培養ヒト骨細胞の subpopulation について

久留米大学 整形外科, 第2病理*

小 宮 節 郎・笹 栗 靖 之*
中 島 雅 典・山 元 三 郎
柳 田 巖・井 上 明 生
森 松 稔*

Subpopulation of Cultured Human Bone Cells

by

Setsuro Komiya, Yasuyuki Sasaguri*
Masanori Nakashima, Saburo Yamamoto
Iwao Yanagida, Akio Inoue
and Minoru Morimatsu*

Department of Orthopaedic Surgery and Pathology*,
Faculty of Medicine, Kurume University, Fukuoka 830, Japan.

Human bone cells were cultured and transformed by SV40 virus. The trabecular bone samples of the femur obtained from surgery of a total hip replacement were prepared for cultures. Heterogenic bone cells were coexisted in early cultures. Cells with alkaline phosphatase activity were transformed by SV40 virus treatment. The cells contained abundant rough endoplasmic reticulum, mitochondria, free ribosomes, and irregularly shaped nucleus with heterochromatin. Mitotic figures were prominent. In extracellular space, collagen fibrils and electron dense materials, probably calcified substance, were noted. The cells were considered to be osteoblasts or osteocytes.

は じ め に

In vitro での骨代謝の研究をするにあたって、骨細胞並びに骨芽細胞の培養株を利用するのは有用なことを考えられる。骨芽細胞の培養株として確立されたものに MC3T3-E1¹⁾がある。本細胞株は新生児マウス頭蓋骨を培養系に移し、3日目毎の継代をくり返すことによって transformation 化されたもので、高いアルカリフォスファターゼ (ALP) 産生能、石灰化能、タイプ I コラーゲン産生能など骨芽細胞としての機能を維持しているものである。

しかし、未だ、ヒト骨芽細胞の培養株を樹立したという報告はなく、その臨床的有用性のうえからも確立が望まれている次第である。我々はヒト骨細胞を培養系に移し、増殖してきた細胞群のうち ALP 陽性細胞を骨芽細胞もしくは骨細胞と考え、SV40 virus を

感染させて transformation に成功した。その概要を示す。

方 法

骨組織は人工膝あるいは人工股関節置換術時に得られる海綿骨を用いた。デュール、ハサミ等で細片化し、PBS にて十分に洗浄し骨髄細胞や脂肪組織、血球成分を可能なだけ取り除くことに努めた。コラゲナーゼ処理を2時間行ない、その骨細片を取り出し、PBS にて十分に洗浄し、シャーレ内に静置し培養を開始した。培養は培養液が Dulbecco 変法培地で10%の牛胎児血清を添加したもので、37°C、5% CO₂・95% air 下のインキュベーター内でおこなった。

観察は倒立顕微鏡にておこない、随時 ALP 染色、石灰化の検索のためのコッサ染色をおこなった。また、透過電顕標本も作成し、微細構造の観察をおこなった。

図1 多数の樹枝状突起をもつ培養骨細胞。

図4 コッサ染色。胞体の辺縁，一部胞体内に，さらに胞体外に石灰沈着をみた。

図2 図1でみられた細胞も，シャーレ中に confluent になると敷石状配列を示した。

図5 SV 40 virus 感染細胞，コロニー形成をみた。

図3 培養細胞のALP染色（アゾ色素法）。胞体内に顆粒状に染まる陽性所見をみた。

図6 継代をしばらくせずに観察を続けていくと著明な石灰化をみとめた。

図7 タイプIコラーゲンでコーティングしたシャーレでの培養。細胞が接着し易く、増殖速度も増強した。

図8 透過電顕像。細胞には異型性がみられ、細胞内小器官は比較的乏しい。胞体内外に electron dense material を、胞体外に未熟な collagen fibril をみた。

結 果

培養液中に静置された骨細胞の周辺に1週間もすると細胞が出現し始めた。増殖速度は極めて遅く、この点で通常の fibroblast とは様相を異にしていた。

いくつか増殖・配列様式、形態の異なる細胞群がみうけられた。1つは小型で円形からやや紡錘形の細胞群で敷石状の増殖配列を示した。また、小型で多角形からやや紡錘形の細胞が索状に、そして一部、管腔の如き囲みを形成して増殖する細胞群をみた。しかし、これらの細胞群は ALP 染色陰性であった。これらと

は別に、比較的大型で楕円形の核と複雑な形態を示す細胞質を持ち、樹枝状の突起を多数持つ細胞をみた。Spider cell の如き様相を呈している部分もみた (図1)。本細胞群も増殖すると敷石状配列を示した (図2)。

本細胞群にアゾ色素法による ALP 染色をおこなうと、大半の細胞の胞体内に顆粒状に染まる陽性所見をみとめた (図3)。

石灰化をみるためコッサ染色をおこなった。胞体内の一部、胞体辺縁、胞体外に石灰沈着をみた (図4)。

これらは骨細胞と思われたが、増殖速度が速く実験材料としては量的に不充分であったので SV 40 virus による transformation を図った。virus に感染させると大半の細胞が壊死に陥り、極く一部の細胞しか生存し続けなかった。1ヶ月後頃に一部にコロニー形成を認め、やがて積層化が著明になった。そのコロニーから辺縁に向かって細胞がやがて増殖し始めた (図5)。

