原	著
---	---

骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞の移動, 増殖 および機能に及ぼす高重力の影響

中 島 亨

東京医科歯科大学歯学部歯科理工学第2講座 (指導: 佐藤温重教授)

(1991年3月20日 受付)

Effects of Hypergravity on Migration, Proliferation and Function of Mouse Osteoblastic Cell Line MC3T3-E1

Tohru Nakajima

Department of Biomaterials Science, Faculty of Dentistry

Tokyo Medical and Dental University

(Director : Prof. Atsushige Sato)

The purpose of this study was to investigate the hypergravity-induced responses and their mediators of osteoblastic cell line, MC3T3-E1. The synchronized G₁ or the S Phase cells were exposed to 5 and 18×g hypergravity at 37°C. The migration velocity was measured and the morphology was observed. MC3T3-E1 cells were cultured for 1, 2 or 3 days at 37°C, exposing to 5, 10, 20 and 40×g hypergravity. The proliferation, prostaglandin E₂ (PGE₂) production rate and alkaline phosphatase (ALPase) activity were measured. The results were as follows :

- 1) In the G₁ phase of the cell cycle, the migration of MC3T3-E1 cells was increased by 18×g. In the S phase, the morphology altered depending on the g-stress.
- 2) The proliferation of MC3T3-E1 cells was enhanced at 20 and 40×g but reduced at 10×g. The proliferation of HeLa cells and JTC-12 cells was also enhanced at 40×g.
- 3) Indomethacin (10⁻⁵M) reduced the proliferation of MC3T3-E1 cells induced by 40×g. But indomethacin (10⁻⁵M) did not reduce the proliferation of HeLa cells.
- 4) The increase of the released PGE₂ from the cells depended on the time (1-8h) and the gravity (1-40×g).
- 5) The increase of the ALPase activity of MC3T3-E1 cells also depended on the gravity.

These results suggest that the hypergravity enhanced the proliferation of MC3T3-E1 cells via PGE₂-mediated mechanism.

I. 緒 言

骨の形成ならびに吸収に機械的刺激が影響することは, 100年前から注目されている^{1,2)}。機械的刺激のない, すなわち荷重が負荷されていない状態では, 骨は正常に機能しない。宇宙飛行士の

踵骨などの荷重骨は, 宇宙飛行により骨密度が10%前後減少する³⁾。また長期臥床患者の脊椎骨も荷重負荷されないためにCa量が減少する⁴⁾。さらに粉末試料を水で練った練試料で飼育したマウスは, 固型試料で飼育したマウスに比較して咬筋重量と下顎枝高が減少する⁵⁾。このような荷重

骨における無荷重の影響は、宇宙実験室の微少重力下で飼育されたラットについても報告されている⁶⁾。また地上でラットの尾を懸垂し、前肢のみが荷重され後肢は非荷重として飼育すると、脛骨と腰椎骨では Ca 量が減少するが、非荷重骨の下顎骨や荷重骨の上腕骨で変化はなかった⁷⁾。

一方、骨組織に対する荷重の影響として代表的なものに、歯科矯正における矯正力に伴う歯槽骨組織の改造がある⁸⁾。

荷重負荷等の機械的刺激に対する骨組織の細胞の応答の機序について、Thompson ら⁹⁾は非荷重によってラット骨の破骨細胞数、骨吸収面が増加し、それらの変化は prostaglandin (以下 PGs) 合成阻害剤である indomethacin (以下 IND) により阻止されるが、非荷重による骨形成抑制には影響しないことを明らかにした。Somjen ら¹⁰⁾は頭蓋冠由来骨芽細胞を播種した培養皿を变形する方法によって機械的刺激を加えると、prostaglandin E_2 (以下 PGE_2) が増加し、それに伴い cyclic AMP が増加すること、さらに PGE_2 により頭蓋冠由来細胞の DNA 合成が促進することを明らかにした。また矯正力を付与した歯周組織における、歯の移動初期の歯根膜圧迫側での骨吸収に関与する主要な PGE 産生細胞は、内皮細胞および線維芽細胞であることが免疫組織学的手法を用いて示されている¹¹⁾。

一方、Tschopp ら¹²⁾は HeLa 細胞、鶏胚線維芽細胞、sarcoma Galliera cells, Friend leukemia virus により形質転換した細胞、さらにヒトリンパ球など、骨の細胞以外の細胞においても高重力を負荷することにより、細胞増殖が促進されると報告した。また Kumei ら¹³⁾は HeLa 細胞を遠心培養法により $15\sim 70\times g$ の適度の高重力を与えると、細胞増殖が促進されるが、それは高重力負荷 15分後と短時間に *c-myc* 遺伝子発現が誘導されるためであることを報告した。さらに培養細胞の運動、移動に対する高重力の影響について報告されている¹²⁾。

このような荷重あるいは無荷重は骨組織のみならず、筋肉組織の成長、神経-筋シナプス形成に

も影響を与えることが知られており¹⁴⁾、機械的刺激は生体にとって重要であるが、その機序は現在十分明らかにされていない。

そこで本研究では、機械的刺激として高重力に注目し、新生マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞を用いて、高重力に対する応答と応答を媒介する物質を検索する目的で、1) MC3T3-E1 細胞の移動および形態に及ぼす高重力の影響、2) MC3T3-E1 細胞の増殖および alkaline phosphatase (以下 ALPase) 活性に及ぼす高重力の影響、さらに 3) MC3T3-E1 細胞の PGE_2 産生に及ぼす高重力の影響について検討した。また骨芽細胞における反応の特異性を明らかにするため、子宮頸部癌由来細胞、サル腎尿管由来細胞についても同様の検討を行った。

