

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

西岡 栄 恵

近畿大学医学部整形外科学教室

Regulation of alkaline phosphatase activity in osteoblasts
by protein kinase C and cyclic strain

Shigetoshi Nishioka

Department of Orthopaedic Surgery, Kinki University
School of Medicine, Osaka, Japan

ABSTRACT

Although alkaline phosphatase activity is a marker of osteoblast differentiation and bone formation, related regulatory mechanisms are not well defined. Osteoblast-like cells (HT-3) have protein kinase C and that alkaline phosphatase activity is reduced with activation of protein kinase C. However, alkaline phosphatase activity is also regulated by prostaglandin E₂, since this activity is reduced in the presence of this prostaglandin. Since it has been shown clinically that induced micromovement leads to rapid healing of long bone fractures, we investigated the effect of applied cyclic stretch on the alkaline phosphatase activity of HT-3 cells, using a computerized and pressure-operated instrument that physically deforms the cells. As cyclic stretch enhanced alkaline phosphatase activity in the cells, the micromovement seems to have a direct effect on osteoblasts. Cyclic stretch reduced production of prostaglandin E₂. It would appear that the stimulatory effect on alkaline phosphatase activity is regulated by a reduction in production of prostaglandin E₂.

Key words : osteoblast, alkaline phosphatase, mechanical stress, prostaglandin 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。骨芽細胞はコラーゲン等の有機基質を合

成するとともに、無機基質を沈着させる働きを有しており、骨代謝における中心的役割を果たしている。アルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase, ALP) は骨芽細胞の特徴的な酵素であり、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知られている。ALP 活性を調節する生物学因子として副甲状腺ホルモン、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。HT-3 細胞は山崎により樹立された細胞株であり、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 cyclic AMP (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特徴を備えている¹。

さて細胞の増殖あるいは分化は、様々な外界の情報によって調節されている。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の解明は、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 cAMP をセカンドメッセンジャーとする系に加えて、最近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²⁻⁵。その特徴は刺激伝達物質が受容体に結合すると、その信号が GTP 結合蛋白を介してフォスホリパーゼ C を活性化し、フォスファチジルイノシトール 2 リン酸 (PIP2) の分解促進が生じることである。その結果 2 つのセカンドメッセンジャーであるイノシトール 3 リン酸 (IP3) とジアシルグリセロール (DG) が産生される。この DG はプロテインキナーゼ C (protein kinase C, PKC) を活性化させ、機能蛋白のリン酸化により細胞応答を引き起こす⁶。今回我々は HT-3 細胞における ALP 調節機構としての PKC の関与について検討した。

以前より骨は荷重に対して反応することが知られている⁷。また骨芽細胞に牽引力を加え、その細胞応答を検討した論文も散見される⁸⁻¹²。しかし骨芽細胞に周期的微動を加え、その影響を検討した報告はない。さらに従来の装置では周期的牽引力を負荷することが困難であり、その構造上の理由で長期に負荷を加えることが困難であった。従って DNA 合成など比較的早期

における現象を捉えることはできても、長期の培養によりはじめて発現される ALP 活性などの分化の指標を検討した報告はない。最近になって、培養細胞に牽引負荷を加える装置が開発された。これは通常の培養器に設置できるという利点があり、1 週間以上の長期培養が可能でありさらには牽引負荷がコンピューターで制御されることで、周期的牽引力を加えることも可能である。

一方骨折においては、従来より骨癒合を得るために強固な固定を行い、骨折部を安定させることが重要であると考えられていたが、最近、骨の長軸方向に周期的に微動 (micromovement) を加えることで骨形成が促進されるとする報告がみられ¹³⁻¹⁴、そこで、今回 HT-3 細胞に対して周期的牽引負荷を加えた時の ALP 活性の変動を解析することにより、骨折治癒の機序との関連を検討した。

材料および方法

1. 細胞培養

HT-3 細胞は山崎によりラットの腹腔内に ³²P を投与して脛骨に発生した骨腫瘍をコラゲナーゼ処理し、得られた細胞をクローニングして樹立された¹。この細胞株は Wistar 系ラットの背部皮下に接種することにより増殖し、これよりコラゲナーゼ処理を行い細胞浮遊液を作製し別のラットに移植が可能である。このようにして現在まで継代されてきた。実験に使用した HT-3 細胞の分離法を示す。継代されてきたラットの背部皮下の腫瘍を、腹腔内に sodium pentobarbital (0.06 ml/100 g) を投与し、麻酔をかけた後、無菌的に採取し、0.2% コラゲナーゼ処理により、HT-3 細胞を分離した。この細胞を 10% ウシ血清 (Logan) 添加 α -minimum essential medium (MEM, Gibco) を用いて、Falcon 3003 円形培養フラスコ (Becton Dickinson) に播種し、37°C、5% CO₂ 飽和水蒸気圧の条件下で培養した。細胞が集密状態に達してから、各種の培養プレートに 10% 血

清存在下で播種した。

2. 周期的牽引負荷

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¹⁵⁻¹⁷。本機には専用のプレート (flexible bottomed culture plate, Flexercell Corp.) があり、そ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II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。HT-3 細胞をプレートに 1×10^5 個/well の細胞密度で播種継代した。プレートを Flexercell に設置した後、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 (Fig. 1)。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出来る。細胞に対する牽引力は1分間に10回のサイクルで、牽引非負荷時に対して最大17%伸張される。(Fig. 2)。細胞培養は10%ウシ血清存在下で37℃、10% CO₂ 飽和水蒸気圧の条件下で行った。

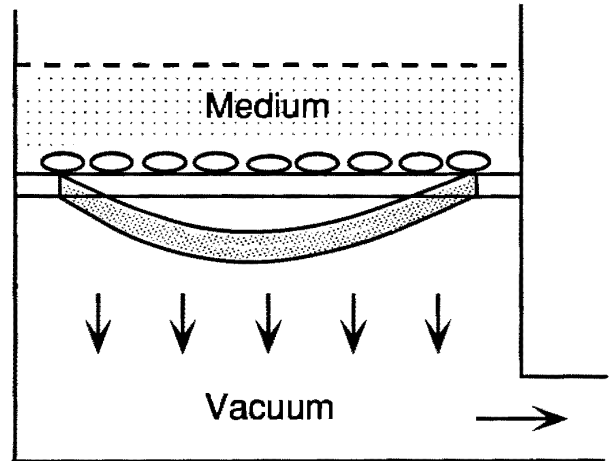


Fig. 1 Flexercell strain unit
The culture plates consist of six wells and each well has a flexible-bottom with collagen coating. The bottom of the culture plates can be stretched over 200%, with a vacuum.

