

骨由来培養細胞の増殖・分化機能発現に及ぼす微小重力の影響 (OSTEOGENE)

代表研究者： 桑井康宏*¹

共同研究者： 下川仁弥太*¹、片野尚子*¹、鎌田伸之*¹、春日井昇平*¹、原 英二*²、
秋山英雄*³、平野昌彦*³、藤沢隆一*⁴、久保木芳徳*⁴、
向井千秋*⁵、長岡俊治*⁵、Peggy A. Whitson*⁶、Clarence F. Sams*⁶

*¹ 東京医科歯科大学 歯学部、*² 大阪大学 医学部、*³ 東レリサーチセンター 生物科学研究部、

*⁴ 北海道大学 歯学部、*⁵ 宇宙開発事業団 筑波宇宙センター、*⁶ NASA/ Johnson Space Center

The increase of urinary calcium and decrease of bone density, bone demineralization have been reported in astronauts. Inhibition of bone formation was reported in rats that were flown for 2 to 3 weeks. It has been suggested that microgravity affects bone metabolism, however, the mechanism remains unknown. The purpose of this study is to clarify the mechanism of microgravity effects on cultured osteoblasts. The investigation is focused on the gene expression and cell productivity, cytokines, growth factors, and bone matrix proteins. Gene expression was analyzed by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), whereas differentiated function of osteoblasts was investigated by quantitating cellular products using enzyme immunoassay or radioimmunoassay.

The cellular products which were secreted into the culture medium were harvested during space flight and analyzed quantitatively after return to the earth. In microgravity, prostaglandin E2 production was increased by 2- to 10-fold, whereas osteocalcin productivity was inhibited by 60 to 90 %. Prostaglandin E2 is reported to activate on osteoclast induction, whereas osteocalcin is reported to play some role in hydroxyapatite crystal formation as the bone matrix protein. The changes of cellular productivity were consistent with changes in mRNA levels for prostaglandin E2 and osteocalcin synthesis. These results suggest that microgravity affects differentiated function of osteoblasts at the transcriptional level and that the changes of the cellular products will then induce bone demineralization in microgravity.

実験の目的、意義

従来、宇宙飛行に伴い宇宙飛行士の尿中カルシウム量増大、骨密度減少、あるいは宇宙飛行ラットの骨形成阻害などが報告されている。微小重力が骨代謝に影響を及ぼすことが示唆されているが、そのメカニズムは解明されていない。本研究は生体内骨分化機能を培養下で再現するラット大腿骨髄由来骨芽細胞をスペースシャトルに搭載し、軌道上で同細胞を数日間培養し、細胞増殖、サイトカイン産生、骨基質合成などの骨分化機能発現に及ぼす微小重力の影響について、主として細胞内遺伝子発現および細胞の骨代謝関連物質産生能の変化などを指標として明らかにすることを目的とする。

実験の方法と試料

実験原理

骨代謝は全身的なカルシウム代謝調節機構の制御下であり、骨吸収と骨形成との平衡関係の下に骨の構造と骨量が維持されている。

骨吸収は破骨細胞が、また骨形成は骨芽細胞が主役となるが、破骨細胞と骨芽細胞の間には骨基質を介した密接な相互作用が存在する。破骨細胞および骨芽細胞がそれぞれの前駆細胞から分化し活性化される過程は複雑であり、全身性ホルモンの制御下で、骨芽細胞から分泌される局所性因子により営まれる。すなわち骨芽細胞およびその前駆細胞は、アルカリホスファターゼ活性、I型コラーゲン、骨シアロタンパク、オステオカルシンなどの骨基質タンパクの合成・分泌に至るまで段階的な分化を示し、それらの過程でインシュリン様成長因子、骨形成因子、Transforming Growth Factor- β 因子、プロスタグランジン E₂、インターロイキンなどのサイトカイン類を分泌し、骨芽細胞のみならず破骨細胞の機能にも深く関与している。

発生過程においては骨組織は大腿骨などの長管骨にみられるように間葉系組織中にまず軟骨が形成され、その部分が骨組織に置換される軟骨内骨化と、頭蓋・顔面部の骨にみられるように間葉系組織中に直接骨が形成され、軟骨形成を経ない膜性骨化のいずれかの様式で形成される。これら2つの様式の骨組織発生形成過程で出現する骨芽細胞の形態は類似しているが由来は異なると考えられる。長管骨を形成する骨芽細胞は中胚葉性の間葉系細胞に由来し、頭部・顔面部の骨を形成する骨芽細胞には神経堤すなわち外胚葉性の間葉系組織に由来するものが多い。成長後の骨組織においては骨髄内および骨膜部に存在する骨芽細胞の前駆細胞が骨芽細胞へ分化する。