II. 実験材料および実験方法

1. 培養細胞および培地

細胞は新生マウス頭蓋冠由来 MC3T3-E1 細胞¹⁵⁾、ヒト子宮頸部癌由来 HeLa 細胞およびサル腎尿管由来 JTC-12 細胞¹⁶⁾の 3 種を用いた。MC3T3-E1 細胞の培養には alpha modification of Eagle's medium (Flow) を、HeLa 細胞には Eagle's minimum essential medium (日水製薬) を、JTC-12 細胞には DM-160 培地 (極東製薬) を用い、それぞれの培地にウシ胎仔血清 (Flow) を 5% 添加し、20 mM HEPES (HEPES 0.5 Na salt, Research Organics Inc.) および 0.1% $NaHCO_3$ で pH 7.3 となるように調整した。

2. 高重力負荷

150~500 rpm の低回転域で回転が安定するように改造したスイングロータ式卓上遠心機 (久保田商事) をふ卵器中にセットし、37℃、5~40×g (170~460 rpm) で遠心培養することにより高重力を細胞に負荷した。遠心培養は細胞を播種した培養容器底面を下にして行った。

実験1 細胞移動に及ぼす高重力の影響

M期同調細胞を得るために、MC3T3-E1 細胞を 1×10^6 個/10 ml を 75 cm² 培養フラスコ (Falcon 3084) に播種し、37℃のふ卵器で72時間静置培養

し、Terasima ら¹⁷⁾の方法によりM期の細胞を採取した。採取したM期細胞を位置確認用の印をつけた 25 cm² 培養フラスコ (Falcon 3013) に 5 × 10³個/5 ml 播種し、37℃ のふ卵器で 2 時間および10時間静置培養してそれぞれ G₁ 期、S 期に達した同調細胞を得た。それらの各期細胞を 5 および18×g で 8 時間遠心培養し、この間 2 時間ごとに同一視野の細胞を位相差顕微鏡 (=コン Diaphot-TMD) にて形態観察し、また写真撮影した。対照群として 1 × g (非遠心培養) でも同様の実験を行い、実験群、対照群それぞれ 100 個の細胞について各 2 時間の核の位置の移動距離を写真上で計測した。得られた値を 1 × g 対照群に対する相対値 (%) で表した。なお実験開始 0 時はM期細胞の播種時とした。

また移動量を計測した細胞の軌跡を大きくある 1 方向に直線的に移動する直進型、もとの位置に戻る円型、ジグザグに移動するジグザグ型の三つのパターンに分類し、細胞移動の軌跡に及ぼす影響も検討した。

実験2 増殖に対する高重力の影響

MC3T3-E1 細胞を 6 ウェルマルチプレート (Falcon 3046) に 1 × 10⁴個/ウェルとなるように播種し、37℃, 100%湿度, 5% CO₂-95%空気下で静置培養した。24時間後、厚さ0.5 mm のシリコンシートを用いプレートを密閉し、5, 10, 20, 40×g で72時間遠心培養を行った。培養終了後ただちに1,000 U/ml trypsin (Sigma), 0.02% ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (第一化学薬品)を含む Dulbecco の Ca, Mg 不含リン酸緩衝塩類溶液 (以下 PBS (-)) で細胞を剥離した。5 分後、1,500 U/ml trypsin inhibitor (Sigma) 含有 PBS(-) で trypsin を失活させ、ウェル中の細胞数を Coulter Counter® (Coulter Electronics Inc. Model-ZM) で計測した。得られた値を 1 × g 対照群の平均値を 100 とした相対値 (%) に換算した。

実験3 conditioned medium の MC3T3-E1 細胞の増殖に対する影響

実験2と同様に MC3T3-E1 細胞を播種し、24

時間の静置培養を行い、培地交換後、さらに40×g で24時間遠心培養した。遠心培養終了時に培地を採取し40×g 群の conditioned medium とした。1 × g 対照群の conditioned medium も同様に作成した。あらかじめ実験2と同様にMC3T3-E1 細胞を播種し、24時間静置培養した細胞の培地をそれぞれの conditioned medium と交換し、48時間静置培養を行った。培養終了後、ただちに実験2と同様に細胞数を計測した。

実験4 細胞の増殖に及ぼす indomethacin の影響

MC3T3-E1 細胞、HeLa 細胞、および JTC-12 細胞を実験2と同様にそれぞれ 6 ウェルマルチプレート中に播種し、24時間静置培養後、IND 10⁻⁵M を含む培地に交換し、40×g, 48時間の遠心培養した。培養終了後、実験2と同様の方法で細胞数を計測した。得られた値を対照群の 1 × g, IND (-) の平均値に対する相対増殖率 (%) を求めた。

実験5 MC3T3-E1 細胞の PGE₂ 産生に及ぼす高重力の影響

MC3T3-E1 細胞を 3 × 10⁴個/ウェルで 6 ウェルマルチプレート中に播種し、実験2と同様の方法で48時間の静置培養後、1, 3, 8 および24時間40×g で遠心培養した。各時間の培養後、培地を採取し4℃, 500×g で5分間遠心後の上清中の PGE₂ を Prostaglandin E₂ [¹²⁵I]-RIA Kit (NEN) を用い、radioimmunoassay 法で定量した。また MC3T3-E1 細胞を 5, 10, 20 および 40×g で 8 時間の遠心培養を行い、各培地中の PGE₂ の定量した。

実験6 MC3T3-E1 細胞の ALPase 活性に対する高重力の影響

MC3T3-E1 細胞を 6 ウェルマルチプレートに 1 × 10⁵個/ウェルで播種し、3 日ごとに培地交換して37℃, 100%湿度, 5% CO₂-95%空気 で 7 日間静置培養した。その後、実験2と同様に密閉し、48時間の遠心培養を行った。遠心培養後、各ウェルを PBS(-) で 3 回洗浄し、cell scraper にて細胞を剥離して採取し、800×g, 5 分間遠心