3. 薬剤

Prostagrandin E₂, インドメタシン および phorbol 12, 13-dibutyrate (PDBu) は Sigma より, プロテインキナーゼインヒビターである 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) は生化学工業より, 20-³H (N) phorbol-12, 13-dibutyrate (PDBu, specific radioactivity, 740 GBq/mmol) は Du Pont よ

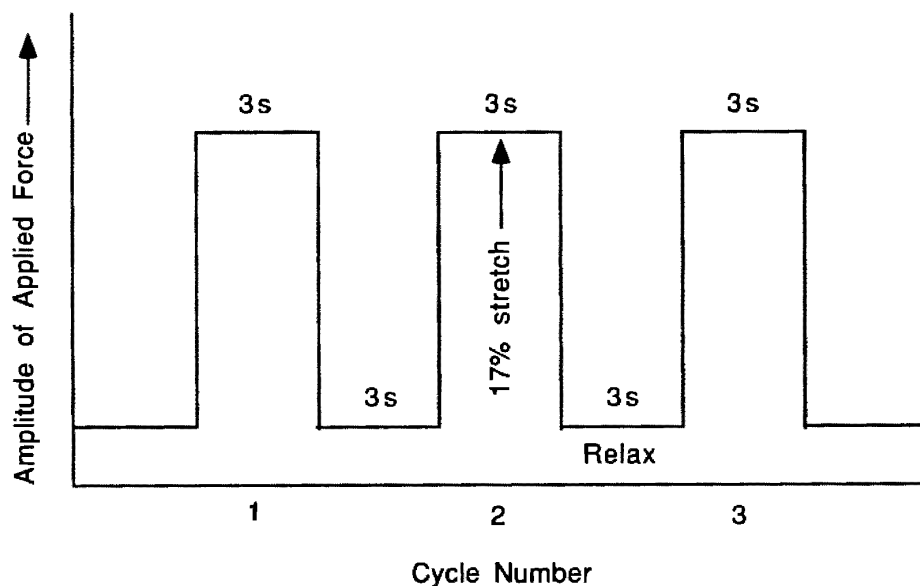


Fig. 2 The strain were applied cycle.

Ten cycles were applied per minute (0.17 Hz) with a tension gradient that was near zero at a center of the culture well and 17% at the periphery. The timing was 3 s of strain and 3 s of relaxatin. The resulting square wave was displayed as the voltage from a pressure transducer.

り, ^3H -thymidine (specific radioactivity, 37 MBq/ml) と ^3H -proline (specific radioactivity: 9.25 MBq/ml) は Amersham より購入した.

4. 組織学的検討

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) にて固定後, ヘマトキシリン染色を行った. また, HT-3 細胞の ALP 染色を ALP 染色 kit (武藤化学薬品) を用いて行った.

5. 結合実験

24穴プレート (Falcon) 内で集密状態となった HT-3 細胞を対象とした. 結合緩衝液 (Hank's basic salt solution, HBSS, 10 mM HEPES, pH 7.4) 1 ml で細胞層を3回洗浄し, 10 nM に調整した標識フォルボールエステル (^3H -PDBu) を含む結合緩衝液 0.6 ml を 4°C の条件下で種々の時間作用させた. その後結合緩衝液 1 ml で3回洗浄し, 0.25%トリプシン処理により細胞を採取し, 液体シンチレーションカウンターを用いて測定し, 全結合量を求めた. 非特異的結合量は PDBu (12 μM) を作用させ測定した. 特異的結合量は全結合量より非特異的結合量を差し引き求めた.

6. ALP 活性

細胞層を 0.2 ml のリン酸緩衝液 (phosphate buffered saline, 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-X100 (0.5%) を加えた. 超音波破碎機 (トミー精工) を使用し, 氷上において 28 kHz・10 W の条件で細胞を約30秒間破碎した. 遠沈 (4°C , 1,500 rpm, 5分) 後, その上清の ALP 活性を Lowry の方法に従い計測した¹⁸.

7. PGE2 合成能

HT-3 細胞が合成する PGE2 を培養上清を検体として測定した. 培養上清 100 μl を採取し, radioimmunoassay kit (Du pont) を用いて PGE2 量を測定した.

8. DNA 合成能

HT-3 細胞の DNA 合成能に及ぼす牽引負

荷の影響を検討するため以下の実験を行った. 細胞を PBS で3回洗浄し, ^3H -thymidine を 2 $\mu\text{Ci/ml}$ となるように培養液中に加えた. 37°C , 5% CO_2 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. 遠沈により得られた不溶画分を 0.3 N NaOH で溶解させ, 6 N 塩酸で中和した. Econofluor (Du Pont) を 10 ml 加え, 液体シンチレーションカウンターを用いて γ 線量 (dpm) を測定した¹⁹.

9. コラーゲン合成能

HT-3 細胞のコラーゲン合成能に対する牽引負荷の影響を検討するため, 牽引負荷後7日の HT-3 細胞に対して血清濃度を5%とし, 48時間の培養を行った. 細胞を PBS で3回洗浄し, ^3H -proline を 4 $\mu\text{Ci/ml}$ となるように加えた. 37°C , 5% CO_2 飽和水蒸気圧の条件下で18時間培養後, 細胞層をさらに3回 PBS で洗浄した. 細胞に 1 ml の NaOH (0.2 N) を加え, 完全に溶解した. 50%トリクロロ酢酸 (半井)・5%タンニン酸を 1 ml 加え, 遠沈により得た不溶画分について液体シンチレーションカウンターを用いて γ 線量 (cpm) を測定した¹⁵.

10. 統計処理

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

結 果

1. HT-3 細胞の ALP 活性の調節機構

1.1. HT-3 細胞の ALP 活性

10%血清存在下の ALP 活性は (17.3 ± 2.1 KA/ 10^6 cells) であった. ALP 染色 (アズ色素法) で細胞内 ALP 活性陽性がみられた (Fig. 3).

