

—平成 22 年度 JAXA 研究チーム活動報告—

三次元培養による無重力骨代謝モデルの開発：宇宙実験の準備研究

長崎大学

池田 通

東北大学

上高原 理暢

東北大学

井奥 洪二

Three dimensional culture system for analysis of bone metabolism under zero or low gravity: feasibility study

¹Tohru Ikeda, ²Masanobu Kamitakahara, ³Koji Ioku

¹Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852-8588

E-Mail: tohrupth@nagasaki-u.ac.jp

^{2,3}Department of Environmental Studies, Tohoku University, 6-6-20 Aoba, Arakami, Aoba-ku, Sendai 980-8579

²E-Mail: kamitakahara@mail.kankyo.tohoku.ac.jp, ³E-mail: ioku@mail.kankyo.tohoku.ac.jp

Abstract: The final objective of this team is to detect biological change of osteoclasts under zero gravity using an in vitro culture system. In this system, we use biodegradable and unbiodegradable hydroxyapatite discs and granules as scaffolds of osteoclasts. Using this system, we will detect calcium and phosphate concentration and protein constitution in the culture medium, and will also analyze gene expression in osteoclasts.

Key words; zero gravity; osteoclast; calcium; bone metabolism; ceramics

【目的と背景】

骨代謝は骨形成を担当する骨芽細胞と骨吸収を担当する破骨細胞によって調節されるため、両者は互いに連携しながら体内のカルシウムバランスを厳密に制御している。無重力または低重力下では骨量の減少が認められることが明らかにされているが、これは長期臥床者等で見られる骨量の減少と同様、mechanical loading の減少に関連した骨代謝異常であると考えられている。

宇宙研究において骨芽細胞活性に関する情報が蓄積されてきており、無重力では骨芽細胞活性の低下をもたらすという複数の報告があることから、骨形成の賦活化は重要な課題である。一方、骨吸収を担う破骨細胞に関しては宇宙研究の実績はあるものの、無重力または低重力が個々の破骨細胞活性に及ぼす影響についてはまだほとんどわかっていない。

破骨細胞は、生理的には骨芽細胞が発現する破骨

細胞形成因子 RANKL の刺激を受けたマクロファージが分化、融合することで形成される。

無重力の骨代謝への影響は、今までに宇宙飛行士自身が多く情報を提供してきたが、サンプルを採取して直接細胞を観察、解析することは困難であり、代替の方法による詳細な解析が望まれる。小動物、特にラットまたはマウスが骨代謝研究に供されているが、ほ乳類の宇宙での飼育が困難な現状では、さらに別の有効な方法を用いて解析する必要がある。

骨細胞生物学者とセラミック工学研究者からなる小さな研究チームである我々は、生体内非吸収性セラミックであるハイドロキシアパタイト (HA) と生体内吸収性セラミックである β -リン酸三カルシウム (β -TCP) を用いて、非吸収期の破骨細胞と吸収期の破骨細胞を人工的に作成する実験系を確立している。これら工学的に均質なセラミック上で破骨細胞が分化、融合することから、活性の大きく

異なる比較的均質な破骨細胞を大量に作成することが可能となった。本研究チームでは、我々が開発したこの技術を用いて、無重力が非吸収期の破骨細胞と吸収期の破骨細胞にそれぞれどのような影響を及ぼすかを明確に示すことを目的とする。無重力が破骨細胞あたり、どれほどの量のカルシウム、リンの融解に影響を及ぼすかを定量的に確認し、宇宙飛行士が無重力下で生活することで、体内の破骨細胞がどれだけの骨量減少に直接関与するかをシミュレートしたい。

【材料と方法】

生体内非吸収性セラミックである HA と、生体内吸収性セラミックである、一般的な非柱状粒子 β -TCP の他、独自の水熱処理で作成した柱状粒子 β -TCP の、ディスク及び直径 0.5-0.6 mm の顆粒を作製した。作成した HA 及び β -TCP を X 線解析し、いずれも純粋なものであることを確認し、さらに走査型電子顕微鏡に粒子構造を確認のうえ、実験に供した。非柱状粒子 β -TCP 及び柱状粒子 β -TCP がともに生体内吸収性であることは、すでに動物実験にて確認済みである。

