下と破骨細胞顕著な分化阻害、骨吸収抑制が認められた。抑制のメカニズムについて、細胞死が亢進することや、分化に必要な転写因子の発現が低下することが明らかになった。また試作した閉鎖系培養容器で破骨細胞の分化誘導を行い、容器の課題を見出すことができた。

1 はじめに

骨は脊椎動物の骨格を形成する組織で、体の支持や血中ミネラルの恒常性、造血環境の提供など、生命維持に必要な多様な機能を担っている。骨組織は常に骨吸収と骨形成(骨代謝)を繰り返しており、正常組織ではこの骨代謝がバランスよく維持されている。しかし骨代謝のバランスが崩れ正常な骨代謝が行われない場合、骨粗しょう症や関節リウマチをはじめとした様々な疾患を引き起こすことが知られている。

骨吸収を担う破骨細胞は単球・マクロファージ系の細胞より分化し、酸やタンパク質分解酵素の分泌により骨成分を分解する。対して骨形成を担う骨芽細胞は間葉系の前駆細胞から分化し、コラーゲンやリン酸カルシウムなどの骨基質を形成する。これら骨代謝を担う細胞の分化・機能メカニズムを分子レベルで明らかにすることが、骨代謝の理解や骨関連疾患の病態解明に必要不可欠である。

細胞・分子生物学的な研究において細胞培養は根幹技術であり、生体(骨髓)内に近い環境下で細胞の培養と解析を行うことが、骨代謝メカニズムの正確な解明へとつながる。しかし従来の培養方法は大気酸素、開放系であり、生体内の環境(低酸素、閉鎖系)とは大きく異なっている。

そこで、低酸素・閉鎖系培養を取り入れた骨代謝細胞の新たな培養法の確立と、当該培養法による細胞の機能解析を行った。第一報では破骨細胞分化誘導系を用いた解析結果を報告する。

2 研究、実験方法

2-1 細胞培養

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 は ATCC より購入し、EMEM (イーグル MEM 培地「ニッスイ」③、日水製薬)に NEAA (非必須アミノ酸、和光純薬)と 10% 分の FBS (ウシ胎児血清, Corning) を添加した培地で培養を行った。大気酸素の場合は CO₂ インキュベーター (SCA-165DRS, アステック)、低酸素はマルチガスインキュベーター (APM-30D, アステック) を用いて培養し、酸素濃度は窒素ガスをインキュベーター内に導入することにより調整を行った。CO₂ 濃度はいずれの条件でも 5.0% とした。

2-2 細胞増殖の評価

RAW264.7 細胞を 1×10^5 cells/well で 6-well plate に播種し、培養を開始した。3 日後に細胞を剥がし、細胞数を Coulter Particle Counter Z1 (Beckman Coulter) により計数した。

2-3 破骨細胞の分化誘導と評価

RAW264.7 細胞を用いた分化誘導法と酒石酸耐性酸

*1 生物食品研究所

*2 (株)アステック 細胞科学研究所

性フォスファターゼ (TRAP) 染色は既報に従い実施した¹⁾。また骨吸収の評価は、細胞を予めリン酸カルシウムで被膜したガラス板上に播種し、破骨細胞へ分化後に細胞を除去、被膜部の分解箇所を破骨細胞による骨吸収部とした。吸収部は ImageJ ソフトウェア (NIH) により定量化を行った。

2-4 破骨細胞分化過程のモニタリング

細胞のモニタリングは、培養細胞観察システム (CCM-1.4XYZ, アステック) により実施した。RAW264.7 細胞を分化密度で播種後、分化開始時から 4 日後まで、5 分間隔でタイムラプス撮影を行った。

2-5 リアルタイム PCR による遺伝子発現解析

各細胞の分化段階における遺伝子発現をリアルタイム PCR により解析した。細胞からの RNA 抽出は NucleoSpin RNA Plus (タカラバイオ) を使用し、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (タカラバイオ) により逆転写反応を行うことで cDNA を作製した。PCR 反応は TB Green Premix Ex Taq II (タカラバイオ) を用いたインターカレーター法で、95°C 5 秒→60°C 30 秒で 40 サイクルの増幅条件により、Thermal Cycler Dice Real Time System II 装置 (タカラバイオ) を用いて解析した。解析した遺伝子と使用したプライマー配列は以下の通りである。