1.2. インドメタシン添加による ALP 活性変化

インドメタシン ($10^{-9}\sim 10^{-6}$ M) 存在下で

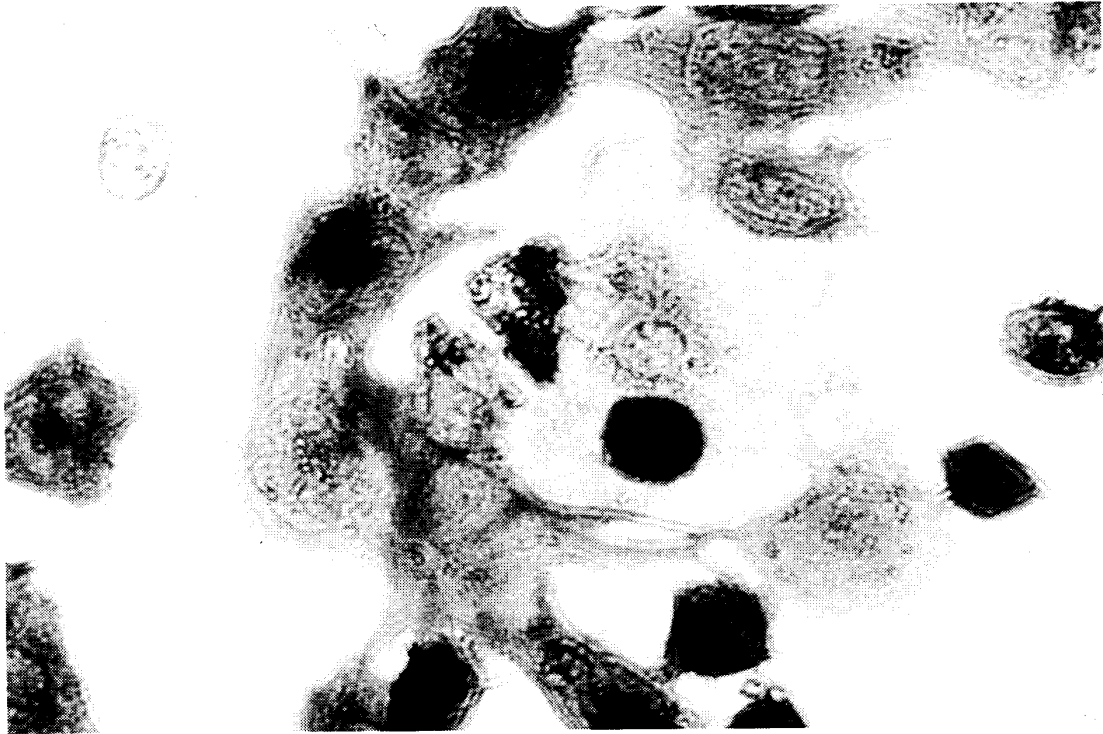


Fig. 3 Alkaline phosphatase stain
Intense alkaline phosphatase activity is diffuse in the cytoplasm of the HT-3 cells($\times 400$)

HT-3 細胞を2日間培養し、ALP 活性の変化を検討した。インドメタシン添加により ALP

活性は 10^{-6} M においてのみ有意に増加した (Fig. 4).

1.3. PGE2 添加による ALP 活性の変化

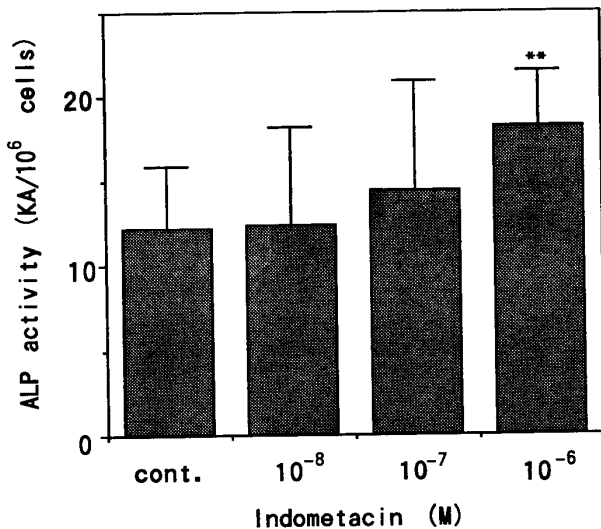


Fig. 4 Effect of Indomethacin on ALP activity
HT-3 cells were incubated with different concentrations of Indomethacin and after 48 h, ALP activity was measured. Data are expressed as percent of control. Data are expressed as means \pm standard deviation for 8 wells. ** $p < 0.01$.

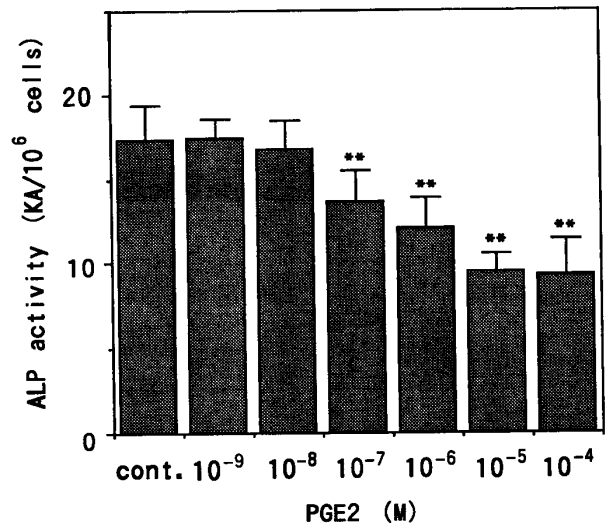


Fig. 5 Effect of PGE2 on basal ALP activity.
HT-3 cells were incubated for 48 h in the presence of different concentrations of PGE2 with Indomethacin($1\mu\text{M}$) to block endogenous PGE2. Data are expressed as means \pm standard deviation for 8 wells. ** $p < 0.01$

インドメタシン (10^{-6} M) 存在下に種々の濃度の PGE2 を添加し2日間培養し, 細胞内の ALP 活性を測定した. PGE2 添加により細胞内の ALP 活性は濃度依存性に抑制された. インドメタシン (10^{-6} M) 存在下において PGE2 非添加時を対照とした PGE2 添加時の ALP 活性における IC_{50} は 100 nM ($n=4$) であった (Fig. 5).

1.4. PDBu の結合実験

^3H -PDBu の全結合量は急速に上昇し, 約20分で平衡状態に達した. また, その結合が平衡状態に達した後, 過剰 ($12\ \mu\text{M}$) の非標識 PDBu を添加すると, 全結合量は10分後には非特異的結合量のレベルとなり, その後一定の値で維持された (Fig. 6). 次に, 種々の濃度の ^3H -PDBu を作用させ, 濃度-結合曲線を作製した. これより Scatchard 解析を行うと, 単一の直線となった. ^3H -PDBu の結合の解離定数 (Kd 値) は 19.9 nM, 最大結合量 (B max) は $35.9\ \text{fmol}/10^4\ \text{cells}$ であった (Fig. 7 A, B).