各ディスク及び顆粒上に RANKL 遺伝子を発現する線維芽細胞と、5 週齢メス ddY マウス大腿骨及び脛骨由来マクロファージを α -MEM、10%ウシ胎仔血清培養液で共存培養し、破骨細胞形成を比較した。

また、細胞と細胞が直接接する必要がある共存培養を無重力下で開始するには、綿密な条件設定が必要であると判断される。そこで、最も簡便な方法として、あらかじめ地上にて共存培養を開始して細胞が定着したまま凍結保管し、無重力下で培養を再開することを想定し、定着したまま凍結した共存培養細胞を解凍後再培養することが可能か否かを検討した。

さらに、ひとつの実験サンプルをなるべく多角的に解析することが望ましいので、本研究では破骨細胞

の遺伝子発現、培養液中のカルシウム及びリン濃度の他、培養液中の可溶性蛋白の網羅解析も目指す。培養液中の蛋白を解析するためには、理想的には無血清培養液の使用が望ましいことから、我々の共存培養系が無血清培養に耐えるか否かを検討した。

【結果】

セラミックディスク及び顆粒上での破骨細胞形成の検討

HA ディスク及び顆粒を用いて比較したところ、共存培養開始 9 日までに表面に酒石酸抵抗性産生フォスファターゼ (TRAP) 陽性破骨細胞が形成され、ディスク、顆粒ともに破骨細胞が定着、増殖可能であることが確認された。

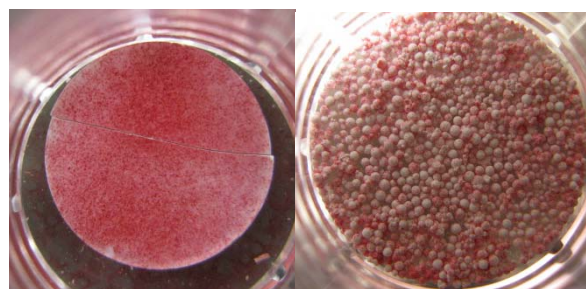


図 1 HA ディスク及び HA 顆粒上の TRAP 陽性細胞

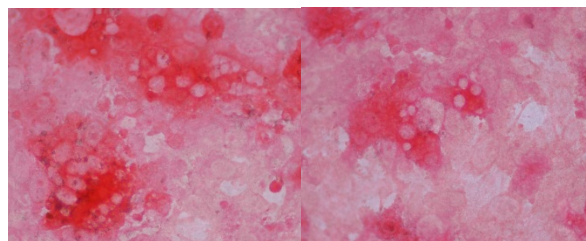


図 2 HA ディスク上の TRAP 陽性細胞 (強拡大像)

培養液は 3 日ごとに交換したが、交換した培養液中のカルシウム及びリン濃度を測定したところ、HA 顆粒ではカルシウム濃度及びリン濃度が培養後期にむしろ減少する傾向が見られ、破骨細胞による吸収を受けないことが強く示唆されるとともに、培養液中のカルシウムとリンを吸着する可能性も疑われた。

β -TCP 顆粒では、培養液中のカルシウム濃度、リン濃度ともに培養が進行するに従って濃度の上昇が見られ、破骨細胞による吸収が起こっていると判断された。また、非柱状粒子 β -TCP の方が柱状粒子 β -TCP よりもカルシウム、リン濃度ともに高く、生体内移植した時の反応を反映し、非柱状粒子 β -TCP がより強い吸収を受けた結果培養上清中のカルシウム及びリン濃度が高くなったと考えられた。

