



# 骨芽細胞に対する機械的ストレスの 細胞内情報伝達機構の解析

上野 貢 生

近畿大学医学部整形外科科学教室

## 抄 録

骨芽細胞に対する機械的ストレスの細胞内情報伝達機構に関与する因子について検討を行った。当教室で樹立した骨芽細胞様細胞株をクローニングし、アルカリホスファターゼ活性の最も高いクローン HT-3-M2 を得た。この細胞クローンでは、細胞の産生するプロスタグランジン E2 はアルカリホスファターゼ活性に対して抑制作用を有した。この HT-3-M2 細胞に機械的ストレスとして周期的牽引を加えたところ、プロスタグランジン E2 の産生は低下した。また周期的牽引負荷はイノシトール 3 リン酸産生を亢進させ、プロテインキナーゼ C の活性と一酸化窒素の産生を低下させた。一酸化窒素はアルカリホスファターゼ活性を低下させ、またプロテインキナーゼ C の活性化により一酸化窒素の産生は亢進した。以上のことより骨芽細胞における機械的ストレスの細胞内情報伝達機構には、プロスタグランジン E2、イノシトール 3 リン酸、プロテインキナーゼ C、一酸化窒素が関与することが明らかになった。

**Key words :** alkaline phosphatase, nitric oxide, osteoblast, osteocalcin, prostagrandin E2, protein kinase C

## 緒 言

骨はコラーゲンを主体とする有機基質にヒドロキシアパタイト様の骨塩結晶が沈着し形成される。骨芽細胞はタイプ I コラーゲンやオステオカルシンなどの有機基質を合成するとともに、無機基質を沈着させる働きを有している。アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase, ALP) は骨芽細胞の有する最も特徴的な酵素であり、骨芽細胞の分化の指標とされる。ALP の作用としてはリン酸エステルをオルトリン酸に変換することより、石灰化に重要な役割を果たすことが示唆されている。骨芽細胞機能を調節する生物学因子としては副甲状腺ホルモン、活性型ビタミン D3、カルシトニン、エストロゲンなどのホルモン、および prostaglandin に代表されるいわゆる local hormone が挙げられる。

細胞の増殖あるいは分化は様々な外界の情報により調節されている。したがってこの情報を細胞内に伝達し、最終的に様々な細胞応答を引き起こす情報伝達機構を解明することは、細胞の増殖あるいは分化の制御機構を探る上で重要であると考えられる。

従来の cyclic AMP (cAMP) をセカンドメッセンジャーとする系に加えて、イノシトールリン脂質代謝も細胞情報伝達機構に関与していることが明らかになってきた<sup>1,2</sup>。刺激伝達物質が受容体に結合すると、その信号が GTP 結合蛋白を介してホスホリパーゼ C を活性化し、ホスファチジルイノシトール 2 リン酸 (PIP2) の分解促進が生じ、イノシトール 3 リン酸 (IP3) が生成される。この結果ジアシルグリセロール (DG) が産生され、この DG はプロテインキナーゼ C (protein kinase C, PKC) を活性化させ、蛋白質のリン酸化により細胞応答を引き起こす<sup>3</sup>。

HT-3 細胞は当教室で樹立された実験的骨肉腫株である。ラットに皮下注射することにより肺転移を起こすという、悪性腫瘍細胞としての形質を有するとともに、ALP 活性が陽性であり、副甲状腺ホルモンに対して濃度依存性に細胞内 cAMP を増加させ、培養条件下でカルシウム沈着を来すという骨芽細胞としての形質を保有している<sup>4</sup>。

以前より骨は荷重や牽引負荷などの機械的ストレスに反応することが知られている<sup>5,6</sup>。また骨芽細胞に in vitro で牽引力を加えてその細胞応答を検討し

た論文も散見される<sup>7,8</sup>。しかし骨芽細胞に周期的微動を加えて、その影響を検討した報告はなかった。骨折の治療として、骨折部に強固 (ligid) な固定をするよりも、弾性的 (elastic) な固定をしたほうが骨癒合が早期に起こるが、これは長軸方向に周期的・機械的な圧迫および牽引力が加わることにより骨癒合が促進されるためと考えられる。しかしその細胞レベルでの検討はなく、今回この目的のため Flexercell strain unit を使用した。この装置はコンピューター制御により任意の条件で細胞に周期的牽引負荷を加えることができる。当教室ではすでに軟骨細胞を対象にこの装置を使用して、周期的牽引負荷が軟骨細胞代謝に与える影響について報告している<sup>9</sup>。また Nishioka らは HT-3 細胞に周期的牽引負荷を加え、ALP 活性の増加と PGE2 産生の減少を報告している<sup>10</sup>。しかし他の報告では機械的ストレスにより PGE2 産生の増加やイノシトールリン脂質代謝の変動が報告されている<sup>8,11</sup>。この結果の差異は使用した細胞、実験条件の違いなどによるものと思われる。

いずれにしてもこれまでの検討では機械的ストレスの骨芽細胞代謝に与える影響や、細胞内情報伝達機構については完全には解明されていない。当教室ではこれまでに軟骨細胞の細胞内情報伝達機構における PKC の役割について検討してきた<sup>12-15</sup>。本研究では骨芽細胞における周期的牽引負荷による PKC の動向を検討した。

一方、近年ガスメディエーターである一酸化窒素 (nitric oxide, NO) が生理活性物質として大きな注目を集めている。NO は1987年に血管内皮細胞から放出される弛緩物質 (endothelium-derived relaxing factor, EDRF) として見出された<sup>16</sup>。ラット肝細胞においてはタンパク合成を阻害し、マウス T 細胞の DNA 合成を抑制し、ウサギ軟骨では組織障害を亢進するなど、種々の細胞において多彩な作用を有することが明らかにされつつある<sup>17</sup>。当教室でも軟骨代謝における NO の役割について検討しており<sup>18,19</sup>、斎藤はすでに軟骨細胞に周期的牽引負荷を加えた場合の NO 誘導を報告した<sup>9</sup>。本研究では骨芽細胞に対する周期的牽引負荷による NO の変動を検討するとともに、この過程における PKC の関与についても検討した。

## 材料および方法

### 1. 薬剤

Fetal bovine serum (FBS) は HyClone より、L-NG-monomethylarginine (L-NMA) と S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) は Dojindo より