宇宙飛行士あるいは地上で長期間横臥患者の骨からのカルシウム溶出は長管骨・荷重骨に顕著である。従来の培養骨芽細胞様細胞を用いた宇宙飛行実験では、骨肉腫由来の細胞株あるいは頭頂骨由来の細胞株が使用されており、実際に荷重・非荷重に鋭敏に反応を示すといわれている生体内長管骨の骨芽細胞の機能・特徴が正確に反映されていない。他方長管骨骨髄から直接採取した骨芽細胞は生体内骨形成過程に近似した分化機能を培養下で経時的に発現することが知られている。本研究は宇宙飛行に伴う生体内長管骨の骨代謝異常の原因を解明するためにラット大腿骨骨髄より採取した培養二代目の正常骨芽細胞を実験材料・飛行試料とし、細胞内遺伝子発現、細胞生理活性等の解析により、骨芽細胞の機能に及ぼす微小重力の影響の詳細を明らかにする。

パイロードクルーの実験教育訓練

パイロードクルーに対しては以下の内容につき延 19 日間の教育・訓練を実施した。

- 1) 細胞生物学および培養手技に関する基礎知識の講義総論(PI 研究室 2 日間)
- 2) 骨代謝および培養骨芽細胞に関する講義各論(PI 研究室 1 日間)
- 3) 培養細胞の顕微鏡写真撮影の訓練(PI 研究室 2 日間、MSFC/PCTC 3 日間)
- 4) 遺伝子発現解析の実習(PI 研究室 1 日間)
- 5) フライトシミュレーターを使用した実験操作に関する訓練(MHI 神戸 3 日間、MSFC/PCTC 2 日間)
- 6) 非正常時対策訓練(MSFC/PCTC 4 日間)
- 7) 打上げ直前の飛行試料に関する説明(KSC/LSSF 2 時間)

PI: 代表研究者

MHI: 三菱重工業

MSFC/PCTC: NASA マーシャル宇宙飛行センターベイロードクルー訓練施設

KSC/LSSF: NASA ケネディ宇宙センターライフサイエンス支援施設

地上予備実験

地上予備実験を以下の内容で計4年間以上にわたり順次行った。

- 1) 宇宙実験に適した合理的な飛行試料候補の選出
- 2) 骨髄由来初代および二代目培養骨芽細胞の機能発現に関する基礎的実験
- 3) 同細胞のフライト型培養容器素材上での細胞増殖、分化機能発現、遺伝子発現に関する基礎的実験
- 4) フライト型培養容器素材仕様決定
- 5) フライト型培養容器組立品を用いた骨芽細胞培養維持、細胞増殖、分化機能発現、遺伝子発現に関する性能確認試験
- 6) 飛行実験用クルー操作手順最終決定のための模擬実験
- 7) フライト用培養容器の実験適合性試験
- 8) フライト用培養容器補修のための確認試験

飛行実験の結果

打上げ8日前、雄性ウイスターラット(5週令)大腿骨髄より骨芽細胞を採取し、前培養を開始した。打上げ3日前、同細胞を 10^4 個/cm²の密度でフライト培養容器に植え込んだ。飛行実験用4個、地上対照実験用8個の培養容器を用意し、打上げ15時間前にシャトルミッドデッキ内に室温状態で搬送された。軌道に到達した後、培養容器は直ちに炭酸ガスインキュベータに移され、以後、37℃、5%炭酸ガス-95%空気気相中、湿度約60%の条件下で培養された。軌道上培養3日目よりクルーによる培養液交換などの実験操作が開始された。軌道上での培養細胞生育状態はクルーから音声により報告された。細胞生理活性あるいは遺伝子発現は細胞生育状態により影響をうけるため、飛行群と地上対照群との細胞生育状態の変化には特に注意した。軌道上培養4日目には地上対照群の一部の細胞生育状態が飛行群と異なる様相を呈し始めたため、軌道上培養を予定より4日間繰り上げ、軌道上5日目に培養を終了し、遺伝子固定・抽出用のグアニジン液を培養容器に注入し、冷凍庫内にて保管した。また軌道上で培養期間中回収した使用培養液は回収後直ちに冷凍庫または冷蔵庫に収納された。上記一連の実験操作について地上対照実験は全て飛行実験より3時間遅延して同調させた。飛行中の培養用インキュベータ内の温度、湿度および炭酸ガス濃度はPOCC端末で常時モニターされ、地上対照に反映された。

