Mechanical stress による骨改造機構に関する研究
—骨改造機構における骨芽細胞と骨髄細胞の相互作用因子について—

清水 義之 千葉 美麗

清水 義信* 三谷 英夫

東北大学歯学部歯科矯正学講座（主任：三谷英夫教授）

* 東北大学歯学部口腔細菌学講座（主任：熊谷勝男教授）

〔受付：平成元年12月1日〕

A study of bone remodeling mechanism
induced by mechanical stress
—Factors of interaction between osteoblasts and
bone marrow cells in bone remodeling—

Yoshiyuki Shimizu, Mirei Chiba, Yoshinobu Shimizu*
and Hideo Mitani

*Department of Orthodontics, Tohoku University School of
Dentistry 4-1, Seiryō-cho, Aobaku, Sendai 980*
(Chief: Prof. Hideo Mitani)

* *Department of Oral Microbiology, Tohoku University School of
Dentistry 4-1, Seiryō-cho, Aobaku, Sendai 980*
(Chief: Prof. Katuo Kumagai)

〔Accepted for publication : December, 1, 1989〕

Key words: Osteoblasts / bone marrow cells / co-culture / FACS / ALPase activity

Abstract: The purpose of this investigation was to reveal the physiological bone remodeling mechanism by means of cellular interaction phenomenon between osteoblasts (OB) and bone marrow cells (BM) *in vitro*. When OB (1×10^5 cells) originated from newborn mouse calvaria and BM (1×10^6 cells) obtained from 4 weeks old mouse long bones were co-cultivated by using millicell as a separator in a CO₂ incubator for 14 days, the number of BM was increased and the markedly high incorporation of ³H-thymidine into the cellular DNA of BM was recognized after 3 days incubation. However, the number of BM and uptake of ³H-thymidine into BM did not increase in only the BM cultivation. The increased BM were identified to have surface antigens of Mac-1 and LFA-1 by FACS analysis. However, ALPase activity of OB co-cultivated with BM was remarkably suppressed after 3 days incubation and reduced to one half of that of the control after 5 days incubation. These results clearly indicate that both OB and BM produced some differential factors of the clonal growth of Mac-1 and LFA-1 positive cells from BM cells and the suppression of ALPase of OB in co-cultivation with OB and BM. It is suggested that the factors produced from the interaction between OB and BM might regulate the mechanism of physiological bone remodeling.

緒 言

骨は活発な代謝器官で、絶えず吸収と形成を繰り返してリモデリングを行っている。歯科矯正臨床においては、骨のこのダイナミックな特性と mechanical stress (機械的応力) を利用して、歯の移動や顎顔面複合体の成長のコントロールを行っている。

最近、リンパ球やマクロファージが産生する OAF (osteoclast activating factor: 破骨細胞活性化因子) について数多く報告されており¹⁻³⁾、歯周病に代表される病的な骨吸収については、細胞レベルでこれらのサイトカインが骨吸収に及ぼすメカニズム⁴⁾についてかなり解明されている。しかし、生理的な骨改造機構、特に mechanical stress による骨改造機構については不明な点が多く、mechanical stress に対して骨構成細胞がどのような反応を示し、どのような相互作用を及ぼし合いながら骨吸収と骨形成が起きているのか、また、この骨吸収と骨形成の過程で、局所でどのような因子がどのようなメカニズムで関係しているのかという問題に関する知見は少ない。千葉は⁵⁾、新生ラット培養長管骨に圧迫力を負荷する実験により、mechanical stress による破骨細胞の分化誘導のメカニズムは、炎症に伴う抗原刺激または細菌の内毒素等による病的な骨吸収機構とは異なることを示し、骨芽細胞と骨髄細胞の相互作用因子による制御機構が存在すると述べている。我々は、mechanical stress の負荷に伴い、骨芽細胞と骨髄細胞との間に相互作用が起きて、これらの細胞から骨吸収系または骨形成系に変換する相互作用因子が産生されることにより骨改造が行われていると考えた。そこで本研究では、骨芽細胞と骨髄細胞を co-culture してこれらの細胞の分化機能と増殖の変化を調べることにより、mechanical stress による骨改造機構を制御していると考えられる骨芽細胞と骨髄細胞の相互作用因子について検討を加えた。

