

骨代謝細胞の新規低酸素・閉鎖系培養技術の開発(第二報) — 骨芽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 Osteoblastogenesis -

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髄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。MC3T3-E1細胞を用いて解析した結果、低酸素環境は骨芽細胞分化を抑制する一方、継代培養時の分化能維持に良い影響を与えることが分かった。また分化過程で低酸素が細胞死を亢進することや、分化シグナルを抑制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骨芽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(骨髄)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。第二報では骨芽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

マウス頭蓋骨由来細胞株 MC3T3-E1 は理研バイオリソースセンターより購入し、MEM α (アスコルビン酸不含, GIBCO)に Penicillin-Streptomycin(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。培養用インキュベーター、各種ガス濃度の調整については、前報「骨代謝細胞の新規低酸素・閉鎖系培養技術の開発(第一報)」と同様に実施した。

2-2 細胞増殖の評価

MC3T3-E1 を 5×10^4 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 骨芽細胞の分化誘導と評価

MC3T3-E1 細胞を用いた分化誘導法とアルカリフォスファターゼ(ALP)染色は既報に従い実施した¹⁾。骨形成の指標であるアリザリンレッド染色(石灰化評

*1 生物食品研究所

*2 (株)アステック 細胞科学研究所

価セット, PG リサーチ) は, キットのプロトコールに従い実施した。

2-4 骨芽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。MC3T3-E1 を分化密度で播種後, 分化開始後 11 日目から 14 日目まで, 10 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

リアルタイム PCR による解析は前報「骨代謝細胞の新規低酸素・閉鎖系培養技術の開発 (第一報)」と同様に実施した。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。

<i>Runx2</i> -f	5' -GCCCAGGCGTATTTTCAGA-3'
<i>Runx2</i> -r	5' -TGCCTGGCTCTTCTACTGAG-3'
<i>Osterix</i> -f	5' -CTCCTGCAGGCAGTCCTC-3'
<i>Osterix</i> -r	5' -GGGAAGGGTGGGTAGTCATT-3'
<i>Alp</i> -f	5' -CGGATCCTGACCAAAAACC-3'
<i>Alp</i> -r	5' -TCATGATGTCCGTGGTCAAT-3'
<i>Colla</i> -f	5' -CCAGCCGCAAAGAGTCTACA-3'
<i>Colla</i> -r	5' -TTCCACGTCTACCATTGGG-3'
<i>Osteocalcin</i> -f	5' -TGACCTCACAGATGCCAAGC-3'
<i>Osteocalcin</i> -r	5' -CGCCGGAGTCTGTCTACTAC-3'
<i>β actin</i> -f	5' -TGAGAGGGAAATCGTGCCTGAC-3'
<i>β actin</i> -r	5' -AAGAAGGAAGGCTGGAAAAGAG-3'

2-6 閉鎖系培養容器の試作と骨芽細胞の分化

閉鎖系培養容器は前報「骨代謝細胞の新規低酸素・閉鎖系培養技術の開発 (第一報)」と同じ試作容器を使用した。1 容器あたり 6.6×10^5 cells の MC3T3-E1 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, MC3T3-E1細胞を骨芽細胞前駆細胞株として用いた。図1に酸素濃度と細胞増殖との関係について示す。

その結果, 10% O₂では大気酸素と同等, あるいは増殖が良い傾向であったが, 2% O₂では前報のRAW264.7細胞と同様に増殖が低下した。しかし顕微鏡観察による細胞の状態は大気酸素とほとんど変わらず, また継代を繰り返しても細胞の増殖は安定していた (データ

