力学的刺激の負荷による骨芽細胞様細胞内 Ca^{2+} 反応

宮本裕一, 田中茂雄, 西坂 剛

北陸先端科学技術大学院大学 材料科学研究科

Changes of Intracellular Ca^{2+} in Osteoblast-like Cells Applied by Mechanical Stimulation

Yuuichi MIYAMOTO, Shigeo TANAKA, Tsuyoshi NISHISAKA

Department of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology

Abstract

It is well-known that the mechanical stimulation influence the bone metabolism. However, the relationship between bone metabolism and the mechanical stimulation are still uncertain. The bone formation and absorption has been performed by bone-cells. Therefore, it is necessary to discuss cellular and molecular levels. Exploring the effect of mechanical stimulation in the intracellular Ca^{2+} response of osteoblast-like cells, we developed the experimental apparatus which applied mechanical stimulation to osteoblast-like cells. The main part of the apparatus is composed of piezoceramics and pulse generator.

The cells were cultured for four days in culture dish, and it was dyed by fluorescent indicators for intracellular Ca^{2+} . This sample was fitted on the apparatus using coupling medium. The variation of intracellular Ca^{2+} concentration was evaluated by fluorescence intensity using the confocal laser scanning microscopy.

The result revealed that the intracellular Ca^{2+} concentration of osteoblast-like cells were risen by cyclic pulse stimulation. It suggested that osteoblast-like cells detected the mechanical stimulation, and use it to regulate the function-expression.

1・緒言

スポーツ選手の骨の肥大化や宇宙飛行士の骨塩量の減少などに見られるように、力学的刺激は骨の形成・吸収に大きな影響を与えていることは良く知ら

れている。しかしながら、力学的刺激に対する骨の反応メカニズムは、未だ明らかにされていない。骨の形成や吸収は骨の細胞活動によって行われていることから、骨に対する力学的刺激の影響を詳細に解

明するためには細胞レベルでの検討が必要である。力学的刺激の骨芽細胞への影響は多くの研究により調べられているものの^{(1),(2)}、十分解明されているとは言えない。

細胞には情報伝達系が存在し、 Ca^{2+} は、細胞内小器官に情報を伝達する代表的なセカンドメッセンジャーである。近年、各種機能細胞の細胞内遊離 Ca^{2+} を観測することで、外的刺激が細胞に与える影響評価が行われている^{(3),(4)}。

ここでは、ピエゾセラミックスにより得られた周期的なパルス振動が、骨芽細胞様細胞に与える影響を評価するため、細胞内遊離 Ca^{2+} の濃度変化を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

2. 試料および実験方法

試料としてマウス頭蓋冠由来の骨原生細胞株 MC3T3-E1 を用いた。これを培養ディッシュ (テルモ (株), ペトレイ®, 35m/m) に 5×10^6 個播種し、37℃、湿度95%、5% CO_2 -95%air のインキュベータ内で4日間培養した。培養液は α -MEM (10% FBS, 抗生物質含む) を用いた。

Ca^{2+} 感受性色素の細胞への負荷は、Fluo3-AM の濃度を $6.6 \mu\text{M}$ に調整した培養液に交換し、30分間インキュベートすることで行った。

このような観察試料を90分間にわたり、10分ごとに共焦点レーザー顕微鏡 (BIORAD, MRC1000) を用いて観察した。観察開始後、30分から60分にかけて、図1に示されるような PZT (トーキン (株), Lot No. N21-1220) とパルスジェネレータ (日本光電 (株), Model SEN-1101) から構成される振動負

荷装置を用いて、周期 500ms のパルス振動を負荷した。なお、観察域でのひずみは、ひずみゲージ (ゲージ長1mm) を用いて測定した結果、 $20 \mu\text{strain}$ 生じていた。また、 Ca^{2+} 濃度の変化は、観察像の蛍光強度により評価した。

3. 結果

図2は細胞内遊離 Ca^{2+} を示した共焦点レーザー顕微鏡像であり、その蛍光強度が、 Ca^{2+} 濃度に対応している。パルス振動を負荷していない 0 ~ 30分においては、 Ca^{2+} 濃度にほとんど変化は見られなかった。しかし、パルス振動を負荷した 30分 ~ 60分にかけて、わずかながら濃度の上昇が見られ、振動を停止した後も、さらに濃度の上昇が確認できた。

図3に蛍光強度から求めた観察細胞群の Ca^{2+} 濃度の経時変化を示す。無負荷状態の 0 ~ 30分にかけては、数%の変動は伴うものの、ほぼ、濃度は一定していた。しかし、パルス振動の負荷とともに、カルシウムイオン濃度は 10%以上の上昇を示し、振動停止後もさらに上昇を続け、最終的には当初の 30%以上の濃度上昇があることが確認できた。

4. 考察

本実験結果より、表面ひずみ約 $20 \mu\text{strain}$ 程度を発生させるパルス振動の負荷は MC3T3-E1 細胞の細胞内遊離カルシウムイオン濃度の上昇を引き起こした。また、無負荷から振動負荷、振動停止それぞれの状態への移行期において、 Ca^{2+} 濃度の上昇の傾きが明らかに変化していることから、細胞は刺激の変化を認識していると思われる。このことは骨芽細

Fig.1 A schematic diagram of the experimental apparatus

Fig.2 Confocal laser scanning microscopic images of intracellular Ca^{2+} in MC3T3-E1 cells

胞様細胞において力学的刺激の検知機構が存在することを示すと同時に、力学的刺激が細胞の機能発現に有効な因子であることを示唆するものである。

Fig.3 Changes of intracellular Ca^{2+} concentration of MC3T3-E1 cells by mechanical stimulation
(Values are means $\pm$ SD from six cells)

文献

- (1) Harell, A., Dekel, S. and Binderman, I.,
Biochemical Effect of Mechanical Stress on
Cultured Bone Cells: Cal. Tiss. Res, 22
(1977), 202.
- (2) 牛田多加志, 立石哲也, 高重力負荷に対する
骨原生細胞の活性化: 日本臨床バイオメカニ
クス学会誌, 15 (1994), 85.
- (3) Yui, N., Kataoka, K., Fujishima, Y., Aoki, K.,
Sanui, K., Ogata, N., Change in cytoplasmic
free Ca^{2+} concentration in rabbit platelets
contacting with alubumin coated and uncoated
polystyrene surfaces: Biomaterials, 10 (1989),
309.
- (4) Ando, J., Ohtsuka, A., Korenaga, R.,
Kawamura, T., Kamiya, A., Wall shear stress
rather than shear rate regulates cytoplasmic
 Ca^{2+} responses to flow in vascular endothelial
cells: Biochemical and Biophysical research
communications, 190 (1993), 716.