地上帰還後、遺伝子を含むグアニジン液を培養容器から個別に回収し、それぞれシアリングによりDNAを切断した後、セシウムトリフルオロ酢酸-EDTA液に混合し超遠心分離(30000 rpm、20時間)によりRNA、DNA、タンパクの各分画を得た。RNA沈澱物についてはグアニジン液に再度溶解し、エタノール沈殿・洗浄・溶解を繰り返し、純度の良好な最終試料を調製した。DNA、RNAの各分画については波長260 nmおよび280 nmにおける吸光度を測定し、濃度・純度を求めた。

遺伝子発現の解析は、目的とする遺伝子の塩基配列に特異的に相補的結合をするオリゴ

ヌクレオチドプライマーを合成し、 ^{32}P -標識ヌクレオチドを用いて逆転写酵素-ポリメラーゼ鎖反応(RT-PCR)により等量の全 RNA をもとに cDNA 合成・遺伝子増幅を一定の割合で行った。それぞれの遺伝子転写物の増幅回数については予め増幅効率が半対数性を示す範囲で決定した。各群で増幅に用いた RNA の等量性を確認するため glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) 遺伝子を各遺伝子と同一条件で増幅し、比較対照とした。得られた PCR 産物の一定量をポリアクリルアミド電気泳動し、該当する遺伝子転写物のバンドの放射活性の強さをオートラジオグラフ・画像解析により求め、一定の割合で増幅された遺伝子転写物の相対量とした。

軌道上で回収した培養液は、地上帰還後融解し、少量ずつ分別したのち、直ちに -70°C 中に保存し、凍結融解を繰り返すことなく、細胞により産生・分泌された細胞成長因子、サイトカイン、骨基質タンパクなどの定量解析に供された。得られた値は各培養容器中に含まれる細胞 DNA 総量に対し標準化したのち飛行群と地上対照群とについて比較した。

解析と考察

細胞形態・増殖

飛行群および地上対照群いずれも打上げ前に比し、細胞の順調な増殖が確認された(図1および図2)。両群ともに多数の骨芽細胞が培養容器基材上のほぼ全域に拡がる以前にグアニジン液注入により培養を終了した。両群ともに培養中の細胞はやや扁平な多角形の形態を示すものが多く、明瞭な細胞核、核小体、細胞内顆粒等が観察された。両群ともに培養容器基材上には細胞が全く生育していない箇所が認められたと同時に、また部分的に細胞増殖が過密になり、細胞同志が重なり合う箇所も観察された。