購入した。Phorbol 12, 13-dibutyrate (PDBu), 4 $\alpha$ -phorbol 12, 13-didecanoate (4 $\alpha$ -PDD), インドメタシン, bacterial lipopolysaccharide (LPS), staurosporine は Sigma より、プロテインキナーゼインヒビターである H-7 は生化学工業より購入した。抗ラットタイプ I コラーゲンおよび抗タイプ II コラーゲン抗体は LSL 社より、抗マウスオステオカルシン抗体は Biomedical Technologies 社より購入した。

### 2. 細胞のクローニング

HT-3 細胞は山崎により樹立されたラット細胞株で、これまで Wistar 系ラット皮下で継代されてきた<sup>4</sup>。ラットの腹空内に sodium pentobarbital を 0.06 ml/100 g 投与し麻酔をかけた後、背部に形成された腫瘍塊を無菌的に採取した。これをハサミで細断後、0.2% コラゲナーゼで 1 時間酵素処理し、腫瘍細胞を単離した。この細胞を 96 穴の培養プレート (Falcon) に限外希釈により播種した。培養条件は 10% ウシ血清 (Logan) 添加  $\alpha$ -MEM を用いて、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 飽和水蒸気圧の条件下とした。ALP 活性を指標に 4 回の限外希釈を繰り返した。

### 3. 免疫化学的検討

牽引負荷後 7 日の HT-3 細胞をアセトン/エタノール (v/v: 50/50) にて 5 分間固定後、ヘマトキシリン染色を行った。免疫化学的検討として、1% ホルムアルデヒドにて 10 分間固定後、ラットタイプ I およびタイプ II コラーゲンに対する抗体を、0.03% Triton-X100 を含む 0.01 M 磷酸緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.4) で 500 倍に希釈し、30 分間反応させた。その後 Vectastain ABC キット (フナコシ) を用いて反応させ、発色には diaminobenzidine (DAB) を使用した。

### 4. 周期的牽引負荷

細胞を専用のプレート (flexible-bottomed culture plate, Flexercell 社) に  $1 \times 10^5$  個/well の密度で播種した。同プレートの底部は可撓性を有するシリコン膜よりなり、表面にタイプ I コラーゲン処理がなされており、細胞の接着を容易にしている。牽引装置は最近開発された Flexercell 社の装置を使用した。これはコンピューター制御のコントローラー、モニター、吸引機、培養プレート設置台より構成されている<sup>20,21</sup>。培養プレートを設置した後、これに吸引を加えることにより膜が弯曲し、これにともない付着した細胞に牽引力が加わる。コンピューターのコマンドを変更することにより、牽引周期及び牽引力を任意に設定することができる。今回使用した牽引負荷の条件は、1 分間に 10 回のサイクルで全方向に牽引力を加え、最大伸張を 17% とした<sup>21</sup>。

### 5. Prostaglandin E2 産生能

細胞が産生する PGE2 を培養上清を検体として測定した。培養上清 100  $\mu$ l を採取し, Prostaglandin E2  $^{125}$ I kit (Du Pont) を用いて PGE2 量を測定した<sup>21,22</sup>。

### 6. アルカリホスファターゼ活性 (ALP 活性)

細胞が集密状態に達した後, 各種薬剤を添加し培養した。周期的牽引負荷による ALP 活性の測定には専用プレート上の細胞を対象とした。細胞層を 0.2 ml の PBS で 3 回洗浄した後, 0.2 ml のトリス緩衝液 (10 mM, pH 8.0)・塩化マグネシウム (1 mM)・Triton-X (0.5%) を加えた。超音波破碎機 (トミー精工) を使用し, 細胞を破碎し遠沈を行った。ALP 活性を Lowry の方法に従い計測した<sup>21</sup>。

### 7. DNA 合成能

細胞を PBS で 3 回洗浄し, [ $^3$ H]-thymidine (specific radioactivity: 37 MBq/ml, Amersham) を 74 kBq/ml となるように加えた。37°C, 5% CO<sub>2</sub> 飽和水蒸気圧の条件下で 6 時間培養後, 細胞層をさらに 3 回 PBS で洗浄した。細胞に 5% トリクロロ酢酸 (半井) とエタノール/エチルアルコール (3:1) を加え rubber policeman で細胞を完全に回収した。遠沈により不溶画分を抽出し, 0.3N NaOH で溶解させ, 6N 塩酸で中和した。Econofluor (Du Pont) 10 ml を加え, 液体シンチレーションカウンターを用いて測定した<sup>21,23</sup>。

### 8. イノシトール 3 リン酸の測定

細胞を専用プレートに  $1 \times 10^5$  個/well の細胞密度で播種し, 集密状態に達したものを Flexercell strain unit を用いて myoinositol (1  $\mu$ M) の存在下に周期的牽引を 24 時間負荷した。細胞を PBS で 3 回洗浄した後, 20% (v/v) トリクロロ酢酸存在下で超音波破碎機で細胞を破碎した。遠沈によりその上清を回収し, Inositol-1,4,5-triphosphate [ $^3$ H] assay kit (Du pont) を用いてイノシトール 3 リン酸量を測定した。

### 9. protein kinase C 活性の測定

細胞層を 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 0.3%  $\beta$ -mercaptoethanol, 10 mM benzamidine, 50  $\mu$ g/ml phenylmethylsulphonyl fluoride を含む Tris/HCl (50 mM, pH7.5) で 3 回洗浄し, 超音波破碎機で細胞を破碎し, 遠沈を行った。その上清 25  $\mu$ l を用いて PKC 活性を測定した。測定には Biotrak kit (Amersham) を使用した。

### 10. NO の測定

培養液中の NO ガスのほとんどが酸化された状態にあるため, これが還元されないよう, アスコルビン酸を含まない培養液を用いた。Flexercell 社の

牽引装置に付属していた直径 18.7 mm・高さ 48.0 mm のガラス瓶に検体の培養液 100  $\mu$ l を入れ, ゴム栓で密閉した。アスコルビン酸の飽和水溶液を加え, 還元されて発生する NO を NO 専用測定機 (Scholar Tec 社製 FES-450) を用いて測定した。本機での NO 測定法は化学発光法に準じ, NO ガスの直接測定が可能である。NO 量は波形の積分値 (digit) として計算し, 亜硝酸塩の溶解液よりえられた標準曲線に外挿させた<sup>18</sup>。