1.5. PKC 活性化による ALP 活性の変化

HT-3 細胞を96穴プレート (Falcon) に $5\times$

$10^4/\text{ml}$ の細胞濃度で播種した. 細胞が集密状態に達した後, インドメタシン (10^{-6} M) 存在及び非存在下で PKC の activator (PDBu) ま

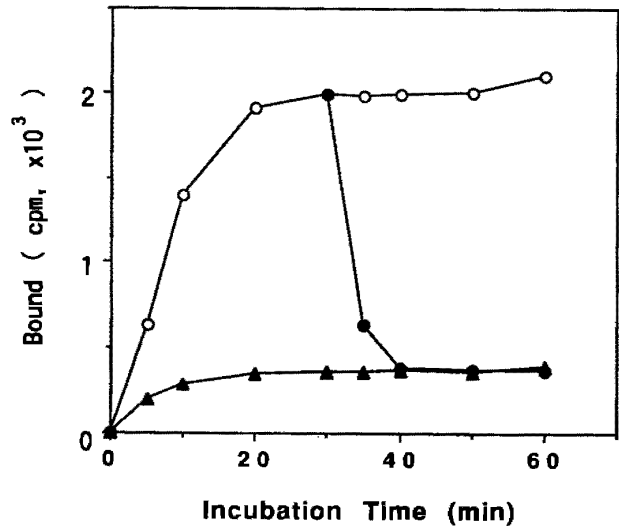


Fig. 6 Time-course of [^3H]-PDBu binding. HT-3 cells were incubated with 10nM of [^3H]-PDBu in the presence (non-specific binding, \blacktriangle) or absence (total binding, \circ) of PDBu ($12\ \mu\text{M}$). After 30 min, PDBu ($12\ \mu\text{M}$) was added to a portion of the cells which had been incubated in the absence of PDBu (\bullet).

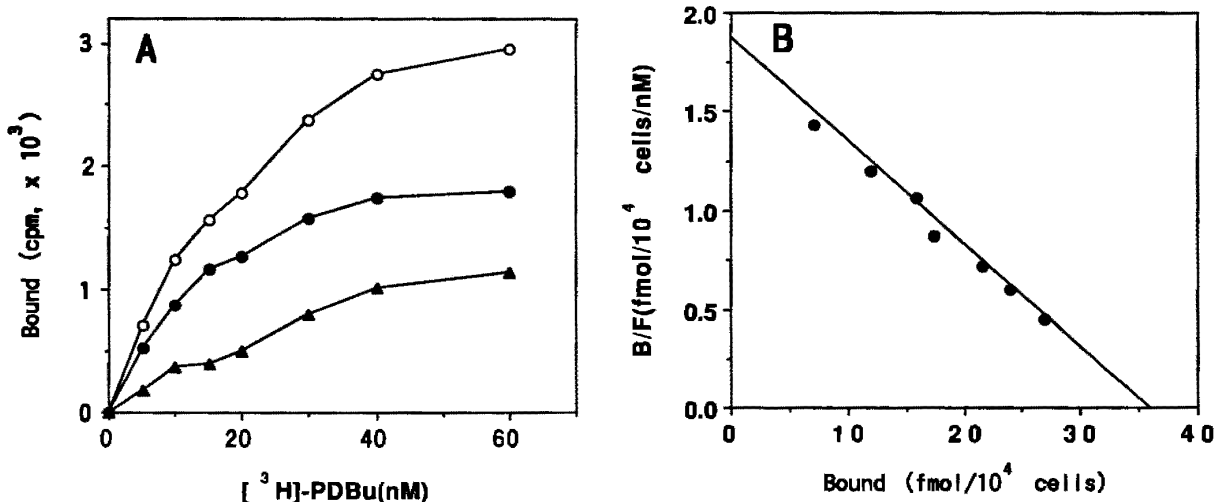


Fig. 7 Binding study of [^3H]-PDBu.

A : Concentration dependency of [^3H]-PDBu. HT-3 cells were incubated with different concentrations of [^3H]-PDBu in the presence or absence of $12\ \mu\text{M}$ PDBu at $4\ ^\circ\text{C}$ for 60 min. The specific binding (\bullet) was plotted at each concentration by subtracting non-specific binding (\blacktriangle) from total binding (\circ). The figure depicts one representative experiment of four. Each point is the mean of three experiments. B : Scatchard plot of [^3H]-PDBu binding to the HT-3 cells. The Kd of binding was 19.9 nM and the maximum binding was $35.9\ \text{fmol}/10^4\ \text{cells}$

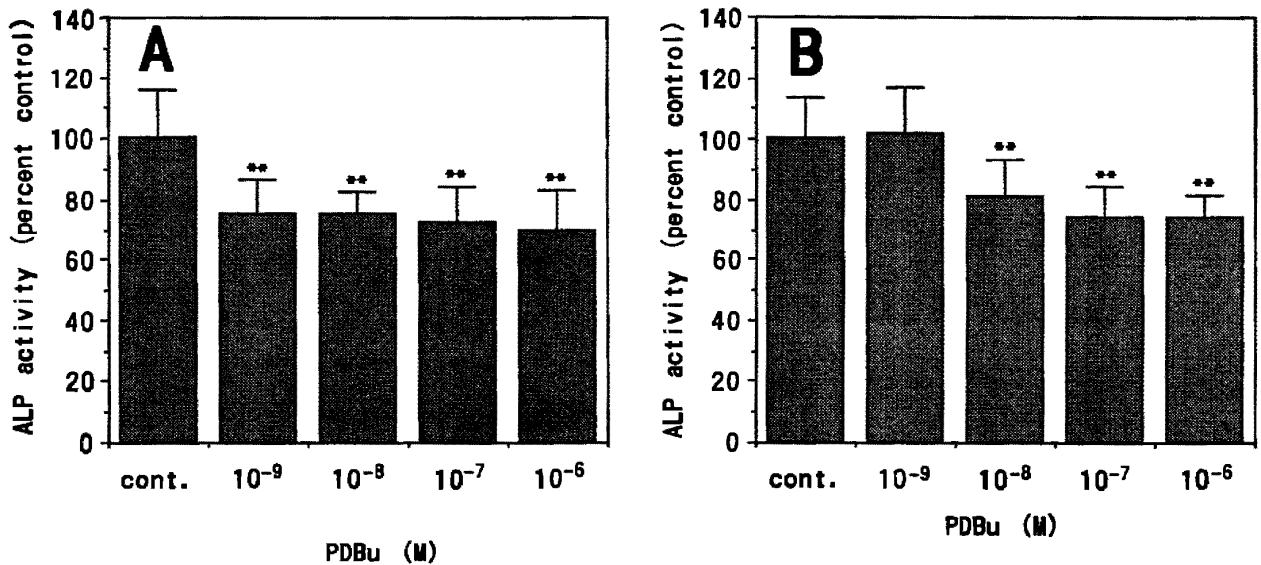


Fig. 8 Effect of PDBu on ALP activity of HT-3 cells.