省略)。このことから, MC3T3-E1細胞は低酸素による増殖の低下はあるものの, RAW264.7細胞よりも安定な状態で維持可能であることが分かった。

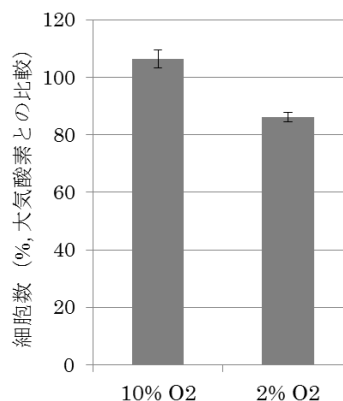


図1 低酸素が細胞増殖へ及ぼす影響

3-2 低酸素が骨芽細胞分化と機能に及ぼす影響

骨芽細胞分化と機能への影響を調べるため, 各酸素条件で分化させて検討した。

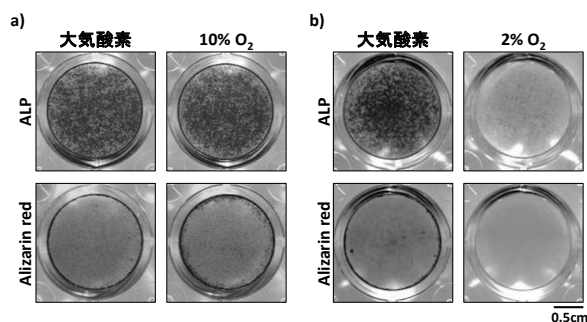


図2 骨芽細胞分化過程における低酸素の影響

分化期間を通して低酸素環境 (2%, 10%) で培養し, 7日目に骨芽細胞分化の指標であるALP染色, 14日目に機能の指標であるAlizarin red染色を行った (図2: 黒い部分が染色部)。コントロールの大気酸素条件と比較した結果, 10% O₂では分化・機能ともにほぼ同等であったが (図2-a)), 2% O₂では顕著に阻害が認められた (図2-b))。

また, 骨芽細胞分化中に24時間間隔での間欠的な低酸素暴露を行い, 分化能を検討したが, 10%と2% O₂条件ともに分化の促進は認められず, むしろ大気酸素条件よりも抑制されていた (データ省略)。これらの結果からMC3T3-E1細胞の骨芽細胞分化・機能について, 特に2% O₂では, 暴露期間に関わらず阻害されることが分かった。

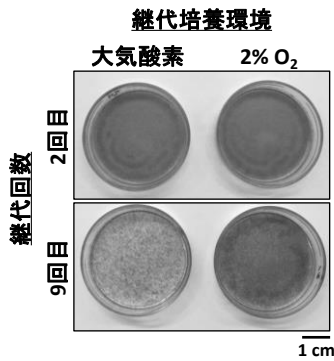


図3 骨芽細胞分化における低酸素の影響
(低酸素での継代培養の影響)

続いて上記とは異なる条件での低酸素の影響を調べるため、以下の実験を行った。低酸素 (2% O₂) で MC3T3-E1細胞を継代、維持培養を続け、その細胞を大気酸素条件で骨芽細胞へと分化させ、7日目にALP染色によりコントロールと比較を行った。その結果、大気酸素下での継代培養は、培養期間依存的に骨芽細胞への分化能を低下させるのに対し、2% O₂での継代培養はその低下を明らかに抑制することが分かった (図3)。このことはMC3T3-E1細胞において、低酸素が骨芽細胞分化能を維持する効果があることを示している。またこの結果は前述した分化過程での低酸素の影響 (図2) と逆で、低酸素が細胞の未分化段階と分化・機能段階で果たす役割が異なることが推察される。

3-3 細胞のモニタリングによる低酸素の影響解析

次に骨芽細胞分化過程における低酸素の影響を詳細に解析するため、培養中の細胞のモニタリングを行った。骨芽細胞の分化過程は破骨細胞のようにダイナミックな細胞の形態変化が起きないことから、分化後過程の骨形成 (リン酸カルシウム結節の形成) に着目し、タイムラプス撮影を行った。