### 11. 統計処理

各データは平均値  $\pm$  標準偏差 (mean  $\pm$  SD) で表し, 有意差検定は Student's t-test を用いた。

## 結 果

### 1. 細胞のクローニングと細胞の特性

#### 細胞のクローニング

HT-3 細胞より ALP 活性を指標に 4 個の細胞クローン (HT-3-M1~M4) を得た。それぞれのクローンをインドメタシン処理に対する ALP 活性の反応性を指標にさらにスクリーニングした。この結果, 最も高い ALP 活性とインドメタシンに対する反応性を有するクローンとして M2 を得た (図 1)。これらの特性をもつ HT-3-M2 細胞を以下の実験に使用した。

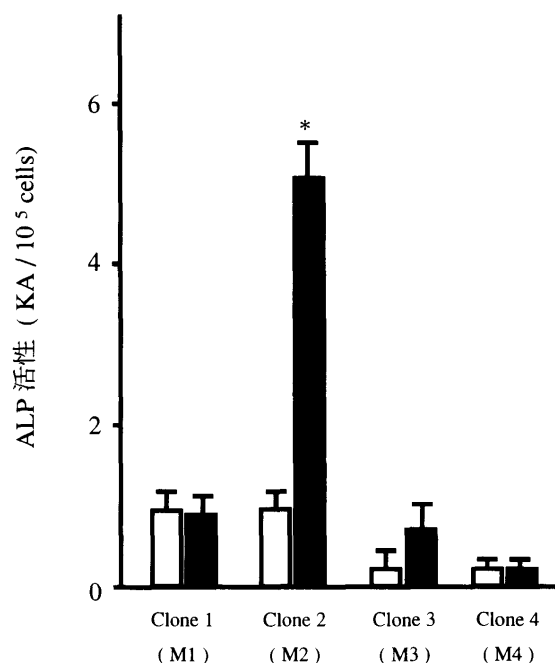


図 1 細胞のクローニング。

HT-3 細胞より ALP 活性を指標に 4 個の細胞クローン (HT-3-M1~M4) を得た。それぞれのクローンをインドメタシン (100 nM) 存在 (■) および非存在下 (□) で 24 時間培養し, 細胞の ALP 活性を測定した。各クローンを 8 well ずつ, 3 回検討を行い, その平均を示す。\*:  $p < 0.01$ 。

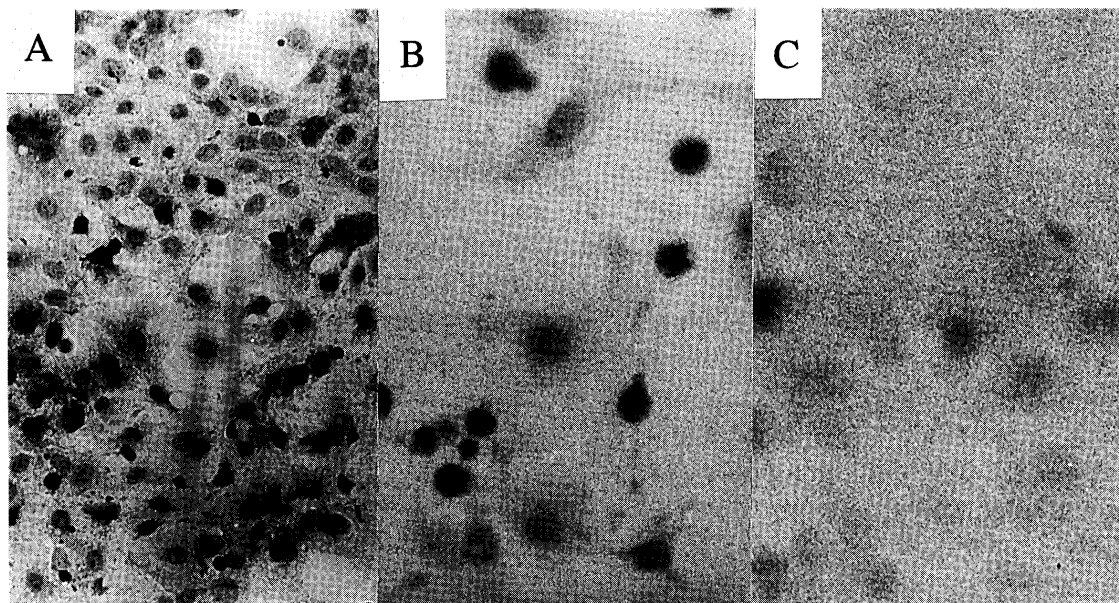


図2 免疫化学的検討。  
A：ヘマトキシリン染色，B：抗タイプIコラーゲン抗体，C：抗タイプIIコラーゲン抗体を用いた免疫染色。×400。

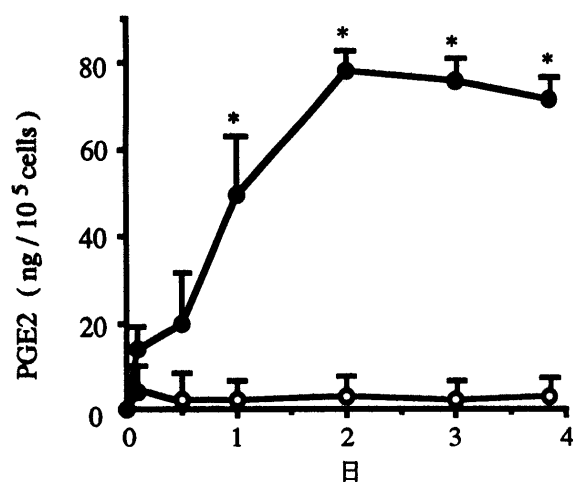


図3 HT-3-M2細胞のPGE2産生。  
細胞を $1 \times 10^5$  個/mlの濃度で96穴プレートに播種し，細胞が集密状態に達した後より1  $\mu$ M インドメタシン存在下(○)，および非存在下(●)で培養を行った。培養液中のPGE2量をRIAで計測した。各点は8 wellの平均値，\*： $p < 0.01$ 。