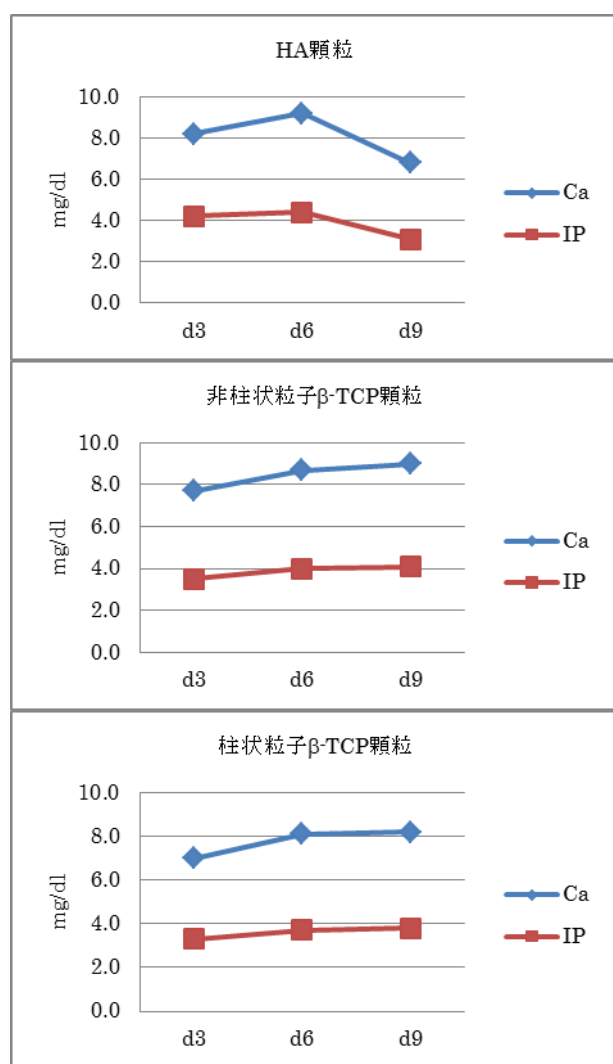
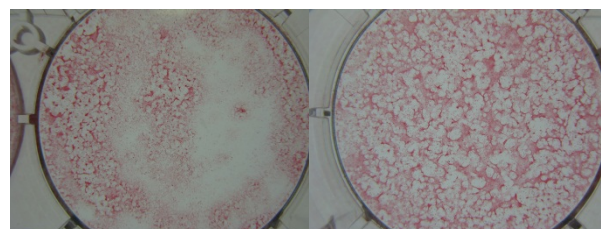


図2 セラミック顆粒共存培養上清のカルシウム、リン濃度

定着共存培養細胞の凍結・融解後の培養

使用したマウス骨髄由来マクロファージ、RANKL 発現線維芽細胞は、ともに単独培養した場

合には培養開始翌日には培養シャーレ上に定着する。共存培養でも同様であるが、凍結・融解による細胞の剥離が起こることが想定されるため、共存培養後、マクロファージに RANKL シグナルが十分に伝わり、マクロファージが前破骨細胞に分化した状態で凍結することが望ましいと考えられた。そこで、共存培養 1 日後、2 日後、3 日後、4 日後の細胞を、培養細胞を吸引後に細胞凍結保存液 (セルバンカー 1 または 2) で覆い、 -80°C にて凍結保管した。数日から 3 週間の後、保管細胞を融解し、凍結保存液を吸引後、培養液を満たして共存培養を再開した。共存 培養開始 1 日後、2 日後に凍結した細胞では、融解時の剥離が顕著で、培養再開 10 日目でも破骨細胞がシャーレ全面を覆うことはなかった。一方、共存培養開始 3 日目、4 日目に凍結保管したものでは、解凍後の剥離が少なく、その後順調に破骨細胞が増殖、分化し、培養再開 10 日目までには破骨細胞がシャーレ全面を覆う状況が観察された。