材料ならびに方法

1. マウス頭蓋冠由来骨芽細胞の採取

Wong ら^{6,7)}の方法に基づき、新生 BALB/c マ

ウス頭蓋冠を滅菌 PBS 液内で無菌的に取り出して直径約 3 mm に細片化し、collagenase type IV (2 mg/ml, Sigma 社)、trypsin (0.25%, Sigma 社)、EDTA (0.02%, Sigma 社) を含む PBS 液に浮遊させ、低速マグネチックスターラーを用いて室温で細胞分散を行なった。20分毎に得られた細胞 fraction No. 1 から No. 5 をそれぞれ培養し、実験には fraction No. 3 を用いた。この fraction の細胞は活発な増殖能と高い ALPase 活性および石灰化能を有し、骨芽細胞が豊富な細胞群であると考えられた。10%牛胎児血清 (FCS) (Filtron 社) 添加 α -MEM 培養液 (Flow 社) で約 1 週間培養した後、細胞が confluent になったことを確認してから、trypsin-EDTA を含む PBS 液で細胞分散して 1×10^5 cells/ml に調整し、24 multi-well plate (Falcon 社) または millicell (Millipore 社) 内で培養して、再び confluent になる約 3 日後、10% FCS 添加 α -MEM 培養液中で millicell を介した骨髄細胞との co-culture に用いた。

2. 骨髄細胞の採取

4 週齢の BALB/c マウスを脱血死させ、上腕骨と大腿骨を摘出して一方の骨端部を切除し、他方の骨端部から注射器 (26G 注射針) にて滅菌 PBS 液を圧注して骨髄細胞を無菌的に取り出し、 α -MEM 培養液で 3 回遠心洗浄した後、10% FCS 添加 α -MEM 培養液で調整して実験に供した。

3. 骨芽細胞と骨髄細胞の co-culture

骨芽細胞と骨髄細胞は Fig. 1 に示すように、millicell (Millipore 社) を介して co-culture した。この millicell の底面は直径 $0.45 \mu\text{m}$ のマイクロポーラスメンブランであり、イオン、タンパク質、その他の高分子を自由に透過させ、物理的な接触なしに同じ well 内で細胞間の液性因子の作用を調べることが可能である。co-culture 時の骨芽細胞と骨髄細胞の細胞数は、骨芽細胞数 1×10^5 cells に対して、骨髄細胞数は 1×10^6 cells とした。

4. Cellular DNA 合成能の変化

骨芽細胞と骨髄細胞の co-culture 系における骨芽細胞と骨髄細胞の cellular DNA 合成能の変化を、培養開始 3, 5, 7 日後に $2.5 \mu\text{Ci/well}$ の ^3H -

Fig. 1 Experimental schema. Osteoblasts and bone marrow cells were co-cultured by using millicell (Millipore Co.) for various days in α -MEM with 10% FCS.
 ▨ : bone marrow cells, ▤ : osteoblasts

thymidine の 6 時間 pulse による DNA への取り込みにより調べた。DNA ラベル細胞は自動 cell harvester によりガラスフィルター上に回収し、液体シンチレーションカウンターにてアイストープ量を測定した。

5. 骨髄細胞の FACS 解析

培養開始 4 日後に、骨芽細胞との co-culture 系における骨髄細胞の分化と増殖の変化を骨髄系、リンパ系の細胞の膜表面抗原モノクローナル抗体を用いて直接または間接蛍光抗体法で染色し、fluorescence activated cell analyzer (FACS) (Becton Dickinson 社) で解析した。1 次抗体は、抗マウス Thy-1, Lyt-1, Lyt-2, L3T4 (以上 Becton Dickinson 社), Mac-1 (Hybritech 社), SIg (DAKO 社), LFA-1 (Hybritech 社) 抗体を、また 2 次抗体は、FITC 標識抗ラット F (ab')₂ (TAGO 社) を用いた。骨芽細胞と co-culture しない骨髄細胞では、培養 4 日目で死細胞が約 70% となり、FACS 解析に必要な細胞数が得られないので、対照として、4 週齢の BALB/c マウスの新鮮骨髄細胞を用いた。

6. 骨芽細胞の ALPase 活性

骨髄細胞との co-culture 系における骨芽細胞の分化機能の変化を調べるために、骨芽細胞の ALPase 活性を経日的に調べた。培養開始 3, 5, 7,

14 日後に well 底面の骨芽細胞をラバーポリスチンで剝離し、冷 PBS 液にて洗浄後、10mM Tris-HCl 緩衝液に浮遊させ、超音波処理して酵素液を作製した。この酵素液を p-nitrophenolphosphate (和光純薬) を用いて 30 分間反応させた後、比色法により p-nitrophenol の生成量を求めることにより ALPase 活性を測定した。なお酵素液のタンパク量を Lowry 法で測定し、ALPase 活性は比活性 ($\mu\text{mol}/\text{mg protein}/\text{hour}$) で求めた。