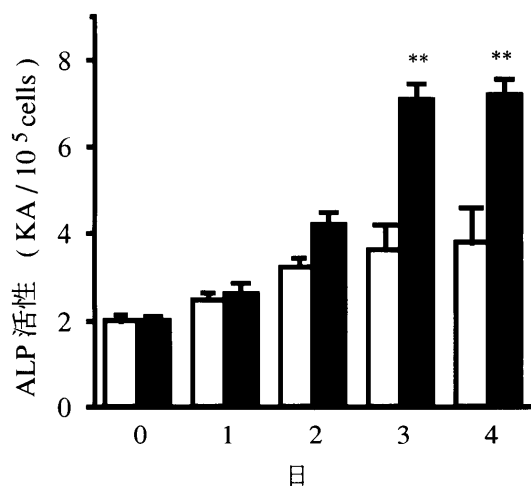


図4 HT-3-M2細胞のALP活性。  
細胞を $1 \times 10^5$  個/mlの濃度で96穴プレートに播種した。細胞が集密状態に達した後より1  $\mu$ M インドメタシン存在下(■)，および非存在下(□)で培養を行い，経時的に細胞内のALP活性を測定した。各点は8 wellの平均値，\*： $p < 0.01$ 。

用することにした。

#### 免疫化学的検討

HT-3-M2細胞は円形の核を有する均一な形態をしている。抗ラットタイプIコラーゲン抗体と反応させることにより細胞質を中心に陽性の反応物質が観察されたが，抗ラットタイプIIコラーゲン抗体には反応しなかった(図2)。この結果はHT-3-M2細胞

の骨芽細胞としての形質のひとつを示している。

#### 2. ALP活性の調節機構

インドメタシンのPGE2産生，ALP活性，DNA合成能に対する影響

96穴プレートに細胞を $1 \times 10^5$  個/mlの濃度で播種し，細胞が集密状態に達した後，培養液を5%の血清を含有するMEMに変更した。培養液を経時的

に採取し、PGE<sub>2</sub> 量と ALP 活性を計測した。PGE<sub>2</sub> はインドメタシン非存在下では時間依存性に増加し、2 日で平衡状態に達した。インドメタシン存在下では PGE<sub>2</sub> の産生は全く認められなかったが、細胞の ALP 活性はインドメタシン非存在下においても時間依存性に増加し、約 3 日で平衡状態に達し、インドメタシン存在下では 3 日以後においても有意に増加した(図 3, 4)。次にインドメタシンの濃度を変えて添加し、ALP 活性と DNA 合成能を計測した。インドメタシンの濃度依存性に ALP 活性は増加したが、DNA 合成能は逆に抑制された(表 1)。さらに PGE<sub>2</sub> はインドメタシン存在・非存在下においても DNA 合成能を抑制した(表 2)。ALP 活性が

表 1 インドメタシンの ALP 活性と DNA 合成能におよぼす作用

インドメタシン (nM)	ALP 活性 (KA/10 <sup>5</sup> cells)	DNA 合成能 (cpm/well)
0	3.80 ± 0.21	1578 ± 364
10	4.08 ± 0.16*	1202 ± 115*
100	6.20 ± 0.44*	1031 ± 336*
1000	7.20 ± 0.36*	804 ± 200*

HT-3-M2 細胞を 96 穴プレートに 1 × 10<sup>5</sup> 個/ml の濃度に播種し、48 時間後に種々の濃度のインドメタシンを添加して 3 日間培養し ALP 活性、DNA 合成能を測定した。

n=8, \*, p<0.01.

表 2 PGE<sub>2</sub> の DNA 合成能におよぼす影響

PGE <sub>2</sub> (nM)	インドメタシン(-) (cpm/well)	インドメタシン(+) (cpm/well)
0	1624 ± 158	1148 ± 244
100	1042 ± 213**	1022 ± 228
1000	812 ± 128**	785 ± 115*

HT-3-M2 細胞を 96 穴プレートに 1 × 10<sup>5</sup> 個/ml の濃度で播種し、48 時間後からインドメタシン (100 nM) 存在、非存在下に種々の濃度の PGE<sub>2</sub> を添加して 3 日間培養し、DNA 合成能を測定した。n=6, \*, p<0.05, \*\*, p<0.01.

表 3 PGE<sub>2</sub> 産生と ALP 活性における PKC の関与

処置	阻害剤	PGE <sub>2</sub> 産生 (ng/10 <sup>5</sup> cells)	ALP 活性 (KA/10 <sup>5</sup> cells)
PDBu			
(-)	(-)	80.2 ± 10.3	3.95 ± 0.62
(+)	(-)	189.4 ± 24.2	2.96 ± 0.28
(+)	H-7	120.3 ± 22.5	4.02 ± 0.28
(+)	staurosporine	130.2 ± 20.3	3.85 ± 0.38
(+)	HA-1004	204.3 ± 32.5	2.73 ± 0.35

HT-3-M2 細胞を 1 × 10<sup>5</sup> 個/ml の濃度で 96 穴プレートに播種し、培養液中の PGE<sub>2</sub> 量と細胞内の ALP 活性を測定した。使用した薬剤の濃度を示す。PDBu (10 μM), H-7 (10 μM), staurosporine (1 μM), HA-1004 (1 μM)。n=8, \*, p<0.01.

亢進し、DNA 合成能が抑制されたことから、この細胞の産生する PGE<sub>2</sub> は細胞増殖を抑制し、細胞分化を促進することが明らかになった。

### 3. PKC

PGE<sub>2</sub> 産生と ALP 活性の調節における PKC の関与

HT-3-M2 細胞にホルボールエステル PDBu を作用させて PGE<sub>2</sub> 産生量を測定した。PDBu 添加により PGE<sub>2</sub> 産生は有意に増加し、PKC の阻害剤である H-7 と staurosporine により部分的に回復し、HA-1004 では回復しなかった。ALP 活性は同様に PDBu 添加により抑制され、H-7 と staurosporine 添加により回復したが、HA-1004 添加では回復しなかった(表 3)。

カルシウムイオノフォアとホルボールエステルの PGE<sub>2</sub> 産生に及ぼす影響

HT-3-M2 細胞にカルシウムイオノフォア A23187 とホルボールエステル PDBu を添加した。いずれの薬剤も PGE<sub>2</sub> 産生を有意に増加させたが、この両者の共存により PGE<sub>2</sub> 産生は相乗的に亢進した(図 5)。同じホルボールエステルであるが PKC に対する活性化作用のない 4α-PDD を使用した場合、この作用は認められなかった。

### 4. NO

ALP 活性の変動

HT-3-M2 細胞に NO の発生剤である SNAP を加え、24 時間後に ALP 活性を測定した。SNAP は濃度依存性に ALP 活性を抑制した(図 6)。

