原 著

播種密度および継代頻度による MC 3 T 3-E 1 の アルカリ性ホスファターゼ活性の変化について

尾之上 さくら 橋 本 修 一* 今 井 敏 夫 丹 羽 源 男

日本歯科大学歯学部衛生学教室（主任：丹羽源男教授）

* 日本歯科大学歯学部共同利用研究所 RI 研究室（主任：橋本修一助教授）

〔受付：平成 11 年 2 月 25 日，受理：平成 11 年 9 月 25 日〕

Effect of Cell Density and Frequency of Inoculation on Alkaline Phosphatase Activity in the Osteoblastic Cell Line MC 3 T 3-E 1

Sakura Onoue, Shuichi Hashimoto*, Toshio Imai and Motoo Niwa

*Department of Preventive and Community Dentistry, School of Dentistry at
Tokyo, The Nippon Dental University*

(Chief : Prof. Motoo Niwa)

**First Laboratory of Radioisotopes, Dental Research Institute, School of Dentistry
at Tokyo, The Nippon Dental University*

(Chief : Assoc. Prof. Shuichi Hashimoto)

1-9-20, Fujimi Chiyoda-ku, Tokyo, 102-8159, Japan

[Received on February 25, 1999 ; Accepted on September 25, 1999]

Key words : Alkaline phosphatase/Glycosylphosphatidylinositol anchored protein/Osteoblastic cells/
MC 3 T 3-E 1/Culture conditions

Abstract : Alkaline phosphatase (ALP), one of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins on the cell surface, is closely related to calcification in osteoblasts. To investigate the effects of culture conditions on the levels of ALP activity in a clonal murine calvaria cell line (MC 3 T 3-E 1), we subcultured the cells at various plating densities and frequencies.

When MC 3 T 3-E 1 cells were inoculated at 6,500 cells/cm² and passaged once per week, a high level of ALP activity (W 1/HD) was maintained with calcification activity for more than 130 days. In contrast, when MC 3 T 3-E 1 cells were passaged twice per week at 1,300 cells/cm², the cells (W 2/LD, W 2/HD-LD) lost more than 90% of both the ALP and calcification activities of the original cells within 50 days. After these different phenotypic cell lines were subcultured for 130 days, the cell population doubling time of W 2/LD or W 2/HD-LD cells without ALP activity or cuboidal morphology at confluence was significantly shorter and the level of protein synthesis was significantly lower than in W 1/HD cells with high ALP activity. Furthermore, the activity of 5'-nucleotidase, another GPI-anchored protein in W 2/LD and W 2/HD-LD cells, was also decreased to less than one-tenth of that in W 1/HD cell. In contrast, the acid phosphatase and β -glucuronidase activities in W 2/LD and W 2/HD-LD cells were significantly increased

compared to those in W 1/HD cells. These phenotypic differences induced by various culture conditions were not caused by biological factors in the culture medium or ionizing radiation.

These results suggest that by subculturing MC 3 T 3-E 1 cells at low plating density and high passage frequency, both the GPI-anchored enzyme and calcification activities disappear, altering the osteoblastic features of the cells.

抄録：アルカリ性ホスファターゼ（ALP）は、細胞表面のグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカー型タンパク質の一つであり、骨芽細胞の石灰化と密接に関わっている。本研究では骨芽細胞様細胞株 MC 3 T 3-E 1 の ALP 活性量におよぼす培養環境の影響を明らかにするため、この細胞をさまざまな播種密度と継代頻度で培養した。MC 3 T 3-E 1 細胞を 6,500 cells/cm² の播種密度で週 1 回継代培養すると、130 日以上たってもこの細胞（W 1/HD）は高い ALP 活性と石灰化能を保持していた。しかし 1,300 cells/cm² の播種密度で、週 2 回継代培養すると、この細胞（W 2/LD, W 2/HD-LD）は培養 50 日以内にもこの細胞のもつ ALP 活性と石灰化能のいずれも 90% 以上を失ってしまっていた。これら形質変化した細胞を 130 日間培養すると、ALP 活性とコンフルエント時の敷石状態を失った W 2/LD や W 2/HD-LD 細胞の細胞集団倍加時間とタンパク質生成能はいずれも W 1/HD 細胞の場合に比べてそれぞれ有意に短くまた低くなった。一方、W 2/LD と W 2/HD-LD 細胞ではもう一つの GPI-アンカー型タンパク質である 5'-ヌクレオチダーゼの活性も ALP 活性の場合と同様に W 1/HD 細胞の酵素活性の 1/10 以下にまで減少していた。しかし W 2/LD や W 2/HD-LD 細胞の酸性ホスファターゼと β -グルクロニダーゼ活性は W 1/HD 細胞に比べ逆に有意に増加していた。培養環境により誘導されるこれら細胞の形質変化は、培養した培地中の生物学的因子や電離放射線の照射に起因するものではなかった。

これらの結果から、MC 3 T 3-E 1 細胞は高頻度・低密度の播種による継代培養を行うと、MC 3 T 3-E 1 細胞の骨芽細胞様の特性から GPI-アンカー型酵素活性と石灰化能が特異的に失われることが示唆された。

緒 言

骨のリモデリングには破骨細胞と骨芽細胞が主に関与し、破骨細胞は血液系の細胞から、骨芽細胞は間葉系の細胞に由来し、分化したものと考えられている。

近年、*in vitro* の系で、骨芽細胞の研究モデルとして骨由来の骨芽細胞株が多数樹立されている。この骨芽細胞株のなかで MC 3 T 3-E 1 細胞は、C 57 BL/N 6 マウスの新生児頭蓋冠から分離樹立された正常細胞由来の細胞株であり¹⁾、グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）-アンカー型タンパク質の一つであるアルカリ性ホスファターゼ（ALP）の高い活性を有し、しかも結節を形成する²⁾。このことから分化により石灰化能を有する細胞株として多くの研究者により生体内における骨芽細胞の分化機構や、石灰化における役割の解明に用いられている³⁻⁸⁾。しかしクローニングされた樹立細胞系でも継代培養をくり返すに従って、細胞が本来もっていた遺伝的均一性や生化学的特性、あるいは機能を失った集団へと変化する可能性が指摘されている⁹⁾。特に MC 3 T 3-E 1 細胞では、形質変化により倍加時間の短縮した細胞が容易に出現することが知られている¹⁰⁾。また、一般に MC 3 T 3-E 1 細胞の ALP 活性は、数十代継代すると消失してしまうといわれており、Leis ら¹¹⁾は同じ MC 3

T 3-E 1 細胞でありながら細胞を継代保持している研究機関によって高い ALP 活性を有している細胞系からきわめて低い活性しかない細胞系まで多種が存在することを明らかにしている。しかしこれら MC 3 T 3-E 1 細胞から ALP 活性が消失する原因についてはまだ明らかにされていない。細胞の分化や石灰化能は ALP 活性と密接に関連していることから、骨芽細胞のモデルとして MC 3 T 3-E 1 細胞を実験に使用する場合には、できるだけ高い ALP 活性を保持した細胞を継代していくことが必須となる。そこで本研究は MC 3 T 3-E 1 の ALP 活性に対する培養環境の影響について、培養の基本となる細胞の播種密度や継代頻度に加えて培養上清中の液性因子や電離放射線についても検索した。また ALP 活性の高い細胞群と活性を失った細胞群の両者についてその石灰化能や細胞増殖、タンパク質生成能、各種酵素活性についても測定し比較検討した。

材料と方法

1. 細胞および培養条件

マウス頭蓋冠より株化された骨芽細胞様細胞株 MC 3 T 3-E 1 (奥羽大学、須藤博士より分与) を実験に供した。細胞は、10% (v/v) ウシ胎児血清 (FCS; Bio Whittaker, Walkersville, MD), 2 mM L-グルタミン (Gibco BRL,

Table 1 Subculture conditions of MC 3 T 3-E 1 cells

	Cells		
	W 1/HD and W 2-W 1/HD*	W 2/HDa and W 2/HDb	W 2/LD and W 2/HD-LD*
Passage frequency	Once/week (W 1)	Twice/week (W 2)	Twice/week (W 2)
Plating cell density (cells/cm ²)	6,500 (HD)	6,500 (HD)	1,300 (LD)

