異方性コラーゲン基板による若齢マウス由来 骨芽細胞配列化制御^{*1}

小 笹 良 輔^{1,*2} 松垣あいら¹ 磯 部 仁 博² 佐 久 太 郎² 中 野 貴 由^{1,*3}

¹大阪大学大学院工学研究科マテリアル生産科学専攻

²株式会社アトリー

J. Japan Inst. Met. Mater. Vol. 81, No. 10 (2017), pp. 480-484

© 2017 The Japan Institute of Metals and Materials

Preferential Arrangement of Mature Osteoblast from Juvenile Mouse Calvariae on the Oriented Collagen Substrate

Ryosuke Ozasa^{1,*2}, Aira Matsugaki¹, Yoshihiro Isobe², Taro Saku² and Takayoshi Nakano^{1,*3}

¹Division of Materials and Manufacturing Science, Graduate School of Engineering, Osaka University, Suita 565-0871

²Atree, Inc, Tokyo 150-0012

Bone tissue has a highly anisotropic microstructure composed of biological apatite (BAP) and collagen fibrils, which is closely related to bone mechanical function. The formation of anisotropic bone microstructure is governed by bone-forming osteoblasts; therefore, establishment of isolation method of osteoblasts and assessment of their arrangement for generating bone tissue with optimally oriented microstructure during bone reconstruction are important. In this study, we established the isolation and culture conditions of mature osteoblasts derived from juvenile mice (2-week-old). Osteoblasts from juvenile mice expressed significantly higher level of osteoblastic markers (alkaline phosphatase, osteonin, and osteocalcin) than osteoblasts from neonatal mice, indicating that juvenile osteoblasts are promising materials for bone tissue engineering. Moreover, the mature osteoblasts aligned along the collagen molecule direction of substrate. This is the report that shows preferential orientation of mature osteoblasts isolated from juvenile mice. [doi:10.2320/jinstmet.J2017027]

(Received June 7, 2017; Accepted June 29, 2017; Published August 4, 2017)

Keywords: bone anisotropy, primary osteoblast, isolation method, mature cell, cell orientation, oriented collagen substrate

1. 緒 言

骨は動的な生体組織であり、骨系細胞による骨形成と骨吸収によって、自己組織的に骨形状を最適化する。特に、コラーゲン線維と生体アパタイト(BAP)結晶により構成される骨配向化構造¹⁾は、骨組織が力学的・生物学的機能を発揮するために重要である²⁻⁴⁾。一方、加齢や骨疾患、骨欠損時には、骨配向性低下が骨力学機能低下を引き起こす主要因⁵⁻⁷⁾であるものの、その原因や機構についてはほとんど明らかになっていない。

これまで骨研究分野では、生体内現象のメカニズム解明のために、*in vitro*における骨芽細胞の研究が数多くなされてきた。ほとんどの場合、新生児マウスから単離された骨芽細胞が研究対象として使用されている。なぜならば、細胞単離が容易であり、高い細胞増殖能を示す細胞が得られるためである⁸⁾。骨芽細胞はドナー動物の週齢や抽出部位、遺伝子状態によって機能を変化させる。例えば、新生児から単離した骨

芽細胞は、成体マウスから単離した骨芽細胞と比較して、石灰化能の低い未熟な骨芽細胞であると報告されている⁹⁾。したがって、骨芽細胞動態を明らかにし、骨配向性変化のメカニズムを解明するためには、新生児マウスとは異なる、他週齢マウスからの骨芽細胞の単離手法が必要となるが、現状確立されていない。

我々の研究グループでは、骨基質形成過程において、骨芽細胞の形態変化が配向化骨基質の形成に重要な役割を担うことを報告している^{10,11)}。興味深いことに、異方性コラーゲン基板上において、骨芽細胞の配列度合いと骨基質配向性は正の相関を示す¹²⁾。つまり、骨芽細胞の配列度を解析することで、配向化骨基質の形成能を評価可能な骨芽細胞培養モデルの構築に成功している。