後上清を除去した。得られたペレットに 1 mM $MgCl_2$, 0.1% Triton X-100 含有 10 mM tris (hydroxymethyl) aminomethane-HCl (pH 7.4) 緩衝液を 250 μ l 加え、超音波粉碎装置 (コスモバイオ Bioruptor UCD-200) で 45 秒間細胞を粉碎し、ALPase 活性測定用試料とした。ALPase 活性の測定にはアルカリ性ホスファテース K-テストワコー (和光純薬) を用い、分光光度計 (島津製作所 UV-240) で波長 500 nm における吸光度を測定した。また同じ試料を用い DNA 量を定量した。DNA 定量は Johnson-Wint らの方法¹⁸⁾に準じ、試料 25 μ l に 40 mg/ml の 3, 5-diaminobenzoic acid (Nakarai tesque) 100 μ l を加えて 60°C, 30 分間反応させた後、1N HCl を 2 ml 加え、蛍光分光光度計 (日立製作所 F-2000) を用い、励起波長 410 nm, 蛍光波長 500 nm での蛍光を測定し、標準試料の測定値より細胞の DNA 量を算出した。DNA 標準試料には、牛胸腺 DNA (Boehringer Mannheim) を用いた。ALPase 活性は DNA 1 μ g で 1 分間あたりに生成される phenol 量 (nmol) で表した。得られた値は 1 $\times$ g 群の平均値に対する相対値 (%) で表した。

実験 7 MC3T3-E1 細胞, HeLa 細胞および JTC-12 細胞の PGE_2 産生能

実験 4 で MC3T3-E1 細胞, HeLa 細胞, JTC-12 細胞を培養した培地中の PGE_2 を実験 5 と同様に定量した。MC3T3-E1 細胞については、実験 4 および実験 6 の growth 期および confluent 期の細胞の培地中の PGE_2 を定量した。

3. 統計処理

実験 1 では各群例数 100, 実験 2 より実験 7 ではすべて各群例数 5 とし、Student の t 検定により有意差検定を行った。

Ⅲ. 結 果

1. MC3T3-E1 細胞の移動に及ぼす高重力の影響

1) MC3T3-E1 細胞の移動量

MC3T3-E1 細胞の細胞周期の各期での移動量と重力の関係を検討するため、M 期細胞を採取し、 G_1 期および S 期に達した細胞について移動量

に及ぼす高重力の影響を検討した。MC3T3-E1 細胞は形態を変化させながら移動した (図 1)。

1 $\times$ g 対照群の MC3T3-E1 細胞の G_1 期の初期における 2 時間あたりの G_1 期の移動量は、18.2 μ m であり、細胞周期の進行に伴い徐々に増加し、 G_1 期後期 (M 期より 8~10 時間後) でプラトーとなった。S 期における MC3T3-E1 細胞の移動量はほぼ一定で、 G_1 期後期 (M 期より 8~10 時間後) とほぼ同じであったが、S 期後期 (M 期より 16~18 時間後) では若干減少した (図 2)。この傾向は 5 $\times$ g および 18 $\times$ g 高重力下培養群でも対照群と同様で、 G_1 期の進行に従って移動量が増加し、S 期でプラトーになった。 G_1 期での MC3T3-E1 細胞の 1 $\times$ g 群の平均移動量は、26.9 μ m/2hr であった。5 $\times$ g 群の平均移動量と 1 $\times$ g 群のそれとは有意差が認められなかった。18 $\times$ g 群の平均移動量は 31.2 μ m/2hr であり、1 $\times$ g 群の 116 % で有意に増加した。S 期の MC3T3-E1 細胞の 1 $\times$ g 群の平均移動量は 32.4 μ m/2hr であった。18 $\times$ g 群および 5 $\times$ g 群の移動量は 1 $\times$ g 群に比較して、それぞれ 100.3%, 101.5% で有意差は認められなかった (図 3)。

2) 細胞移動の軌跡に及ぼす高重力の影響

MC3T3-E1 細胞の移動の軌跡を大きく三つの型、すなわち直進、円、ジグザグ型に分類することができた。 G_1 期の 1 $\times$ g 群での直進、円、ジグザグ型の比率はそれぞれ 58, 30, 12% で直進型が多かった。また 5 $\times$ g, 18 $\times$ g と重力の増加に伴い、ジグザグ型の軌跡を描く細胞が増加した。S 期の 1 $\times$ g 群での直進、円、ジグザグ型の比率はそれぞれ 42, 32, 21% で直進型が多かったが、 G_1 期の直進型の 72% で直進型の軌跡が少なかった。直進型は 5 $\times$ g, 18 $\times$ g と重力の増加に伴い減少したが、ジグザグ型は増加した (表 1)。

3) 形態に及ぼす高重力の影響

1 $\times$ g における MC3T3-E1 細胞の形態は G_1 期, S 期とも多角を示した。 G_1 期の MC3T3-E1 細胞では 5 $\times$ g 群, 18 $\times$ g 群とも形態に著しい変化は認められなかったが (図 4), S 期の場合では 5 $\times$ g, 18 $\times$ g とともに非常に長い細胞突起をの

図1 G₁ 期における MC3T3-E1 細胞の移動

●は核の位置を示す
時間はM期からの時間

ばすなど形態が変化した。特に18×g での変化が顕著であった (図5)。

2. MC3T3-E1 細胞の増殖に及ぼす高重力の影響

MC3T3-E1 細胞を 5, 10, 20 および 40×g で遠心培養を行い, 72時間後の細胞数を 1×g 対照

図2 MC3T3-E1 細胞の細胞周期各期における移動量

値は平均値±S. E.

図3 MC3T3-E1 細胞の移動に及ぼす高重力の影響
値は平均値±S. D.

