

鶏胚長管骨より分離した二つの cell population について

— Alkaline phosphatase 活性に対する細胞密度ならびに
prostaglandin E₂ の影響 —

永井 雅 純

岩手医科大学歯学部歯科矯正学講座

(主任 : 石川富士郎教授)

岩手医科大学歯学部口腔解剖学第二講座

(指導 : 名和橙黄雄教授)

[受付 : 1988年10月17日]

抄録 : 18日鶏胚大腿骨および脛骨の骨梁面より二つの cell population を分離, 培養しそのアルカリフォスファターゼについて検討した。今回分離, 培養した細胞のうち, 酵素消化の前半に得られた細胞は, 比較的高いアルカリフォスファターゼ活性をもっていた。また, プロスタグランジンの生合成を阻害するインドメタシンを加えると, アルカリフォスファターゼ活性は有意に低下し ($p < 0.01$), インドメタシンと共にプロスタグランジン E₂ を添加するとその活性は僅かに増加した。さらに, この細胞は増殖が盛んなことから未分化な骨原性細胞であると思われる。一方, 後半に分離されてくる細胞は, 一般に骨芽細胞様の細胞として広く実験に用いられている頭頂骨由来の細胞よりもアルカリフォスファターゼ活性が高かった。この細胞は, インドメタシンによるアルカリフォスファターゼ活性の低下が少いことや, プロスタグランジン E₂ に応答して活性は有意 ($p < 0.01$) に増加することから, より分化の進んだ細胞であることが示唆された。

DNA あたりのアルカリフォスファターゼ活性の強さは, 培養細胞密度に依存しており 2 cm² の培養面あたり 3.0—4.0 μg DNA のときに最も活性が高かった。

Key word : osteoblast, cell culture, PG E₂, cell density, ALPase.

はじめに

従来, 骨芽細胞はラット, マウス, ニワトリの頭頂骨骨膜面より分離されてきたが, 骨形成ならびに骨吸収を調節する因子の一つと考えられているプロスタグランジンによって生じる生体での骨の組織的な変化は, 長管骨に関する報告が多い¹⁻⁸⁾。また, Volpi ら⁹⁾ は鶏胚長管骨骨梁面にはいろいろな分化の段階にある骨芽細胞が存在していることを, Gray ら¹⁰⁾ は実験的な海綿骨移植時の骨形成には endosteal lining

cell の関与が最も高いことを報告している。そこで今回, 長管骨骨梁面から二つの細胞系を分離し, 骨芽細胞の marker enzyme であるアルカリフォスファターゼ活性に及ぼすプロスタグランジン E₂ の影響について検討を試みた。

また, 培養骨芽細胞の細胞密度と分化機能の発現との関連を考慮することは, 最適な培養条件の設定だけでなく, 各種刺激が細胞機能の調節に対して示す効果を検討するうえで重要な因子となりうることから DNA あたりのアルカリフォスファターゼ活性との関連を調べた。

Two cell populations isolated from chick embryonic long bone.

— Influences of cell density and PG E₂ upon alkaline phosphatase activity —

Masazumi NAGAI,

(Department of Orthodontics, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka 020)

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 13 : 262-268, 1988

材料ならびに方法

1. 細胞分離液¹⁾ および培養液

- (a) Ca, Mg-free PBS (Solution A): 137mM 塩化ナトリウム + 2.7mM 塩化カリウム + 3mM リン酸二水素ナトリウム, pH7.2
- (b) EDTA 溶液: solution A + 4mM エチレンジアミン四酢酸ナトリウム, pH7.2
- (c) コラゲナーゼ溶液: solution A + 180U/ml コラゲナーゼ (細胞分散用: 和光純薬)
- (d) 増殖用培養液: α -MEM (Gibco) + 10% 新生仔牛血清 (Flow labo.) + 60mg/l カナマイシン, pH7.2
- (e) ALPase 活性測定用培養液: Eagle-MEM (フェノールレッド不含: 日水製薬) + 0.1% 牛血清アルブミン (fraction V: Miles Laboratories, Inc.) + 各種アミノ酸 (L-グルタミン: 584mg/l, L-セリン: 25mg/l, プロリン: 40mg/l, グリシン: 50mg/l) + 5mM β -グリセロリン酸ナトリウム + 0.1 mM アスコルビン酸, pH7.2