* W 2-W 1/HD and W 2/HD-LD cells were derived from W 2/HDa and W 2/HDb cells by change of inoculate condition, respectively

Island, NY), 5 μ g/ml ゲンタマイシン (Gibco BRL) を含む α -MEM 培地 (Gibco BRL) を用いて, 37°C, 5% CO₂, 100%の湿度の下で培養した。細胞の継代方法は, 0.05% コラゲナーゼおよび 0.05% トリプシン, 0.025% EDTA 処理で細胞を剥離し, ノイバイエル血球計算盤で計測後, 新鮮培地を用いて 25 cm² フラスコに播種した。細胞の植え継ぎ頻度は週 1 回 (W 1, 7 日ごと) あるいは週 2 回 (W 2, 3-4 日ごと) とし, 細胞の播種密度は, 1,300 cells/cm² (LD) あるいは 6,500 cells/cm² (HD) で行った。以上の継代条件を組み合わせる各細胞の培養を行った (Table 1)。実験開始前の細胞培養は, Sudo ら²⁾の方法に準じ播種密度を 6,500 cells/cm², 植え継ぎ頻度を週 2 回にして行った。なお, 本実験における生細胞数の計測は, 上述の方法で細胞を回収後, 0.25% トリパンブルー (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) で染色し, ノイバイエル血球計算盤で行った。

2. 酵素活性の測定

培養した細胞は HEPES 緩衝液 (10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, pH 7.4) で 3 回洗浄後, ラバーポリスマンで細胞を回収した。回収した細胞は, 1% NP-40 を含む HEPES 緩衝液中で超音波ホモジナイザー (TAITEC, 埼玉) を用いて氷冷下 20 秒間破碎した。これを 18,500 $\times g$ で 15 分間遠心分離 (MR-150, TOMY, 東京) し, 上清を ALP を始めとした各種酵素活性の測定用試料として用いた。酵素活性はすべて mg タンパク質量当たりの国際単位 (U; 37°C において, 1 分間に 1 μ mol の基質を変化させる酵素活性) で表した。

1) アルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性の測定

ALP 活性の測定は Bessey-Lowry 法¹²⁾を基にしたアルカリ性ホスファターゼ測定キット「アルカリ性ホスファB-テストワコー」(和光純薬, 大阪) を用いた。酵素活性は基質として 6.7 mM *p*-ニトロフェニルリン酸を用い, 50 mM 炭酸塩緩衝液, pH 9.8 中で 37°C, 15 分間反応し, 反応生成物である *p*-ニトロフェノールの量を波

長 405 nm の吸光度で測定した。酵素活性は 15 分間当たりの *p*-ニトロフェノールの生成量で算出し, 国際単位で表した。

すべての ALP 活性の値は, ある一定期間継代培養した細胞を 3.6 $\times 10^4$ cells/cm² となるように培養フラスコに播き直し, 2 日間培養した細胞における酵素の比活性で評価した。

2) 5'-ヌクレオチダーゼ活性の測定

5'-ヌクレオチダーゼ活性は Widnell の方法¹³⁾を一部改良し, ³H-アデノシン 5'-モノホスフェイト (AMP) から生成される ³H-アデノシンの量を測定した。反応は酵素基質として 2 mM の ³H-AMP (5 mCi/mmol; American Radiolabeled Chemical Inc., St. Louis, MO) と 2 mM 塩化マグネシウムを含む 100 mM トリス塩酸緩衝液, pH 7.3 中で 37°C, 30 分間行った。反応停止は, 最終濃度が 50 mM となるアデノシンの添加と, 2 分間の煮沸除タンパクで行った。除タンパク上清中の反応生成物 ³H-アデノシンは, Hashimoto ら¹⁴⁾の方法に従いシリカゲル 60 F₂₅₄ (Merk, Darmstadt, Germany) の薄層クロマトグラフィー (TLC) により分離・抽出し, 放射能を測定した。酵素活性は 30 分間の反応で生成した ³H-アデノシン量で評価し, 記載した。TLC の展開溶媒には n-ブタノール:アセトン:アンモニア:水 (50:40:3.5:14.5) を用いた。

3) 乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性の測定

LDH 活性の測定は, 乳酸脱水素酵素測定用キット「ラクトレートデヒドロゲナーゼ C II-テストワコー」(和光純薬) を用いた。酵素試料に基質として 100 mM 乳酸リチウム, 発色剤として 2.6 mM β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型, 0.49 mM ニトロテトラゾリウムブルー, 1.8 単位/ml ジアホラーゼを加え 100 mM トリス塩酸緩衝液, pH 8.4 中で 37°C, 10 分間反応した。生成したジホルマザン量は波長 422.7 nm の吸光度で測定し, 酵素活性は 10 分間の反応で生成したジホルマザン量を算出し, ALP と同様に国際単位で表した¹⁵⁾。

4) 酸性ホスファターゼ (ACP) 活性の測定

ACP 活性の測定には酸性ホスファターゼ測定キット「酸性ホスファターゼテストワコー」(和光純薬)を用いた。酵素試料に基質として 6.7 mM *p*-ニトロフェニルリン酸を加え、50 mM クエン酸緩衝液、pH 4.9 中で 37°C、30 分間反応し、生成した *p*-ニトロフェノール量を波長 405 nm の吸光度で測定した。酵素活性は 30 分間の反応で生成した *p*-ニトロフェノール量を算出し、ALP と同様に国際単位で表した¹²⁾。

5) β -グルクロニダーゼ活性の測定

β -グルクロニダーゼ活性の測定は Stahl と Touster¹⁶⁾の方法に準じた。酵素試料と基質である 10 mM フェノールフタレイングルクロン酸 (Sigma, St. Louis, MO) を 62.5 mM 酢酸緩衝液、pH 5.0 中で 37°C、10 分間反応し、生成したフェノールフタレイン量を波長 553 nm の吸光度で測定した。酵素活性は 10 分間の反応で生成したフェノールフタレイン量を算出し、ALP と同様に国際単位で表した。

3. カルシウムの測定

細胞を 10% FCS 含有 α -MEM 培地で 7 日間培養した後、5 mM β -グリセロリン酸 (Sigma) を含む FCS 含有培地で、さらに 24 時間培養した。細胞を Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 不含リン酸緩衝液 [PBS (-)] で 2 回洗浄し、12 N 塩酸にて湿式灰化した。この溶液中のカルシウム量は、0.1 N 塩酸と 1% 塩化ランタン溶液を加えた後、原子吸光分析装置 (SpectrAA-250 plus, Varian Techtron, Mulgrave Victoria, Australia) を用い、ランプ電流値：7 mA、スリット幅：0.5 nm、波長：422.7 nm の測定条件で定量した¹⁷⁾。これにより細胞の石灰化能(細胞タンパク質当たりのカルシウム量)を算出した。なお校正にはカルシウム標準液(和光純薬)を用いた。また β -グリセロリン酸添加 24 時間培養後の細胞にはフォンコッサ染色を行い結節の形成を観察した¹⁸⁾。

4. ^3H -チミジンおよび ^{14}C -ロイシンの細胞への取り込み

^3H -チミジン (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) および ^{14}C -ロイシン (Amersham Pharmacia Biotech) の DNA およびタンパク質への取り込みは、細胞の酸不溶性分画へのそれぞれのアイソトープの取り込み量で評価した¹⁹⁾。細胞は、 3.6×10^4 cells/cm² となるように 10% FCS 含有培地で調製し、24 マルチウェルプレートに播種した。66 時間培養後、18.5 kBq/ml ^3H -チミジン (3.03 TBq/mmol) あるいは 3.7

kBq/ml ^{14}C -ロイシン (11.3 GBq/mmol) になるように調整した 10% FCS 含有培地と交換し、さらに 6 時間培養した。細胞を PBS (-) で 3 回、5% トリクロル酢酸で 3 回洗浄した。洗浄した細胞を 0.2 N 水酸化ナトリウムで溶解し、シンチゾール EX-T (同仁化学、熊本) と混和後、DNA 中に取り込まれた ^3H -チミジンあるいはタンパク質中の ^{14}C -ロイシンの放射能を液体シンチレーションカウンター LSC-3500 (アロカ、東京) で測定した。これらの取り込み量から DNA およびタンパク質の生成能を推定した。