その結果を図4に示す。大気酸素環境において骨芽細胞は、撮影開始 (11日目) から細胞の周囲に急激な骨形成 (図4の黒色部) が進み、24時間後にはプラトーに達した (図4上段)。10% O₂でも骨形成が起きるものの、非常に緩やかで大気酸素とは明らかな差が生じた (図4中段)。さらに2% O₂においては、全く形成を確認することができなかった (図4下段)。また2% O₂では分裂する細胞が非常に少なく、撮影後半には分裂も停止し、死細胞が急激に増える様子を観察することができた (データ省略)。これらの結果から、前報

の破骨細胞と同様に、骨芽細胞においても低酸素による細胞増殖の停止と細胞死が分化・機能阻害の要因と考える。上記モニタリング結果に加えて、2% O₂では骨芽細胞の分化特異的に急激な細胞傷害が生じることがLDH放出測定により判明しており、この可能性を裏付けている (データ省略)。

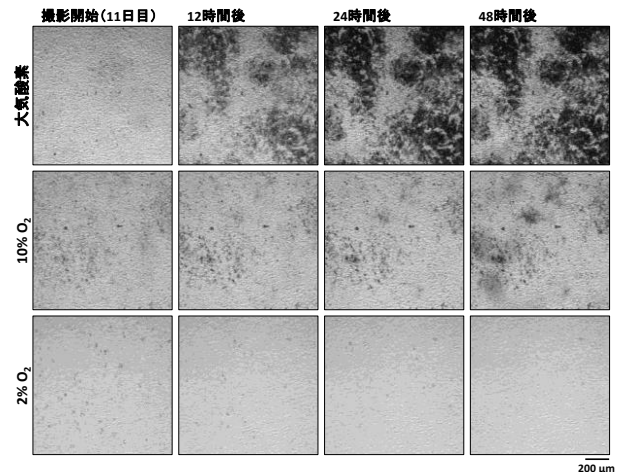


図4 骨芽細胞分化過程のモニタリング

3-4 低酸素培養における遺伝子変動の解析

低酸素が骨芽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。解析した遺伝子の概要は以下の通りである。

Runx2, *Osterix*: 骨芽細胞分化に必須の転写因子。

ALP, *Col1a*: 分化初期～中期に発現する遺伝子。

Osteocalcin: 分化後期に発現する遺伝子。

各時点での遺伝子発現量はリファレンス遺伝子 β -actinで補正を行い、*Osteocalcin*のみ4日目、その他の遺伝子は0日目 (分化開始前) の発現量を1として、その相対変化を算出した (*Osteocalcin*は0日目で全く検出できなかったため)。

各遺伝子の発現変動を図5に示す。解析の結果、*Runx2*の発現は大気酸素と2% O₂でほとんど変わらず、*Osterix*は逆に2% O₂の方が分化後期で発現上昇することが分かった (図5上段)。しかし*ALP*, *Col1a*, *Osteocalcin*の発現は2% O₂で明らかに低下しており、特に*ALP*と*Osteocalcin*は顕著な低下が認められる (図5下段)。これらの結果から骨芽細胞分化過程において、低酸素は転写因子*Runx2*, *Osterix*の発現を抑制せずに、*ALP*, *Col1a*, *Osteocalcin*の発現を低下させることが

分かった。これらの骨芽細胞分化マーカーは*Runx2*と*Osterix*によって発現が制御されることが知られている。低酸素誘導転写因子であるHIF-1 α が他の転写因子の機能を直接制御する報告もあり、HIF-1 α を中心とした直接的、間接的なシグナル伝達が骨芽細胞分化制御に関わっていると考える。