7. タンパク合成阻害剤の前処理による影響

骨芽細胞および骨髄細胞から産生される因子がタンパク成分であるか否かを調べるために、タンパク合成阻害剤である cycloheximide で骨芽細胞と骨髄細胞を前処理してその影響を調べた。3 日間培養後の骨芽細胞もしくは新鮮骨髄細胞を 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の cycloheximide で 12 時間処理後、10% FCS 添加 α -MEM 培養液で 3 回遠心洗浄して前述と同様の実験に供し、cycloheximide で前処理した骨芽細胞との co-culture による骨髄細胞の増殖の変化と、cycloheximide で前処理した骨髄細胞との co-culture による骨芽細胞の ALPase 活性の変化を調べた。なお、実験に用いた cycloheximide の処理条件では、骨髄細胞および骨芽細胞の増殖に変化はなかった。

結 果

1. 骨芽細胞と co-culture した骨髄細胞の増殖

1 $\times 10^5$ cells の骨芽細胞と 1 $\times 10^6$ cells の骨髄細胞を millicell を介して 5 日間 co-culture した骨髄細胞の倒立顕微鏡像を Fig. 2 に示す。骨髄細胞のみで培養した対照群では、大小様々の円形および紡錘形の細胞が plastic well の底面に観察されたのに対して、骨芽細胞と co-culture した実験群においては、円形でほぼ均一な大きさの浮遊細胞が数多く認められ、所々にコロニーを形成していた。

培養 7 日目以降になると、骨芽細胞と co-culture した骨髄細胞から増殖した細胞群は well 底面に付着して形態が円形からやや偽足をのびた形態に変化した。

経日的な骨髄細胞数の変化をトリパンブルー染色により生細胞数を血球計算盤を用いて測定した

Fig. 2 Bone marrow cells co-cultivated with osteoblasts for 5 days. A lot of round shape cells were observed and those cells formed colonies in some places (b). Bone marrow cells only cultivation was used as control (a). ($\times 80$)

Fig. 3 The effect of co-cultivation with osteoblasts on the number of bone marrow cells. The number of bone marrow cells were markedly increased after 3, 5 and 7 days co-cultivation with osteoblasts. Points and bars represent means $\pm$ SEM of 4 replicates.
 —○— : bone marrow cells co-cultivated with osteoblasts
 ...●... : control

結果を Fig. 3 に示す。10% FCS 添加 α MEM 培養液中では、骨髓細胞の生細胞数は培養日数を経るに従って急激に減少し、2週間目で骨髓細胞数はほぼ0に近づいた。骨芽細胞と co-culture した実験群では、実験期間中常に対照群よりも多くの骨髓細胞数を示した。

また、同様の実験系において、培養開始から3, 5, 7日後に ^3H -thymidine の6時間パルスラベル

Fig. 4 The effect of co-cultivation with osteoblasts on ^3H -thymidine incorporation into cellular DNA of bone marrow cells. A marked high incorporation of ^3H -thymidine into cellular DNA of bone marrow cells were recognized after 3, 5 and 7 days co-cultivation with osteoblasts. Points and bars represent means $\pm$ SEM of 4 replicates.
 —○— : bone marrow cells co-cultivated with osteoblasts
 ...●... : control

により、骨髓細胞の cellular DNA 合成能の変化を調べた結果を Fig. 4 に示す。骨芽細胞と co-culture した骨髓細胞では、培養開始3日目に cellular DNA 合成の著明な増加が認められた。すなわち骨芽細胞と co-culture した骨髓細胞では、培養初期の段階で活発な DNA 合成が起き、分裂細胞

Fig. 5 FACS analysis of bone marrow cells stained with Mac-1 antibody. Fresh bone marrow cells were used as control (A). Mac-1 antigen positive (Mac-1⁺) cells increased after 4 days co-cultivation with osteoblasts (B).

Fig. 6 FACS analysis of Mac-1⁺ cells with size and cell number. Fresh bone marrow cells were used as control (A). Increased Mac-1⁺ cells after 4 days co-cultivation with osteoblasts were larger than control cells (B).