2. 細胞の分離

1) 長管骨からの細胞の分離

18日鶏胚の大腿骨と脛骨を無菌的に摘出し、付着する軟組織を十分に除き、40ml 丸底遠心管中にてハサミで十分に細切した後に、PBSを加えピペティングして骨髄を洗い流した。この骨片を100mlの三角フラスコに移し、37°CのEDTA溶液を10ml加えて毎分100回振蕩し一回目の細胞分離を行った。20分後、上清をステンレスメッシュ(100mesh)で濾過して骨片を除いた細胞浮遊液を40mlの尖底遠心管に回収した。骨片は10mlのsolution Aで静かにピペティングして洗い、これも上記のごとく濾過し、先の細胞浮遊液に加えてFraction 1とした。次に、同様にして、37°Cのコラゲナーゼ溶液10mlで細胞分離を4回行い(10, 10, 20, 20分) Fraction 2-5を得た。

各Fractionには、回収後ただちに氷冷した増殖用培養液10mlを加えて分離液を不活化し、400xgで5分間遠心して細胞を集め、さらに20

mlの増殖用培養液で二度洗浄、遠心を繰り返した。最後にFraction 1とFraction 2を合わせてPopulation 1 (Pop. 1), Fraction 4とFraction 5を合わせてPopulation 2 (Pop. 2)とし、10mlの培養液に浮遊させて100mmのプラスチックディッシュに植え込んだ。

2) 頭頂骨からの細胞の分離

骨膜を剥離した18日鶏胚頭頂骨から、上記と同じ方法で細胞を分離、培養した。

3) 骨髓腔からの細胞の分離

18日鶏胚大腿骨と脛骨より、注射器を用い骨髓腔をコラゲナーゼ溶液でflush outし、37°Cで毎分100回震蕩し細胞を分離した。20分後、細胞浮遊液をメッシュで濾過して40mlの尖底遠心管に採り、ただちに氷冷した増殖用培養液をほぼ同量加えて酵素を不活化し、400xgで5分間遠心して細胞を集めた。細胞は培養液20mlで二度洗浄、遠心を繰り返したのち、10mlに浮遊させて100mmのプラスチックディッシュに植え込んだ。

3. 培養法

以上の方法で分離した各細胞群は、CO₂-incubator (5%CO₂-95% air, 37°C, 湿度100%)で培養した。培養液は48時間後に交換し、72時間で細胞がほぼconfluentに達したところで、24穴(well)のプラスチックプレート(Corning社)に0.5×10⁶個/500 μ l/wellの細胞密度で植え継いだ。一部の実験では0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5×10⁶個/500 μ l/wellの異なる細胞密度で継代した。継代12時間後、増殖用培養液をピペットで除き、培養面に付着した細胞をALPase活性測定用培養液500 μ lで静かに二度洗ったのち、500 μ lの培養液を加えて実験を開始した。

4. ALPase 活性の測定

一実験1—

長管骨、頭頂骨、骨髓より分離した各細胞群を測定用培養液で24時間培養後、細胞を培養液とともに超音波処理して得られた細胞破砕液を測定用試量とし、Lowryら¹²⁾の方法にしたがい、アルカリフォスファターゼ(ALPase)活

性を測定した。測定用試量 100 μ l に、1 ml の反応液 (0.2% *p*-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム, 1mM 塩化マグネシウム, 0.05M グリシン緩衝液, 37°C, pH10.4) を加え 37°C で 30 分間反応させた後、0.2N 水酸化ナトリウムを 1 ml 加え反応を停止させ、405nm の波長で吸光度を測定した。結果は、1 時間に 1 mM の *p*-ニトロフェノールの遊離を触媒する酵素活性を 1 単位(U)とし、細胞破碎液の残り 100 μ l より Burton¹³⁾の方法に準じて DNA 量を決定して、mU/ μ g DNA で表した。

—実験 2—

長管骨の Pop. 1, Pop. 2 を 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5×10^5 個/500 μ l/well の細胞密度で培養を始め、48 時間後に培養上清と細胞層の ALPase 活性を測定した。途中 24 時間で各 well の培養上清を 1.5ml のマイクロチューブに採り、あらたに 500 μ l の測定培養液を加えて培養を続けた。24 時間の各培養上清は 4°C にて保存し、48 時間後の培養上清を加えて酵素活性測定用試量とし、上記と同様の方法で ALPase 活性を測定した。細胞層は 200 μ l の蒸留水を加え超音波処理して破碎液とし、100 μ l を ALPase 活性の測定に、残り 100 μ l を DNA 量の測定に用いた。結果は、Plas ら¹⁴⁾の報告に準じ、48 時間培養後の 1 well あたりの DNA 量で細胞密度を代表させ、そのときの ALPase 活性を細胞層と培養上清とに分けて示した。