Rank-f 5' -CATCTTCGGCGTTACTACAGG-3'
Rank-r 5' -TCCACTTAGACTACTGCAAGCA-3'
Trap-f 5' -TCCTGGCTCAAAAAGCAGT-3'
Trap-r 5' -ACATAGCCACACCGTTCTC-3'
DC-STAMP-f 5' -TCCTCCATGAACAAACAGTTCCAA-3'
DC-STAMP-r 5' -AGACGTGGTTTAGGAATGCAGCTC-3'
Ctsk-f 5' -CAGTAGCCACGCTTCTCTATCC-3'
Ctsk-r 5' -GAGACAGAGCAAAGCTCACCA-3'
NFATc1-f 5' -CAAGTCTCACACAGGGCTCACTA-3'
NFATc1-r 5' -GCGTGAGAGGTTTATTCTCCAAGT-3'
βactin-f 5' -TGAGAGGGAAATCGTGCCTGAC-3'
βactin-r 5' -AAGAAGGAAGGCTGGAAAAGAG-3'

2-6 閉鎖系培養容器の試作と破骨細胞の分化

閉鎖系培養容器は 5 cm×5 cm 角の容器で、厚さが 1, 2, 4 mm の 3 種類を試作した。辺縁部はガス透過性のシリコンゴムでシールし、2 ヲ所の細胞・培地導入口を持つ (図 1)。細胞の導入や液体の入れ替え・除去作業は、全てシリンジを用いて慎重に実施した。

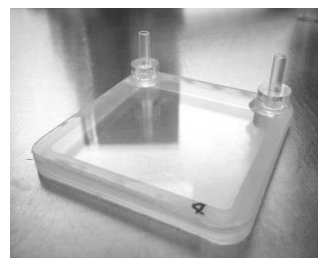


図 1 閉鎖系培養容器

1 容器あたり 3.3×10^5 cells の RAW264.7 細胞を播種し、翌日に培地交換して分化誘導を開始した。以後の分化スケジュールは開放系培養と同様に実施した。

3 結果と考察

3-1 低酸素が細胞の増殖に及ぼす影響

本研究においては、RAW264.7 細胞を破骨細胞前駆細胞株として用いた。図 2 に酸素濃度と細胞増殖との関係について示す。

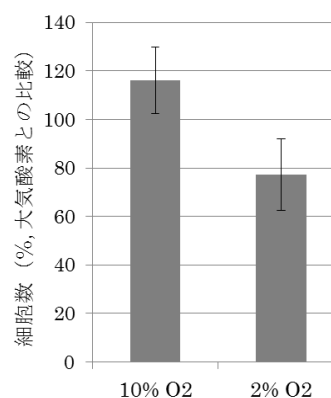


図 2 低酸素が細胞増殖へ及ぼす影響

計数した結果、10% O₂ で大気酸素と同等、あるいは増殖が良かったが、2% O₂ では明らかな増殖低下が認められた。5% O₂ でも同様に増殖が低下した (データ省略)。また培養中の細胞の状態が非常に悪くなり、継代を繰り返すほど増殖が不安定になることが分かった。この結果から、RAW264.7 細胞は 5% O₂ 以下の低酸素により細胞の増殖が低下することが分かった。

3-2 低酸素が破骨細胞分化と機能に及ぼす影響

破骨細胞分化への影響を調べるため、各酸素条件で分化させ、分化の指標である TRAP 染色を行った。低酸素にする時期は分化開始時からと、分化後半の 3 日目からの 2 条件検討した。

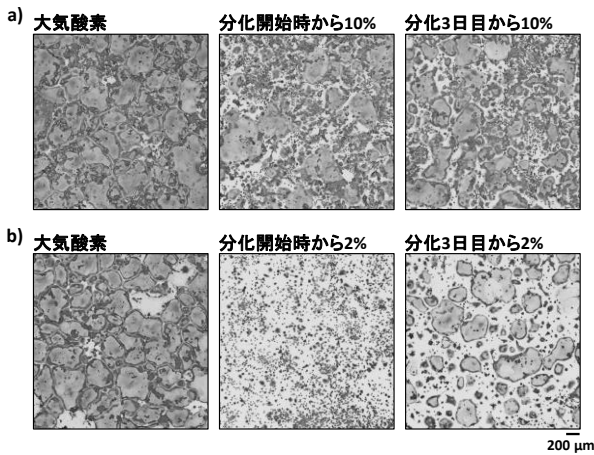


図3 破骨細胞分化における酸素濃度の影響

2%および10% O₂での結果を図3に示す。コントロールの大気酸素条件では、TRAP陽性の多核の成熟破骨細胞が多数形成される(図3左列)。しかし低酸素ではどの酸素濃度でも、また低酸素暴露の時期に関わらず、破骨細胞分化は阻害されることが分かった(図3)。またこの現象は酸素濃度が低いほど、あるいは低酸素暴露期間が長いほど顕著で、分化開始時から2% O₂にした場合、多核の破骨細胞はほとんど形成されない(図3-b))。この結果から、低酸素環境はRAW264.7の破骨細胞分化を顕著に阻害することが分かった。