* ; 1 x g 対照群に対し 5 % の危険率で有意差あり

表1 MC3T3-E1 細胞の軌跡に及ぼす高重力の影響

	G ₁ 期			S 期		
	1 × g	5 × g	18 × g	1 × g	5 × g	18 × g
直進型 (%)	58	33	45	42	39	16
円型 (%)	30	41	22	37	33	53
ジグザグ型 (%)	12	26	33	21	28	31

群に比較すると、図6に示すように、10×g 群では1×g 対照群の92%と有意な増殖抑制が認められた。20×g 群、40×g 群ではそれぞれ1×g 対照群の111%、127%と有意な増殖促進が認められた。これより高重力の作用に二相性があることが明らかとなった。

3. conditioned medium の増殖への影響

20~40×g の遠心培養による増殖促進に液性因子の関与するかどうかを調べるために、1×g および40×g で24時間培養後の conditioned medium の MC3T3-E1 細胞の増殖に及ぼす影響を調べた。40×g conditioned medium 投与群の細胞数は1×g conditioned medium 投与対照群の106%となり、わずかではあるが有意な増殖促

進が認められた(表2)。以上の結果から、40×g の遠心培養による増殖促進に、液性因子の介在が示唆された。

4. 高重力の細胞増殖促進作用に及ぼす indomethacin の影響

高重力の増殖促進作用の液性因子の本体を明らかにするために、PGs 合成阻害剤である IND を添加した培地で MC3T3-E1 細胞、HeLa 細胞および JTC-12 細胞を遠心培養し、それらの増殖に及ぼす影響を調べた。MC3T3-E1 細胞では図7に示すように、40×g, IND(+) 群の増殖が顕著に抑制され、その増殖は、1×g, IND(-) 群と同程度であった。しかし1×g 群でも IND 10⁻⁵M 投与により増殖が有意に抑制された。HeLa 細胞

図4 G_1 期における MC3T3-E1 細胞の形態に及ぼす高重力の影響

位相差顕微鏡写真像 (120倍)

時間はM期からの時間

および JTC-12 細胞に対する高重力の影響は、図 8 および図 9 に示すように、 $40\times g$ により HeLa 細胞では 134 %、JTC-12 細胞では 108 % の有意な増殖促進が認められた。しかし高重力の増殖促進作用の IND $10^{-5}M$ による抑制は、JTC-12 細

胞では認められたが、HeLa 細胞では認められなかった。IND の作用は細胞種により異なっていた。MC3T3-E1 細胞および JTC-12 細胞における高重力の増殖促進作用の液性因子が、PGs である可能性が示唆された。

図5 S期における MC3T3-E1 細胞の形態に及ぼす高重力の影響
位相差顕微鏡写真像 (120倍)
時間はM期からの時間

5. MC3T3-E1 細胞の PGE₂ 産生に対する高重力の影響

MC3T3-E1 細胞を 1×g で培養したときの培地中の PGE₂ を、1, 3, 8, 24の各時間で経時的に定量すると、3 時間までは増加し、その後は

24時間まではほぼ一定値を示した。一方、40×g で培養したときの培地中の PGE₂ 量は、1, 3, 8 時間では経時的に増加したが、その後24時間まではほぼ一定値であった。培地中にはウシ胎仔血清由来の PGE₂ が 6.58 pg/ml 含まれていた。こ

図6 MC3T3-E1 細胞の増殖に及ぼす高重力の影響
値は平均値±S. D.
** ; 1 × g 対照群に対し 1 % の危険率で有意差あり

図8 HeLa 細胞における高重力の増殖促進作用に対する IND 10⁻⁵M の影響
値は平均値±S. D.
** ; 1 % の危険率で有意差あり
* ; 5 % の危険率で有意差あり

表2 高重力下培養 MC3T3-E1 細胞の conditioned medium の MC3T3-E1 細胞の増殖に及ぼす影響

		細胞数 (×10 ⁵)		
		0 日	2 日	(%)
1 × g	conditioned medium	0.35 ± 0.01	1.28 ± 0.02	(100)
40 × g	conditioned medium	0.35 ± 0.01	1.34 ± 0.03**	(106)

値は平均値±S. D. ** ; 1 % の危険率で有意差あり

図7 MC3T3-E1 細胞における高重力の増殖促進作用に対する IND 10⁻⁵M の影響
値は平均値±S. D.
** ; 1 % の危険率で有意差あり

図9 JTC-12 細胞における高重力の増殖促進作用に対する IND 10⁻⁵M の影響
値は平均値±S. D.
** ; 1 % の危険率で有意差あり
* ; 5 % の危険率で有意差あり

れを除いた MC3T3-E1 細胞から放出された 40 × g 群の PGE₂ 量は, 3, 8, 24 の各時間で 0.989 ± 0.235, 1.357 ± 0.292, 1.362 ± 0.155 ng/ml で 1 × g 群の 0.667 ± 0.079, 0.685 ± 0.092, 0.687

± 0.105 ng/ml に比較して有意に高く, それぞれ 1 × g 対照群の 148, 198, 198% であった (図 10)。また培地中の PGE₂ の定量を行った 1 時間より 3 時間までは, 1 × g 群, 40 × g 群ともに細

図10 1×g および40×g 培養における MC3T3-E1 細胞の PGE₂ 産生の経時的変化

値は平均値±S. D.

実線は培地中の PGE₂ 量、破線は細胞数を示す

**；1×g 群に対し 1%の危険率で有意差あり

*；1×g 群に対し 5%の危険率で有意差あり

図11 MC3T3-E1 細胞の PGE₂ 産生に及ぼす高重力の影響

値は平均値±S. D.

**；1×g 群に対し 1%の危険率で有意差あり

*；1×g 群に対し 5%の危険率で有意差あり

表3 MC3T3-E1 細胞の growth 期および confluent 期における PGE₂ 産生

	PGE ₂ (pg/ml)			
	1×g	40×g	1×g+IND	40×g+IND
MC3T3-E1 (growth 期)	683±17.7 (100)	1,559±574 (228)	7.88±2.61 (1.15)	7.70±2.47 (1.13)
MC3T3-E1 (confluent 期)	56.9±8.77 (100)	138±25.8 (242)	5.60±2.01 (9.84)	5.42±2.58 (9.53)

値は平均値±S. D. () 内は 1×g 群に対する相対値 (%) を示す

胞数の増加はなかったが、8時間後および24時間後では1×g 群、40×g 群ともに 118%，271% に増殖した。したがって細胞あたりの PGE₂ は、8時間以後減少し、細胞から放出される PGE₂ 量は、培養初期に多かった。