—実験 3—

長管骨の Pop. 1, Pop. 2 をインドメタシン (INDM: 1.4×10^{-7} M), INDM + プロスタグランジン E_2 : 10^{-9} – 10^{-4} M) で 48 時間処理し、実験 2 と同様に培養上清、細胞層の ALPase 活性を測定した。各薬剤はエタノールに溶かし、エタノールの培養液中の最終濃度が各群とも 0.1% となるように希釈した。対照群には 0.1% エタノールのみを加えた。

統計学的分析

一元配置分散分析により、細胞種間 (Tab.

1), および同一細胞系内における薬剤処置 (Fig. 2) による ALPase 活性の有意差 ($P < 0.01$) を確認した後、Newman-Keuls test にて各群間の差の有意性を検定した。

結 果

1. 各細胞群の ALPase 活性の比較—実験 1—

長管骨の Pop. 1 には骨髓の細胞 (BM cell) の混入も疑われるが、その ALPase 活性は Tab. 1 に示す様に BM cell の約 5 倍も高く ($P < 0.01$)、従来、破骨細胞様の細胞群とされている頭頂骨の Pop. 1 と骨芽細胞様の細胞群とされている頭頂骨の Pop. 2 のほぼ中間の値を示した。このことから、長管骨の Pop. 1 は BM cell とは性質の異なる比較的 ALPase 活性の高い細胞より構成されていることが示された。

長管骨の Pop. 2 は、頭頂骨の Pop. 2 よりも有意に高い酵素活性をもち ($P < 0.01$)、極めて活動性の高い骨芽細胞に富んだ population であることが示唆された。

2. 細胞密度と ALPase 活性の関係

長管骨の各 population の細胞密度と 1 μ g DNA あたりの ALPase 活性を Fig. 1 に示す。培養上清、細胞層の ALPase 活性はともに細胞密度に依存しており、3.0–4.0 μ g DNA/well の時に最も高い活性を示した。

3. 各 cell population の増殖傾向

Fig. 1 の横軸は異なる細胞密度で培養を始めてから 48 時間後の well あたりの DNA 量を示している。Pop. 1, 2 ともにグラフの左端の座標から順に 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5×10^5 個/well の細胞密度で培養を始めたところ、12 時間後には、ほとんど全ての細胞が培養面に付着しており、各群ともほぼ同じ細胞数で培養が始まったことを確認した。実験開始後 48 時間経過すると、どの細胞密度でも Pop. 1 の方が Pop. 2 よりも well あたりの DNA 量が高くより細胞の増殖が盛んであったことが示めされた。

4. INDM, PG E_2 が ALPase 活性に及ぼす影響

Fig. 2 に INDM, PG E_2 で 48 時間処理した

Table 1 ALPase activity in each cell population.

	ALPase activity (mU/μgDNA)		
	BM cell	Population 1	Population 2
Long bone	0.61±0.05(a)	3.06±0.26(c)	5.56±0.38(e)
Calvaria	—	1.21±0.10(b)	4.80±0.41(d)

Newman-Keuls table					
means	a	b	c	d	e
a 0.61	—		**	**	**
b 1.21	—	—	**	**	**
c 3.06	—	—	—	**	**
d 4.80	—	—	—	—	**

ALPase activities in cell layer along with medium were assayed at 24hr of experimental incubation. Values are mean ± SD from four wells. Significant differences among the groups : * P<0.05 ; ** P<0.01

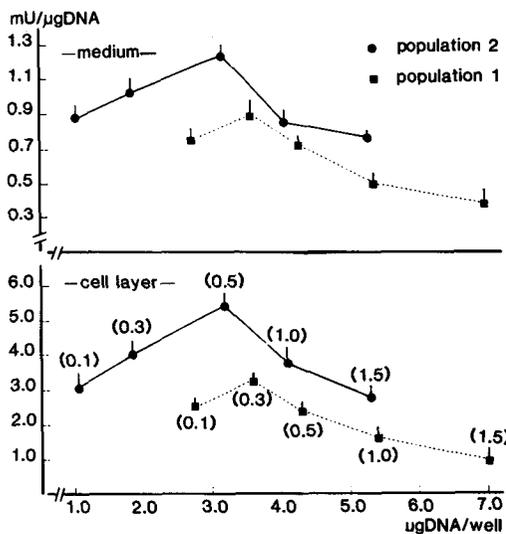


Fig.1 Effect of cell density upon ALPase activity. ALPase activity was assayed at 48hr of experimental incubation. Parentheses indicate initial numbers of cells x 10⁶. Values are means ± SD from four wells. Significantly different from the control : * P<0.05 ; ** P<0.01