PKC の関与

細胞内の PKC を直接活性化するホルボールエステル PDBu の添加により、HT-3-M2 細胞の NO 産生は濃度依存性に増加した(図 7)。PKC を活性化しないホルボールエステル 4α-PDD (100 nM) を添加してもこの増加は認められなかった。

### 5. 周期的牽引負荷による細胞代謝の変化

PGE<sub>2</sub> と ALP 活性

培養液中にアラキドン酸非添加の状態では PGE<sub>2</sub>

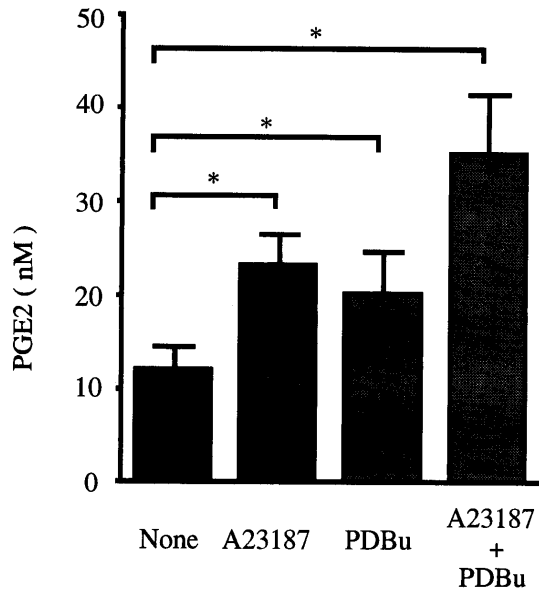


図5 カルシウムイオノフォアとホルボールエステルのPGE2産生に対する作用。  
細胞を $1 \times 10^5$  cells/mlの濃度で96穴プレートに播種し、集密状態に達したものを実験に使用した。calcium ionophore A23187 ( $1 \mu\text{M}$ )とホルボールエステル (PDBu,  $50 \text{ nM}$ )を添加し24時間の培養を行った。各点は6 wellの平均値, \*:  $p < 0.01$ 。

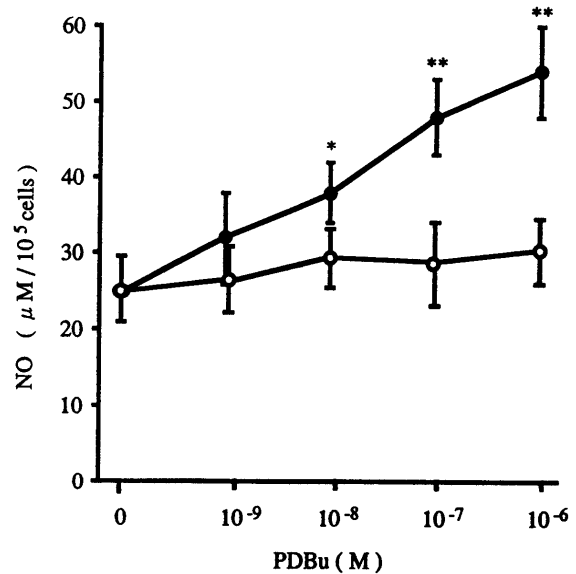


図7 ホルボールエステルのNO産生に対する作用。  
種々の濃度のホルボールエステルを添加し、24時間後の培養液内のNO量を計測した。●: PDBu, ○:  $4\alpha$ -PDD, 各点は8 wellの平均値, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ 。

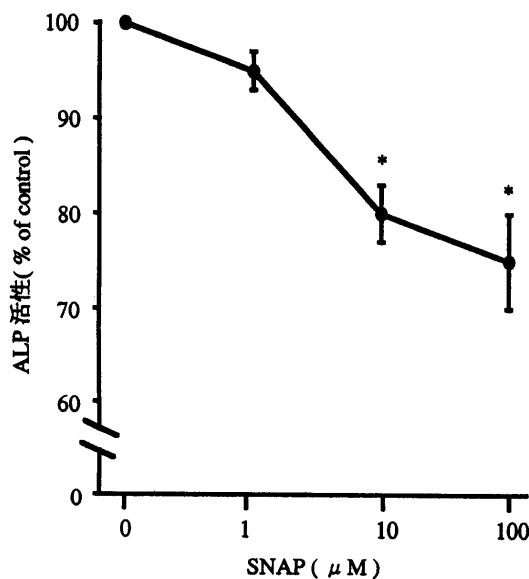


図6 NOのALP活性に対する作用。  
細胞を $1 \times 10^5$  cells/mlの濃度で24穴プレートに播種し、集密状態に達したものを実験に使用した。NOの発生剤であるSNAPを加え、24時間後にALP活性を測定した。各点は8 wellの平均値, \*:  $p < 0.05$ 。

産生は24時間の周期的牽引負荷により明らかに低下した。しかしアラキドン酸を添加した条件では、PGE2産生は牽引負荷無しで明らかに増加し、周期

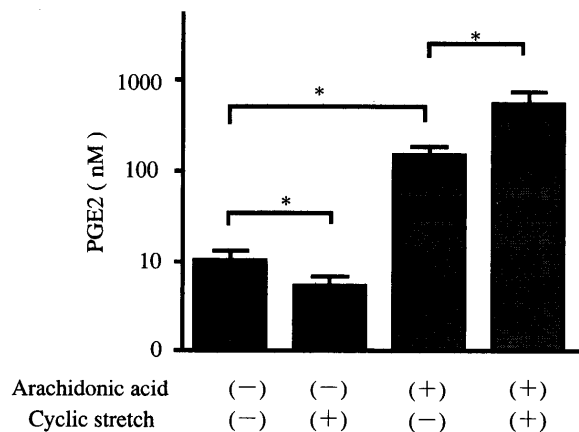


図8 周期的牽引負荷のPGE2産生におよぼす影響。  
HT-3-M2細胞を専用プレートに $1 \times 10^5$  個/wellの細胞密度で播種し、集密状態に達したものをFlexercell strain unitを用いて周期的牽引を24時間負荷した。各点は6 wellの平均値, \*:  $p < 0.01$ 。

的牽引負荷でさらに増加した(図8)。ALP活性はアラキドン酸非添加の状態では牽引負荷により約1.5倍増加した。アラキドン酸を添加した条件では、ALP活性は牽引負荷無しで著明に低下し、牽引負荷でさらに低下した(図9)。