5. ALP 活性に対する細胞培養上清の影響

ALP 活性の低下した細胞の出現と細胞から遊離される液性因子との関連を検討するため、10% FCS 含有の細胞培養上清をあらかじめ採取し、この上清で培養した細胞の ALP 活性を分析した。まず ALP 活性の高い W 1/HD 細胞と ALP 活性の低い W 2/LD 細胞を 4 日間培養した後、それぞれの 10% FCS 培養上清を採取し、10% FCS 新鮮培地と等量混和して異なる細胞系の培養に使用した。W 1/HD 細胞には W 2/LD 細胞の培地上清を、W 2/LD 細胞には W 1/HD 細胞の培養上清を用いて、各細胞の継代条件 (W 1/HD；W 1, 6,500 cells/cm²) (W 2/LD；W 2, 1,300 cells/cm²) で 25 日間培養し、この間の細胞の ALP 活性を経日的に測定した。

6. ALP 活性に対する放射線照射の影響

W 1/HD 細胞は、 1.2×10^4 cells/cm² となるように直径 100 mm のプラスチックシャーレーに播種し 2 日間培養した。培養した細胞を FCS を含まない α -MEM 培地で洗浄後、培地を取り除き、ただちに放射線を照射した。照射後ただちに 10% FCS 含有培地を加え、6 日間培養後、各細胞の ALP 活性を測定した。

放射線照射には、soft X-ray system OMC-55 G (OHMICROM, 東京) を使用した。照射条件は、5 mA、50 kV で 10、30、60 秒間行った。照射線量は、東芝ガラス線量計 GD-403 を用いて算出した。1 秒当たりの照射線量は 22.6 R/sec、平均エネルギーは 13.8 keV であり、1 秒当たりの吸収線量は 198 mGy であった。これから細胞に対する線量当量率は約 200 mSv/sec であると推定された。

7. タンパク質の定量

タンパク質の定量は血清アルブミンを標品として、BCA タンパク質測定用キット (Pierce, Rockford, IL) を用いて行った。タンパク質との反応によって生じた

Fig. 1 Effect of passage frequency of subcultures on ALP activity levels in MC 3 T 3-E 1 cells. All cells were inoculated at 6,500 cells/cm² in α -MEM supplemented with 10% fetal calf serum. W 1/HD (○) and W 2/HDa (△) cell cultures were passaged once and twice per week, respectively. The passage of the W 2/HDa culture was changed to once per week (W 2-W 1/HD cells; ▲) from twice per week on culture day 54 (↓). Before measuring ALP activity, the cells were re-cultured for 2 days. ALP activity level in the cells on various culture days was measured using *p*-nitrophenylphosphate as a substrate at 37°C for 15 min. Values and bars are means $\pm$ SD of three experiments.

Cu¹⁺とピシニコニン酸のキレート体（紫色）を波長 562 nm の吸光度で測定した²⁰⁾。

8. 統計処理

2 群間の平均値の有意差検定には, student's *t*-test を, また酵素活性の経日的変化の検定には二元配置分散分析 (ANOVA) を行った。

結 果

1. 細胞の培養条件と ALP 活性について

石灰化能を保持している MC 3 T 3-E 1 細胞のアルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性に対する培養条件の基本である細胞の植え継ぎ頻度と, 播種密度の影響について検討した。

植え継ぎ頻度の異なる MC 3 T 3-E 1 細胞の培養 2 日

後の ALP 活性を 130 日間にわたり経日的に比較した (Fig. 1)。細胞の播種密度を 6,500 cells/cm² で一定にし, 週 1 回の植え継ぎで培養をくり返した W 1/HD 細胞の ALP 活性は, 培養 20 日目と培養開始直後に比べ 1.8 倍有意に増加してほぼ平衡となり (500 mU/mg protein 附近), 培養 120 日目以降も高い値で保持されていた。これに対して, 週 2 回の植え継ぎで継代培養をくり返した W 2/HDa 細胞の ALP 活性は, 培養開始後急激な増加はなく W 1/HD 細胞の酵素活性に比べると有意に低い値を示していた (ANOVA, *p* < 0.01)。また W 2/HDa 細胞は培養 100 日目を越えると ALP 活性が減少し, 培養 117 日目で最低となりその後回復は認められなかった。一方, 週 2 回の植え継ぎで培養していた W 2/HDa 細胞を培養 54 日目で週 1 回の植え継ぎに変えたところ, 細胞 (W 2-W 1/HD) の ALP 活性は, 条件変更後から培養 103 日目 (条件変更後 49 日目) まで W 2/HDa 細胞と同

Fig. 2 Effect of plating cell density on ALP activity levels in MC 3 T 3-E 1 cells. The passage of all subcultures was carried out twice per week. W 2/HDa (□) and W 2/LD (▽) cells were inoculated at 6,500 and 1,300 cells/cm², respectively, in α -MEM supplemented with 10% fetal calf serum. The inoculated cell density of W 2/HDa cells was changed from 6,500 to 1,300 cells/cm² (W 2/HD-LD; ■) on culture day 54 (↓). Before measuring ALP activity, the cells were re-cultured for 2 days. ALP activity level in the cultured cells on various days was measured as described in Fig. 1. Values and bars are means $\pm$ SD of three experiments.

程度かわずかに高い値で推移し、その後も W 2-W 1/HD 細胞の ALP 活性は急激に減少することなく親細胞である W 2/HDa 細胞の酵素活性に比べると有意に高い値を示していた (ANOVA, $p < 0.01$)。これらの結果から、MC 3 T 3-E 1 細胞の ALP 活性の発現量には、培養条件の一つである細胞の植え継ぎ頻度が影響している可能性が示唆された。

一方、細胞の播種密度による ALP 活性の推移を Fig. 2 に示した。細胞の植え継ぎ頻度を週 2 回で一定にし、細胞播種を高密度の 6,500 cells/cm²あるいは低密度の 1,300 cells/cm²の 2 条件にして、継代培養をくり返した。播種密度が高い W 2/HDa 細胞では、120 日以上長期間継代培養をくり返しても、ALP 活性は高い値で保持されていた。これに対して、播種密度の低い W 2/LD 細胞の ALP 活性は、まず培養 7 日目に急激に減少し、さらに培養 20 日目以降にも有意に減少し、培養 50 日目以降には播種密度の高い W 2/HDa 細胞の酵素活性の 10 分の 1 以下になり平衡となった。これ以降この細胞の酵素活

性の回復は認められなかった。次に、培養 54 日目に播種密度の高い W 2/HDa 細胞を低密度の播種条件に変えて継代培養したところ、細胞 (W 2/HD-LD) の ALP 活性は培養 61 日目 (条件変更後 7 日目) に急激に減少し、さらに 75 日目 (条件変更後 21 日目) にも同程度減少することがわかった。この W 2/HD-LD 細胞の 2 段階にわたる ALP 活性の変化は、播種密度を低くして培養を開始した W 2/LD 細胞の酵素活性の減少傾向ときわめてよく相似していた。また両細胞の酵素活性は培養開始から 120 日以上経過すると、酵素の検出限界程度にまで低下した。また W 2/HDa のように高頻度であれば高密度の培養条件でも培養 120 日以上にわたり ALP 活性が比較的高く保持されている場合もあった。しかし Fig. 1 に示したように W 2/HDa のようにこの継代条件では長期間培養 (100 日以上) で活性が低下する細胞群も認められた。本実験では ALP 活性の分析はすべて再培養 2 日後に行ったが、ALP 活性の低い W 2/HDa, W 2/LD および W 2/HD-LD 細胞を 7 日間以上継続培養しても ALP

Fig. 3 Phase-contrast micrographs of W 1/HD (A), W 1/HDb (B), W 1/HDa (C), and W 2/LD cells (D) at confluence. $\times 200$

活性の回復は認められなかった。

以上の結果から、MC 3 T 3-E 1 細胞の ALP 活性は植え継ぎ頻度を少なくすると高い値で保持されているが、播種密度を下げると著しく減少することがわかった。したがって、この細胞の ALP 活性は、低頻度・高密度 (W 1, 6,500 cells/cm²) の継代培養を行うことで長期間高い状態に保持され、高頻度・高密度 (W 2, 6,500 cells/cm²) では ALP 活性は安定せず低い値の細胞群も認められた。さらに高頻度・低密度 (W 2, 1,300 cells/cm²) の継代培養を行うと、条件変更後ただちに酵素活性が消失してしまうことが明らかになった。