共存培養 2 日目凍結 共存培養 4 日目凍結

図3 凍結後再培養 10 日目の TRAP 陽性細胞

共存培養細胞に対する血清濃度の影響

共存培養開始後、2 日ごとに培養液を換え、血清濃度を 10% から、血清を最終濃度 5%、2.5%、1.25%、0.625%、0% まで段階的に減少させて影響を観察した。最終濃度で培養 48 時間後に TRAP 染色を行い細胞の状態を観察したところ、血清 0% でも TRAP 陽性細胞が観察された。血清濃度 0%、0.625%、1.25% では TRAP 陽性多核巨細胞の顕著な減少が見られたが、単核から数核までの小型の TRAP 陽性細胞は比較的よく維持されていた。血清濃度 5% では、10%

で培養した時と顕著な差は見られなかった。

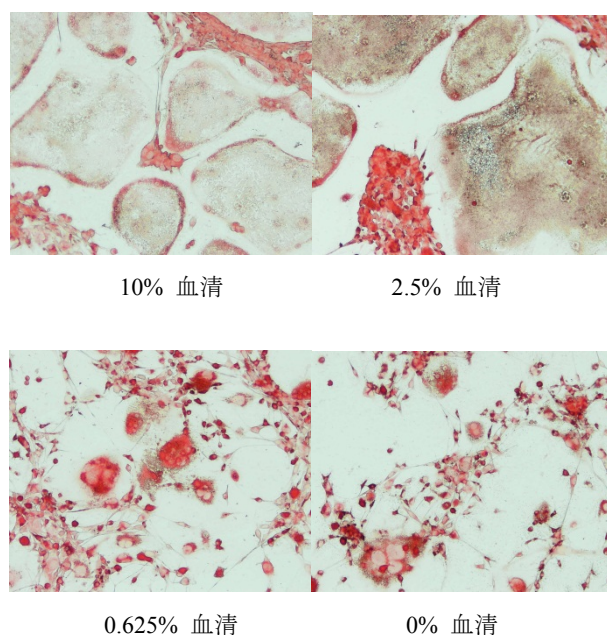


図4 各血清濃度にて48時間培養後のTRAP陽性細胞像

【考察】

今回の実験ではセラミックディスク及び球状顆粒を使用した。ディスク及び顆粒表面での破骨細胞の定着が認められた。しかし、顆粒を用いた場合でも厳密な意味で三次元培養ではない。今後は、セラミックにマクロポアを付与する等の対応を行い、少ない体積で最大限の表面積を効率よく利用するセラミック培養系を確立したい。また、シンプルな形状で実験を行う場合には、セラミックに加え、動物骨組織上で同様の実験を行うことを検討する必要がある。それにより、無重力の骨吸収への影響を直接解析することができる。

今回の最大の目的であった定着共存培養細胞の凍結・融解後の培養については、細胞を定着させたまま凍結、再培養することが可能であることが示された。条件としては、共存培養4日目に凍結するのが最良であり、共存培養開始1日目、2日目といった初期に凍結するとうまくいかないことが明らかとなった。さらに、凍結の影響がほとんど見られないまでに破骨細胞を分化、増殖させるには、培養

再開後10日ほどの期間が必要であることがわかった。

培養上清中の可溶性蛋白の網羅解析を有効に行うには、培養液中の血清濃度をできる限り下げることが望ましい。今回、血清濃度が2.5%以上では48時間まで共存培養系の破骨細胞が大きなダメージを受けることなく維持されることが強く示唆された。さらに、融合した巨大な破骨細胞ではなく、単核から数核の比較的小さなTRAP陽性細胞は比較的耐性があり、無血清の状態でも確認することができた。今後、無血清化がこれらの細胞に及ぼす影響についてさらに検討したい。

これらの技術開発により、哺乳動物を用いることなく、また、無重力下でも十分に実施可能な簡便な実験系を確立することで、不明のままである無重力下での破骨細胞活性の変化を、細胞生物学的に明確に示すことが可能であると期待される。