ときの培養上清ならびに細胞層の ALPase 活性の変化を示す。Pop. 1 では Pop. 2 に比較して INDM を加えると酵素活性が著しく低下したが、PG E₂ を共に添加すると INDM による抑制は軽減した。最も効果の高かった 10⁻⁷ M PG E₂ では細胞層では僅かに増加したが、培養上

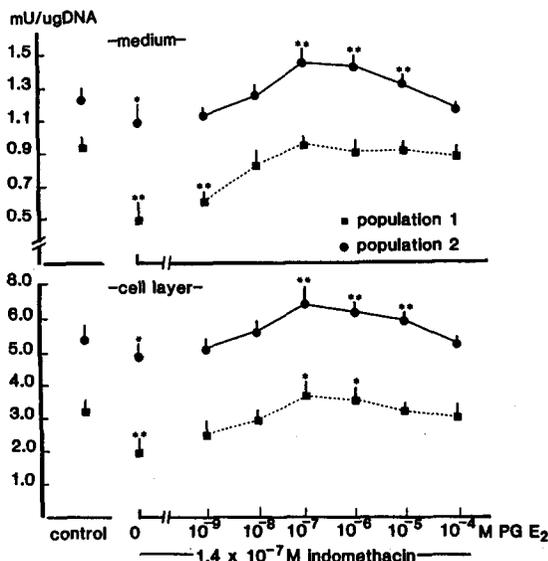


Fig.2 Effects of INDM and PG E₂ upon ALPase activity. ALPase activity was assayed after 48hr of the agents treatments. Values are means ± SD from four wells. Significantly different from the control : * P<0.05 ; ** P<0.01

清では有意な差は認められなかった。

一方、Pop. 2 は INDM による ALPase 活性の減少は少なく、PG E₂ により有意 (P<0.01) な上昇が認められた。

なお、細胞層と培養上清の酵素活性の増減は平行していた。

考 察

骨代謝に影響を及ぼす様々な因子の役割を解明するために、培養骨芽細胞を用いた研究が多数報告されている。培養骨芽細胞は、骨より分離後早い世代のもの¹⁶⁻¹⁷⁾と、骨芽細胞の性質を持ったクローン化細胞株^{15, 18)}とに分けられる。前者は正常二倍体の染色体を有し、各種調節因子に対し本来の応答能をより多く保っていると考えられるが、不均一な細胞集団であることが問題となる。一方、後者は骨芽細胞としての性質をもった均一な細胞集団であるが、形質転換を起こした細胞でありホルモン等に対する応答の一部に変化が認められる¹⁹⁾。したがって、ある生理活性物質が骨芽細胞の増殖、基質合成等に与える作用に関する研究は、できるだけ生体内の細胞と同一の形質をもった培養初期の細胞で観察することが必要と思われる。

今回分離した長管骨の Pop. 1 の細胞は、骨髄細胞よりも遙かに高い ALPase 活性を有していたことから、骨面から遊離した osteogenic な細胞であると思われる。また、形態的には紡錘形を呈し、増殖が比較的盛んであることから、Volpi ら⁹⁾が報告した鶏胚の長管骨骨梁面に存在する骨芽細胞の sub-type のうち、未分化な細胞に相当するものと思われる。さらに、INDM を加えて内因性の prostaglandin の生合成を抑制すると ALPase 活性の低下がみられ、PG E₂ を補うと活性が回復したことから、この細胞が PG E₂ への応答能を有した osteogenic な細胞で、Raisz と Martin²⁰⁾が報告しているように、PG E₂ により分化機能が調節されていることが示唆された。これに対し、Pop. 2 は多角形の細胞で、極めて高い ALPase 活性をもっており、PG E₂ に応答してその活性を上昇させたことから、分化した骨芽細胞と思われた。この cell population では INDM による活性の低下が少ないが、これは既に分化した骨芽細胞であるためとも考えられる。また、PG E₂ がこの細胞の酵素活性を著しく増加させたことは、骨芽細胞の分化誘導だけでなく、分化