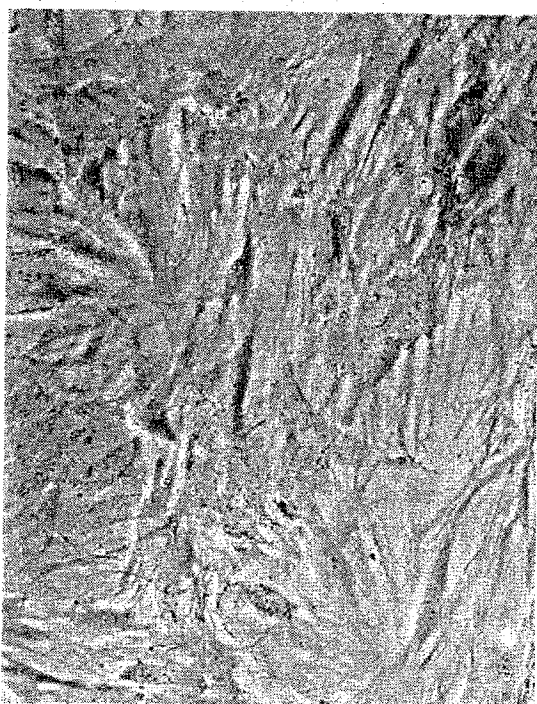


図1 飛行群骨芽細胞

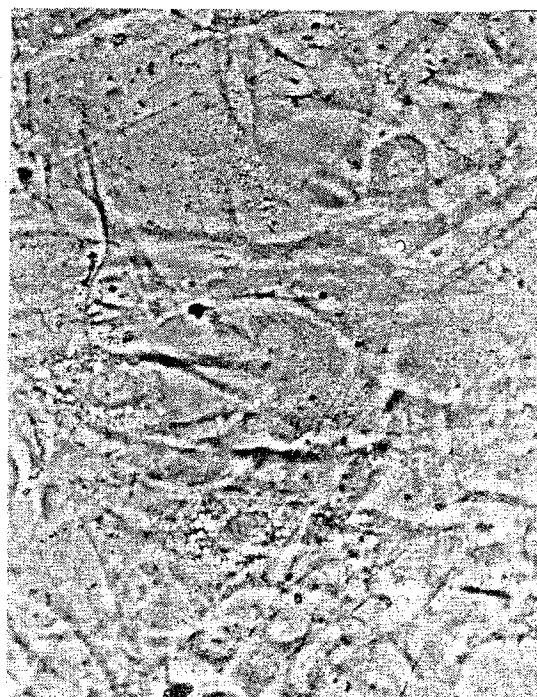


図2 地上対照群骨芽細胞

培養容器内 DNA 総量

培養容器内のグアニジン液を全部回収し、超遠心分離後、DNA 分画を集め 260 nm の吸光度により DNA 量を求めた。培養容器あたりの回収 DNA 総量は飛行群では 9.7 から 25.0 μg であり、地上対照群では 9.7 から 33.4 μg となった。回収した DNA 総量は細胞総数を反映する指標であり、また回収した時期が軌道上 4 日目及び 5 日目であったことから、飛行群と地上対照群とで若干のバラツキはあるものの、細胞は両群ともにほぼ同程度の順調な増殖を示した。

クレアチンキナーゼ、乳酸脱水素酵素活性

回収した培養液中のクレアチンキナーゼ活性および乳酸脱水素酵素については飛行群と地上対照群との間に有意差はなく、両群の細胞障害度に差はなかった。

糖消費量

培養液中のグルコース濃度を測定し、細胞の糖消費量を計算した結果、飛行群と地上対照群の間に有意差はなかった。

プロスタグランジン E2 (PGE2)

回収した培養液中に含まれる PGE2 量を酵素免疫法により吸光度測定し、標準曲線を Logit-Log 法により直線化し(直線性 0.993)、得られた吸光度より PGE2 量を計算し、さらに DNA 量に対する標準化を行った。最初の 3 日間で飛行群では計 20 $\text{pg}/\mu\text{g}$ DNA の PGE2 産生分泌が行われ、地上対照群の約 11 倍の値を示した。軌道上培養 4 日目にかけては、2.7 $\text{pg}/\mu\text{g}$

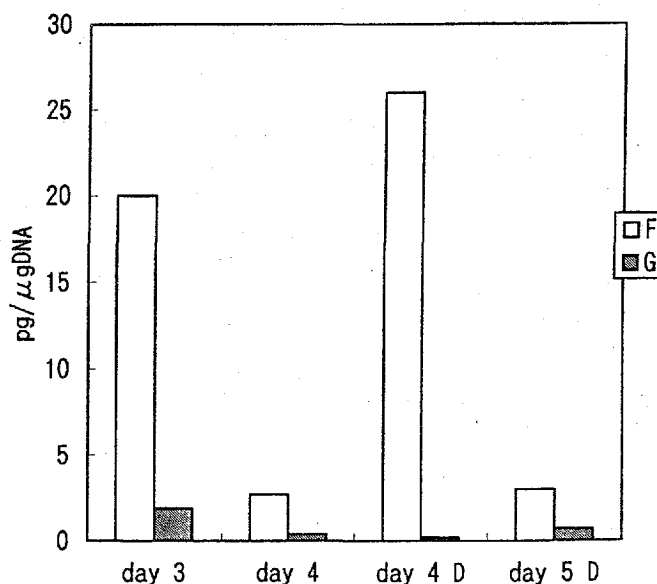


図 3 軌道上培養骨芽細胞のプロスタグランジン E2 合成・分泌
横軸：培地回収日(ミッション経過日数)、D：活性型ビタミン D 添加
F：飛行群 G：地上対照群

DNA となり、地上対照群の約 7 倍の値となった。また活性型ビタミン D3 添加による効果は認められなかった(図 3)。

骨芽細胞から合成・分泌される最も重要な PG は PGE2 である。PGE2 合成の調節はホスホリパーゼ A2 およびホスホリパーゼ C によるリン脂質からのアラキドン酸が遊離、そして PG 合成の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ(PGH 合成酵素)の作用により PGH2 に変換されるが、PGH2 はきわめて不安定なため PGE2、トロンボキサンなどへ変わる。骨芽細胞の PG 合成と cAMP とが正の相関であり、PG 合成促進は cAMP を介したシグナル伝達によるシクロオキシゲナーゼ合成の誘導によってもたらされることが知られている。シクロオキシゲナーゼには二つのアイソザイムが存在し、外的刺激がないときでも常時内在的に合成される内在性シクロオキシゲナーゼ(COX1)と、cAMP 等の因子や各種刺激によって速やかに産生誘導されるもの(COX2)とがある。ラット COX1 および COX2 の cDNA 塩基配列よりそれぞれの 5' 及び 3' プライマーオリゴヌクレオチドを合成し、RT-PCR により遺伝子発現を調べた結果、飛行群では地上対照群に比較して COX2 遺伝子が 2 倍 - 10 倍高く発現されていることがわかった(図 4)。

