

—平成 20 年度 JAXA 研究班 WG 活動報告—

活性型及び非活性型破骨細胞を用いた低重力実験：要素技術の調査研究

長崎大学	池田 通
東京医科歯科大学	桑井 康宏
東北大学	井奥 洪二
長崎大学	権田芳範
長崎大学	柴田恭明
長崎大学	戸田 一雄
東京医科歯科大学	関 幸子

Culture System of Active and Quiescent Osteoclasts for Parabolic Flight

Tohru Ikeda, Yasuhiro Kumei, Koji Ioku, Yohinori Gonda, Yasuaki Shibata, Kazuo Toda, Sachiko Seki

Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Sakamoto, Nagasaki 852-8588
E-Mail: tohrupth@nagasaki-u.ac.jp

Abstract: Osteoclast plays pivotal roles in bone metabolism. However, details of osteoclast activity in low gravity remain unknown. We have developed a unique osteoclast culture system using biodegradable and unbiodegradable ceramic discs. Using an ultrasensitive intracellular calcium analyzing system, we are studying change in intracellular calcium of active osteoclasts cultured on biodegradable ceramics and quiescent osteoclasts cultured on unbiodegradable ceramics. It is highly possible that low gravity changes function of calcium channels in osteoclasts and will change the intracellular calcium concentration very quickly. It has been shown that intracellular calcium affects osteoclast bioactivity. Hence, parabolic flight experiments will be able to clarify the mystery of osteoclast in space medical biology.

Key words: Osteoclast, Ceramics, Calcium Channels, Parabolic Flight

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。特に、重力変化に応じて活性が変化していくのか、ある閾値を境に活性が変化するのかという宇宙医学の重大問題に対する解答はまだ得られていない。

破骨細胞の主たる機能は骨組織の吸収であるが、主たる骨基質であるコラーゲンを分解するプロテアーゼと骨の無機成分すなわち、ハイドロキシアパタイトを主体としたリン酸カルシウムを溶解させる酸の作用によって、破骨細胞下の吸収窩には高濃度のコラーゲン分解産物とカルシウムイオンが存在し、カルシウムイオン濃度は 40 mM にのぼると報告されている。

本研究課題ではこのカルシウムイオンに目を向け、これを指標にして低重力刺激による破骨細胞活性への影響を明らかにすることを目的としている。

破骨細胞が吸収窩中の高濃度のカルシウムイオンをどのように排出させているかについてはまだ不明な点も多いが、現時点では以下の3つの機構が考えられている。

1. 非特異的なトランスサイトosis
2. カルシウムチャンネルを介したもの
3. 破骨細胞と吸収窩の間からの漏出

このうち、従来は1のトランスサイトosisが重要であると考えられてきたが、最近では2のカルシウムに特異性の高いチャンネル輸送機構が非常に重要であることが示唆されている。また3の漏出についてはまだ仮説の域を出ていない。破骨細胞のカルシウムチャンネルには voltage-operated channel、ligand-gated channel、receptor-linked channel の各タイプがあることがわかっている。さらに、Na-Ca exchanger や ryanodine receptor channel の存在も確認され、それぞれの機能の重要性が示唆されている。これらのチャンネルを介して細胞内に入ったカルシウムイオンは主に小胞体に移動し、さらに細胞外に排出されるが、この排出は主として ATPase 活性を有するカルシウムポンプの作用によるものと考えられている。実際、カルシウムチャンネルブロッカー等を用いて破骨細胞内カルシウムを検出した研究がなされており、予想通りチャンネルを介した鋭敏な反応が起こることが示されている。

本 WG では、パラボリックフライトによる約 10~20 秒間の低重力がこれらカルシウムチャンネル機能にどのように影響するかについて、超高感度の細胞内カルシウム検出システムを用いて検討する。今回は以下の2点のうち、主として1を明らかにする目的で実験を行った。

1. セラミックディスク上でカルシウムイオンの検出が可能か？
2. カルシウムチャンネルブロッカーを用いて破骨細胞内のカルシウムの変化を検出できるか？

材料と方法

1. 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と、生体内吸収性セラミックである β -TCP のディスクを作製した。

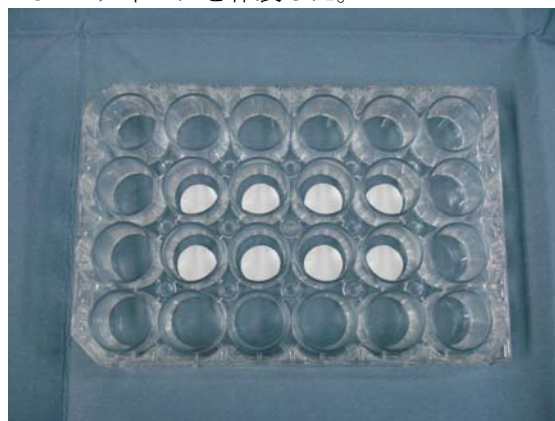


図1 培養容器に挿入されたセラミックディスク

2. 各ディスク上に RANKL 遺伝子導入線維芽細胞と 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た。