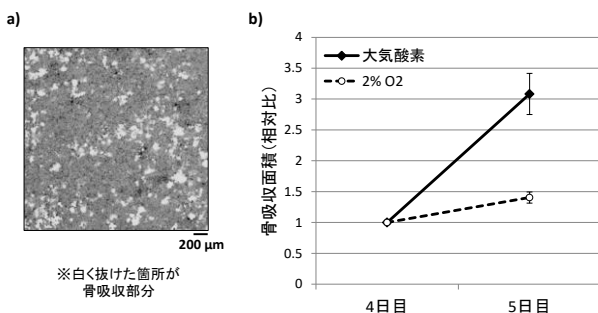


図4 低酸素が骨吸収活性に及ぼす影響

次に骨吸収活性について検討を行った。特に、破骨細胞分化において最も顕著な変化が見られた2% O₂条件に着目し、実験を行った。図3の結果から、破骨細胞分化阻害による骨吸収低下の影響を極力排除し、成熟破骨細胞における骨吸収活性を見る必要があった。そこで、成熟破骨細胞が形成される分化4日目までは大気酸素条件で分化誘導し、その後5日目まで2% O₂条件で培養した。

骨吸収活性の結果を図4に示す。グラフは4日目の吸収面積を1とし、その相対比として示している。破骨

細胞の骨吸収活性により、培養基板上のリン酸カルシウム化合物が分解され穴が生じる(図4-a))。この穴の面積を定量化して比較した結果、大気酸素条件では4~5日目にかけて吸収面積の増大が認められるのに対し、2% O₂では顕著に抑制されていた(図4-b))。このことから、低酸素はRAW264.7細胞の破骨細胞分化だけでなく、骨吸収も抑制することが分かった。

3-3 細胞のモニタリングによる低酸素の影響解析

これまでの結果から、低酸素により破骨細胞の分化は抑制されることが明らかとなった。その影響について詳細に解析するため、破骨細胞の分化過程における細胞の挙動をタイムラプス撮影により観察した。

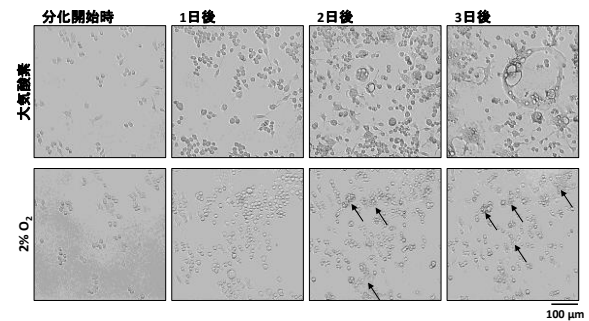


図5 破骨細胞分化過程のモニタリング

破骨細胞分化過程のモニタリング結果を図5に示す。大気酸素環境における破骨細胞分化は、細胞増殖や活発な遊走を経て細胞融合し、最終的に巨大な多核細胞を形成する(図5上段)。しかし2% O₂では、分化開始1日後までは大気酸素と同様の挙動であったが、それ以降は細胞死が亢進して細胞数が減少し、多核の破骨細胞はほとんど形成されなかった(図5下段: 矢印は死細胞を示す)。また、培地中へのLDH放出を指標とした細胞傷害活性の測定を行った結果、2% O₂では破骨細胞分化過程の中期において、顕著な細胞傷害が生じていることが判明した(データ省略)。これらの結果を合わせて、低酸素環境は分化の中期段階で過剰な細胞死を誘導し、破骨細胞の分化を顕著に抑制することが考えられる。

3-4 低酸素培養における遺伝子変動の解析

低酸素が破骨細胞分化過程における細胞の遺伝子発現にどのような影響を与えているか調べるため、リアルタイムPCRにより代表的な遺伝子群の解析を行った。なお各時点での遺伝子発現は、リファレンス遺伝子β-actinで補正を行い、0日目の発現を1として相対比を