ALP 活性の高い W 1/HD 細胞、活性の低い W 2/LD 細胞および同条件で培養しても酵素活性の高い W 2/HDb 細胞と活性の低い W 2/HDa を培養 130 日目で光学顕微鏡で観察した。W 1/HD および W 2/HDb 細胞は播種直後では線維芽細胞様の形態を示したが、増殖が進みコンフルエントな状態になると、Fig. 3 A, B に示したような敷石状様の形態を呈した。さらに培養を続けるとコラーゲン様の線維成分を介して重層化することが認められた。これに対し形質変化した W 2/HDa 細胞および

W 2/LD 細胞では Fig. 3 C, D に示したように細胞増殖が進んでも線維芽細胞様の形態は変化せず、コラーゲン様の線維成分の生成も W 1/HD や W 2/HDb 細胞ほど多くは観察されなかった。

2. カルシウム蓄積について

培養条件により MC 3 T 3-E 1 細胞の ALP 活性は容易に低下することが明らかになった。そこで培養開始後 130 日を経過したこれら細胞系のカルシウム蓄積能について検討し、Table 2 に示した。ALP 活性が高い W 1/HD, W 2-W 1/HD および W 2/HDb 細胞では、7 日間培養後、5 mM の β -グリセロリン酸を添加してさらに 24 時間培養するとカルシウムの顕著な蓄積が認められた。しかし、ALP 活性の低い W 2/HDa, W 2/LD および W 2/HD-LD 細胞のカルシウム蓄積量は、W 1/HD 細胞の各々 15, 5, 4% にとどまり、これらの細胞はいずれもきわめてカルシウム蓄積能の低いことがわかった。またこれら 6 種類の細胞のカルシウム蓄積能と各細胞の ALP 活性との間には $r=0.99$ と有意 ($p<0.01$) な相関が認められた。

Fig. 4 von Kossa stain image of W 1/HD (A) and W 2/LD (B) cells. Cells were cultured in α -MEM supplemented with 10% fetal calf serum for 7 days and then incubated with 5 mM β -glycerophosphate in the same medium for 24hr. The cells were stained by the von Kossa technique.

Table 2 Calcium level in cell layers

Cells	Calcium ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)
W 1/HD	349 ± 63
W 2-W 1/HD	303 ± 29
W 2/HDa	$53 \pm 2^{**}$
W 2/HDb	$279 \pm 3^*$
W 2/LD	$19 \pm 2^{**}$
W 2/HD-LD	$14 \pm 4^{**}$

The cells were cultured in α -MEM contained with 10 % fetal calf serum in 24-multiwell plates for 7 days and then treated with 5 mM β -glycerophosphate for 24hr. Total calcium content in cell layers was determined by atomic absorption spectrophotometry after washing with PBS (-). All cells were used after subculturing for 130 days. Values are means $\pm$ SD of six experiments. Significant difference to W 1/HD cells (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$).

次に ALP 活性の最も高い W 1/HD 細胞および活性の最も低い W 2/LD 細胞をフォンコッサ染色して観察したところ、W 1/HD 細胞では細胞集団に一様ではない、局所的な結節の形成を示す黒色に染色された部位が観察された (Fig. 4 A)。これに対して W 2/LD 細胞ではこれらの結節の形成像が全く認められなかった (Fig. 4 B)。また、培養 130 日以上を細胞を 1 カ月以上継続培養し自然石灰化を観察した。W 1/HD、W 1-W 2/HD および W 2/LD 細胞では結節の形成像が認められたが、W 2/HDb、W 2/LD および W 2/HD-LD 細胞では全く認められなかった。これらの結果から、MC 3 T 3-E 1 細胞は高頻度・低密度の継代培養によりもたらされる ALP

Fig. 5 Cell numbers of W 1/HD (○), W 2/LD (●), and W 2/HD-LD (△) cells in culture. The cells were inoculated at 4×10^4 cells/well in 24-well plates and the number of cells was counted on various days of culture. The cells had been subcultured for 130 days before use. Values and bars are means $\pm$ SD of three experiments.

活性の減少に伴い石灰化能も容易に消失してしまうことがわかった。

以後の実験では ALP 活性が高く石灰化能を保持している細胞群の代表としては W 1/HD 細胞を、また ALP 活性と石灰化能が低い細胞群としては W 2/LD および W 2/HD-LD 細胞を用いた。

Fig. 6 Level of ³H-thymidine in the acid-insoluble fraction of W 1/HD, W 2/LD, and W 2/HD-LD cells. The cells were cultured in α -MEM supplemented with 10% fetal calf serum for 3 days in 24-well plates and incubated with 0.5 μ Ci/ml ³H-thymidine at 37°C for 6hr. The reaction was terminated by adding trichloroacetic acid, and ³H-thymidine incorporated into the precipitate was measured using a liquid scintillation counter. All cells were used for experiments after subculturing for 130 days. Values and bars are means $\pm$ SD of four experiments.

* Significantly different compared with W 1/HD cells ($p < 0.01$).

3. 細胞増殖について

培養開始後 130 日を経過した細胞において、植え継ぎ頻度と播種密度の細胞増殖にもたらす影響について検討した。低頻度・高密度の培養により ALP 活性を保持している W 1/HD 細胞と高頻度・低密度の培養で ALP 活性を失ってしまった W 2/LD および W 2/HD-LD 細胞を培養し、各々の生細胞数を経日的に測定し、Fig. 5 に示した。高い ALP 活性を有する W 1/HD 細胞の数は、培養 1 日から 2 日目にかけて 2.2 倍増加し、3—4 日目も継続して増加する傾向が認められ、細胞の集団倍加時間は約 21 時間であった。これに対し形質変化して ALP 活性の減少した W 2/LD および W 2/HD-LD 細胞は、培養 1 から 2 日目にかけて 4—8 倍に増殖し、3 日目以降はほぼ飽和状態に達していた。この時の両細胞の倍加時間は約 9 時間であった。これらの結果から、形質変化した細胞では倍加時間がもとの細胞に比べてきわめて短くなってお

Fig. 7 Level of ¹⁴C-leucine in the acid-insoluble fraction of W 1/HD, W 2/LD, and W 2/HD-LD cells. The cells were cultured in α -MEM supplemented with 10% fetal calf serum for 3 days and incubated with 0.1 μ Ci/ml ¹⁴C-leucine at 37°C for 6hr. The reaction was terminated by the addition of trichloroacetic acid, and ¹⁴C-leucine incorporated into the precipitate was measured using a liquid scintillation counter. All cells were subcultured for 130 days and used as described in Fig. 5. Values and bars are means $\pm$ SD of four experiments.

Significantly different compared with W 1/HD cells (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$).

り、細胞周期の短縮が示唆された。

これら培養 130 日を経過した細胞の DNA およびタンパク質の生成能について、細胞播種後 3 日目の細胞の酸不溶性分画への³H-チミジンの取り込みと、¹⁴C-ロイシンの取り込みを指標にして各々評価した。

ALP 活性の高い W 1/HD 細胞への³H-チミジンの取り込み量は、ALP 活性の減少した W 2/LD 細胞や W 2/HD-LD 細胞に比べて約 2 倍高い値を示した (Fig. 6)。この結果は、生細胞数の計測実験で培養 3 日目の W 1/HD 細胞が対数増殖期にあり、W 2/LD と W 2/HD-LD 細胞がいずれもすでに増殖飽和していたこととよく一致していた。また形質変化してからの経過期間の短い W 2/HD-LD 細胞 (ALP 活性が低下した培養 82 日目から 48 日経過) は、形質変化してからの期間が長い W 2/LD 細胞 (ALP 活性低下後 83 日経過) に比べ約 40% 有意に高い³H-チミジンの取り込み量を示していた。

Table 3 Levels of enzyme activities in cells

Enzyme	Cells		
	W 1/HD	W 2/LD	W 2/HD-LD
ALP (mU/mg protein)	403±13	10±1*	18±1*
5'-Nucleotidase (mU/mg protein)	6.163±0.218	0.511±0.011*	0.428±0.049*
LDH (mU/mg protein)	144±22	116±4*	126±11
β -Glucuronidase (mU/mg protein)	0.685±0.060	1.160±0.007*	0.858±0.007*
ACP (mU/mg protein)	29.7±2.0	53.3±6.7*	55.3±4.7*

W 1/HD, W 2/LD and W 2/HD-LD cells were re-cultured for 2 days after the cells were subcultured with each passage condition for 130 days. The cultured cells were washed twice with HEPES saline buffer, collected in the HEPES saline buffer containing 1% NP-40, and sonicated. After the sonicate was centrifuged at $18,500 \times g$ for 15 min, enzymes activity in the supernatant were assayed. Values are means±SD of six experiments.