本研究では、2週齢の若齢マウスからの骨芽細胞単離手法の確立を試みた。さらに、得られた骨芽細胞に対して、骨芽細胞関連遺伝子の発現量解析により骨芽細胞成熟度を評価するとともに、骨類似の異方性コラーゲン基板上にて細胞配向性の解析を行うことで、若齢マウス由来骨芽細胞(若齢骨芽細胞)における配向化骨基質形成能の評価を行った。

^{*1} Mater. Trans. **58**(2017) 958-962に掲載

^{*2} 大阪大学大学院生 (Graduate Student, Osaka University)

^{*3} Corresponding author, E-mail: nakano@mat.eng.osaka-u.ac.jp

2. 実験方法

2.1 若齢マウス由来骨芽細胞の単離と培養方法

初代骨芽細胞単離は、成体マウスからの単離手法に変更を加えて行った¹³⁾。生後2週齢(若齢マウス)、および8週齢(成体マウス)のC57BL6マウス(日本SLC)を安楽死後、頭部を血清不含の氷冷 α -modified Eagle's Medium(α -MEM; GIBCO, Invitrogen)に浸漬した。以後の操作は全て安全キャビネット内において滅菌環境下で行った。先鋭ピンセットにて頭部皮膚を剥離し、頭蓋骨および全脳を剪刀で切り出して頭蓋冠を分離した。骨芽細胞以外の細胞の混入を防ぐため、頭蓋冠より前頭骨と頭頂骨のみを切り出し、周辺組織は先鋭ピンセットにて可能な限り除去した。分離した頭蓋冠を剪刀にて1-2 mm²に細切し、骨片を血清不含 α -MEMとともに回収した。上清を除去し、Hanks' Balanced Salt Solution(HBSS; GIBCO)により骨を洗浄し、 α -MEMを完全に除去した。以上のように単離した頭蓋冠より、コラゲナーゼとトリプシンを用いた逐次酵素処理法により骨芽細胞の遊走を図った。コラゲナーゼ液(2.5 w/v% collagenase I; WAKO)を加え、温度37℃、5.0% CO₂雰囲気中で30分間保持し、上清を除去した。この処理を2回繰り返した後、トリプシン液(0.25 w/v% trypsin/EDTA; GIBCO)を加え、温度37℃、5.0% CO₂雰囲気中で30分間保持し、上清を除去した。最後にコラゲナーゼ液で同様の処理を行った後、骨芽細胞培養液(10% FBS; GIBCO, 100 U/ml penicillin; GIBCO, 100 µg/ml streptomycin; GIBCO in α -MEM)にて骨片を洗浄後、2週間外植培養した。なお、培養環境はインキュベータ(Series 5400, NAPCO)中で37℃、5% CO₂とした。実験には、PBS(phosphate-buffered saline)およびトリプシン液を用いて1回継代した骨芽細胞を使用した。

2.2 新生児マウス由来骨芽細胞の単離と培養方法

生後2-3日齢のC57BL/6マウス新生児を安楽死後、頭部を血清不含の氷冷 α -MEMに浸漬した。以後の操作は全て安全キャビネット内において滅菌環境下で行った。先鋭ピンセットにて頭部皮膚を剥離し、頭蓋骨および全脳を剪刀で切り出して頭蓋冠を分離した。頭蓋冠を剪刀にて1-2 mm²に細切した。単離した頭蓋冠より、コラゲナーゼを用いた逐次酵素処理法により骨芽細胞の抽出を行った⁸⁾。酵素液(0.25 w/v% collagenase I in HBSS, 0.125 w/v% trypsin/EDTA)を加え、温度37℃、5.0% CO₂雰囲気中で15分間保持した。その後、同じ処理を5回繰り返した。骨芽細胞前駆細胞を多く含む1、2回目に取り除いた上清は廃棄し、3-5回目に取り除いた上清を回収した。酵素活性を抑制するため、回収した上清に血清含有 α -MEMを添加した。メッシュセルストレーナー(BD Biosciences)にて細胞凝集塊を除去し、遠心分離後に上清を取り除いて、得られた初代骨芽細胞は骨芽細胞培養液にて懸濁し、培養皿に播種した。なお、培養環境はインキュベータ中で37℃、5% CO₂とした。実験には、PBSおよびトリプシン液を用いて1回継代した骨芽細胞を使用した。