した細胞の ALPase 活性を直接高めたことを示しており、Hakeda ら²¹⁾の報告と一致する。

さらに、ALPase は ectoenzyme であり細胞外の活性を評価することが必要と考え、培養上清中の活性も測定したところ、PG E₂ による活性の上昇は細胞層だけでなく細胞外でも認められ、細胞周囲の石灰化に関与している可能性が示された。

この分化度の異なる二つの cell population の増殖と分化に及ぼす影響を比較することにより、様々な生理活性物質の骨芽細胞にたいする役割を推察できると思われる。

培養細胞を用いた実験では、目的とする因子の細胞に対する特異的な作用を、その他の因子の影響を受けずに観察することが可能である。しかしながら、培養条件で細胞機能が異なる場合もあるので、基本的な培養環境自体のもつ影響を明確にしておくことが実験結果の考察に役立つものと考えられる。Plas ら¹⁴⁾によりホルモン(副甲状腺ホルモン、PG E₂)が骨芽細胞様の細胞の増殖に及ぼす作用は、細胞密度と刺激する時間に依存していることが報告されているが、本研究では骨芽細胞の分化機能の一つである ALPase 活性が細胞密度に依存していることが示され、至適培養細胞密度を設定するための知見を得ることができた。これらの条件は今後、薬剤等と骨芽細胞の分化機能との関係を調べるための実験を立案する際の指針となるものと考えられる。

結 論

18日鶏胚の長管骨骨梁面より酵素消化法の前半に分離された population は、未分化な stage にある骨芽細胞であり、後半に分離された細胞は分化度の高い stage にある骨芽細胞であることが示唆された。

この二つの細胞の ALPase 活性に対する PG E₂ の作用を検討した結果、PG E₂ は骨芽細胞の分化を誘導し、さらに分化した骨芽細胞の酵素活性を刺激することが示唆された。

また、本細胞の ALPase 活性は培養細胞密

度に依存しており、2 cm²あたり3.0—4.0 μg DNAのときに最も高い活性をもつことが示された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導、御校閲を賜った、岩手医科大学歯学部歯科矯正学講座、石川富士郎教授、亀谷哲也助教授に深甚なる謝意を表します。

実験に当たり終始御指導、御鞭達を頂いた本学口腔解剖学第二講座、名和橙黄雄教授ならび

に立花民子助教授、石関清人講師、坂倉康則講師、藤原尚樹助手、大学院生各位に衷心より深謝いたします。

また、生化学的な面より御教授、御鞭達を賜りました本学口腔生化学講座 太田稔教授、佐藤詔子助教授、黒川理樹講師、客本斉子助手に深く感謝の意を表します。

最後に、本研究に対して数多くの御援助、御助言をいただいた本学歯科矯正学講座の諸先生方に深く感謝します。

Abstract : Two different bone cell populations were isolated from trabecular surface of long bones of 18-day old chick embryos. One population (Pop.1) was supposed to be undifferentiated osteoblast and the other (Pop.2) was supposed to be rich in active osteoblast on the basis of following reasons : (1) Pop.1 had high replicative capacity and ALPase activity. (2) Pop.1 decreased ALPase activity when endogenous prostaglandin synthesis was inhibited by indomethacin and this inhibition was reversed by the addition of prostaglandin E₂. (3) Pop.2 had a higher ALPase activity than the cells isolated from periosteum-free calvaria which are generally thought to be osteoblastic cells, and had enhanced ALPase activity in response to prostaglandin E₂.

ALPase activities in both cell populations were dependent on their cell densities. The optimum ALPase activity was observed when the cell density was 3.0-4.0 μg DNA per 2cm² of culture well in both cell populations.