イノシトール3リン酸

牽引負荷無しの場合のHT-3-M2細胞における

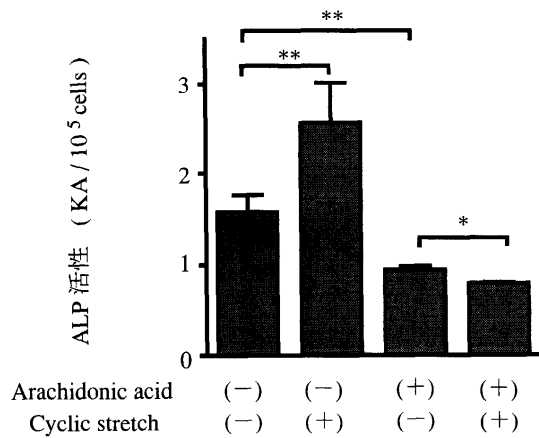


図9 周期的牽引負荷のALP活性におよぼす影響。  
HT-3-M2細胞を専用プレートに $1 \times 10^5$ 個/wellの細胞密度で播種し、集密状態に達した細胞に周期的牽引を24時間負荷した。各点は6wellの平均値, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ .

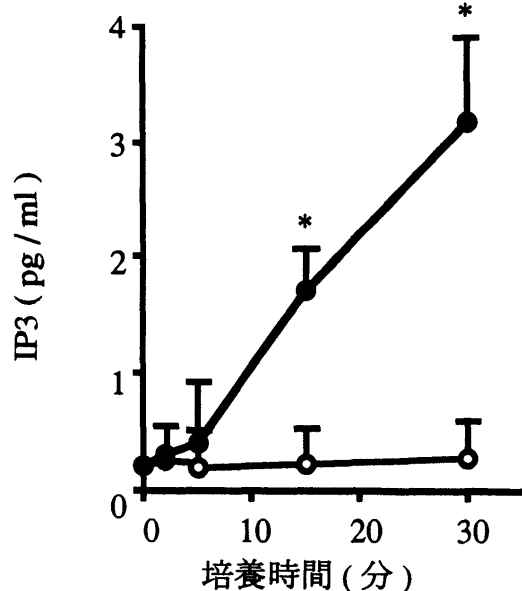


図10 周期的牽引負荷のイノシトール3リン酸産生におよぼす影響。  
HT-3-M2細胞を専用プレートに $1 \times 10^5$ 個/wellの細胞密度で播種し、集密状態に達した細胞に周期的牽引を負荷した。○: 対照, ●: 牽引負荷。各点は6wellの平均値, \*:  $p < 0.01$ .

イノシトール3リン酸量は $0.21 \pm 0.08$  pg/mlであった。周期的牽引負荷によりイノシトール3リン酸量は時間依存性に増加し、30分の牽引負荷により約15倍に増加した(図10)。

#### PKC活性

HT-3-M2細胞に周期的牽引負荷を24時間行い、細胞内のPKC活性を測定した。周期的牽引負荷によりPKC活性は明らかに低下した(表4)。

#### NO産生

HT-3-M2細胞に周期的牽引負荷を24時間行い、培養液中のNO量を測定した。周期的牽引負荷によりNO産生は明らかに低下した(表4)。

### 考 察

Yamasakiらは実験的骨腫瘍細胞(HT-3細胞)を1988年に樹立し、当教室ではこの腫瘍をラットの皮下移植により現在まで継代してきた<sup>4</sup>。Nishiokaらはこの細胞を利用し、動的負荷における骨芽細胞の代謝の変化を検討した<sup>10</sup>。しかし皮下継代を続けるうちにその形質が変化する可能性があるため、均一な細胞集団を得ることを目的に、細胞のクローニングを行った。ALP活性は骨芽細胞の最も重要な形質の一つであり、これを指標として4つの細胞クローンを得た。そのうちインドメタシンによりALP活性が著しく亢進する細胞クローンとしてHT-3-M2を得た。このHT-3-M2細胞は均一な形態を有し、骨基質に特徴的なタイプIコラーゲンを産生する骨芽細胞としての特性をよく継承していた。

そこでこのHT-3-M2細胞を用いたさらなる基礎的検討として、ALP活性を指標としてそれを調節する因子の検討を行うことにし、まずPGE2をとりあげた。PGE2は細胞によって産生されるアラキドン酸の代謝産物であり、その働きとしてYamasakiらはHT-3細胞の産生するPGE2が生体内で破骨細胞を誘導し、骨吸収を惹起することを報告した<sup>4</sup>。これとは別にPGE2は骨形成機能も調節することが報告されている<sup>24</sup>。そこで今回in vitroにおけるPGE2産生とALP活性の時間経過を調べたところ、PGE2およびALP活性はともに播種後3日以

表4 周期的牽引負荷によるPKC活性とNO産生

	PKC活性 (ng/10 <sup>5</sup> cells)		NO産生 ( $\mu$ M/10 <sup>5</sup> cells)	
	対照	牽引負荷	対照	牽引負荷
実験1	201.9 $\pm$ 9.1	176.9 $\pm$ 7.4*	27.9 $\pm$ 4.4	20.4 $\pm$ 2.1*
実験2	189.6 $\pm$ 8.4	165.0 $\pm$ 7.9*	24.1 $\pm$ 3.8	17.9 $\pm$ 4.3*
実験3	215.7 $\pm$ 8.9	180.7 $\pm$ 9.7*	29.9 $\pm$ 3.7	23.1 $\pm$ 3.0*

HT-3-M2細胞を専用のプレートに $1 \times 10^5$ 個/wellの濃度で播種し、集密状態になってから周期的牽引負荷を24時間加えて、PKC活性とNO産生量を測定した。n=6, \*:  $p < 0.01$ .