が多いことがわかった。

2. 骨芽細胞との co-culture により増殖した骨髄細胞の FACS 解析

骨芽細胞と co-culture した骨髄細胞を培養開始 4 日後に取り出し、PBS 液で洗浄して各種リンパ球・単球の分化抗原に対するモノクローナル抗体を用いて、どのような分化抗原を保有する細胞が増殖しているのかについて新鮮骨髄細胞と比較した。Thy-1, Lyt-1, Lyt-2, L3T4, Mac-1, SIg, LFA-1 等の骨髄系、リンパ系の細胞の分化抗原マーカー抗体を用いて FACS により解析したが、T 細胞のマーカー (Thy-1, Lyt-1, Lyt-2, L3T4) また B 細胞のマーカー (SIg) を示す細胞の増殖は見られず、マクロファージのマーカーである Mac-

1 抗原と細胞接着因子として知られている LFA-1 抗原を分化抗原とする細胞が増殖していた。

骨芽細胞と co-culture した骨髄細胞の Mac-1 抗原陽性細胞は、Fig. 5 に示すように培養前である新鮮骨髄細胞よりも明らかに高い蛍光強度を示し、細胞数が増加していることがわかった。Mac-1 抗原陽性細胞の大きさをみると、骨芽細胞と co-culture した骨髄細胞は Fig. 6 に示すように、対照群と比較して大きな細胞であった。

次に、Fig. 7 に示すように LFA-1 抗原陽性細胞は、Mac-1 抗原陽性細胞の結果と同様に骨芽細胞との co-culture により細胞数が増加していることがわかった。また、Fig. 8 に示すように、この増殖した LFA-1 抗原陽性細胞は対照群よりも大

Fig. 7 FACS analysis of bone marrow cells stained with LFA-1 antibody. Fresh bone marrow cells were used as control (A). LFA-1 antigen positive (LFA-1⁺) cells also increased after 4 days co-cultivation with osteoblasts (B).

Fig. 8 FACS analysis of LFA-1⁺ cells with size and cell number. Fresh bone marrow cells were used as control (A). Increased LFA-1⁺ cells after 4 days co-cultivation with osteoblasts were larger than control cells (B).

きな細胞であった。骨芽細胞と co-culture した骨髄細胞において、Mac-1 および LFA-1 抗原陽性細胞の蛍光強度および大きさの結果を比較すると似かよった分布を示しており、Mac-1 および LFA-1 抗原を同時に持つ細胞が増殖していることが示唆された。

ここでタンパク合成阻害剤である $1 \mu\text{g/ml}$ の cycloheximide で12時間前処理した骨芽細胞を骨髄細胞と co-culture した時、骨髄細胞の特異的な増殖は認められなかった (Fig. 9)。すなわち、骨芽細胞から産生される因子の産生には何らかのタンパク合成の過程が関与していることが示された。

3. 骨髄細胞と co-culture した骨芽細胞の ALPase 活性の変化

次に、骨髄細胞と co-culture した骨芽細胞の分化機能の変化を調べるために、骨芽細胞の ALPase 活性の変化を経日的に調べて、骨芽細胞を単独で培養したときの ALPase 活性と比較した。骨髄細胞と co-culture した骨芽細胞は、Fig. 10 に示すように培養3日目より ALPase 活性が明らかに低下し、7日目で対照群の約2分の1、14日目で約3分の1まで ALPase 活性が抑制された。また、骨髄細胞と co-culture した骨芽細胞のタンパク量および DNA 合成能の変化を経日的に調べたが、Fig. 11B に示すように co-culture した期間中において対照群の骨芽細胞と差は認められなかったが、co-culture した骨芽細胞の DNA 合成は Fig. 11A に示すように対照群より抑制

Fig. 9 The inhibitory effect of osteoblasts pre-treated with cycloheximide (c.h.OB) on the increase of co-cultured bone marrow cells. The number of bone marrow cells co-cultivated with osteoblasts pre-treated with cycloheximide did not increase after 5 days incubation.

されていた。このことより、骨髓細胞から産生される因子は、骨芽細胞に細胞障害を示すことなく骨芽細胞の DNA 合成と ALPase 活性を抑制することが示された。

ここで $1\mu\text{g/ml}$ の cycloheximide で12時間前処理した骨髓細胞を骨芽細胞と co-culture しても, Fig. 12 に示すように骨芽細胞の ALPase 活性は抑制されなかった。すなわち、骨髓細胞から産生される因子の産生には何らかのタンパク合成の過程が関与していることが示された。

考 察

破骨細胞の分化誘導と活性化には骨芽細胞およびその前駆細胞が密接に関わっていることが知られている。Shiina ら⁸⁾は、株化骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞が (colony stimulating factor) および DIF (differentiation inducing factor) を産生し、前破骨細胞の分化と増殖に関係していることを示唆している。Chambers ら^{9,10)}は、骨芽細胞が未知の Chambers' factor を産生し、破骨細胞

Fig. 10 The inhibitory effect of co-cultivation with bone marrow cells on ALPase activity of osteoblasts. ALPase activity of osteoblasts was remarkably suppressed after 3 days co-cultivation with bone marrow cells and reduced to half of that of control after 7 days incubation. Points and bars represent means $\pm$ SEM of 4 replicates.