HT-3 cells were incubated with different concentrations of PDBu in the presence or absence of Indomethacin. Experiments were carried out in the presence (A) or absence (B) of Indomethacin (10⁻⁶M). After 48 h incubation, ALP activity of HT-3 cells were measured. Data are expressed as a percent of control. Columns and bars show mean and standard deviation of 4 different cell preparations. **p<0.01.

Table 1 Effect of H-7 on PDBu-mediated ALP activity

treatment		ALP activity (percent control)
PDBu(nM)	H-7(μM)	
none	none	100.0 ± 15.1
10	none	75.2 ± 7.6**
10	0.1	73.8 ± 6.6**
10	1	78.6 ± 13.3**
10	10	103.2 ± 2.4

HT-3 cells were treated with or without PDBu(10 nM) for 48h. Data are expressed as mean ± S.D.. ** p<0.01

たは inhibitor (H-7) を添加し 2 日間培養した。細胞内 ALP 活性はインドメタシン存在または非存在下のいずれの条件でも, PDBu により濃度依存性に抑制された(Fig. 8 A, B)。この作用は H-7 同時添加により回復された (Table 1)。また PKC の down regulation の影響を検討する目的で, PDBu (1 μM) で 24 時間前処理を行った。さらに PDBu (1 μM) を加え 2 日間培養し, 細胞内の ALP 活性を測定した。PDBu で前処理を行うことにより, PDBu による ALP 活性抑制効果は明らかに消失した

(Fig. 9)。

1.6. PKC 活性化により産生される PGE2 の変化

インドメタシン非添加・10% 血清存在下で HT-3 細胞に種々の濃度の PDBu を反応させ, 培養液中に産生される PGE2 の濃度を測定した。PDBu 刺激により HT-3 細胞の産生する PGE2 は約 2 倍に増加した (Fig. 10)。

2. 牽引負荷の影響

2.1. 組織学的検討

牽引開始 7 日後の HT-3 細胞の形態を組織学的に検討した。非負荷の対照では細胞は多形性を示し, 均一な配列様式を示さない。しかし牽引負荷により, 特に辺縁部において, 牽引方向に直交する方向で細胞は線維状の配列を示した (Fig. 11)。

2.2. ALP 活性

牽引負荷 1, 3, 7 日後の細胞内の ALP 活性を測定した。牽引負荷により HT-3 細胞の ALP 活性は 3 日目より対照に比較して約 1.5 倍と有意に亢進した。牽引負荷 7 日後には正常の約 1.9 倍とさらに増加した (Fig. 12)。

2.3. PGE2 合成能

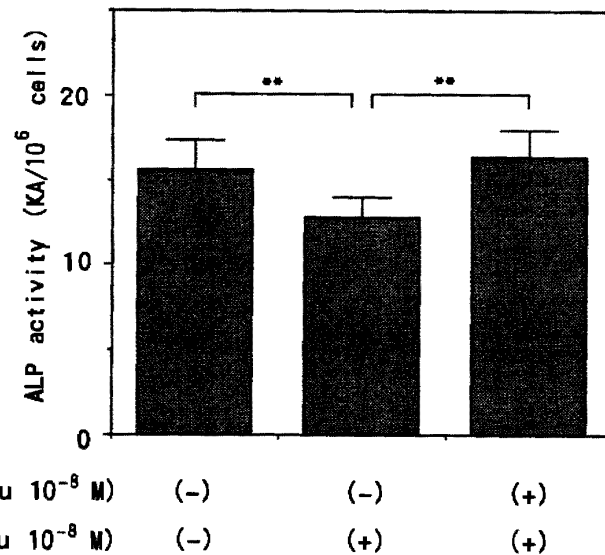


Fig. 9 Effect of preincubation with PDBu on ALP activity.

HT-3 cells were incubated in the presence or absence of $1\mu\text{M}$ of PDBu for 24 h. The cell layer was washed 3 times with PBS and further incubated for 48 h in the presence or absence of PDBu ($1\mu\text{M}$). Data are expressed as means \pm standard deviation for 8 wells. ** $p < 0.01$

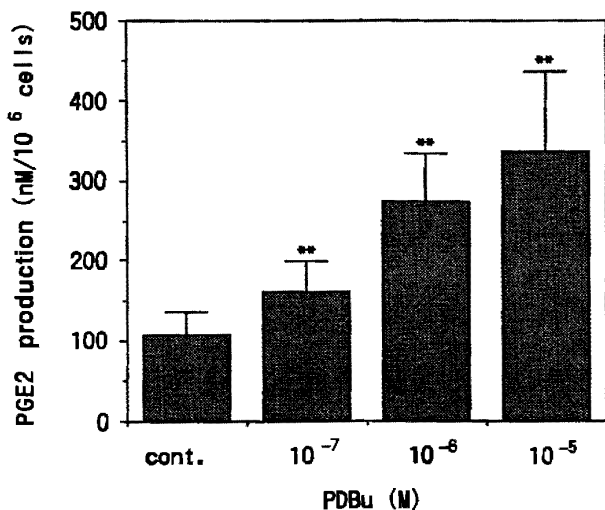


Fig. 10 Effect of PDBu on PGE2 production. HT-3 cells were cultured in the presence of different concentrations of PDBu for 48 h and the concentrations of PGE2 were determined using RIA. Data are expressed as means \pm standard deviation for 8 wells. ** $p < 0.01$

HT-3 細胞が合成する PGE2 を培養上清を検体として測定した。HT-3 細胞は活発に PGE2 を合成し、培養開始10分後には約 3 nM と測定可能となった。その後も活発な合成が続き、非牽引下では $71.2 \pm 4.1\text{ ng/ml}$ ($n=6$) に達した。これは約 200 nM の濃度に相当する。牽引負荷によっても PGE2 は増加するものの、