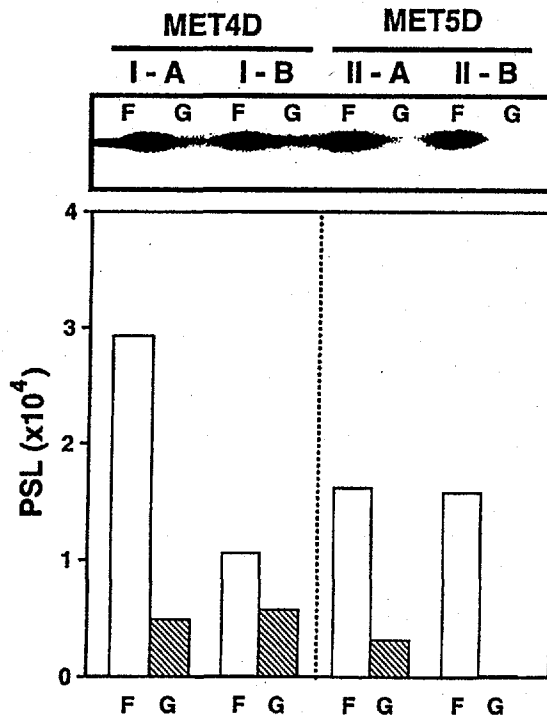


図 4 定量的 RT-PCR によるシクロオキシゲナーゼ-2 遺伝子発現量の比較

また COX1 遺伝子についても飛行群のほうが地上対照群に比較して若干多く発現していた。以上により微小重力環境では骨芽細胞による PGE2 産生が著しく亢進し、その作用機序として、微小重力により PG 合成の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ(PGH 合成酵素)-2 の産生が誘導されたためと考えられる。

オステオカルシン

培養液中に含まれるオステオカルシン量を抗ラットオステオカルシン抗体を用いラジオイムノアッセイにより求め、細胞 DNA 量に対し標準化した。活性型ビタミン D3 添加時では飛行群のオステオカルシン産生・分泌は軌道上 4 日目で平均 154 pg/ μ g DNA であり、地

上対照群の平均 1418 pg/ μ g DNA に比し約 90 % も抑制された。軌道上 5 日目では飛行群の平均は 583 pg/ μ g DNA となり、地上対照群の 1037 pg/ μ g に比し抑制の割合は約 40 % となった(図 5)。

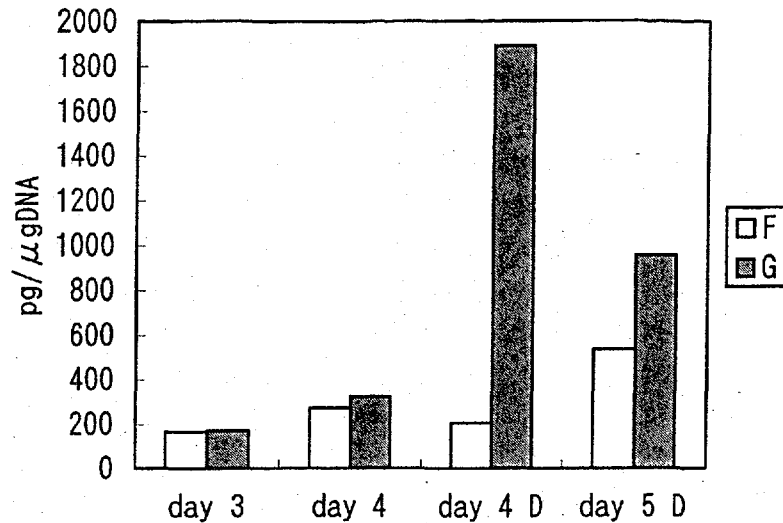


図 5 軌道上培養骨芽細胞のオステオカルシン合成・分泌
 横軸：培地回収日(ミッション経過日数)、D：活性型ビタミン D 添加
 F：飛行群 G：地上対照群

ラットオステオカルシンの cDNA 塩基配列より 5' 及び 3' プライマーオリゴヌクレオチドを合成し、RT-PCR により遺伝子発現を調べた結果、飛行群では地上対照群に比較してオステオカルシン遺伝子の発現が約 60% - 90% も抑制されることがわかった(図 6)。