—○—: osteoblasts co-cultivated with bone marrow cells
 ...●...: control

の活性化に関係していると報告している。また千葉⁵⁾によると, mechanical stress を加えて培養したラット長管骨はその stress 負荷部位に特異的に破骨細胞が誘導されるが, ラット頭蓋冠由来の骨芽細胞と co-culture すると, その特異的な破骨細胞の誘導は完全に抑制されることを報告している。一方, Farley¹¹⁾は、破骨細胞もしくはその前駆細胞を含む骨髓系細胞から分泌される液性因子が未分化間葉系細胞を骨芽細胞に分化させるとし、これを coupling factor と呼んだ。このように、破骨細胞と骨芽細胞およびそれらの前駆細胞は、その分化誘導および活性化の過程において、互いに密接に関係していると考えられているが、その分化段階および機能発現と細胞間相互作用との関係については不明な点が多い。本研究において、頭蓋冠由来の骨芽細胞を骨髓細胞と co-culture することにより、骨髓細胞群から Mac-1 および LFA-1 抗原陽性細胞を増殖させる因子を骨芽細胞

Fig. 11 ^3H -thymidine incorporation into cellular DNA (A) and cellular protein (B) of osteoblasts co-cultivated with bone marrow cells. Osteoblasts co-cultivated with bone marrow cells were labelled with ^3H -thymidine for 6 hours. The ^3H -thymidine incorporated into the cellular DNA was counted after 3, 5 and 7 days. The cellular proteins were measured with the Lowry method after 3, 5, 7 and 14 days incubation. Points and bars represent means $\pm$ SEM of 4 replicates.
 —○— : osteoblasts co-cultivated with bone marrow cells
 ...●... : control

Fig. 12 No inhibitory effect of co-cultivation with bone marrow cells (BM) pre-treated with cycloheximide (c.h.) on ALPase activity of osteoblasts (OB). ALPase activity of osteoblasts co-cultivated with bone marrow cells pre-treated with cycloheximide was not suppressed after 5 days incubation.

が産生することが示された。また FACS の結果を見ると、骨芽細胞との co-culture により増殖した Mac-1 抗原陽性細胞は対照群と比較すると大きな細胞であった。Mac-1 抗原はマクロファージ系の細胞の膜表面分化抗原で、マクロファージの他に顆粒球および NK 細胞に表現される分化抗原である^{12,13)}が、骨改造機構に関与する細胞の Mac-1

抗原の意義については解析されていない。破骨細胞の起源については様々な説があるが、現在のところ、血液幹細胞由来で¹⁴⁾、単球・マクロファージ系の細胞、特に CFU-GM から独自の分化を遂げたものだという説¹⁵⁾が主流である。しかし、破骨細胞の形成と機能発現に関して、肺泡マクロファージに $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を添加して多核化した

細胞は破骨細胞に近い性質を有しているという報告¹⁶⁾もあり、破骨細胞の分化誘導過程については未だに定説はない。本研究の結果から、破骨細胞の前駆細胞を含むと考えられている単球・マクロファージ系細胞が骨芽細胞の因子で増殖したことは破骨細胞の前駆細胞がクロナールに増殖しているとも考えられて興味深いことである。ここで、骨芽細胞が産生する因子としては、現在まで PG E₂ (prostaglandin E₂)¹⁷⁾, CSF⁸⁾, DIF¹⁸⁾, IL-1 (interleukin 1)¹⁹⁾, β_2 microglobulin²⁰⁾, TGF- β ²¹⁾ 等が報告されているが、この中で我々の実験のように、Mac-1 抗原陽性細胞を増殖させる因子として考えられるのは CSF である。しかし、複数の因子が産生されている可能性もあり、また、それ以外の未知の因子も含まれていることも考えられる。

次に、FACS 解析で示された Mac-1 抗原陽性細胞と LFA-1 抗原陽性細胞の分布を比較すると、かなり近似しており、ほぼ同一の細胞集団であると考えられる。LFA-1 抗原は細胞接着因子として知られており^{22,23)}, T細胞とB細胞²⁴⁾, マクロファージ²⁵⁾の活性化に関与していると考えられている。また LFA-1 抗原は、 α , β 鎖のヘテロダイマーよりなる糖タンパク質で、その β 鎖は Mac-1 抗原と共通である。我々の実験の結果では、Mac-1 抗原陽性細胞の増殖に伴って LFA-1 陽性細胞が増殖しているの、この細胞は、Mac-1 抗原と LFA-1 抗原を同時に保有する細胞 (Mac-1⁺ LFA-1⁺ 細胞) と考えられる。Strassmann²⁵⁾ が述べているように、LFA-1 抗原はマクロファージの活性化に伴って発現する抗原であり、我々の実験で増殖した LFA-1 陽性細胞も Mac-1 陽性細胞の活性化に伴って発現した可能性も考えられる。破骨細胞の分化誘導過程における LFA-1 抗原発現の意味については不明であるが、LFA-1 抗原が破骨細胞の前駆細胞に特異的に発現する可能性も否定できず、LFA-1 抗原の意義については非常に興味を持たれる点である。