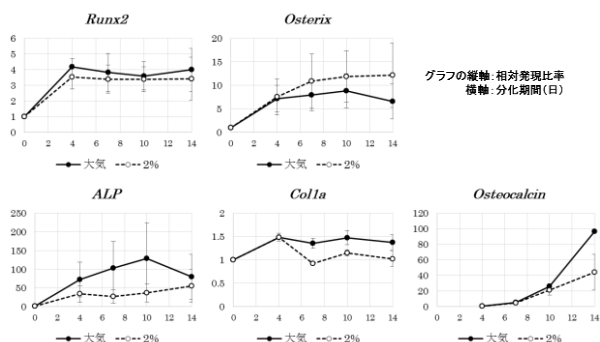


図5 骨芽細胞分化過程における遺伝子変動解析

3-5 閉鎖系培養容器を用いた骨芽細胞分化の解析

前報の破骨細胞の解析と同様に、試作容器での骨芽細胞分化について調べた。まず試作容器へのMC3T3-E1細胞の接着性については、T25フラスコと同等で異常は認められなかった。また分化途中の細胞についても顕微鏡観察を行ったが、RAW264.7細胞とは異なり、明らかな細胞死は観察できなかった（データ省略）。

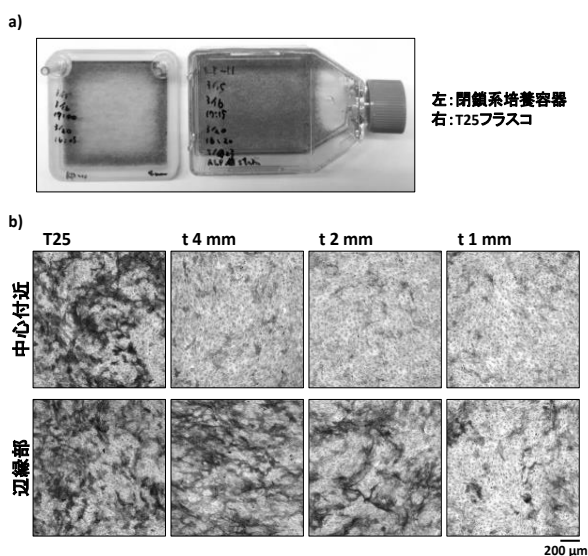


図6 閉鎖系培養容器における骨芽細胞分化

MC3T3-E1細胞を分化刺激後7日目にALP染色した結果、試作容器の辺縁部と中心部で、細胞染色像に顕著な差があることが分かった（図6-a）。このような現象は、

開放系のT25フラスコでは見られなかった（図6-a）。顕微鏡で観察すると、容器の全面に細胞は接着しているものの、一様に骨芽細胞の分化が認められるT25フラスコに対して、試作容器では中心部で顕著に骨芽細胞分化が阻害されていた（図6-b）。逆にガス交換部に近い辺縁部では骨芽細胞分化が進行しており、4 mm厚の容器ではT25フラスコと同等であった（図6-b）。

これらの結果から、試作した閉鎖系培養容器は、開放系培養と比べて全体的な骨芽細胞分化は低下、分化の偏りが見られ、特に容器中心部での分化が阻害されていることが分かった。前述の低酸素培養で得られた研究結果と、容器中心部の骨芽細胞の表現型が類似していることから、辺縁部と中心部の溶存酸素量の違いにより分化に差が生じた可能性が高い。

4 まとめ

本研究により、低酸素がMC3T3-E1細胞の分化シグナルを抑制して、顕著に骨芽細胞の形成と機能を阻害することが分かった。一方で、骨芽細胞分化能力の維持には、低酸素で継代培養した方が良いという結果も得られた。この低酸素の役割の違いから、酸素濃度により前駆細胞の増殖や分化の指向性を調整できる可能性が考えられる。

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骨芽細胞の不均一な分化を生じることが判明した。このことは、細胞の酸素消費量を賄うには今回のガス交換方法では不十分であることを示している。

今後は本研究成果を間葉系幹細胞などに適用して研究することで、骨再生医療に必要とされている、良質な骨芽細胞の培養が可能な細胞培養装置の技術開発に活かしたいと考えている。

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. 20，pp. 22-25 (2010)