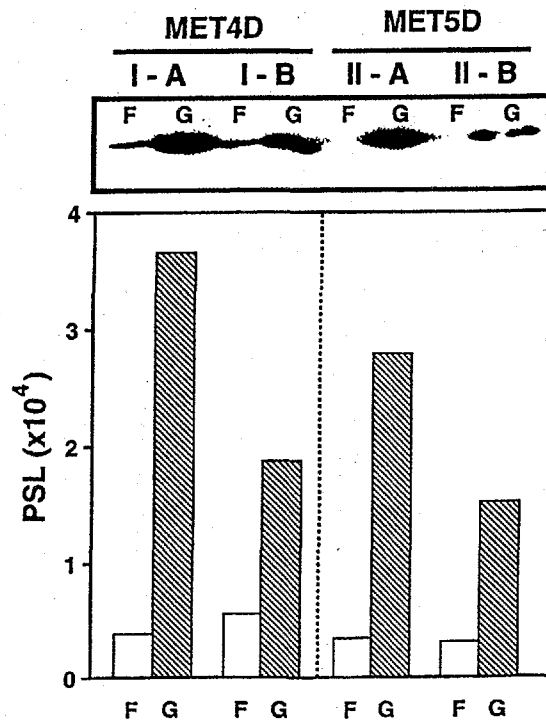


図 6 定量的 RT-PCR によるオステオカルシン遺伝子発現量の比較

以上により微小重力環境では骨芽細胞によるオステオカルシン産生が著しく低下し、その作用機序として、微小重力による同遺伝子の発現が抑制されたためであることがわかった。

Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1)

培養液中では通常不活性型で存在するため抗体による認識が可能な活性型に変える必要がある。1 N 塩酸添加により活性型にしたのち中和し、通常の ELISA 法により培養液中の TGF- β 1 を定量した。

活性型ビタミン D3 添加時では飛行群の TGF- β 1 産生は軌道上 4 日目で平均 271 pg/ μ g DNA であり、地上対照群の平均 364 pg/ μ g DNA に比し約 26 % 抑制された。軌道上 5 日目では飛行群の平均は 45 pg/ μ g DNA であり、地上対照群の 274 pg/ μ g DNA に比し顕著に抑制された。ビタミン D3 非添加時では飛行群の平均は軌道上 4 日目で 181 pg/ μ g DNA であり、地上対照群の 360 pg/ μ g DNA に比し、約 50 % 抑制された。

TGF- β 2

培養液中の TGF- β 2 は大部分が他のポリペプチドと複合体を形成し、不活性状態にあるため抗体に認識されない。そこで 1 M 酢酸含有液の状態にし、TGF- β 2 を分離させたのち ELISA 法により吸光度測定後、定量した。

活性型ビタミン D3 添加時では、軌道上 4 日目の飛行群と地上対照群の間に TGF- β 2 産生量の有意差はなかったが、軌道上 5 日目には飛行群の平均は 3.8 pg/ μ g DNA となり、地上対照群の 38 pg/ μ g DNA に比し、90 % もの TGF- β 2 産生抑制現象が見られた。活性型ビタミン D3 非添加時では軌道上 4 日目の飛行群の TGF- β 2 産生量の平均は 23 pg/ μ g DNA であり、地上対照群の 124 pg/ μ g DNA に比し、80 % 以上もの抑制となった(図 7)。