現在、骨芽細胞と骨髄細胞による co-culture は 14日間行っているが、破骨細胞の形成は認められなかった。また、骨芽細胞と co-culture して増殖した Mac-1⁺ LFA-1⁺ 細胞を 50mM の L(+)酒石

酸を用いて酒石酸耐性 acid phosphatase 染色を行ったが、酒石酸耐性 acid phosphatase 活性は陰性であった。このことは、骨芽細胞が産生する因子により増殖した骨髄細胞は、破骨細胞の前駆細胞であると仮定してもかなり未熟な細胞であり、この細胞が破骨細胞になるためには、骨基質の存在や $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 等の因子²⁶⁾が必要であることが考えられる。また、もう一つの可能性として、増殖した Mac-1⁺ LFA-1⁺ 細胞は破骨細胞の前駆細胞ではなく、分化したマクロファージである可能性も否定できない。

次に、骨芽細胞の ALPase 活性の変化をみると、骨髄細胞との co-culture により骨芽細胞の ALPase 活性は明らかに抑制された。培養 3 日目で ALPase 活性の低下が始まり、培養 7 日目で対照群の ALPase 活性の約 2 分の 1 であった。骨髄細胞の growth curve と比較すると骨芽細胞の ALPase 活性は骨髄細胞の増殖と反比例する形で低下しており、骨髄細胞の増殖と ALPase 活性の低下は何らかの相関関係を持っていることが推察された。すなわち、増殖した Mac-1⁺ LFA-1⁺ 細胞は骨芽細胞に対して逆に骨形成機能を抑制する因子を産生していると考えられた。この因子の産生には何らかのタンパク合成の過程に関与していることはわかったが、複数の因子が同時に産生されていることも考えられる。マクロファージ系の細胞が産生する因子は多数知られているが、本実験のように骨芽細胞の ALPase 活性を下げる因子としては IL-1²⁷⁾ と tumor necrosis factor- α (TNF- α)²⁸⁾ が報告されているが詳細なことは不明である。以上のように、骨芽細胞と骨髄細胞を millicell を介して co-culture すると、両者の細胞からそれぞれの分化機能をコントロールする因子が相互に産生されることがわかった。我々の実験系では骨髄細胞 1×10^6 cells に対して、骨芽細胞 1×10^5 cells と骨髄細胞数が優位な培養系であった。また、骨髄細胞は種々の分化段階の細胞を含み、未分化な細胞も多数存在すると考えられる。骨芽細胞は 3 日間 pre-culture した後に実験に用いているので、実験期間中は活発な増殖期にあると考えられる。この骨芽細胞 (1×10^5 cells) と骨髄細胞 (1×10^6 cells) の細胞数のバランスとこ

これらの細胞の分化状態により、本実験の結果のような骨吸収系に進む因子がこれらの細胞より相互に産生されたと考えられた。すなわち、骨芽細胞と骨髄細胞の相互作用因子の解析を進めていくうえで、両細胞の細胞数の比率や細胞の分化段階がこの因子の産生にどの様に影響するのかを検討する必要があると思われる。

最後に、本実験における骨芽細胞と骨髄細胞の相互作用因子と mechanical stress による骨改造機構、特に骨改造の初期に起きる骨吸収のメカニズムについて考察する。すなわち、局所的な mechanical stress が骨に負荷された場合、千葉⁵⁾が示したようにその場において骨髄系細胞が集まり、骨表面の骨芽細胞の因子によりクロナールに Mac-1⁺ LFA-1⁺ 細胞が増殖し、そしてこの増殖した細胞から産生される因子により骨芽細胞の ALPase 活性は抑制され、骨形成能が停止して骨吸収が開始されると考えられる。現在の段階で mechanical stress により骨髄系細胞が集まるメカニズムと Mac-1⁺ LFA-1⁺ 細胞から破骨細胞が形成される過程を解明していないが、mechanical stress による骨改造は骨髄細胞と骨芽細胞から骨形成もしくは骨吸収に変換する因子が相互に産生されることにより起きると推察される。これらの実験結果から、骨芽細胞と骨髄細胞の co-culture 系で産生されている因子の同定を進めることと、破骨細胞の形成に必要な条件を調べることで、および mechanical stress に対する骨芽細胞と骨髄細胞の反応とこれらの細胞間の相互作用を詳細に解析することにより、mechanical stress による骨改造機構のメカニズムが明らかになるとと思われる。