培養開始2日後の PGE2 量は $42.7 \pm 3.4\text{ ng/ml}$ ($n=6$) であり、その後も一定のレベルに維持された。この濃度は約 120 nM となり、対照に比較して有意に低値であった。インドメタシン ($1\mu\text{M}$) の添加により培養上清に放出される PGE2 は何れの時期にも完全に抑制された (Fig. 13)。

2.4. DNA 合成能

牽引負荷後1, 3, 5, 7日後に ^3H -thymidine の DNA への取り込みを指標に測定した。牽引負荷により HT-3 細胞の DNA 合成能は3日目より有意に亢進した。牽引負荷5日後には対照の約2.6倍に達し、7日後には牽引負荷による DNA 合成の亢進は認められなくなった (Fig. 14)。

2.5. コラーゲン合成能

HT-3 細胞のコラーゲン合成能に対する牽引負荷の影響を ^3H -proline のトリクロロ酢酸不溶画分への取り込みを指標に検討した。牽引負荷7日後のコラーゲン合成を測定したところ、牽引負荷では $5.23 \pm 0.42\text{ cpm}$, $\times 10^4/\text{well}$ ($n=6$) となり対照の $4.10 \pm 0.37\text{ cpm}$, $\times 10^4/\text{well}$ ($n=6$) と比べ、1.28倍と有意に増加していた。

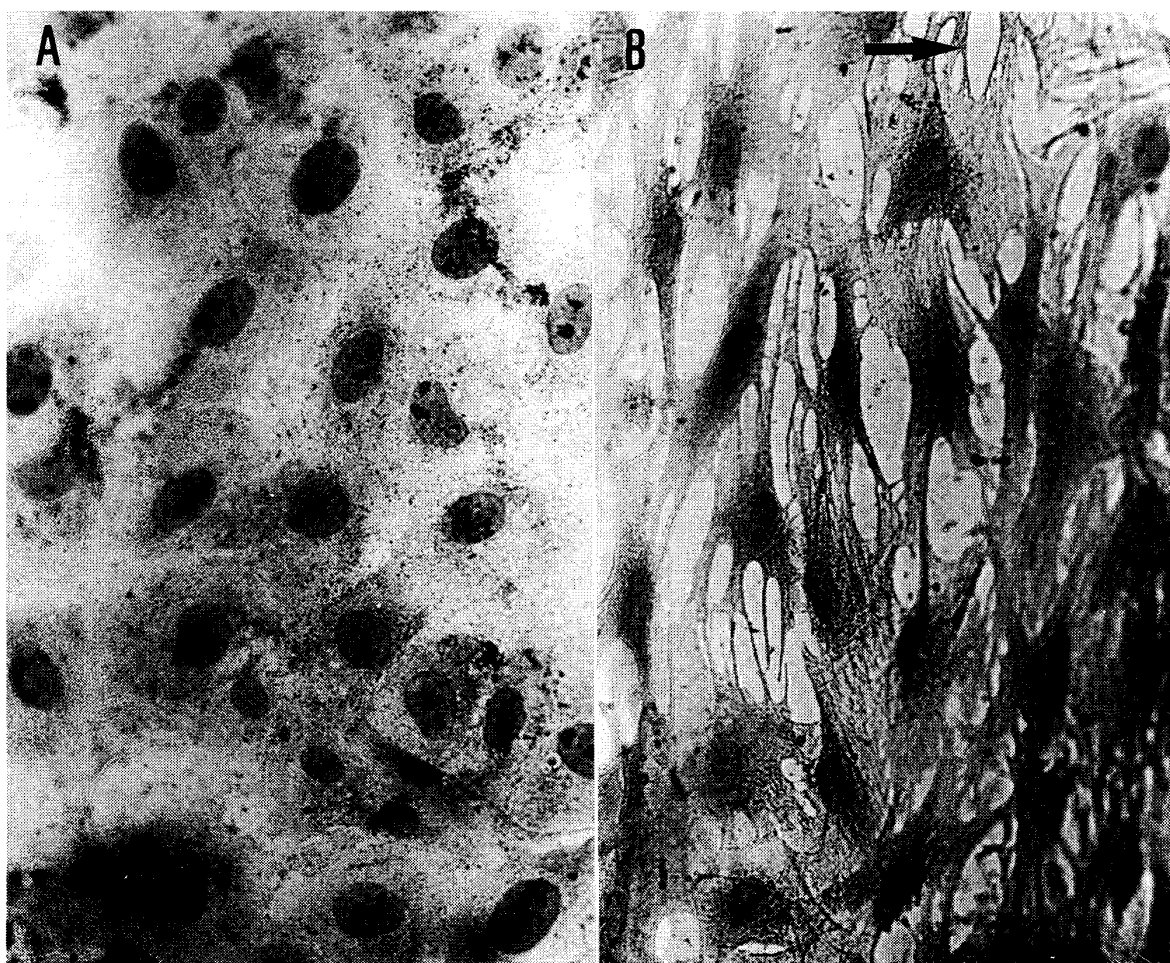


Fig. 11E Effect of cyclic tensile stretch on morphology of HT-3 cells. HT-3 cells were placed under cyclic tensile stretch for 5 days. The arrow indicates direction of the strain field. A : control, B : cyclic stretch, Hematoxylin stain($\times 400$).

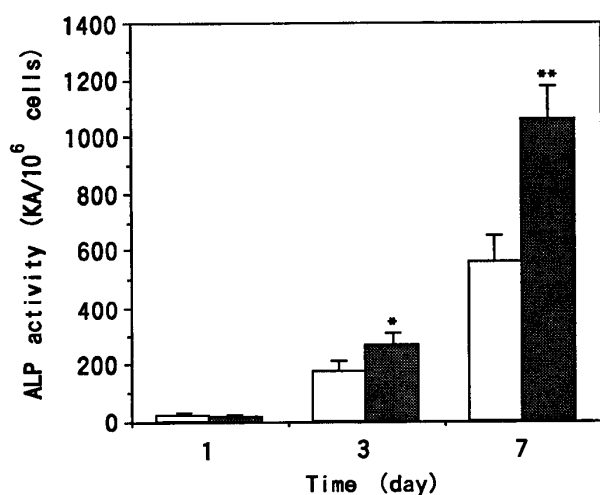


Fig. 12 Effect of the cyclic tensile stretch on ALP activity. After appropriate culture periods, HT-3 cells were washed and sonicated and ALP activity was assayed. Open and hatched columns indicate static control and cyclic stretch, respectively. Data are expressed as means \pm standard deviation for 6 wells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