2.3 遺伝子発現解析

全RNAはTrizol(Invitrogen)を用いて抽出し、バイオフォトメーター(Eppendorf)にてRNA量を測定した。それぞれの細胞から抽出したmRNA 0.3 µgを用い、骨芽細胞分化マーカーであるCOL-1(I型コラーゲン)、ALP(アルカリフォスファターゼ)、OSX(オステリクス)とBGLAP(オステオカルシン)の遺伝子発現解析を行った。解析は、StepOne real time polymerase chain reaction(PCR) system(Applied Biosystems, Invitrogen)を用いて行った。得られた値はGAPDHにて規格化した(n=3)。

2.4 細胞配列化制御

ラット尾より抽出したアテロコラーゲン(Becton, Dickinson and Company, Ltd)を原料とし、そのコラーゲンを流体力学的手法にて人工的に配列化させ、シート状の骨類似異方性コラーゲン基板を作製した¹⁴⁾。コラーゲン基板の異方性は、偏光顕微鏡(BX60-P; Olympus)を用いて事前に確認した。

細胞配向性解析のために、骨芽細胞は細胞密度 5.0×10^4 cells/mlにて異方性コラーゲン基板上に播種し、3日間培養した。骨芽細胞は、4% formalin-PBSにより20分間室温で固定した後、PBSTで洗浄を行った。続いて1% normal goat serum(NGS; Invitrogen)-PBSTにて30分間室温でブロッキング反応を行った。次に、1次抗体(anti Src; Cell Signaling, MA, USA, or anti vinculin; Sigma, MO, USA)を1% NGS-PBSTにて希釈し、4℃で12時間反応させた。その後、PBSTで洗浄し、2次抗体をPBSTにて希釈し、遮光しながら室温で90分間反応させた。なお、以後の実験は遮光状態で行った。PBSTで十分に洗浄した後、Alexa Fluor[®] 488-conjugated phalloidin(Invitrogen)をPBSTにて希釈し、室温で20分間反応させた。その後、PBSTで洗浄し、Prolong Gold antifade reagent with DAPI(Invitrogen)にて封入した。得られた試料の任意の5ヶ所において、蛍光顕微鏡(Biozero; Keyence)にて撮影した。解析対象とする細胞には画像端および細胞同士が重なることで形状の判別が困難な細胞を除去し、単一細胞を選択した。取得した画像はImage J(NIH)にて2値化処理し、Cell Profiler software(Broad Institute)により細胞の位置・形状を認識させた。さらに、細胞を楕円近似して短軸・長軸の長さおよび長軸の傾きを算出した。このとき、楕円の長軸方向とコラーゲン基板走行方向のなす角度を細胞配向角度(基板コラーゲン走行方向を0°)とし、10°刻みでヒストグラムに表した。本研究では、基板コラーゲン走行方向に最も細胞が配向するという想定のもと、その分布が正規分布により近似され则认为、以下のように評価した。角度分布のヒストグラムを以下の式(1)-(3)を用いて正規分布近似¹⁵⁻¹⁷⁾した。

$$f(\theta) = 1/\pi \left(1 + 2 \sum_{p=1}^{\infty} \rho^p \cos(2p(\theta - \pi)) \right), \quad (1)$$

$$\rho = 1/n \sqrt{\left(\sum_{i=1}^n \cos 2\theta_i \right)^2 + \left(\sum_{i=1}^n \sin 2\theta_i \right)^2}, \quad (2)$$

$$\mu = \tan^{-1} \left(\frac{\sum_{i=1}^n \sin 2\theta_i}{\sum_{i=1}^n \cos 2\theta_i} \right). \quad (3)$$