結 論

BALB/c マウスの骨芽細胞 (1×10^5 cells) と骨髄細胞 (1×10^6 cells) を millicell を介して co-culture し、これらの細胞の分化・増殖の変化を調べたところ以下のような結果が得られた。

1. 骨芽細胞と co-culture した骨髄細胞では、培養3日目から細胞数および DNA 合成の著明な増加が認められた。

2. 骨芽細胞と co-culture した骨髄細胞を FACS で解析すると、増殖した細胞は Mac-1 および LFA-1 抗原陽性細胞であった。また、Mac-1 および LFA-1 抗原陽性細胞の分画は近似し、両分化抗原を保有した細胞が増殖したことを示していた。

3. 骨芽細胞の ALPase 活性は骨髄細胞との co-culture により明らかに抑制された。

4. 骨芽細胞と骨髄細胞から産生される因子の産生には、何らかのタンパク合成の過程が関与していた。

以上の結果より、骨芽細胞と骨髄細胞から両細胞の分化機能をコントロールする因子が相互に産生されることが明らかになった。このことより、生理的な骨改造機構はこれらの相互作用因子により制御されていると考えられた。

本論文の要旨は、第7回日本骨代謝学会(1989年7月28日、東京)、第31回歯科基礎医学会総会(1989年9月2日、徳島)ならびに第48回日本矯正歯科学会大会(1989年10月6日、金沢)において発表した。また、本研究の一部は、文部省科学研究費補助金(平成元年度一般研究C、課題番号 01571113)によって行われた。

抄録: マウスの骨芽細胞 (1×10^5 cells) と骨髄細胞 (1×10^6 cells) を millicell (Millipore 社) を介して co-culture することにより、骨改造機構におけるこれらの細胞の分化と増殖に対する相互作用因子の影響を調べた。その結果、骨芽細胞と co-culture した骨髄細胞では、培養3日目から細胞数および cellular DNA 合成の著明な増加が認められた。また、4日間骨芽細胞と co-culture した骨髄細胞を細胞分化抗原のモノクローナル抗体を用いて FACS で解析すると、増殖した細胞は Mac-1 および LFA-1 抗原陽性細胞であった。次に、骨芽細胞の ALPase 活性は、骨髄細胞との co-culture により培養3日目から明らかに抑制された。以上の結果より、骨芽細胞と骨髄細胞は両者の分化機能をコントロールする因子を相互に産生していることがわかった。このことより、生理的な骨改造機構は骨芽細胞と骨髄細胞の相互作用因子により制御されていることが示唆された。