* Significant difference to W 1/HD cells ($p < 0.05$).

次に W 1/HD, W 2/LD および W 2/HD-LD 細胞の培養 3 日目におけるタンパク質生成能を比較した結果を Fig. 7 に示した。形質変化した W 2/LD および W 2/HD-LD 細胞の ^{14}C -ロイシンの取り込み量は、ALP 活性の高い W 1/HD に比べ有意に低い値を示した。このうち形質変化した後の期間が長い W 2/LD 細胞の ^{14}C -ロイシンの取り込み量は、W 1/HD 細胞に比べて約 40% も低かったが、形質変化した後の期間が短い W 2/HD-LD 細胞では、わずか 10% しか低下していなかった。

これらの結果から、高頻度・低密度の継代培養により ALP 活性を早期に失ってしまった MC 3 T 3-E 1 細胞 (W 2/HD-LD, W 2/LD) であっても、形質変化した後の経過時間により、DNA やタンパク質の生成能には有意な差があることがわかった。このことから、培養環境の変化によって最も速く表われる細胞の形質変化に、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI)-アンカー型タンパク質である ALP の活性の消失が含まれることがわかった。

4. 細胞内酵素について

培養開始後 130 日を経過した W 1/HD, W 2/LD および W 2/HD-LD の細胞に含まれる代表的な酵素の比活性を測定し、Table 3 に示した。まず、細胞表面に局在する GPI-アンカー型タンパク質である ALP は、W 1/HD 細胞において 400 mU/mg protein であるのに対し、W 2/LD および W 2/HD-LD 細胞では W 1/HD 細胞の

各々 3% と 5% と酵素活性の検出限界に近いきわめて低い活性であった。また ALP 活性と同様に GPI-アンカー型タンパク質である 5'-ヌクレオチダーゼも W 1/HD 細胞に最も高い活性が観察され、形質変化した W 2/LD および W 2/HD-LD 細胞では、W 1/HD 細胞のわずか 10% 以下の活性しか認められなかった。

次に細胞質中の代表的な可溶性酵素である乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性について調べたところ、GPI-アンカー型酵素活性の高い W 1/HD 細胞においても、形質変化したこれらの活性をほとんど失ってしまった W 2/LD および W 2/HD-LD 細胞でも同程度の LDH の比活性が認められた。

さらに細胞内小胞に局在するリソソーム酵素である β -グルクロニダーゼおよび酸性ホスファターゼ (ACP) の活性について調べた。GPI-アンカー型酵素の場合とは逆に、 β -グルクロニダーゼ活性は形質変化した W 2/LD 細胞および W 2/HD-LD 細胞において W 1/HD 細胞に比べ各々 70% と 25% 有意に高い値を示していた。また ACP についても W 2/LD および W 2/HD-LD 細胞における活性は、 β -グルクロニダーゼと同様、W 1/HD 細胞に比べてそれぞれ 80% と 86% 増加していた。

5. 細胞液性因子の ALP 活性に与える影響について

MC 3 T 3-E 1 細胞から ALP 活性が失われていく過程に、細胞から培地中に放出される液性因子が関与しているかについて検討した。Fig. 8 に示すように、ALP 活

Fig. 8 Effect of culture medium on ALP activity levels in cells. W 1/HD (○) or W 1/HD' (●) cells were passaged once per week for 25 days of culture in fresh α -MEM supplemented with 10% fetal calf serum or the supernatant medium of W 2/LD culture, respectively. W 2/LD (△) and W 2/LD' (▲) cells were passaged twice per week in fresh medium or the supernatant of W 1/HD culture, respectively. ALP activity levels in the incubated cells were determined as in Fig. 1. All cells were used after subculturing for 130 days. Values and bars are means $\pm$ SD from six experiments.

性が高い W 1/HD 細胞を活性の低い W 2/LD 細胞の培養上清を用いて低頻度・高密度 (W 1, 6,500 cells/cm²) で 25 日間継代培養しても、細胞 (W 1/HD') の ALP 活性は低下することなく W 1/HD 細胞の酵素活性がそのまま保持されていた。また ALP 活性の低い W 2/LD 細胞を W 1/HD 細胞の培養上清を用いて高頻度・低密度 (W 2, 1,300 cells/cm²) で継代培養しても、細胞 (W 2/LD') の ALP 活性は増加することなく低い値で推移していた。これらの結果は、本実験で観察された ALP 活性の消失を伴う細胞の変化が、単に培養上清中に遊離してくる化学的に安定な液性因子によるものではない可能性を示している。

6. 放射線の ALP 活性に与える影響について

電離放射線を照射すると遺伝子が変異することから、MC 3 T 3-E 1 細胞の ALP 活性に及ぼす X 線の影響について調べた。その結果 Fig. 9 に示すように W 1/HD 細胞の ALP 活性は、2 Gy までの X 線の 1 回照射では対照群との間に有意な変化は認められなかった。しかし 6 Gy 以上の X 線照射では ALP 活性の低下が顕著に認められ、12 Gy の照射で約 40% 抑制された (Fig. 9)。このことから ALP 活性の消失は、少なくとも 1 回の照射では

Fig. 9 Effect of X-ray radiation on ALP activity levels in W 1/HD cells. The cells were exposed to various doses of radiation on culture day 2 and successively cultured for 4 days. ALP activity levels in the cells was measured as in Fig. 1. Values and bars are means $\pm$ SD of six experiments.

* Significantly different compared with nonradiation cells ($p < 0.01$).

大量の電離放射線に曝された時のみ確定的に生じることが強く示唆された。

考 察

1. 培養環境と ALP 活性について

ALP は、C 末端側でグリコシルホスファチジルイノシトールの修飾を受けて細胞表面に結合している脂質アンカー型タンパク質であり²¹⁻²³、細胞外のリン酸複合体の濃度を制御し、骨基質の石灰化に必要な酵素であると考えられている²⁴⁻²⁷。この酵素の分布については、腎臓、肝臓、小腸以外では硬組織およびその周辺組織に特異的に局在していることが組織学的に証明されている²⁸。またこの酵素は、マウス新生児頭蓋冠からクローニングされた骨芽細胞様細胞株 MC 3 T 3-E 1 にも活性が存在し、細胞の増殖、伸展に伴い顕著に増加することが知られている^{1,2}。細胞の分化や石灰化能は ALP 活性と密接に関連していることから、MC 3 T 3-E 1 細胞は骨芽細胞のモデルとして現在繁用されている。しかし、この細胞は容易に形質変化し¹⁰、高い ALP 活性を有している細胞系からきわめて低い活性しかない細胞系まで多種類存

在することが知られている¹¹⁾。そこで本研究では、MC 3 T 3-E 1 細胞に発現している ALP 活性に対する培養環境の影響について、継代条件を中心に検討した。

週 1 回と 2 回の植え継ぎで培養した MC 3 T 3-E 1 細胞の ALP 活性を比較してみると、週 1 回の継代では培養 20 日目に細胞の ALP 活性が有意に増加し、その後は高い酵素活性を保持した細胞集団 (W 1/HD) が形成された (Fig. 1)。これに対し週 2 回の継代で細胞培養すると、細胞 (W 2/HDa) の酵素活性は当初ほとんど変化せず、培養 100 日を経過したところで減少傾向が認められた。一方、この週 2 回の継代で培養していた細胞を途中で週 1 回の条件に代えて培養すると、この細胞 (W 2-W 1/HD) の ALP 活性は、培養 100 日以降でも W 2/HDa 細胞に比べ酵素活性が高いレベルで保持されていることが明らかになった。このことから MC 3 T 3-E 1 細胞の ALP 活性の保持には、細胞の植え継ぎ頻度を少なくすると有利であることが示唆された。