内に平衡状態に達した。そのため以下の実験は播種後3日で行うこととした。インドメタシンの添加はHT-3-M2細胞におけるPGE2産生を抑制するのみならず、ALP活性を明らかに増加させた。したがってこの細胞クローンにおいては、細胞自身の産生するPGE2がALP活性に対して抑制作用を有すると考えられた。この点を確認するためにインドメタシンの濃度を変化させてALP活性を計測したところ、ALP活性はインドメタシンの濃度依存性に亢進した。しかしPGE2が細胞増殖を増加させ、この結果としてALP活性が亢進した可能性も考えられるので、細胞増殖の指標としてDNA合成能を検討した。その結果インドメタシンは明らかにDNA合成能を濃度依存性に抑制し、さらに外因性に添加したPGE2は明らかにDNA合成能を抑制した。これらの結果より、この細胞クローン(HT-3-M2細胞)の産生するPGE2は細胞増殖を抑制し、細胞分化を促進することが明らかになった。

つぎに本研究ではHT-3-M2細胞においてアラキドン酸より代謝されてPGE2が産生される過程における細胞内情報伝達機構の解析を目指した。FukudaらはすでにHT-3細胞にPKCが存在することを結合実験にて証明している<sup>15</sup>。また西岡らはHT-3細胞株におけるPGE2産生にPKCが関与することを証明した<sup>21</sup>。今回クローン化したHT-3-M2細胞でも同様にPGE2産生にPKCが関与することを、PKCを直接活性化するPDBuとその阻害剤H-7、staurosporineおよびHA1004を用いて確認した。すなわちPDBu添加によりPGE2産生は有意に増加し、H-7やstaurosporineの添加により回復した。HA-1004はPKCに対する特異性が乏しく、このためPDBuに対する抑制作用を認めなかったものと考えられる。また細胞内のPKCを直接活性化させるホルボールエステルPDBuと細胞内のカルシウムイオン濃度を増加させるA23187はともにPGE2の産生を亢進させた。この両者が共存するとPGE2産生は相乗的に増加した。いずれにしても、今回クローニングしたHT-3-M2細胞は、PKCの活性化により増加するPGE2によりALP活性が低下するというこれまでのHT-3細胞株の特性を継承するのみならず、骨芽細胞に対する機械的ストレスの細胞内情報伝達機構をPKCを中心に解析するという本研究の目的に合致するクローンであることが明らかになった。そこで機械的ストレスをこの細胞クローンに加えることにした。

Nishiokaはすでにアラキドン酸非添加の状態での周期的牽引負荷はPGE2産生を抑制し、またALP活性を明らかに亢進させることを報告している<sup>10</sup>。

今回の細胞クローンでもこの結果は同じであった。しかしアラキドン酸添加状態での周期的牽引負荷ではPGE2産生は著明に増加し、これにともないALP活性は抑制された。これはHT-3細胞のアラキドン酸の代謝経路がこれまでに報告された他のクローン化細胞と比較して明らかに亢進しており<sup>25</sup>、大量のPGE2を産生することに起因しているものと考えられる。すなわちPGE2の供給源としてのアラキドン酸を添加しない場合はPGE2産生の亢進にともない早期にアラキドン酸が枯渇し、逆にアラキドン酸を添加した状態では機械的ストレスによりPGE2産生が持続的に亢進したものと考えられる。いずれにしても、細胞の産生するPGE2がALP活性に対して抑制作用を有するとした基礎的検討より得られた結果が、機械的ストレスを加えることによっても確認された。

つぎに周期的牽引負荷がイノシトール代謝におよぼす影響について検討した。血管平滑筋においては機械的ストレスによりイノシトール代謝の亢進することは既に報告されているが<sup>26</sup>、骨芽細胞における報告はなかった。本研究では周期的牽引負荷によりイノシトール3リン酸は時間依存性に増加した。イノシトール磷脂質代謝においてはイノシトール3リン酸はホスホリパーゼCの活性化により合成され、これに続いて、endoplasmic reticulumよりカルシウムイオンが遊離される。最近平滑筋細胞の表面に機械的ストレスを加えるとチャネルが開いて細胞内カルシウムの増加をきたすことが報告された<sup>27</sup>。さらにジアシルグリセロール(DG)が合成され、最終的には細胞のPKCが活性化される<sup>3</sup>。これらのことから、この細胞クローンにおいても周期的牽引負荷がPKCを活性化させる可能性が示唆された。そこで周期的牽引負荷を加えた状態でPKC活性を測定したところ、PKC活性は逆に低下した。以上の結果は機械的ストレスにおける情報伝達機構にPGE2、イノシトール3リン酸、PKCが関与していることを示唆している。しかしながらこれ以外の調節因子もありうるので、本研究では最近注目されているNOの関与についても検討することにした。

同じ条件で行った周期的牽引負荷は軟骨細胞におけるNO誘導を増加させた<sup>9</sup>。しかしHT-3-M2細胞においては逆に機械的ストレスはNO産生を低下させた。このことは細胞の種類によって機械的ストレスに対する応答が異なることを示唆している。そこでNOのHT-3-M2細胞代謝に与える影響について検討した。

まずNOの発生剤であるSNAPを添加し、HT-3-M2細胞のALP活性を測定した。この結果NOは



明らかに ALP 活性を低下させた。これまでも NO は骨芽細胞の DNA 合成能を抑制することが報告されている<sup>28</sup>。しかし骨芽細胞の特徴的な機能に対する検討はなされていなかった。今回の結果より、NO は骨芽細胞の ALP 活性を調節しているガスメディエーターであることは明らかである。また細胞内の PKC を直接活性化させるホルボールエステルは NO 産生を増加させ、NO 産生にも PKC が関与することが本研究により初めて明らかになった。Yamasaki らは PGE2 が破骨細胞を活性化させる因子であることを報告したが、近年 NO が破骨細胞の活性を抑制するとの報告がある<sup>29,30</sup>。PGE2 と NO は骨芽細胞の PKC 活性化にともない産生が増加することが本研究により明らかになった。したがって今後骨代謝における PKC の働きについて、より詳細な検討が必要と思われる。

周期的牽引負荷を加えることにより細胞の PKC 活性が低下することは先に述べた。NO 産生における PKC の関与を証明した今回の結果とあわせて考えると、周期的牽引負荷による PKC 活性の低下が NO 産生の低下につながったものと思われる。この PKC 活性の低下の原因については今後の検討を要するが、現在別のガスメディエーターである活性酸素の関与、細胞内のカルシウムイオンや pH などの機械的ストレスによる細胞内の環境変化にともなうレドックス制御機構が考えられ、今後の研究課題である。いずれにしても骨芽細胞に対する機械的ストレスや NO はその代謝を変化させるが、この情報伝達機構にはプロスタグランジン E2、イノシトール 3 リン酸、プロテインキナーゼ C が関与することが本研究により明らかになった。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました田中清介教授に深謝致します。また、直接のご指導、ご助言をいただいた福田寛二講師ならびに本研究にご協力いただいた教室の諸先生方に心から感謝致します。