MC3T3-E1 細胞を 1，5，10，20および40×g の各重力下において 8時間培養したときの PGE₂ 産生は、図11に示すように、PGE₂ 量は 5×g 群および10×g 群では 1×g 群との差が認められなかったが、20×g 群で 159%，40×g 群で 220% と重力の大きさに依存した有意な増加が認められた。

MC3T3-E1 細胞の growth 期および confluent 期での PGE₂ 産生量およびそれらに及ぼす高重

力の影響を調べた。growth 期および confluent 期での MC3T3-E1 細胞の PGE₂ 産生は、表3に示すように growth 期で 683±17.7 pg/ml，confluent 期で 56.7±8.77 pg/ml で confluent 期の PGE₂ 産生量は growth 期のその約 1/10であった。growth 期，confluent 期ともに PGE₂ 産生量は 40×g によりそれぞれ 228%，242% に促進された。

高重力による PGE₂ 産生促進が、MC3T3-E1 細胞に特異的であるかどうかを明らかにするため HeLa 細胞および JTC-12 細胞の 40×g，48時間培養後の培地中の PGE₂ 量を測定した。表4に示すように、1×g 下の HeLa 細胞の培地中の PGE₂ 量は 10⁵個あたり 0.70±0.16 pg，JTC-12 細

表4 MC3T3-E1 細胞, HeLa 細胞および JTC-12 細胞の PGE₂ 産生

	PGE ₂ (pg/10 ⁵ cells)			
	1 × g	40 × g	1 × g+IND	40 × g+IND
MC3T3-E1	474 ± 12.3	861 ± 317	5.92 ± 1.96	5.79 ± 1.86
HeLa	0.70 ± 0.16	0.56 ± 0.23	1.01 ± 0.49	0.62 ± 0.23
JTC-12	0.76 ± 0.33	1.08 ± 0.43	0.97 ± 0.49	1.18 ± 0.50

値は平均値 ± S. D.

図12 MC3T3-E1 細胞の ALPase 活性に及ぼす高重力の影響

値は平均値 ± S. D.

** ; 1 × g 群に対し 1 % の危険率で有意差あり

* ; 1 × g 群に対し 5 % の危険率で有意差あり

表5 MC3T3-E1 細胞の ALPase 活性に及ぼす高重力の影響

	ALPase activity (nmol phenol/min/μgDNA)
1 × g	41.41 ± 2.22
40 × g	56.00 ± 2.67**
1 × g+IND (10 ⁻⁶ M)	46.55 ± 3.97*
40 × g+IND (10 ⁻⁶ M)	59.86 ± 5.92**

値は平均値 ± S. D.

** ; 1 × g 群に対し 1 % の危険率で有意差あり

* ; 1 × g 群に対し 5 % の危険率で有意差あり

胞のそれは 0.76 ± 0.33 pg で MC3T3-E1 細胞のそれより少なかった。HeLa 細胞, JTC-12 細胞の PGE₂ 産生量は $40 \times g$, 48 時間培養で $1 \times g$ 対照群との間に差を認めなかった。高重力により MC3T3-E1 細胞, HeLa 細胞, JTC-12 細胞のい

ずれかにおいても増殖は促進されるが, PGE₂ 産生の促進が認められるのは MC3T3-E1 細胞のみで, HeLa 細胞および JTC-12 細胞ではほとんどないことが明らかとなった。

6. MC3T3-E1 細胞の ALPase 活性に対する高重力の影響

MC3T3-E1 細胞の分化機能の指標のひとつである ALPase 活性が良好に発現する, confluent 期の細胞に対する高重力の影響を調べた。48 時間培養した後の MC3T3-E1 細胞の ALPase 活性は重力の大きさに依存して上昇し, $40 \times g$ 群では $1 \times g$ 対照群の 135% に達した (図12)。高重力によって MC3T3-E1 細胞の分化機能の発現促進が示された。ALPase 活性は, IND 10^{-6} M 投与によって $1 \times g$, $40 \times g$ とも非投与群に比較しわずかに上昇した (表5)。

IV. 考 察

本研究は MC3T3-E1 細胞を用いて, 高重力に対する応答と応答を媒介する物質を検索する目的で, MC3T3-E1 細胞の移動, 形態, 増殖, ALPase 活性および PGE₂ 産生に及ぼす高重力の影響について検討した。

1. 細胞移動および形態と高重力

一般に, 培養細胞を単層培養したとき, 細胞は基材上で移動, 運動する。細胞移動の解析には金コロイド法^{19~21)}, 細胞の足跡を利用する方法²²⁾, ビデオ等の記録装置を利用してコマ撮り録画し観察する方法²³⁾等がある。金コロイド法では細胞移動の正確な測定は難しく, 細胞の足跡を用いた方法は細胞種や実験条件によって異なり, 適切な条

件の設定が困難である。またビデオ等の記録装置を利用するコマ撮り法では、遠心に伴う振動等の問題を解決しなければ正確な測定は不可能であった。そこで本研究ではコマ撮り観察法の変法を用いた。

本法を用いて MC3T3-E1 細胞の移動量を測定したとき、細胞周期の各相で移動量は異なり、 G_1 期初期の移動量に比較し、後期および S 期のそれが大きく、S 期では終期に小さくなることが明らかとなった。MC3T3-E1 細胞の移動に及ぼす高重力の影響に関しては、 G_1 期と S 期で異なっていた。すなわち G_1 期では $18 \times g$ 群で有意に移動量が増加し、 $5 \times g$ 群ではそれが減少傾向であったが、S 期では $5 \times g$ 群および $18 \times g$ 群で移動量に変化が認められなかった。高重力と細胞移動に関して、Tschopp ら¹²⁾は金コロイド法を用いて非同調の HeLa 細胞の運動に対する $10 \times g$ の影響を研究し、細胞運動は高重力下で低下するという本研究の結果と異なる結果を報告している。研究に用いた培養細胞株が異なり、また与えた高重力の大きさも異なるため、そのまま単純に本研究の結果と比較することはできないが、細胞の移動量は細胞周期各期によって異なり、また高重力に対する反応も細胞周期各期によって異なるので、Tschopp ら¹²⁾のように非同調細胞を用いた測定では、正確な結果が得られないと考えられる。さらに細胞移動の軌跡が直線型だけではないため金コロイド法では細胞移動量を過小評価する可能性がある。