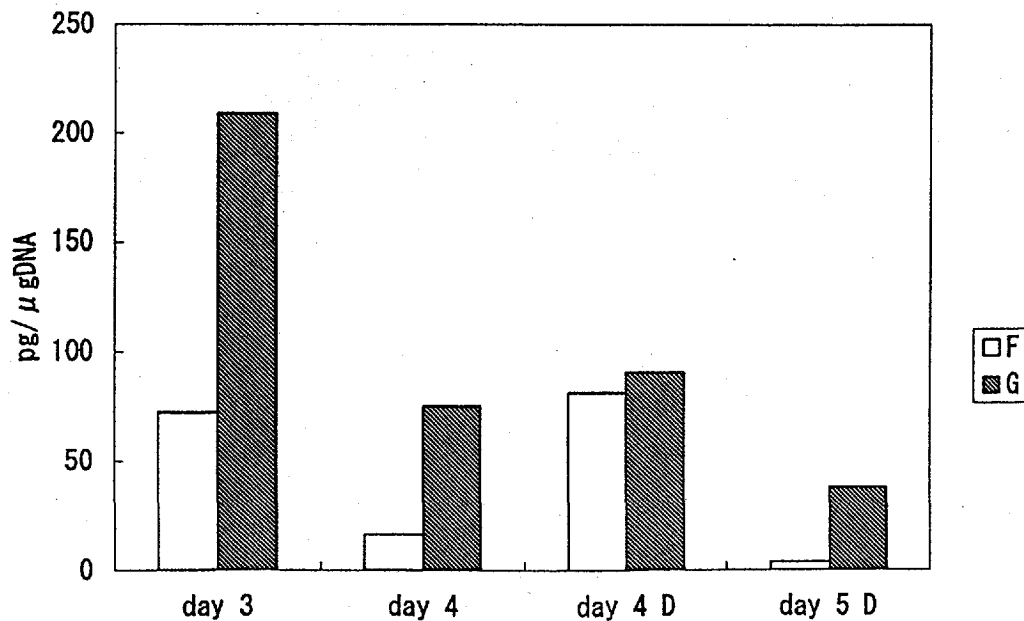


図 7 軌道上培養骨芽細胞の TGF- β 2 合成・分泌
横軸：培地回収日(ミッション経過日数)、D：活性型ビタミン D 添加
F：飛行群 G：地上対照群

インシュリン様増殖因子 IGF-I

IGF-IはIGF結合タンパクに強固に結合した状態で存在するため、IGF-Iの正確な定量を行うためには、酸-エタノールで分離させ冷却下沈殿により単離した状態でIGF-Iを回収し、抗ヒトIGF-I抗体を用いラジオイムノアッセイにより定量した。飛行群と地上対照群との間にはIGF-I産生量に有意な差は認められなかった。

IGF-I結合タンパク(IGFBP)-3

IGFBP-3は直接ラジオイムノアッセイにより定量された。軌道上4日目までは飛行群、地上対照群ともにIGFBP-3量は検出限界(1 ng/ml)以下であった。軌道上5日目になると活性型ビタミンD3添加時において飛行群では平均30 ng/ μ g DNAのIGFBP-3産生が見られ、地上対照群の平均3.1 ng/ μ g DNAに対し約10倍の高い値を示した(図8)。

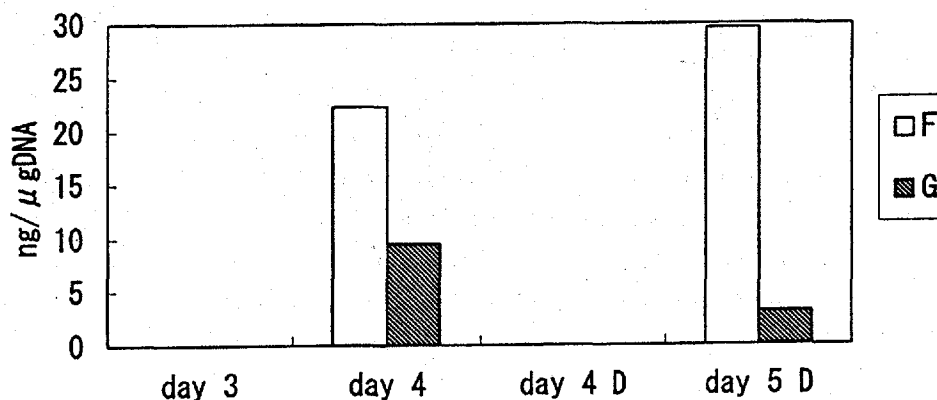


図8 軌道上培養骨芽細胞のIGFBP-3合成・分泌
横軸：培地回収日(ミッション経過日数)、D：活性型ビタミンD添加
F：飛行群 G：地上対照群

結論

飛行群、地上対照群ともにラット大腿骨由来、正常骨芽細胞の増殖は概ね良好であった。飛行群では地上対照群に比し、PGE2およびIGFBP-3の産生が亢進したのに対し、オステオカルシンおよびTGF- β 1, 2の産生は逆に低下した。

PGE2は骨芽細胞が産生しオートクリン、パラクリンの作用することが報告されると同時に骨吸収促進作用を有することでも知られている。また骨吸収促進作用を示す副甲状腺ホルモンは骨芽細胞からIGFBP-3の産生・分泌を促進し、骨吸収促進後の骨代謝平衡維持に重要な役割を果たすともいわれている。さらにオステオカルシンは骨芽細胞により産生・分泌され、カルシウム沈着、骨形成に必須の骨基質タンパクである。TGF- β は正常ラットの骨芽細胞に対し、その増殖を促進するとともに、コラーゲンの合成など、分化機能も促進するという骨形成には必須の分子であるが、その作用機序の詳細は解明されて

いない。

本研究により正常な骨形成および骨代謝に関与する骨芽細胞のもつ重要な機能が微小重力により影響を受けることが明確に示され、その作用点が明らかにされた。過去 20 年間不明であった宇宙での骨粗鬆症の原因を細胞レベルで解明したことは画期的なことと評価できる。