次に細胞の播種密度と ALP 活性との関連を調べたところ、高密度 (6,500 cells/cm²) で細胞を播種し長期間継代培養しても、細胞 (W 2/HDb) の ALP 活性は高い状態で保持されていたが、初めから低密度 (1,300 cells/cm²) で播種した場合 (W 2/LD) でも途中で低密度条件に切り替えた場合 (W 2/HD-LD) でも早期に活性が減少し、やがて消失してしまうことがわかった (Fig. 2)。これらの結果は、培養環境のなかでも継代条件すなわち細胞の植え継ぎ頻度ならびに播種密度がいずれも、MC 3 T 3-E 1 細胞の ALP 活性に影響していることを表している。またこうした現象は、MC 3 T 3-E 1 細胞を高頻度・低密度で継代することにより、ALP 活性の少ない増殖期の未分化細胞や変異により分化能を失った細胞が選択、維持されて生じたものと推察される。Yohay ら²⁷⁾は MC 3 T 3-E 1 細胞の培養に伴う ALP 活性の変化は、ALP の mRNA の発現量とよく相関していると報告している。またこの継代条件の変化に伴う ALP 活性の低下は、経時的に漸次生じていることから酵素分子の変化・修飾による活性抑制ではなく、恐らく細胞における酵素の発現量の低下を反映したものと考えられる。

一方、ALP 活性を失った W 2/LD と W 2/HD-LD の細胞は、いずれもコンフルエントな状態で MC 3 T 3-E 1 細胞に特徴的な数石状様の形態を示さず、コラーゲン様の線維成分を介した重層化も認められなかった。このことから ALP 活性を失った MC 3 T 3-E 1 細胞の形態や機能は、いずれも大きく変化してしまっていることがわかった (Fig. 3, 4)。

2. ALP 活性と Ca 蓄積について

一般に硬組織周辺の ALP は、有機物のリン酸エステルを加水分解し、遊離の無機リン酸を産生し、その結果リン酸カルシウム複合体による石灰化が進行すると考えられている^{17,25-27)}。Kodama ら²⁹⁾は、分化した MC 3 T 3-E 1 細胞では ALP 活性の増加に伴い細胞のカルシウム蓄積量が増え、この細胞に ALP の基質である β -グリセロリン酸を添加すると、石灰化がさらに促進されることをそれぞれ観察している。またラット頭蓋冠由来の細胞に ALP 活性の阻害剤であるレバミゾールを処理することで β -グリセロリン酸添加による石灰化が阻害されることも報告されている^{24,30)}。本研究においても、ALP 活性の高い W 1/HD、W 1-W 2/HD および W 2/HDb 細胞では、培養 7 日後 β -グリセロリン酸の添加によりカルシウムの顕著な蓄積が認められたが、酵素活性の低い W 2/HDa、W 2/LD および W 2/HD-LD 細胞ではカルシウムの蓄積はほとんど観察されなかった (Table 2)。またこれら細胞を 1 カ月以上培養後、自然石灰化の観察を行っても、結節形成および Ca の増量は全く認められなかった。したがって、骨芽細胞様細胞株 MC 3 T 3-E 1 における ALP 活性と石灰化能の間にはやはり密接な関連があり、細胞は高頻度・低密度の継代培養で ALP 活性のみならず、石灰化能も失ってしまうと考えられる。

3. 細胞増殖について

本研究において植え継ぎ頻度を少なく、播種密度を高くして培養した W 1/HD 細胞と高頻度・低密度の継代培養で ALP 活性を失った W 2/LD および W 2/HD-LD 細胞の増殖を生細胞数の計測で比較したところ、W 2/LD と W 2/HD-LD 細胞の倍加時間は ALP 活性が高い W 1/HD 細胞に比べて 2 分の 1 以下ときわめて短いことがわかった (Fig. 5)。クローニングされた MC 3 T 3-E 1 細胞であっても結節の形成は、細胞集団全体に様ではなく、局所的に生じるといわれている²⁾。また本研究においても細胞集団のフォンコッサ染色像でカルシウム沈着が均一でないことを観察している (Fig. 4)。これらの結果は、継代ごとに細胞集団中に増殖や分化程度、表現形質あるいは遺伝的性質が異なる細胞が生じ、これらが混在して培養されていることを表している³¹⁻³³⁾。本研究において、高頻度・低密度の継代により培養した細胞群 (W 2/LD、W 2/HD-LD) が短い集団倍加時間を示したのは、細胞集団の中で比較的倍加時間が短い細胞が、高頻度の植え継ぎにより選択、維持されたために生じたものと考えられる。また、いったん ALP 活性が低下した細胞群を一週間以上継続培養しても活性回復は認められ

なかった。したがって W 2/LD および W 2/HD-LD 細胞などは増殖は行うが分化能 (ALP 活性) をもっていない細胞群に変化してしまった可能性が考えられる。これに対して植え継ぎ頻度を少なくし、高密度で細胞を培養すると、Fig. 5 に示すように ALP 活性の高い細胞は、倍加時間が長いにもかかわらず、培養 3 日目以降になると ALP 活性の低い細胞群に比べ細胞数が増えることが認められた。これは ALP 活性の高い細胞群 (W 1/HD, W 2-W 1/HD) が、コラーゲンなどの細胞外マトリックスを形成することにより重層化し、ALP 活性の低い細胞に比べて優位に増加していくためではないかと考えられる。そして W 1/HD や W 2-W 1/HD 細胞のように 7 日間ごとに継代することで ALP 活性の高い細胞のみが選択・維持されたと推察される。したがってこれらは分化過程で ALP 活性が増加する骨芽細胞の特徴を保持した細胞群であると考えられる。また Spiess ら³⁴⁾が ROS 17/2.8 細胞からクローニングして ALP 活性の低い細胞系と高い細胞系を作成し、その細胞増殖を比較したところ、ALP 活性の低い細胞は ALP 活性の高い細胞に比べ倍加時間がきわめて短いことを報告しており、本研究結果とよく一致している。

これら細胞の DNA 生成能を³H-チミジンの取り込みで調べたところ、播種後 3 日目では ALP 活性の低い W 2/LD と W 2/HD-LD 細胞の DNA 生成能はいずれも ALP 活性の高い W 1/HD 細胞の 55% 以下にまで低下していた。この結果は、先の細胞数の計測実験で、培養 3 日目で W 2/LD, W 2/HD-LD 細胞がすでに増殖飽和していたのに対し、W 1/HD 細胞がまだ対数増殖期にあることと一致していた (Fig. 6)。

一方、¹⁴C-ロイシンの取り込みを指標にしたタンパク質生成能について調べたところ、ALP 活性のほとんど消失してしまった細胞は活性の高い細胞に比べタンパク質生成能が低く、ALP 活性が低下してから経過時間に依存してその生成能が減少することが示唆された (Fig. 7)。ALP 活性が低下してから期間が 48 日目の W 2/HD-LD 細胞では、W 1/HD 細胞に比べて ALP 活性がすでに 20 分の 1 以下であるにもかかわらず、タンパク質生成能は 90% 程度も保持されていた。これに対して活性が低下してから 83 日間経過した W 2/LD 細胞では、酵素活性は W 2/HD-LD 細胞と同程度であったが、タンパク質生成能は 60% 以下にまで減少していた。このように ALP 活性は、タンパク質生成能が有意に低下する前にすでに著しく減少してしまっていることから、培養環境の変化により最も早く消失してしまう細胞表現形質の一つと推察される。

腰原¹⁰⁾は MC 3 T 3-E 1 細胞を継代培養を続けると、細胞の倍加時間が 18 時間から 13 時間と短くなり、染色体数がマウス正常細胞の染色体数 42 本ではなく数にかなりの幅を生じることを報告している。われわれもまた ALP 活性の高い W 1/HD 細胞と活性の低い W 2/LD 細胞の染色体数を比較したところ、W 2/LD 細胞の染色体数は有意に 2 本減少 ($p < 0.001$, $df = 60$) していた。これらの結果は、高頻度・低密度の継代培養を行うことにより本来の MC 3 T 3-E 1 細胞の特性、すなわち高い ALP 活性、結節の形成、コラーゲン様の線維成分の生成能等を消失した変異細胞群が出現することと関連していると推察される。