MC3T3-E1 細胞の形態に及ぼす高重力の影響に関しては、 G_1 期細胞では $5 \times g$ および $18 \times g$ 高重力に曝露したときの形態と、 $1 \times g$ 群の形態との間に著しい差を認めなかったが、S 期細胞においては、 $5 \times g$ 群および $18 \times g$ 群の細胞は長い突起をのばすなどの変化が認められた。MC3T3-E1 細胞の形態に対する高重力の作用も細胞周期各期によって異なることが明らかとなった。

このような MC3T3-E1 細胞の移動および形態に及ぼす高重力の作用の機序は不明である。しかし、細胞の移動や形態維持に細胞骨格が重要な役

割を演じており²⁴⁾、microtubule 阻害剤のひとつである colchicine がラット頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞の PGE_2 産生を促進することが知られており²⁵⁾、高重力により MC3T3-E1 細胞が産生した PGE_2 が、細胞骨格系に作用し、移動や形態に影響を与える可能性が考えられる。

2. 細胞増殖と高重力

MC3T3-E1 細胞を $20 \times g$ および $40 \times g$ 下で 72 時間培養したときの細胞の増殖は、 $1 \times g$ 対照群の増殖に比較して 110～127% に促進された。また HeLa 細胞、JTC-12 細胞においても $40 \times g$ 群で増殖促進が認められた。すでに Tschopp ら¹²⁾は HeLa 細胞、鶏胚線維芽細胞、ヒトリンパ球などを $10 \times g$ で培養したとき、20～30% の増殖促進が認められたと報告し、また Kumei ら¹³⁾は HeLa 細胞を 18, 35 および $70 \times g$ で 72 時間培養することにより増殖が促進したと報告している。本研究の結果は Tschopp ら¹²⁾や Kumei ら¹³⁾の結果と一致している。しかし MC3T3-E1 細胞の増殖は、 $10 \times g$ において抑制され、高重力の作用が二相性であることが示された。これは従来の報告と異なっていた。

MC3T3-E1 細胞における高重力で誘起される増殖促進と抑制の機序に関して、本研究においては液性因子の存在について検討した。すなわち、 $40 \times g$ で培養を行った conditioned medium は MC3T3-E1 細胞の細胞増殖を促進する。このことは高重力により細胞からなんらかの成長因子が産生され、培地中に放出されていることを示している。また高重力の増殖促進作用が IND により抑制されたことから、高重力の増殖に対する作用には PGs が関与することを示していた。

液性因子のひとつとして、 PGE_2 が有力な候補物質のひとつと考えられたので、実際に培地中の PGE_2 量の測定を $5 \sim 40 \times g$ に 8 時間曝露した細胞の培地について行ったところ、MC3T3-E1 細胞の PGE_2 産生が高重力に刺激され、その量は $10 \sim 40 \times g$ の範囲で重力に依存して増加することが明らかとなった。MC3T3-E1 細胞における PGE_2 産生は $1 \times g$ 対照群においても認められたが、培

地中の PGE_2 量の増加が3時間までであったのに対して、 $40\times g$ 群の PGE_2 量の増加は8時間まで続き、いずれの時間においても PGE_2 量は $1\times g$ 対照群より有意に多かった。以上のことから、MC3T3-E1 細胞の PGE_2 産生に対し、高重力は8時間までの比較的早い時期に作用することを示している。

細胞の増殖に PGE_2 が影響することに関して多数報告がある。Hakeda ら²⁶⁾は培地に 10^{-7}M の低濃度の PGE_2 を外から与えると、MC3T3-E1 細胞の DNA 合成が抑制され、 10^{-5}M 以上の高濃度の PGE_2 により DNA 合成が促進され、MC3T3-E1 細胞の増殖に対する PGE_2 の作用に二相性があることを示している。本研究で明らかにされた高重力の増殖に及ぼす作用も二相性であることと関連して興味深い。しかし、本研究において $10\times g$ で刺激され産生された培地中の PGE_2 量は 0.71 ng/ml で、上記の報告で培地に添加した PGE_2 量よりも低濃度であり、 $10\times g$ における増殖抑制は PGE_2 によるとは断定できない。また増殖促進を示す $20\times g$ 、 $40\times g$ における PGE_2 産生量も 0.97 ng/ml 、 1.36 ng/ml であり、Hakeda ら²⁶⁾の研究と濃度上の一致はない。また IND 10^{-5}M により高重力の作用が完全に抑制されない。このことは MC3T3-E1 細胞の、 $10\times g$ 高重力における増殖抑制や $40\times g$ 高重力における増殖促進、その他高重力の移動や形態に対する影響には、未知物質が関与していることが推測できるが、それらの詳細については今後の検討が必要である。

骨芽細胞の PGE_2 産生を刺激する機械的刺激として、すでに Somjen ら¹⁰⁾の tensile force, Ozawa ら²⁷⁾の continuously applied compressive pressure (以下 CCP) などが報告されている。Somjen ら¹⁰⁾は矯正用スクリューを用い、plastic dish に tensile force を加えると、ラット胎仔頭蓋冠由来の細胞の PGE_2 が増加し、それに伴い cyclic AMP が増加し、DNA 合成が促進することを示した。Ozawa ら²⁷⁾は3気圧 CCP により、MC3T3-E1 細胞の PGE_2 産生の増加を認めた。

しかし DNA 合成には1気圧群との間に差は認められなかったが、ALPase 活性および石灰化は抑制されたことから CCP による MC3T3-E1 細胞の分化機能の抑制は PGE_2 を介するとしている。本研究で用いた3種細胞、MC3T3-E1 細胞、HeLa 細胞および JTC-12 細胞は高重力により細胞増殖が促進された。培地中の PGE_2 量は、MC3T3-E1 細胞では高重力で増加したのに対し、HeLa 細胞および JTC-12 細胞では増加せず、高重力による細胞増殖促進の機序が細胞により異なることが推定された。HeLa 細胞に関して Kumei ら¹³⁾は18, 35, $70\times g$ での培養による増殖促進は細胞周期回転時間、特に G_1 期が短縮したためであること、さらにこの高重力の増殖促進は、c-myc 遺伝子の mRNA の発現を介することを報告している。