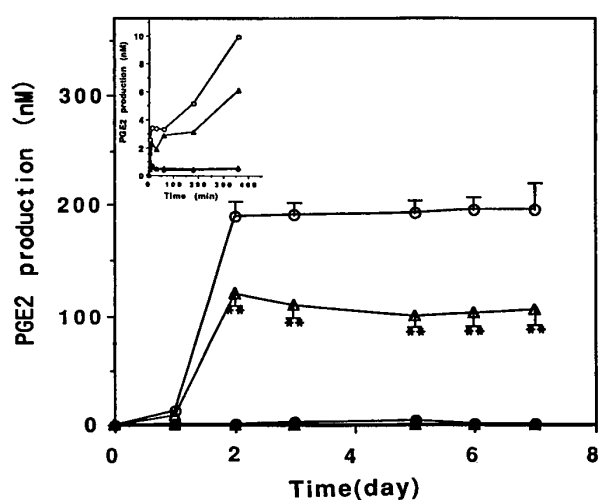


Fig. 13 Effect of the cyclic tensile stretch on PGE2 production. The concentration of PGE2 in the medium was quantified using RIA. Circle:static control. Triangle : cyclic stretch. Open and closed symbols indicate the absence or presence of indomethacin, respectively. Data are expressed as means \pm standard deviation for 6 wells. ** $p < 0.01$

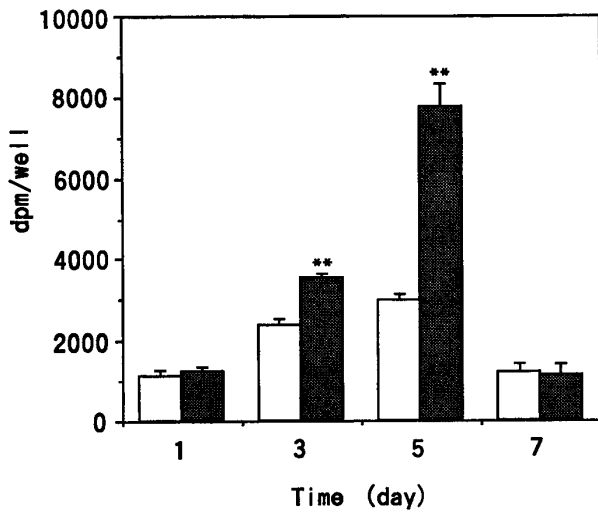


Fig. 14 Effect of the cyclic tensile stretch on DNA synthesis. The incorporation of [^3H]-thymidine was used to measure DNA synthesis. Open and hatched columns indicate static control and cyclic stretch, respectively. Data are expressed as means \pm standard deviation for 6 wells. ** $p < 0.01$.

考 察

1. HT-3 細胞における ALP 活性の調節機構

HT-3 細胞は ALP 活性陽性で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特徴を有している。山崎は HT-3 細胞が破骨細胞活性化因子を産生していることを *in vitro*, *in vivo* の系で証明した。この活性化因子としてプロスタグランジン様物質の存在が示唆された¹。今回著者は HT-3 細胞の産生する PGE2 量を測定し、HT-3 細胞が 200 nM という他の骨芽細胞株に比較して大量の PGE2 を産生していることを明らかにした²⁰⁻²¹。

そこでこの PGE2 産生が自己分泌 (auto-crine) 的に働いて HT-3 細胞の ALP 活性を調節していることが考えられる。このことを証明するために、シクロオキシゲナーゼを阻害するインドメタシンを HT-3 細胞に添加し、ALP 活性の変化を検討した。インドメタシンは HT-3 細胞の ALP 活性を有意に増加させた。こ

れはアラキドン酸カスケードにおけるシクロオキシゲナーゼ系の産物である PGE2 が、ALP 活性を抑制していることを示唆している²²。これを証明するために、内因性の PGE2 合成をインドメタシン添加により停止させた状態で、外因性に PGE2 を加え ALP 活性を測定した。この結果 PGE2 は明らかに ALP 活性を抑制した。以上の結果より、HT-3 細胞の ALP 活性は細胞内 PGE2 だけでなく、自己分泌された細胞外の PGE2 によっても調節されていることが示唆された。

PKC は1977年西塚²により発見された。ジアシルグリセロールにより本酵素が活性化されることが報告されて以来、この酵素は受容体刺激に共役したイノシトールリン脂質の代謝回転の鍵となることが知られている。今回、著者は PKC が HT-3 細胞に存在することを証明し、ついで骨芽細胞の最も重要な分化の指標である ALP 活性に及ぼす PKC 活性化の役割を検討した。 ^3H -PDBu を用いた結合実験では、全結合量は時間依存性に増加し、平衡状態に達した。大量の非標識 PDBu 添加でこの結合が解離されることより、標識物質の取り込みは非特異的ではなく、PKC への直接の取り込みであることが明らかにされた。このことは HT-3 細胞に PKC が存在していることを証明するものである。得られた結合の解離定数 (Kd) 及び最大結合量 (B max) は、何れも他の細胞と同様の値であった²³⁻²⁴。細胞内の PKC を直接活性化することが知られている PDBu の添加により、HT-3 細胞の ALP 活性は明らかに抑制された。これは PKC の阻害剤である H-7 の添加により回復された。さらに PDBu の前処置により、PDBu による ALP 活性の抑制はダウンレギュレーションされた。これらの事実より HT-3 細胞における ALP 活性は PKC で調節されていることが証明された。

そこで、HT-3 細胞の PGE2 産生における PKC の役割を検討した。HT-3 細胞に PDBu を作用させ PGE2 を測定した結果、PDBu は PGE2 を誘導することが明らかになった。以

上の結果をまとめると、HT-3 細胞における ALP 活性と PGE2 産生にはいずれも PKC が関与しており、その活性化により ALP 活性は抑制され、PGE2 産生は増加する。さらに PKC の活性化により細胞外周囲に増加した PGE2 は自己分泌的に働いて ALP 活性を抑制することが示唆された。しかしインドメタシン存在下で PGE2 産生を停止させた状態でも、PDBu は ALP 活性を抑制した。従って PKC は単に PGE2 産生を介して間接的に ALP 活性を制御するのみならず、ALP 活性に対する直接の制御機構も有していることが示唆された。PGE2 は骨代謝に重要な働きをする事が示唆されているが²⁵⁻²⁹、ALP 活性に直接影響を与えるとした報告はなく、これら両者間に PKC が関与することが今回の研究により始めて明らかになった。