4. 細胞内酵素について

GPI-アンカー型タンパク質であり、骨芽細胞の分化指標でもある ALP 活性は、培養環境の変化により細胞から速やかに消失してしまうことを明らかにした。そこで細胞に局在する他の代表的な酵素の活性についても測定したところ、ALP と同じく GPI-アンカー型タンパク質である 5'-ヌクレオチダーゼの活性³⁵⁾は、ALP 活性と同様に、形質変化した細胞では W 1/HD 細胞の 10 分の 1 以下にまで減少していた。しかし細胞内酵素のうち、可溶性酵素である LDH 活性には顕著な変化は認められず、しかも細胞内小胞に局在している β -グルクロニダーゼや ACP の活性は逆に両者とも ALP 活性の高い細胞に比べて低い細胞の方が 1.3—1.9 倍有意に増加していることが明らかになった (Table 3)。Leis ら¹¹⁾は ALP 活性の高い MC 3 T 3-E 1 細胞と ALP 活性の低い MC 3 T 3-E 1 細胞ではブラジキニンレセプターの mRNA の発現に明らかな差があることを、また副甲状腺ホルモン、プロスタグランジン E₁, E₂ に対するサイクリック AMP 応答にも差があることを報告している。これらのことから、培養環境の変化は、MC 3 T 3-E 1 細胞表面の GPI-アンカー型タンパク質のみならず細胞膜上のレセプターの発現にも影響をおよぼしている可能性が考えられる。

5. 細胞が放出する液性因子の影響について

骨芽細胞の分化過程にはシグナル因子として bone morphogenetic proteins, transforming growth factor- β , insuline-like growth factors, interleukins, 副甲状腺ホルモン他多くの因子が paracrine あるいは autocrine によって分化を制御していることが明らかにされている^{36,37)}。本研究では MC 3 T 3-E 1 細胞の ALP 活性の消失が、細胞から放出される液性因子によって誘発される可能性を、ALP 活性の高い細胞の培養上清と ALP

活性の低い細胞の培養上清を相互に置き換え長期間培養することによって検討した。しかし培養上清を培養溶液として異なった細胞系に使用しても、各々の細胞の継代条件を変えないで培養すると、細胞の ALP 活性に有意な変化は認められなかった (Fig. 8)。このことから少なくとも変異した細胞から ALP 活性の消失を誘導するような比較的半減期の長い液性因子が培地中に放出されている可能性は少ないと考えられる。しかし本実験系では 10%FCS を添加した培養液であるため、FCS に含まれる因子により、細胞から放出される物質の効果がコントロールされている可能性も考えられる。また細胞同士の接着による情報伝達³⁸⁾も考えられるが、この点についてはまだ明らかにしていない。

6. 放射線の影響について

電離放射線によって培養細胞が変異することはよく知られている³⁹⁾。本研究においても MC 3 T 3-E 1 細胞の ALP 活性の消失が放射線によって誘発される可能性を検討したところ、X 線の 1 回照射では 2 Gy までは ALP の比活性にほとんど変化は認められなかった (Fig. 9)。Dare ら⁴⁰⁾は、ラット由来骨芽細胞株 ROB 細胞と MC 3 T 3-E 1 細胞において、0.4 Gy までの放射線照射では ALP 活性の低下は認められず、4 Gy 以上の放射線を照射することで初めて活性に変化が認められたことを報告している。また Matsumura ら⁴¹⁾も MC 3 T 3-E 1 細胞において 1 Gy の放射線照射では対照群との間に ALP 活性に有意差がないことを報告している。これらの結果から、本研究で観察した ALP 活性の消失は、自然放射線のような低い線量の範囲 (約 0.2 μ Sv/h) で定量的に生じたものでないと考えられる。しかし、MC 3 T 3-E 1 細胞においても自然放射線により通常発生する程度の遺伝子の突然変異は生じていると考えられる。

マイコプラズマの感染についての結果を示していないが、ALP 活性の高い細胞も低い細胞も *Mycoplasma hyopneumoniae* をはじめとする 10 種類のマイコプラズマ属の感染は陰性であった。

以上の結果から MC 3 T 3-E 1 細胞の ALP 活性の消失は、細胞由来の液性因子、放射線、細菌感染等の外的因子によって引き起こされたのではなく、おそらく培養中に生じる染色体の組み替え、欠失、消失などマクロな染色体の変化により誘発された変異細胞が、高頻度・低密度の培養により選択、維持された結果生じたものと考えられる。また、本研究により MC 3 T 3-E 1 細胞を低頻度・高密度の細胞条件で培養することにより、細胞の ALP 活性が高く保持されることも明らかになった。

結 論

本研究は MC 3 T 3-E 1 の ALP 活性と培養環境、すなわち細胞の継代頻度、播種密度、培養上清中の液性因子、電離放射線等について検索した。また ALP 活性を失った細胞については石灰化能のみならず細胞増殖・タンパク質生成能、各種酵素活性についても ALP 活性の高い細胞と比較検討した。

1. 細胞の ALP 活性は、低頻度・高密度 (週 1 回, 6,500 cells/cm²) の継代培養を行うことで長期間高い状態に保持され、高頻度・高密度 (週 2 回, 6,500 cells/cm²) で一定期間培養後には ALP 活性の低いものも認められた。さらに高頻度・低密度 (週 2 回, 1,300 cells/cm²) の培養では培養条件変更後ただちに酵素活性が消失してしまった。

2. ALP 活性の失われた細胞のカルシウム蓄積は、原子吸光分析、フォンコッサ染色により ALP 活性の高い細胞に比べきわめて低いことが明らかになった。

3. ALP 活性の失われた細胞の集団倍加時間はもとの細胞に比べて短く、タンパク質生成能も有意に低かった。これらの傾向は ALP 活性が低下し始めてからの経過時間に依存して強くなった。

4. 形質変化した細胞の GPI-アンカー型酵素は ALP 活性だけではなく 5'-ヌクレオチダーゼ活性も顕著に減少していた。細胞内可溶性酵素である LDH 活性は両細胞間で有意な差が認められなかった。これに対しリソソーム酵素である β -グルクロニダーゼおよび ACP の活性は、いずれも ALP 活性の高い細胞に比べてむしろ増加していた。

5. MC 3 T 3-E 1 細胞における ALP 活性の消失は、細胞から放出される化学的に安定な液性因子による可能性は低く、また放射線が直接の原因となって生じたものではなかった。

以上の結果から MC 3 T 3-E 1 細胞は高頻度・低密度の播種による継代培養を行うと、優先的に ALP や 5'-ヌクレオチダーゼ等 GPI-アンカー型酵素の活性と石灰化能を失う形質変化を生じることが明らかとなった。これは細胞培養時に複数の外的因子によりに生じた変異が、高頻度・低密度培養により選択維持されたために生じるものと考えられる。