継代を遅らし気味にすると石灰化が著明になった (図6)。この石灰化誘導は培地に β -グリセロリン酸とアスコルビン酸を添加するとおこない易かった。

培養条件を生体内に近づけるため、タイプIコラーゲン膜上で、あるいはコーティングしたシャーレ上で培養すると細胞も接着し易く、増殖能も高まった (図7)。

透過電顕での観察では、個々の細胞は肉腫細胞の様相を呈していた。核は円形からひょうたん形、奇怪な形を呈するものまで様々であり、核クロマチンはヘテロクロマチンパターンで核小体は著明であった。細胞内小器官はそれほど目立たず、ミトコンドリア、粗面小胞体、ゴルジ装置等をみた。胞体内に electron dense な物質の貯溜を認める部分があった。また、胞体内にも small vesicle や electron dense material、さらには immature な collagen fibril を認めた (図8)。

考 察

骨芽細胞の特性として、高い ALP 活性¹⁾⁻⁹⁾、骨グラー蛋白産生能^{5), 8)}、タイプIコラーゲン産生能^{5), 8)}、石灰化物質産生能⁷⁾がある。他、コラーゲナーゼ産生能⁶⁾、活性型ビタミンD₃レセプターの存在、プロスタグランディンE産生能³⁾も非特異的ではあるが、細胞同定の際の指標となり得るものである。

株化された MC3T3-E1⁷⁾は高い ALP 活性、石灰化

物の産生並びに、ハイドロキシアパタイトへの成熟化を認め、骨芽細胞としての特異性に富み、骨代謝研究に繁用されている細胞である。しかしながらマウス由来であるため臨床的に応用する場合には自づと限界があるのは否めない。

一方、ヒト骨細胞に関してはコラーゲナーゼ処置により得られる細胞群が heterogenic であって⁹⁾、個々の細胞の単離が難しく、仮にできたとしても成熟化した細胞の場合、極端に増殖能が悪いことから株化されるまでには至っていない。

我々が継代を続けている細胞は ALP 陽性、石灰物質産生能の面からみて骨細胞由来のものと考えられる。今後、同定のためには分光光度計による ALP 測定、分析電顕あるいは X 線解析によるハイドロキシアパタイトの証明、骨グラ蛋白の測定・あるいはその活性型ビタミン D₃ に対する反応、タイプ I コラーゲンの検索をすすめていく必要がある。

骨細胞培養株の確立は、単に骨代謝分野の研究のみならず、ウィルス誘導肉腫の形質発現機序、骨肉腫の分子生物学研究への応用といった可能性を秘めており、早急に進めていかねばならない仕事だと考えられる。

結 語

ヒト骨細胞を培養素にうつし、SV40 virus により transformation を図った。本細胞は ALP 陽性、石灰物質の産生能を有し、骨細胞由来のものと考えられた。

参 考 文 献

- 1) Ashton, B. A., Abdullah, F., Williamson, C. M., Sykes, B. C., Couch, M., and Poser, J. W.: Characterization of cells with high alkaline phosphatase activity derived from human bone and marrow: Preliminary assessment of their osteogenicity. *Bone*, 6: 313-319, 1985.
- 2) Cohn, D. V. and Wong, G. L.: Isolated bone cells. *Skeletal Research* (Academic Press, Inc.), 3-20, 1979.
- 3) MacDonald, B. R., Gallagher, J. A., Ahnfelt-Ronne, J., Beresford, J. N., Gowen, M., and Russell, G. G.: Effects of bovine parathyroid hormone and 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ on the production of prostaglandins by cells derived from human bone. *FEBS LETTERS*, 169: 49-52, 1984.

- 4) Maurizi, M., Binaglia, L., Donti, E., Ottaviani, F., Paludetti, G., and Venti Ponti, G.: Temporal-bone cell culture. *Cell Tissue Res.* 229: 505-13, 1983.
- 5) Robey, P. G. and Termine, J. D.: Human bone cells in vitro. *Calcif. Tissue Int.*, 37: 453-460, 1985.
- 6) Sakamoto, S. and Sakamoto, M.: On the possibility that bone matrix collagen is removed prior to bone mineral during active cell-mediated bone resorption. in *Current advances in skeletogenesis*. Elsevier Science Publishers B. V., 65-69, 1985.
- 7) Sudo, H., Kodama, H., Amagi, 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.
- 8) Whitson, S. W., Harrison, W., Dunlap, M. K., Bowers, D. E., Fisher, L. W., Robey, P. G. and Termine, J. D.: Fetal bovine bone cells synthesize bone-specific matrix proteins. *J. Cell Biol.*, 99: 607-614, 1984.
- 9) Wong, G. and Cohn, D. V.: Separation of parathyroid hormone and calcitonin-sensitive cells from non-responsive bone cells. *Nature*, 252: 713-715, 1974.

質 問

九州大学 野口 康男

骨細胞や骨芽細胞の特徴として細胞間のギャップ結合がありますが、先生の培養細胞にギャップ結合は見られますか。

解 答

久留米大学 小宮 節郎

ギャップ結合については検討していませんでした。

質 問

山口大学 重富 充則

①材料の採取手技について。

②得られた各細胞群の同定、特に Osteocyte をどの様にして同定されたか？

解 答

久留米大学 小宮 節郎

①海綿骨をコラーゲナーゼ処理して細胞を剥脱させ、その海綿骨を explant して増殖してくる細胞群のうち Alkaline 陽性群のものをクローニングして継代しました。