参考文献

- 1) Schneider, V. S., Leblanc, A. D. and Taggart, L. C. Bone and Mineral Metabolism. In *Space Physiology and Medicine*, 3rd ed., ed. by A. E. Nicogossian et al., Lea & Febiger, Baltimore (1994). 327-333.
- 2) Horowitz, M. C. Cytokines and estrogen in bone: Anti-osteoporotic effects. *Science*. 260, 626-627 (1993).
- 3) Goode, A. W. and Rambaut, P. C. The skeleton in space. *Science*. 317, 204-205 (1985).
- 4) Maniopoulos, C., Melcher, A. H. and Sodek, J. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cells Tissue Res*. 254, 317-330 (1988).
- 5) Stein, G. S., Lian, J. B. and Owen, T. A. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASWEB J*. 4, 3111-3123 (1990).
- 6) Massague, J. The transforming growth factor- β family. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 597-641 (1990).
- 7) Sporn, M. B. and Roberts, A. B. The transforming growth factor- β s. In *Peptide Growth Factors and Their Receptors I*, ed. by M. B. Sporn and A. B. Roberts, Springer-Verlag, New York (1990). 419.
- 8) Unerwood, L. E. and Murphy, M. G. Radioimmunoassay of the somatomedins/insulin-like growth factors. In *Radioimmunoassay in Basic and Clinical Pharmacology*, ed. by C. Patrano and B. A. Peskar, Springer-Verlag, Berlin (1987). 561-574.
- 9) Daughaday, W. H., Mariz, I. K. and Blethen, S. L. Inhibition of access of basic somatomedin to membrane receptors and immunobinding sites. A comparison of radioreceptor and radioimmunological somatomedin in native and acid-ethanol extracted serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51, 781-788 (1980).
- 10) Raisz, L. G., Pilbean, C. C., Klein-Nulend, Harrison, J. R. Prostaglandins and bone metabolism: Possible role in osteoporosis. In *Osteoporosis*, ed. by C. Chistiansen and K. Overgaard, Aalborg ApS, Denmark (1990). 253-258.
- 11) Rodan, S. B., Rodan G. A., Simmons, H. A., Walenga, R. W., Feinstein, M. B. and Raisz L. G. Bone resorptive factor produced by osteosarcoma cells with osteoblastic features is PGE₂. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102, 1358-1365 (1981).
- 12) Akatsu, T., Takahashi, N., Debari, K., Morita, I., Murota, S., Nagata, N., Takatani, O. and Suda, T. Prostaglandins promote osteoclast-like cell formation by a mechanism involving cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in mouse bone marrow cultures. *J. Bone Miner. Res.* 4, 29-35 (1989).
- 13) Schmid, C., Schlapfer, I., Waldvogel, M., Zapf, J. and Froesch, E. R. Prostaglandin E₂ stimulates synthesis of insulin-like growth factor binding protein-3 in rat bone cells in vitro. *J. Bone Miner. Res.* 7, 1157-1163 (1992).
- 14) Bonewald, L. F. and Dallas, S. L. Role of active and latent transforming growth factor β in bone formation. *J. Cell. Biochem.* 55, 350-357 (1994).

外部発表

- 1) Kumei, Y., Whitson, P. A., Sato, A. and Cintron, N. M. Hypergravity signal transduction in HeLa cells with concomitant phosphorylation of proteins immunoprecipitated with anti-microtubule-associated protein antibodies. *Exp. Cell Res.* **192**, 492-497 (1991).
- 2) 桑井康宏. 高重力による培養細胞の増殖促進と遺伝子. *組織培養研究*. **11**, 77-81 (1992).
- 3) Hara, E. Subtractive cDNA cloning using oligo(dT)50-latex and PCR: Isolation of cDNA clones specific to undifferentiated human embryonal carcinoma cells. *Nucleic Acids Res.* **19**, 7097-7104 (1991).
- 4) 桑井康宏. 骨細胞の増殖・分化に及ぼす微小重力の影響. 第8回宇宙利用シンポジウム proceedings (1991). 154-156.
- 5) Kumei, Y. and Whitson, P. A. Signal Transduction and gene expression in HeLa cells at hypergravity. *17th International Symposium of Physiological Society, Barcelona* (1993).
- 6) 桑井康宏, 下川仁弥太, 片野尚子, 原 英二, 秋山英雄, 向井千秋, 長岡俊治, Whitson, P.A., Sams, C.F. 第12回宇宙利用シンポジウム proceedings (1995). 1-3.