文 献

- 1) Horton, J. E., Raisz, L. G., Simmons, H. A., Oppenheim, J. J. and Mergenhausen, S. E. : Bone resorbing activity in supernatant fluid from cultured human peripheral blood leukocytes. *Science* **177** : 793-795, 1972.
- 2) Dewhirst, F. E., *et al.* : Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor : Identify with interleukin 1β . *J. Immunol.* **135** : 2562-2568, 1985.
- 3) Stashenko, P., *et al.* : Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J. Immunol.* **138** : 1464-1468, 1987.
- 4) 須田立雄, 小澤英浩, 高橋栄明 : 病的骨吸収 : 骨の科学, 東京, 1985, 医歯薬出版, pp. 231-248.
- 5) 千葉美麗 : Mechanical stress による骨改造機構に関する研究—圧迫力を負荷した新生ラット培養長管骨における破骨細胞の分化誘導について—*一日矯歯誌* **48**(6) : 585-600, 1989.
- 6) Wong, G. L. and Cohn, D. V. : Separation of parathyroid hormone and calcitonin-sensitive cells from non-responsive bone cells. *Nature* **252** : 713-715, 1974.
- 7) Wong, G. L. and Cohn, D. V. : Target cells for parathormone and calcitonin are different : enrichment for each cell type by sequential digestion of mouse calvaria and selective adhesion to polymeric surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72** : 3167-3171, 1975.
- 8) Shiina-Ishimi, Y., Abe, E., Tanaka, H., *et al.* : Synthesis of colony stimulating factor (CSF) and differentiation-inducing factor (D-factor) by osteoblastic cells, clone MC 3T3-E1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **134** : 400-406, 1986.
- 9) Chambers, T. J. and Dunn, C. J. : The effects of parathyroid hormone, 1, 25-dihydroxy-cholecalciferol and prostaglandins on the cytoplasmic activity of isolated osteoclasts. *J. Pathol.* **137** : 193-203, 1982.
- 10) Thomson, B. M., Mundy, G. R. and Chambers, T. J. : Tumor necrosis factors α and β induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *J. Immunol.* **138** : 775-779, 1987.
- 11) Farley, J. R. and Baylink, D. J. : Purification of a skeletal growth factor from human bone. *Biochemistry* **21** : 3502-3507, 1982.
- 12) Ault, K. A. and Springer, T. A. : Cross-reaction of a rat-anti-mouse phagocyte-specific monoclonal antibody (anti-Mac-1) with human monocytes and natural killer cells. *J. Immunol.* **126** : 359-364, 1981.
- 13) Ho, M. K. and Springer, T. A. : Mac-1 antigen : quantitative expression in macrophage populations and tissues, and immunofluorescent localization in spleen. *J. Immunol.* **128** : 2281, 1982.
- 14) Ash, P., Loutit, J. F. and Townsend, K. M. S. : Osteoclasts derived from hematopoietic stem cells. *Nature* **283** : 669, 1980.
- 15) Horton, M. A., Rimmer, E. F., Moore, A. and Chambers, T. J. : On the origin of osteoclast : the cell surface phenotype of rodent osteoclasts. *Calcif. Tissue Int.* **327** : 46-50, 1985.
- 16) Shiina, Y., Yamaguchi, A., Abe, E., Suda, T., *et al.* : Comparison of mechanisms of bone resorption induced by $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 and lipopolysaccharides. *Calcif. Tissue Int.* **39** : 28-34, 1986.
- 17) Yokota, K., Kusaka, M., Ohshima, T., *et al.* : Stimulation of prostaglandin E_2 synthesis in cloned osteoblastic cells of mouse (MC3T3-E1) by epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **261** : 15410-15415, 1986.
- 18) Abe, E., Ishimi, Y., Takahashi, N., *et al.* : A differentiation-inducing factor produced by the osteoblastic cell line MC3T3-E1 stimulates bone resorption by promoting osteoclast formation. *J. Bone Miner. Res.* **3** : 635-645, 1988.
- 19) Hanazawa, S., Ohmori, Y., Amano, S., *et al.* : Spontaneous production of interleukin-1-like cytokine from a mouse osteoblastic cell line (MC3T3-E1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **131** : 774-779, 1985.
- 20) Canalis, E., McCarthy, T. and Centrella, M. : A bone-derived growth factor isolated from rat calvariae is β_2 microglobulin. *Endocrinology* **121** : 1198-1200, 1987.
- 21) Robey, P. G., Young, M. F., Flanders, K. C., *et al.* : Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type- β (TGF- β) *in vitro*. *J. Cell Biol.* **105** : 457, 1987.
- 22) Mentzer, S. J., Burakoff, S. J. and Faller, D. V. : Adhesion of T lymphocytes to human endothelial cells is regulated by the LFA-1 membrane molecule. *J. Cell Physiol.* **126** : 285-290, 1986.
- 23) Nishimura, T., Yagi, H. and Hashimoto, Y. : The role of lymphokine-activated cell-associated antigen II. Distribution and correlation with cell cycle. *Cell Immunol.*, **107** : 24-31, 1987.
- 24) Davignon, D., Martz, E., Reynolds, T. *et al.* : Monoclonal antibody to a novel lym-

- phocyte function-associated antigen (LFA-1): Mechanism of blocking of T lymphocyte-mediated killing and effects on other T and B lymphocyte functions. *J. Immunol.* **127** : 590-595, 1981.
- 25) Strassmann, G., Springer, T. A. and Adams, D. O.: Studies on antigens associated with the activation of murine mononuclear phagocytes.: Kinetics of and requirements for induction of Lymphocyte Function-Associated (LFA)-1 antigen *in vitro*. *J. Immunol.* **135** : 147-151, 1985.
- 26) 久米川正好, 折茂 肇, 井上哲郎 : 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ による多核細胞の形成. *日骨代謝誌* **6** : 27-29, 1988.
- 27) Stashenko, P., Dewhirst, F. E., Rooney, M., *et al.*: Interleukin-1 β is a potent inhibitor of bone formation *in vitro*. *J. Bone Miner. Res.* **2** : 559-565, 1987.
- 28) Centrella, M., McCarthy, T. L. and Canalis, E.: Tumor necrosis factor- α inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity independently of its effect on deoxyribonucleic acid synthesis in osteoblast-enriched bone cell cultures. *Endocrinology* **123** : 1442-1448, 1988.