本論文の要旨は第11回日本骨代謝学会（平成5年8月、横浜）、第9回日本整形外科学会基礎学術集会（平成6年10月、神戸）、第10回日本整形外科学会基礎学術集会（平成7年10月、神戸）、第2回日米加欧合同本整形外科学会基礎会議（平成7年11月、米国）において発表した。

## 文 献

1. Wang DJ, Huang NN, Gonzalez FA, Heppel LA (1991) Multiple signal transduction pathway lead to extracellular ATP-stimulated mitogenesis in mammalian cells: involvement of protein kinase C-dependent and-independent Pathways. *J Cell Physiol* 146: 473-482
2. Huang NN, Wang DJ, Gonzalez FA, Heppel LA (1991) Multiple Signal Transduction pathway lead to extracellular ATP-stimulated mitogenesis in mammalian cells: a pathway involving arachidonic acid release, prostagrandin synthesis, and cyclic AMP accumulation. *J Cell Physiol* 146: 483-494
3. Nishizuka Y (1986) Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233: 305-312
4. Yamasaki H, Fukuda K, Tanaka S (1989) Bone resorption by experimentally induced osteogenic tumor. *J Bone Mineral Metab* 7: 25-29
5. Hamanishi C, Kawabata T, Yoshii T, Tanaka S (1995) Bone mineral density changes in distracted callus stimulated by pulsed direct electrical current. *Clin Orthop* 312: 247-252
6. Hamanishi C, Yoshii T, Totani Y, Tanaka S (1994) Lengthened callus activated by axial shortening. *Clin Orthop* 307: 250-254
7. Hasegawa S, Sato S, Suzuki Y, Brunette D (1985) Mechanical stretching increases the number of cultured bone cells synthesizing DNA and alters their pattern of protein synthesis. *Calcif Tissue Int* 37: 431-436
8. Binderman I, Zor U, Kaye AM, Shimshoni Z, Harell A, Somjen D. (1988) The transduction of mechanical force into biochemical events in bone cells may involve activation of phospholipase A2. *Calcif Tissue Int* 42: 261-266
9. 斎藤政克 (1994) 培養軟骨細胞代謝に対する周期的牽引の影響. *近畿大医誌* 19: 521-535
10. Nishioka S, Fukuda K, Tanaka S (1993) Cyclic stretch increases alkaline phosphatase activity of osteoblast-like cells: a role for prostaglandin E2. *Bone Mineral* 21: 141-150
11. Brighton CT, Sennett BJ, Farmer JC, Iannotti JP, Hansen CA, Williams JL, Williamson J (1992) The inositol phosphate pathway as a mediator in the proliferative response of rat calvarial bone cells to cyclical biaxial mechanical strain. *J Orthop Res* 10: 385-393
12. Fukuda K, Yamasaki H, Nagata Y, Motoyoshi H, Matsumura F, Kuno T, Tanaka S (1991) Histamine H1-receptor-mediated keratan sulfate production in rabbit chondrocytes: involvement of protein kinase C. *Am J Physiol* 261: C413-416
13. Satsuma H, Saito N, Hamanishi C, Hashima M, Tanaka S (1996) Alpha and epsilon isozymes of protein kinase C in the chondrocytes in normal and early osteoarthritic articular cartilage. *Calcif Tissue Int* 58: 192-194
14. Hamanishi C, Hashima M, Satsuma H, Tanaka S (1996) Protein kinase C activator inhibited progression of osteoarthritis induced in rabbit knee joints. *J Lab Clin Med* 129: 540-544
15. Fukuda K, Ueno M, Saitoh M, Nishioka S, Tanaka S (1995) Activation of protein kinase C and the involvement of prostaglandin E2 in the inhibition of

- osteosarcoma-derived cell alkaline phosphatase activity. *J Lab Clin Med* 126: 269-274
16. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526
  17. Stefanovic-Racic M, Stadler J, Evans CH (1993) Nitric oxide and arthritis. *Arthritis Rheum* 36: 1036-1044
  18. Fukuda K, Kumano F, Takayama M, Saitho M, Otani K, Tanaka S (1995) Zonal difference in nitric oxide synthesis by bovine chondrocytes exposed to interleukin-1. *Inflamm Res* 44: 434-437
  19. 福田寛二, 熊野文雄, 高山正文, 田中清介(1996) Interleukin-1 による軟骨破壊とガスメディエーター. *炎症* 16: 85-89
  20. Sumpio B, Banes A, Levin L, Johnson G (1987) Mechanical stress stimulates aortic endothelial cells to proliferate. *J Vasc Surg* 6: 252-256
  21. 西岡栄恵 (1993) 骨芽細胞における ALP 活性とその細胞内調節機構: プロテインキナーゼ C の関与および周期的牽引の影響. *近畿大医誌* 18: 149-161
  22. Fukuda K, Ohtani K, Dan H, Tanaka S (1995) Interleukin-1 inhibits keratan sulfate production by rabbit chondrocytes: possible role of prostaglandin E2. *Inflamm Res* 44: 178-181
  23. Fukuda K, Matsumura F, Ohtani K, Tanaka S (1993) Keratan Sulfate inhibits its release in rabbit chondrocyte. *Connect Tissue Res* 30: 75-83
  24. Mori S, Jee WSS, Li XJ (1992) Production of new trabecular bone in osteopenic ovariectomized rats by prostaglandin E2. *Calcif Tissue Int* 50: 80-87
  25. Shupnik MA, Tashjian AHJ (1982) Epidermal growth factor and phorbol ester actions on human osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 257: 12161-12164
  26. Ratz PH (1990) Effect of the kinase inhibitor, H-7, on stress, crossbridge phosphorylation, muscle shortening and inositol phosphate production in rabbit arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 252: 253-259
  27. Davis MJ, Meininger GA, Zawieja DC (1992) Stretch-induced increase in intracellular calcium of isolated vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 32: H1292-1299
  28. Ralston S, Todd D, Helfrich M, Benjamin N, Grabowski P (1994) Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase. *Endocrinol* 135: 330-336
  29. Lowik CWGM, Nibbering PH, Ruit M, Papapoulos SE (1994) Inducible production of nitric oxide in osteoblast-like cells and in fetal mouse bone explants is associated with suppression of osteoclastic bone resorption. *J Clin Invest* 93: 1465-1472
  30. Collin-Osdoby P, Nickols G, Osdoby P (1995) Bone cell function, regulation, and communication: a role for nitric oxide. *J Cell Biochem* 57: 399-408