文 献

- 1) Ueda, K., Sito, A., Nakano, H., Aoshima, M., Yokota, M., Muraoka, R. and Iwaya, T.: Cortical hyperostosis following long-term administration of prostaglandin E₁ in infants with congenital heart disease. *J. Pediat.* 97 : 834-836, 1980.
- 2) Ringel, R.E., Brenner, J.I., Haney, P.J., Burns, J.E., Moulton, A.L. and Berman, M. A. : Prostaglandin-induced periostosis : a complication of long-term PG E₁ infusion in an infant with congenital heart disease. *Radiology.* 142 : 657-658, 1982.
- 3) Sone, K., Tashiro, M., Fujinaga, T., Tomomasa, T. and Kuroume, T.: Long-term low-dose prostaglandin E₁ administration. *J. Pediat.* 97 : 865-866, 1980.
- 4) Jee, W.S. S., Ueno, K., Deng, Y.P. and Woodbury D.M. : The effects of prostaglandin E₂ in growing rats : Increased metaphyseal hard tissue and cortico-endosteal bone formation. *Calcif. Tissue. Int.* 37 : 148-157, 1985.
- 5) Jee, W.S. S., Ueno, K., Woodbury D.M., Price, P. and Woodbury, L.A. : The role of bone cells in increasing metaphyseal hard tissue in rapidly growing rats treated with prostaglandin E₂. *Bone.* 8 : 171-178, 1987.
- 6) Ueno, K., Kimmel D.K., Haba, T. and Jee, W.S.S. : Endocrine control of bone and mineral metabolism, Elsevier Science Publishers, B.V. pp151-154, 1984.
- 7) Ueno, K., Haba, T., Woodbury, D., Price P., Anderson R. and Jee, W.S.S. : The effects of prostaglandin E₂ in rapidly growing rats : depressed longitudinal and radial growth and increased metaphyseal hard tissue mass. *Bone.* 6 : 79-86, 1985.
- 8) Furuta, T. and Jee, W.S.S. : Effect of 16, 16-dimethyl prostaglandin E₂ methyl ester on weanling rat skeleton : daily and systemic administration. *Anat. Rec.* 215 : 305-316, 1986.
- 9) Volpi, G., Pillazzini, S., Remaggi, F. and Mugia, M.A. : Morphometric analysis of osteoblast dynamics in the chick embryo tibia. *Anat. Embryol.* 162 : 393-401, 1981.

- 10) Gray, J.C., and Elves, M.W. : Donor cells' contribution to osteogenesis in experimental cancellous bone grafts. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 163 : 261-271, 1982.
- 11) Boonekamp, P.M., Hekkelman, J.W., Hamilton, J.W., Cohn, D.V. and Jilka, R.L. : Effect of culture on the hormone responsiveness of bone cells isolated by an improved sequential digestion procedure. *Biochemistry.* 87 : 371-381, 1984.
- 12) Lowry, O.H., Roberts N.R., Wu, M.L., Hixon, W.S. and Crawford, E.J. : The quantitative histochemistry of brain II. enzyme measurements. *J. Biol. Chem.* 207 : 19-37, 1954.
- 13) Burton, K. : A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 62 : 315-323, 1956.
- 14) van der Plas, A., Feyen, J.H.M. and Nijiweide, P.J. *Biochem.*: Direct effect of parathyroid hormone on the proliferation of osteoblast-like cells ; a possible involvement of cyclic AMP. *Biophys. Res. Commun.* 129 : 918-925, 1985.
- 15) Partridge, N.C., Alcorn, D., Michelangeli, V.P., Kemp, B.E., Ryan, G.B. and Martin, T.J. : Functional properties of hormonally responsive cultured normal and malignant rat osteoblastic cells. *Endocrinology.* 108 : 213-225, 1978.
- 16) Nijiweide, P.J., van der Plas, A. and Scherft, J.P. : Biochemical and histological studies on various bone cell populations. *Calcif. Tissue. Int.* 33 : 529-540, 1981.
- 17) Nijiweide, P.J., van Iperen-van Gent, A.S., Kawlarang-de Haas E.W.M., van der Plas, A. and Waszenaar A.M. : Bone formation and calcification by osteoblast-like cell populations. *J. Cell. Biol.* 93 : 318-323, 1982.
- 18) 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.
- 19) Livesey, S.A., Kemp, B.E., Re, C.A., Partridge, N.C. and Martin, T.J. : Selective hormonal activation of cyclic AMP-dependent protein kinase isoenzymes in normal and malignant osteoblast. *J. Biol. Chem.* 257 : 14983-14987, 1982.
- 20) Raisz, L.G. and Martin, T.J. : *Bone and Mineral Research, Annual 2.*, Elsevier Science Publishers, B.V. pp286-302, 1983.
- 21) Hakeda, Y., Nakatani, Y., Hiramatu, M., Kurihara, N., Tsunoi, M., Ikeda, E. and Kumegawa, M. : Inductive effects of prostaglandin on alkaline phosphatase in osteoblastic cells, clone MC3T3-E1. *J. Biochem.* 97 : 97-104, 1985.