式(4)のように、標準偏差 σ を計算し、細胞配向度と定義した。

$$\sigma = 1/2\sqrt{-2\ln p}. \quad (4)$$

2.5 統計処理

得られたデータは平均値 $\pm$ S.D. で表記した。2群間の有意差検定には student's t-test を用いた。有意水準は $p < 0.01$ で有意に差があるとした。

3. 結果と考察

本研究では、骨芽細胞を単離するための細胞ドナーとして、

2週齢の若齢マウスを選択した。頭蓋冠由来の骨芽細胞は、長骨由来骨芽細胞よりも高い細胞増殖能を有し、良好な石灰化ノジュールを形成するとの報告¹⁸⁾から、頭蓋冠を抽出部位として選択した。若齢マウスの頭蓋冠は硬組織化が進行しているため、逐次的酵素処理後の外植培養により、骨芽細胞単離を図った(Fig. 1)。培養2日後には骨片からの細胞遊走が確認され、2週間後にはコンフルエント状態となった。

Fig. 2 には、成体マウスと若齢マウスから単離した、それぞれの初代骨芽細胞の免疫染色像を示す。成体マウスから単離した骨芽細胞では、他細胞種による混入が確認された(Fig. 2A)。マウス骨においては、加齢とともに骨組織でのリンパ様細胞や骨髄性細胞の増加が報告されている¹⁹⁾。すなわち、

Fig. 1 Schematic illustration of the procedure of primary osteoblast culture on oriented collagen substrate. Phase contrast image indicates osteoblasts migrating from bone chip. Scale bars = 100 μ m.

Fig. 2 Fluorescent images of osteoblasts from adult mice. Arrows indicate the contaminated other cell types such as lymphoid cells or myeloid cells. Scale bars = 200 μ m. The inset shows the magnified image of the contaminated cells. Scale bars = 50 μ m. B: Fluorescent images of osteoblasts from juvenile mice stained by (a) F-actin, (b) c-src, (c) nuclei and (d) merged. Scale bars = 100 μ m.

成体マウスから単離した細胞ではこれらの細胞種による混入が考えられる。一方、若齢マウスから単離した骨芽細胞では、他細胞種の混入は確認されず (Fig. 2B), 高純度な骨芽細胞が得られた。さらに、若齢骨芽細胞において、発達したアクチンストレスファイバー (Fig. 2B(a)) と c-src の発現 (Fig. 2B(b)) が確認された。これらのタンパク質は細胞遊走等の動的挙動において重要な役割を持つ分子である²⁰⁾。特に、c-src は細胞の接着斑を構成するタンパク質の 1 つで、様々な生体カスケードを司る因子である²¹⁾。したがって、若齢骨芽細胞は、上記タンパク質を発現することから、正常な機能を有する細胞であるといえる。

初代細胞単離時においては、目的細胞以外他細胞による混入がしばしば問題となる。特に、他細胞の混入は実験精度に大きく影響を与えることから、高純度に目的細胞を単離する手法が求められる。例えば、フローサイトメトリーによる細胞ソーティングの適用が有効である²²⁾。本手法では、一定波長のレーザー光を対象流体に照射し、前方散乱により細胞の大きさや形状を、側方散乱により細胞内小器官の検出を行うことで、目的細胞の単離が可能となる。しかしながら、細胞ソーティングを行うためには、FITC, GFP 等の蛍光物質により目的細胞を事前に標識する必要があり、時間とコストを要する。本研究での骨芽細胞単離法は簡便かつ高精度に骨芽細胞の単離が可能であることから、有効な手段であると言える。以降の実験は、他細胞の混入が確認された成体マウス由来骨芽細胞は使用せず、新生児マウス由来骨芽細胞 (新生児骨芽細胞) と若齢骨芽細胞に対して解析を行った。