算出した。各遺伝子の概要は以下の通りである。

RANK：破骨細胞分化に必須の受容体。

NFATc1：破骨細胞分化に必須の転写因子。

TRAP, *DC-STAMP*, *CTSK*：分化依存的に発現上昇する遺伝子で、破骨細胞分化や骨吸収に必要。

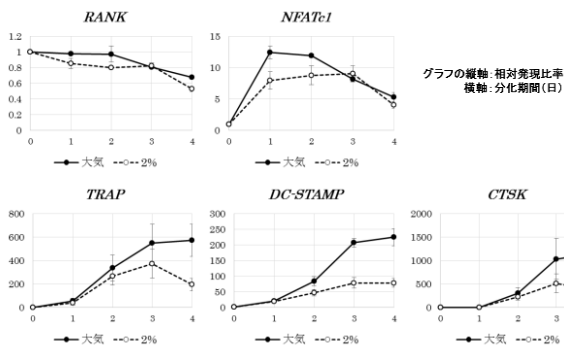


図6 破骨細胞分化過程における遺伝子変動解析

各遺伝子の発現変動を図6に示す。解析の結果、*RANK*の発現には影響がなかったが、分化初期において*NFATc1*発現は低下しており、また分化後期の*TRAP*, *DC-STAMP*, *CTSK*の発現も顕著に低下していた。これらの結果から、低酸素環境では破骨細胞分化初期のシグナル伝達が抑制され、必要な遺伝子群の発現が低下したことが考えられる。

3-5 閉鎖系培養容器を用いた破骨細胞分化の解析

最後に、試作した閉鎖系培養容器で破骨細胞分化の解析を行った。開放系培養との比較のため、同じ培養面積を持つT25培養フラスコを用意し、比較を行った。

まず試作容器への細胞の接着性について調べた結果、T25フラスコと同等の接着性を示し、生着細胞の数や形態にも異常は認められなかった（データ省略）。

図7に3種類の試作容器（厚さ1, 2, 4 mm）とT25フラスコにおける破骨細胞分化の結果を示す。分化開始4日目にTRAP染色を行った結果、閉鎖系培養容器では破骨細胞分化が阻害されており、特に1 mmと2 mm厚では阻害が顕著であった。また、4 mm厚容器では分化は認められるものの、多核の破骨細胞が明らかに少なかった（図7）。培養中の細胞を観察した結果、1 mmと2 mm厚の培養容器では分化途中で多くの細胞が死んでいることが判明した（データ省略）。さらに閉鎖系培養容器では、辺縁部と中心部で破骨細胞の分化の進行に偏りがあり、ガス交換部に近い辺縁部の方が分化していることが確認された（データ省略）。なお、このよ

うな現象はT25フラスコでは見られなかった。これらの結果から、試作した閉鎖系培養容器において、RAW264.7の破骨細胞分化は阻害され、特に中心部ではそれが顕著であることが分かった。前述した低酸素培養での解析結果と試作容器中心部での破骨細胞の表現型が類似していることから、溶存酸素量の違いにより辺縁部と中心部で分化に偏りが生じた可能性が高い。

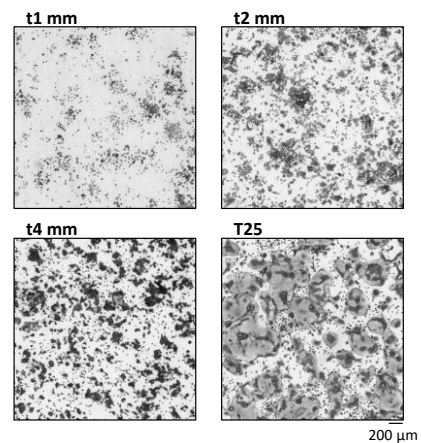


図7 閉鎖系培養容器における破骨細胞分化

4 まとめ

本研究により、低酸素は破骨細胞の分化シグナルを抑制し、細胞死を誘導、顕著に破骨細胞の形成と骨吸収機能を阻害することが分かった。また閉鎖系培養容器の開発において、今回の試作容器では低酸素が原因と思われる破骨細胞の分化阻害や、不均一な分化が生じることが判明した。本成果は均質な細胞状態を維持する培養容器の開発に活かし、低酸素培養を組み合わせた新たな培養法の確立を目指したい。

謝辞

本研究は筆頭著者を研究代表者とし、柿原科学技術研究財団 科学技術研究助成事業の支援を受け実施したものです。

5 参考文献

- 1) 古賀慎太郎：福岡県工業技術センター研究報告，No. 19, pp. 41-44 (2009)