3. 細胞の分化機能の発現と高重力

MC3T3-E1 細胞は高い ALPase 活性および collagen 合成能を有し、*in vitro* において生体内の骨形成とよく似た過程を経て石灰化する株細胞である¹⁵⁾。MC3T3-E1 細胞の ALPase 活性に及ぼす影響を検討し、ALPase 活性が高重力の大きさに依存して上昇した。高重力は MC3T3-E1 細胞の増殖のみならず、分化機能をも促進することが明らかとなった。高重力による MC3T3-E1 細胞の ALPase 活性の上昇は、高重力による PGE_2 産生の増加が介するものと考えられる。confluent 期での MC3T3-E1 細胞の PGE_2 産生は $40\times g$ で増加し、培地中の PGE_2 の濃度が $5\times 10^{-10}\text{M}$ となったが、この濃度は Ozawa ら²⁷⁾が MC3T3-E1 細胞の培地に添加し、ALPase 活性の上昇を認めた PGE_2 の濃度に近似している。したがって、MC3T3-E1 細胞は自ら産生した PGE_2 により ALPase 活性が上昇しうると考えられる。しかし、IND 10^{-5}M の存在下において $40\times g$ 高重力に曝露したとき、培地中の PGE_2 量は増加していないにもかかわらず、ALPase 活性が上昇したことは、 PGE_2 の ALPase 活性上昇への関与を否定するものである。MC3T3-E1 細胞の ALPase 活性に及ぼす PGE_2 の影響について、す

でいくつかの報告がある。Kumegawa ら²⁸⁾は MC3T3-E1 細胞の ALPase 活性が外来の PGE₂ の濃度に依存して上昇すると報告し、Fujimori ら²⁹⁾は PGE₂ は ALPase 活性を濃度依存的に抑制すると報告している。Ozawa ら²⁷⁾は ALPase 活性は 10^{-9} M の低濃度の PGE₂ で上昇し、 10^{-7} ~ 10^{-5} M の高濃度で抑制するという二相性であると報告し、ALPase 活性に対する PGE₂ の作用については一致した見解に達していない。MC3T3-E1 細胞の ALPase 活性と PGE₂ の関係、さらに高重力と ALPase 活性の関係についてはより詳細な検討が必要である。

以上より、MC3T3-E1 細胞の増殖および ALPase 活性に対する高重力の作用の少なくとも一部は PGE₂ が関与することが明らかにされた。

V. 結 論

MC3T3-E1 細胞の移動、増殖および分化機能に及ぼす高重力の影響を検討した。

1) MC3T3-E1 細胞の移動量は、G₁ 期に比較して S 期で大きい。G₁ 期細胞の移動量は、 $5 \times g$ 群では $1 \times g$ 群との差がないが、 $18 \times g$ 群では有意に増加した。S 期細胞の移動量は、 $5 \sim 18 \times g$ の高重力による影響は認められなかった。G₁ 期細胞の形態は、 $5 \sim 18 \times g$ の高重力で変化しなかったが、S 期細胞では $18 \times g$ で顕著な変化が認められた。移動量および形態に対する高重力の影響は、細胞周期各期により異なっていた。

2) MC3T3-E1 細胞の増殖は、 $1 \times g$ 対照に比較して、 $10 \times g$ で 92% と抑制され、 $20 \times g$ および $40 \times g$ でそれぞれ 111 % および 127 % と促進された。増殖に対する高重力の作用が二相性であった。

3) MC3T3-E1 細胞を $40 \times g$ 、24 時間培養して得られた conditioned medium は MC3T3-E1 細胞の増殖を促進する作用を有していた。高重力負荷によって MC3T3-E1 細胞から液性増殖因子の産生が示唆された。

4) MC3T3-E1 細胞に対する $40 \times g$ 高重力の増殖促進作用が、IND 10^{-5} M 投与により $1 \times g$ 、

IND(−) 群と同程度となるまで抑制された。高重力の増殖に対する作用に、アラキドン酸代謝産物が関与することが示唆された。

5) MC3T3-E1 細胞の培地中への PGE₂ を放出量は高重力により刺激され、 $20 \times g$ 群および $40 \times g$ 群でそれぞれ $1 \times g$ 群の 159 %、220 % となり、重力の大きさに依存して増加した。高重力による増殖促進の液性因子のひとつが PGE₂ であることが明らかにされた。また confluent 期での PGE₂ 量は、growth 期でのその 1/10 程度であった。

6) MC3T3-E1 細胞、HeLa 細胞、JTC-12 細胞のいずれも $40 \times g$ 高重力により増殖が促進された。しかし、高重力による PGE₂ の増加は MC3T3-E1 細胞のみに認められ、他の 2 種の細胞では認められなかった。細胞増殖に対する高重力の作用には PGE₂ を介する機序の他に別の作用機序も存在することが考えられた。

7) MC3T3-E1 細胞の confluent 期における ALPase 活性は重力の大きさに依存して上昇し、 $40 \times g$ 群で $1 \times g$ 対照群の 135 % となった。高重力による ALPase 活性の上昇は、IND 10^{-5} M 投与では遮断されなかった。

以上により、MC3T3-E1 細胞の増殖および ALPase 活性に対して高重力が作用し、その機序として細胞による PGE₂ 産生の増加が関与することが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なご指導ならびにご校閲を賜りました佐藤温重教授に謹んで感謝の意を表します。また絶えずご支援、ご協力をいただきました歯科理工学第 2 講座の諸先生方に厚くお礼を申し上げます。

本研究の一部は、1988 16th International Symposium on Space Technology and Science, 昭和 63 年日本宇宙生物科学会第 2 回大会および平成 2 年第 55 回口腔病学会総会において発表した。