Fig. 3 には、新生児骨芽細胞と若齢骨芽細胞における骨芽細胞関連遺伝子の発現解析結果を示す。若齢骨芽細胞は

COL-1 の発現低下を示したが、*ALP*, *OSX*, *BGLAP* 発現は増加を示した。骨芽細胞の成熟化過程では、骨基質タンパク質をコードする遺伝子、転写因子の発現パターンが各段階で変化することが特徴である²³⁾。骨芽細胞分化初期には I 型コラーゲン (*COL-1*)、初期・中期にはアルカリホスファターゼ (*ALP*) やオステリクス (*OSX*) の発現量が増加し、成熟分化後期にはオステオカルシン (*BGLAP*) の発現が誘導される。したがって上記より、若齢骨芽細胞は、新生児骨芽細胞と比較して、成熟化した骨芽細胞であることが示唆される。特にオステオカルシンは約 70 倍の発現増加を示した。in vitro において、オステオカルシン発現骨芽細胞は石灰化基質産生の増加を示す⁹⁾。すなわち、若齢マウスから単離した成熟骨芽細胞は、高い石灰化能を有すると考えられる。

Fig. 4 には、異方性コラーゲン基板上での若齢骨芽細胞と新生児骨芽細胞の細胞形態変化を示す。新生児骨芽細胞は、コラーゲン分子配列方向への優先配列化を示し (Fig. 4A(a))、以前の報告¹²⁾と同様の結果を示した。一方、若齢骨芽細胞においても、ガラス基板上で示した等方的な細胞形態 (Fig. 2) とは対照的に、アクチンストレスファイバーを伸長させ、コラーゲン分子配列方向への優先配列化を示した (Fig. 4A(b))。すなわち、若齢骨芽細胞は、コラーゲン基板の分子配列に基づく細胞外シグナルをインテグリン分子²⁴⁾で感受し、細胞配列化が誘導された可能性が示唆される。さらに若齢骨芽細胞 ($\sigma = 45.8 \pm 0.6$) と新生児骨芽細胞 ($\sigma = 44.4 \pm 2.3$) は同程度の細胞配向度を示した (Fig. 4B) ことから、若齢骨芽細胞は配向化骨基質形成能を有することが示唆された。

以上、本研究により、若齢骨芽細胞は、新生児骨芽細胞よりも成熟化した骨芽細胞であり、配向化骨基質形成能を有す

Fig. 3 Quantitative gene expression analysis of osteoblast differentiation markers for osteoblasts from neonatal and juvenile mice. (A) *COL-1* (collagen type I), (B) *ALP* (alkaline phosphatase), (C) *OSX* (osterix) and (D) *BGLAP* (osteocalcin). **: $p < 0.01$.

Fig. 4 Osteoblasts from (a) neonatal mice and (b) juvenile mice preferentially aligned along the substrate collagen orientation. Green: F-actin, red: vinculin, blue: nuclei. Arrows indicate the direction of oriented substrate collagen. Scale bars = 100 μ m. B: The angular distribution of (a) neonatal and (b) juvenile osteoblasts. The angular standard deviation (σ) representing the degree of cell alignment shows no significant difference between neonatal and juvenile osteoblasts.