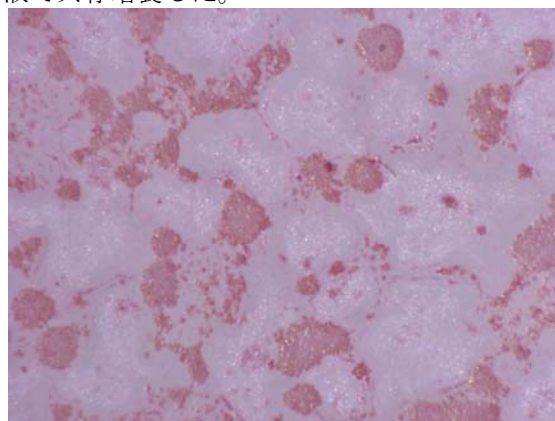


図2 酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ染色培養破骨細胞

3. 約 1 週間後、多核化した破骨細胞数が最大になった時期に細胞を Fura-2 AM 処理し、細胞質内カルシウムをニコン・浜松ホトニクス レシオイメージングシステム顕微鏡を用いて検出した。

結果

1. ハイドロキシアパタイト、 β -TCP セラミックディスクを顕微鏡下で 340 nm 及び 380 nm の波長において観察したところ、340 nm 波長では無視できる程度の低いバックグラウンドであったが、380 nm 波長ではややバックグラウンドが高かった。しかし、検出できる細胞質内カルシウム濃度が低い場合には影響が出る可能性があるものの、セラミックディスク状で培養した細胞のカルシウムを検出することが可能であると判断された。
2. 実際にハイドロキシアパタイトまたは β -TCP ディスク上で培養した破骨細胞の細胞質内カルシウムを顕微鏡下で検出することができた。

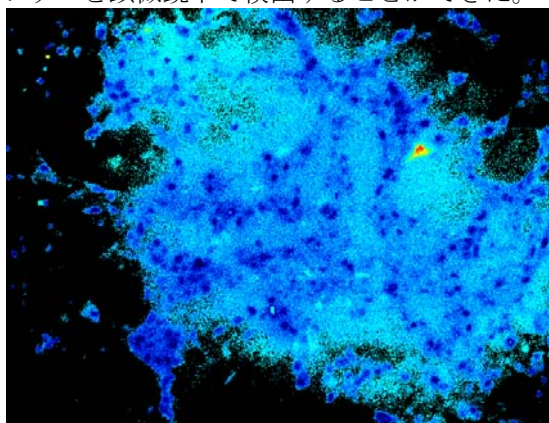


図4 破骨細胞内カルシウム画像例

以上の結果から、本システムを用いて実験を遂行することが可能であることが明らかになった。

考察

今回の結果はニコン培養倒立顕微鏡に浜松ホトニクス レシオイメージングシステムを取り付けたシステムで行った。この場合、セラミックディスクが不透過であるため、通常の倒立顕微鏡では表面に破骨細胞を形成させたセラミックディスクを裏返して観察することとなった。従って、カルシウムチャンネルに作用する薬物を用いた変化検出実験を行うことはできなかった。

従来の研究はあまり多くないものの、すでにカルシウムチャンネルアンタゴニストである PN 200-110 や(-) 202-791 が破骨細胞の細胞質内カルシウム濃度を急変させることが示されていることから (Ritchie C K, et al., Endocrinology 135:996, 1993)、こうした薬物を良好な還流条件下で作用させることでセラミックディスク上の破骨細胞の細胞質内カルシウム濃度の変化を検出することが可能であると判断され、現在実験を進行中である。

航空機実験では観察装置の防振処置が不可欠であり、過去に行われた防振対策を本実験用に改良して用いることで解決される。また、糸井らがすでに開発し、宇宙実験に使用した実績のあるシーリングシステムを応用した無気相細胞培養装置を用いることで、パラボリックフライト実験の遂行は可能である。

本研究は生体内吸収性セラミックと生体内非吸収性セラミックを利用して、個々の培養破骨細胞の機能及び活性を細胞質内カルシウムを指標にして判断するという、世界で全く前例のない独創的なものである。また、この細胞内カルシウムの調節に破骨細胞のカルシウムチャンネルがどのくらい重要な機能を果たしているかを明らかにするだけでなく、低重力または無重力がカルシウムチャンネルにどのような変化をもたらし、それが個々の破骨細胞機能にどのような影響を与えるかを明らかにすることができるため、画期的な成果が期待される。