本研究の要旨の一部は第 46 回日本口腔衛生学会総会 (平成 9 年 10 月、鹿児島) において発表した。

文 献

- 1) Kodama, H., Amagai, Y., Sudo, H., Kasai, S. and Yamamoto, S. : Establishment of a clonal osteogenic cell line from new born mouse calvaria. *Jpn. J. Oral Biol.* **23** : 899-901, 1981.
- 2) Sudo, H., Kodama, H., Amagai, Y., Yamamoto, S. and Kasai, S. : In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J. Cell Biol.* **96** : 191-198, 1983.
- 3) Kumegawa, M., Ikeda, E., Tanaka, S., Haneji, T., Yora, T., Sakagishi, Y., Minami, N. and Hiramatsu, M. : The effects of prostaglandin E₂, parathyroid hormone, 1,25 dihydroxycholecalciferol, and cyclic nucleotide analogs on alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells. *Calcif. Tissue Int.* **36** : 72-76, 1984.
- 4) Hanazawa, S., Ohmori, Y., Amano, S., Miyoshi, T., Kumegawa, M. and Kitano, S. : Spontaneous production of interleukin-1-like cytokine from a mouse osteoblastic cell line (MC 3 T 3-E 1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **131** : 774-779, 1985.
- 5) Hakeda, Y., Yoshino, T., Natakani, Y., Kurihara, N., Maeda, N. and Kumegawa, M. : Prostaglandin E₂ stimulates DNA synthesis by a cyclic AMP-independent pathway in osteoblastic clone MC 3 T 3-E 1 cells. *J. Cell. Physiol.* **128** : 155-161, 1986.
- 6) Horowitz, M. C., Coleman, D. L., Ryaby, J. T. and Einhorn, T. A. : Osteotropic agents induce the differential secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by the osteoblast cell line MC 3 T 3-E 1. *J. Bone Miner. Res.* **4** : 911-921, 1989.
- 7) Quarles, L. D., Yohay, D. A., Lever, L. W., Caton, R. and Wenstrup, R. J. : Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC 3 T 3-E 1 cells in culture : An in vitro model of osteoblast development. *J. Bone Miner. Res.* **7** : 683-692, 1992.
- 8) Quarles, L. D., Haupt, D. M., Davidai, G. and Middleton, J. P. : Prostaglandin F₂ α induced mitogenesis in MC 3 T 3-E 1 osteoblasts : Role of protein kinase-C-mediated tyrosine phosphorylation. *Endocrinology* **132** : 1505-1513, 1993.
- 9) 加治和彦 : 培養環境. 組織培養 **15** : 36-39, 1989.
- 10) 腰原康子 : 骨代謝細胞培養系の確立と応用. 日本臨床 **56** : 1447-1453, 1998.
- 11) Leis, H. J., Hulla, W., Gruber, R., Huber, E., Zach, D., Gleispach, H. and Windischhofer, W. : Phenotypic heterogeneity of osteoblast-like MC 3 T 3-E 1 cells : Changes of bradykinin-induced prostaglandin E₂ production during osteoblast maturation. *J. Bone Miner. Res.* **12** : 541-551, 1997.
- 12) Bessey, O. A., Lowry, O. H. and Brock, M. J. : A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* **164** : 321-329, 1946.
- 13) Widnell, C. C. : Purification of rat liver 5'-nucleotidase as a complex with sphingomyelin. *Methods Enzymol.* **32** : 368-374, 1974.
- 14) Hashimoto, S., Shibata, S. and Kobayashi, B. : Dependence of platelet adenyl cyclase system on oxidation phosphorylation. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **34** : 42-49, 1975.
- 15) Babson, A. L. and Phillips, G. E. : A rapid colorimetric assay for serum lactic dehydrogenase. *Clin. Chim. Acta.* **12** : 210-215, 1965.
- 16) Stahl, P. D. and Touster, O. : β -Glucuronidase of rat liver lysosomes. Purification, properties, subunits. *J. Biol. Chem.* **246** : 5398-5406, 1971.
- 17) Chung, C. H., Golub, E. E., Forbes, E., Takuoka, T. and Shapiro, I. M. : Mechanism of action of β -glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif. Tissue Int.* **51** : 305-311, 1992.
- 18) 小川浩美, 篠田 宏 : 組織内無機質の染色, カラー版染色法のすべて, 月刊 MEDICAL TECHNOLOGY 別冊. 第1版, 94-99, 医歯薬出版, 東京, 1988.
- 19) Smith, J. B. : Aluminium ions stimulate DNA synthesis in quiescent cultures of Swiss 3 T 3 and 3 T 6 cells. *J. Cell. Physiol.* **118** : 298-304, 1984.
- 20) Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeker, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. : Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150** : 76-85, 1985.
- 21) Low, M. G. and Zilversmit, D. B. : Role of phosphatidylinositol in attachment of alkaline phosphatase to membranes. *Biochemistry* **19** : 3913-3918, 1980.
- 22) Ogata, S., Hayashi, Y., Takami, N. and Ikehara, Y. : Chemical characterization of the membrane-anchoring domain of human placental alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.* **263** : 10489-10494, 1988.
- 23) Harrison, G., Shapiro, I. M. and Golub, E. E. : The phosphatidylinositol-glycolipid anchor on alkaline phosphatase facilitates mineralization initiation in vitro. *J. Bone Miner. Res.* **10** : 568-573, 1995.

- 24) Tenenbaum, H. C. : Levamisol and inorganic pyrophosphate inhibit β -glycerophosphate induced mineralization of bone formed in vitro. *Bone Miner.* **3** : 13—26, 1987.
- 25) Bellows, C. G., Aubin, J. E. and Heersche, J. N. M. : Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro : The role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner.* **14** : 27—40, 1991.
- 26) Anagnostou, F., Plas, C., Nefussi, J. R. and Forest, N. : Role of β -GP-derived Pi in mineralization via ecto-alkaline phosphatase in cultured fetal calvaria cells. *J. Cell. Biochem.* **62** : 262—274, 1996.
- 27) Yohay, D. A., Zhang, J., Thrailkill, K. M., Arthur, J. M. and Quarles, L. D. : Role of serum in the developmental expression of alkaline phosphatase in MC 3 T 3-E 1 osteoblasts. *J. Cell. Physiol.* **158** : 467—475, 1994.
- 28) Robinson, R. : The possible significance of hexose-phosphoric esters in ossification. *Biochem. J.* **17** : 286—293, 1923.
- 29) Kodama, H., Amagai, Y., Sudo, H., Ohno, T. and Iijima, K. : Culture conditions affecting differentiation and calcification in the MC 3 T 3-E 1 osteogenic cell line. In : *Cell mediated calcification and matrix vesicles.* (edited by S. Yousuf Ali), pp. 297—302, EXCERPTA MEDICA, Amsterdam, 1986.
- 30) Bellows, C. G., Heersche, J. N. M. and Aubin, J. E. : Inorganic phosphate added exogenously or released from β -glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules in vitro. *Bone Miner.* **17** : 15—29, 1992.
- 31) Manduca, P., Sanguineti, C., Pistone, M., Boccignone, E., Sanguineti, F., Santolini, F. and Federici, A. : Differential expression of alkaline phosphatase in clones of human osteoblast-like cells. *J. Bone Miner. Res.* **8** : 291—300, 1993.
- 32) Grigoriadis, A. E., Petkovich, P. M., Ber, R., Aubin, J. E. and Heersche, J. N. : Subclone heterogeneity in a clonally-derived osteoblast-like cell line. *Bone* **6** : 249—256, 1985.
- 33) Aronow, M. A., Gerstenfeld, L. C., Owen, T. A., Tassinari, M. S., Stein, G. S. and Lian, J. B. : Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *J. Cell. Physiol.* **143** : 213—221, 1990.
- 34) Spiess, Y. H., Price, P. A., Deftos, J. L. and Manolagas, S. C. : Phenotype-associated changes in the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on alkaline phosphatase and bone GLA-protein of rat osteoblastic cells. *Endocrinology* **118** : 1340—1346, 1986.
- 35) Taguchi, R., Hamakawa, N., Harada-Nishida, M., Fukui, T., Nojima, K. and Ikezawa, H. : Microheterogeneity in glycosylphosphatidylinositol anchor structures of bovine liver 5'-nucleotidase. *Biochemistry* **33** : 1017—1022, 1994.
- 36) Sakou, T. : Bone morphogenetic proteins : From basic studies to clinical approaches. *Bone* **22** : 591—603, 1998.
- 37) Jilka, R. L. : Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency : A 1998 update. *Bone* **23** : 75—81, 1998.
- 38) Schiller, P. C., Roos, B. A. and Howard, G. A. : Parathyroid hormone up-regulation of connexin 43 gene expression in osteoblasts depends on cell phenotype. *J. Bone Miner. Res.* **12** : 2005—2013, 1997.
- 39) König, F. and Kiefer, J. : Lack of dose-rate effect for mutation induction by γ -rays in human TK₆ cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **54** : 891—897, 1988.
- 40) Dare, A., Hachisu, R., Yamaguchi, A., Yokose, S., Yoshiki, S. and Okano, T. : Effects of ionizing radiation on proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. *J. Dent. Res.* **76** : 658—664, 1997.
- 41) Matsumura, S., Jikko, A., Hiranuma, H., Deguchi, A. and Fuchihata, H. : Effect of X-ray irradiation on proliferation and differentiation of osteoblast. *Calcif. Tissue Int.* **59** : 307—308, 1996.