ることが明らかとなった。本研究で確立した骨芽細胞単離方法と得られた知見は、加齢による骨微細構造変化や骨疾患の誘導因子の解明に有用であると期待される。

4. 結 論

本研究では、成熟化した骨芽細胞の単離手法を確立し、得られた骨芽細胞に対して細胞配向性の評価を行った。すなわち、2週齢の若齢マウスの頭蓋冠より、高純度の骨芽細胞単離に成功した。若齢骨芽細胞は、骨芽細胞関連遺伝子を高度に発現する、成熟骨芽細胞であることが示された。さらに、生体骨類似の異方性コラーゲン基板上での培養により、若齢骨芽細胞は細胞配列化を示した。以上より、若齢骨芽細胞は、骨配向化構造を構築可能な成熟骨芽細胞であることが示された。

本研究はJSPS科学研究費補助金JP25220912の助成を受け実施されました。

文 献

- 1) S. Weiner and H. D. Wagner: *Ann. Rev. Mater. Sci.* **28**(1998) 271-298.
- 2) J. Seto, H. S. Gupta, P. Zaslansky, H. D. Wagner and P. Fratzl: *Adv. Funct. Mater.* **18**(2008) 1905-1911.
- 3) T. Ishimoto, T. Nakano, Y. Umakoshi, M. Yamamoto and Y. Tabata: *J. Bone Miner. Res.* **28**(2013) 1170-1179.
- 4) T. Nakano, K. Kaibara, T. Ishimoto, Y. Tabata and Y. Umakoshi: *Bone* **51**(2012) 741-747.
- 5) G. E. Bacon, R. K. Griffith: *J. Anat.* **143**(1985) 97-101.
- 6) J. W. Lee, T. Nakano, S. Toyosawa, Y. Tabata and Y. Umakoshi: *Mater. Trans.* **48**(2007) 337-342.
- 7) A. Sekita, A. Matsugaki, T. Ishimoto and T. Nakano: *J. Struct. Biol.* **197**(2016) 260-270.
- 8) G. Wong and D. V. Cohn: *Nature* **252**(1974) 713-715.
- 9) D. Yang, G. J. Atkins, A. G. Turner, P. H. Anderson and H. A. Morris: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **136**(2013) 166-170.
- 10) A. Matsugaki, G. Aramoto, T. Ninomiya, H. Sawada, S. Hata and T. Nakano: *Biomaterials* **37**(2015) 134-143.
- 11) A. Matsugaki, N. Fujiwara and T. Nakano: *Acta Biomater.* **9**(2013) 7227-7235.
- 12) A. Matsugaki, Y. Isobe, T. Saku and T. Nakano: *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **103A**(2015) 489-499.
- 13) A. D. Bakker and J. K. Nulend: *Bone Research Protocols: Methods Mol. Biol.* **916**(2012) 19-29.
- 14) Y. Isobe, T. Kosaka, G. Kuwahara, H. Mikami, T. Saku and S. Kodama: *Materials* **5**(2012) 501-511.
- 15) C. A. Bashur, L. A. Dahlgren and A. S. Goldstein: *Biomaterials* **27**(2006) 5681-5688.
- 16) S. Fujita, M. Ohshima and H. Iwata: *J. R. Soc. Interface* **6**(2009) S269-S277.
- 17) N. I. Fisher: *Statistical Analysis of Circular Data*, (Cambridge University Press, New York, 1993).
- 18) H. Declercq, N. V. D. Vreken, E. D. Maeyer, R. Verbeeck, E. Schacht, L. D. Ridder and M. Cornelissen: *Biomaterials* **25**(2004) 757-768.
- 19) J. A. Yagiela and D. M. Woodbury: *Anat. Rec.* **188**(1977) 287-306.
- 20) L. Blanchoin, R. B. Paterski, C. Sykes and J. Plastino: *Physiol. Rev.* **94**(2014) 235-263.
- 21) S. M. Thomas and J. S. Brugge: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**(1997) 513-609.
- 22) N. Aghaepour, G. Finak, The FlowCAP Consortium, The DREAM Consortium, H. Hoos, T. R. Mosmann, R. Brinkman, R. Gottardo and R. H. Scheuermann: *Nature methods* **10**(2013) 228-238.
- 23) J. E. Aubin: *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2**(2001) 81-94.
- 24) D. Docheva, C. Popov, P. Alberton and A. Aszodi: *Birth Defects Res. C Embryo Today* **102**(2014) 13-36.