本研究の一部は平成元年度および 2 年度科学技術庁振興調整費の助成のもとに行われた。

文 献

- 1) Wolff, J. : Das Gesetz der Transformation der Knochen. Berlin, 1892, Hirshwold.
- 2) 野田政樹, 佐藤温重 : 成長期の骨と物理的要因. 歯科ジャーナル 26 : 897-902, 1987.
- 3) Goode, A. W. and Rambaut, P. C. : The skeleton in space. Nature 317 : 204-205, 1985.
- 4) Krolner, B. and Toft, B. : Vertebral bone loss : an unheeded side effect of therapeutic bed rest. Clin. Sci. 64 : 537-540, 1983.
- 5) 伊藤学而, 黒江和斗, 安田秀雄, 井上直彦, 亀谷哲也 : 顎骨の退化に関する実験的研究. 日矯歯誌 41 : 708-715, 1982.
- 6) Morey, E. R. and Baylink, D. J. : Inhibition of bone formation during space flight. Science 201 : 1138-1141, 1978.
- 7) Globus, R. K., Bikle, D. D. and Morey-Holton, E. : Effects of simulated weightlessness on bone mineral metabolism. Endocrinology 114 : 2264-2270, 1984.
- 8) 三浦不二夫, 栗原三郎 : 歯の移動からみた歯槽骨. 特集 歯槽骨を考える(下). 歯界展望 61 : 1231-1242, 1983.
- 9) Thompson, D. D. and Rodan, G. A. : Indomethacin inhibition of tenotomy-induced bone resorption in rats. J. Bone Miner. Res. 3 : 409-414, 1988.
- 10) Somjen, D., Binderman, I., Berger, E. and Harell, A. : Bone remodelling induced by physical stress is prostaglandin E_2 mediated. Biochim. Biophys. Acta 627 : 91-100, 1980.
- 11) 田口元康 : 歯の移動に関するプロスタグランディン E の研究. 口病誌 54 : 106-128, 1987.
- 12) Tschopp, A. and Cogoli, A. : Hypergravity promotes cell proliferation. Experientia 39 : 1323-1329, 1983.
- 13) Kumei, Y., Nakajima, T., Sato, A., Kamata, N. and Enomoto, S. : Reduction of G_1 phase duration and enhancement of *c-myc* gene expression in HeLa cells at hypergravity. J. Cell Science 93 : 221-226, 1989.
- 14) Gruener, R. and Hoeger, G. : Vector-free gravity disrupts synapse formation in cell culture. Am. J. Physiol. 258 : C489-C494, 1990.
- 15) Kodama, H., Amagai, Y., Sudo, H., Kasai, S. and Yamamoto, S. : Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. Jpn. J. Oral Biol. 23 : 899-901, 1981.
- 16) Takaoka, T., Katsuta, H., Endo, M., Sato, K. and Okumura, H. : Establishment of a cell strain, JTC-12, from cynomolgus monkey kidney tissue. Japan. J. Exp. Med. 32 : 351-368, 1962.
- 17) Terasima, T. and Tolmach, L. J. : Changes in X-ray sensitivity of HeLa cells during the division cycle. Nature 190 : 1210-1211, 1961.
- 18) Johnson-Wint, B. and Hollis, S. : A rapid *in situ* deoxyribonucleic acid assay for determining cell number in culture and tissue. Anal. Biochem. 122 : 338-344, 1982.
- 19) Albrecht-Buehler, G. : The phagokinetic tracks of 3T3 cells. Cell 11 : 395-404, 1977.
- 20) Albrecht-Buehler, G. : Movement of nucleus and centrosphere in 3T3 cells. Cancer cells 1 : 87-96, 1984.
- 21) McAuslan, B. R. and Reilly, W. : Endothelial cell phagokinesis in response to specific metal ions. Exp. Cell Res. 130 : 147-157, 1980.
- 22) Kirk, D., Kagawa, S., Narayan, S. K. and Ohnuki, Y. : Novel antigen system for tracking epithelial cell migration in serum-free culture. Exp. Cell Res. 160 : 221-229, 1985.
- 23) Tatsuka, M., Jinno, S., Owada, M. K. and Kakunaga, T. : A digital image processing system for quantitating dynamic morphology in cultured mammalian cells. Exp. Cell Res. 185 : 342-352, 1989.
- 24) Wehland, J., Osborn, M. and Weber, K. : Phalloidin-induced actin polymerization in the cytoplasm of cultured cells interferes with cell locomotion and growth. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 : 5613-5617, 1977.
- 25) Yeh, C. and Rodan, G. A. : Microtubule disruption enhances prostaglandin E_2 production in osteoblastic cells. Biochim. Biophys. Acta 927 : 315-323, 1987.
- 26) Hakeda, Y., Yoshino, T., Natakani, Y., Kurihara, N., Maeda, N. and Kumegawa, M. : Prostaglandin E_2 stimulates DNA synthesis by a cyclic AMP-independent pathway in osteoblastic clone MC3T3-E1 cells. J. Cell Physiol. 128 : 155-161, 1986.
- 27) Ozawa, H., Imamura, K., Abe, E., Takahashi, N., Hiraide, T., Shibasaki, Y., Fukuhara, T. and Suda, T. : Effect of a continuously applied compressive pressure on mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) in vitro. J. Cell. Physiol. 142 : 177-185, 1990.
- 28) Kumegawa, M., Ikeda, E., Tanaka, S., Haneji, T., Yora, T., Sakagishi, Y., Minami, N. and Hiramatsu, M. : The effects of prostaglandin E_2 , parathyroid hormone, 1, 25 dihydroxycholecalciferol, and cyclic nucleotide analogs on alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells. Calcif. Tissue Int. 36 : 72-76, 1984.

29) Fujimori, A., Tsutsumi, M., Fukase, M. and
Fujita, T. : Cyclooxygenase inhibitors enhance

cell growth in an osteoblastic cell line MC3T3-
E1. J. Bone Miner. Res. 4 : 697-704, 1989.