2. 周期的牽引の影響

HT-3 細胞に周期的牽引力を加え種々の細胞応答を検討した。牽引負荷により Buckley ら¹⁰の報告と同様の細胞の形態変化が認められた。これは実験的仮骨延長にみられる骨芽細胞の線維状配列と同様である³⁰。Buckley らはこの形態変化の原因として、牽引負荷により線維状配列をしていない細胞のみが選択的に脱落する可能性を示唆している。しかし今回の検討により周期的牽引が細胞数の増加及び DNA 合成能の亢進をきたしたことから、機械的刺激により細胞が脱落するとは考え難く、線維性の配列は牽引負荷に対応して細胞そのものが形態変化を示したものと思われる。

周期的牽引により HT-3 細胞の形態変化はみられるものの、骨芽細胞の特性である ALP 活性については失われることなく、むしろその増加がみられた。また、ALP 活性は骨芽細胞の分化の指標として用いられており、牽引負荷が骨芽細胞の分化を促進することが示唆された。また、周期的牽引力の PGE2 産生に及ぼす影響を検討した。周期的牽引力により HT-3 細胞の産生する PGE2 は 120 nM と明らかに

抑制された。外因性に加えた PGE2 は ALP 活性を抑制し、この IC₅₀ が 100 nM であることより、周期的牽引により増加した ALP 活性は、PGE2 産生の抑制を通じて引き起こされたものと思われる。

詳細については現在も不明であるが、*in vitro* における骨芽細胞の ALP 活性は石灰化における重要な役割を果たしている。一方 *in vivo* では ALP 活性は骨芽細胞の分化の指標と考えられている。したがって仮骨延長にみられる骨形成の機序として、牽引負荷が ALP の活性を亢進させ、骨芽細胞の分化を促進、さらには蛋白・コラーゲンの合成を促すことが考えられる。今回の研究では周期的牽引負荷により HT-3 細胞における蛋白およびコラーゲン合成の増加がみられた。臨床的に骨折に対して *dynamic axial fixation* を行って、骨折部に周期的微動を加えると骨癒合が促進されることが報告されており^{13,19}、また骨折治癒過程において骨芽細胞の増殖および蛋白・コラーゲン合成の増加は、仮骨形成に必須の現象である³¹⁻³²。今回の検討はこれらの現象を *in vitro* で再現し証明したものといえる。

以上、今回の研究は HT-3 細胞における PGE2 が自己調節機構を有し、その中心に PKC の存在があることを示した。今後牽引負荷時の PKC の変動を検討することにより、牽引状態での骨芽細胞の応答における詳細な細胞内情報伝達機構が明らかになるとともに、骨折治癒や仮骨延長における骨形成機序もさらに明らかになるとと思われる。

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10回日本骨代謝学会（平成4年7月23日、東京）、第7回日本整形外科学会基礎学術集会（平成4年10月8日、東京）において発表した。

文 献

1. Yamasaki H, Fukuda K, Tanaka S. Bone resorption by experimentally induced osteogenic tumor. *J Bone Mineral Metabolism* 1989 ; 7: 25-29.
2. Nisizuka, Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* 1984 ; 308 : 693-698.
3. Kozawa O, Tokuda H, Miwa M, et al. Cross-talk regulation between cyclic AMP production and phosphoinositide hydrolysis induced by prostaglandin E2 in osteoblast-like cells. *Exp Cell Res* 1992 ; 198 : 130-134.
4. Wang DJI, Huang NA, Fernando A, et al. Multiple signal transduction pathway lead to extracellular ATP-stimulated mitogenesis mammalian cells: I. Involvement of protein kinase C-dependent and-independent pathways. *J Cell Physiol* 1991 ; 146 : 473-482.
5. Wang DJI, Fernando A, Gonzalez FA, et al. Multiple signal transduction pathway lead to extracellular ATP-stimulated mitogenesis in mammalian cells: II. A pathway involving arachidonic acid release, prostaglandin synthesis, and cyclic AMP accumulation. *J Cell Physiol* 1991 ; 146 : 483-494.
6. 竹縄忠臣. 新しい情報伝達系の発見と展開. *実験医学* 1989 ; 7 : 18-21.
7. Morey ER, Baylink DJ. Inhibition of bone formation during space flight. *Science* 1978 ; 201 : 1138-1141.
8. Harrell A, Dekel S, Binderman I. Biochemical effect of mechanical stress on cultured bone cells. *Calcif Tissue Res (supple)* 1977 ; 22 : 202-209.
9. Hasegawa S, Sato S, Suzuki Y, et al. Mechanical stretching increases the number of cultured bone cells synthesizing DNA and alters their pattern of protein synthesis. *Calcif Tissue Int* 1985 ; 37 : 431-436.
10. Burklay MJ, Banes AJ, Levin LG, et al. Osteoblasts increase their rate of division and align in response to cyclic, mechanical tension in vitro. *Bone and Mineral* 1988 ; 4 : 225-236.
11. Somjen D, Binderman I, Berger E, et al. Bone remodeling induced by physical stress is prostaglandin E2 modulated. *Biochim Biophys Acta* 1980 ; 627 : 91-100.
12. Murray DW, Rushton N. The effect of strain on bone cell prostaglandin E2 release: A new experimental method. *Calcif Tissue Int* 1990 ; 47 : 35-39.
13. Aronson J, Harrison B, Boyd CHM, et al. Mechanical induction of osteogenesis: The importance of pin rigidity. *J Pediat Orthop* 1988 ; 8 : 396-401.
14. Goodship A, Kenwright J. The influence of induced micromotion upon the healing of experimental tibial fractures. *J Bone Joint Surg* 1985 ; 67B : 650-655.
15. Sampio BE, Burns AJ, Link WG, et al. Enhanced collagen production by smooth muscle cells during repetitive mechanical stretching. *Arch Surg* 1988 ; 123 : 1233-1236.
16. Brunette DM. Mechanical stretching increases the number of epithelial cells synthesizing DNA in culture. *J Cell Sci* 1989 ; 69 : 35-45.
17. Sumpio BE, Bans AJ, Levin LG, et al. Mechanical stress stimulates aortic endothelial cells to proliferate. *J Vascular Surg* 1987 ; 6 : 252-257.
18. Lowry OH, Rubeuts NR, Wu ML, et al. The quantitative histochemistry of brain: Enzyme measurements. *J Biol Chem* 1954 ; 207 : 19-37.
19. Gliser JH, Conrad HE. Properties of chick embryo chondrocytes grown in serum-free medium. *J Biol Chem* 1984 ; 259 : 6766-6772.
20. Shibata Y, Ogura N, Moriya Y, et al. Platelet-activating factor stimulates production of prostaglandin E2 in murine osteoblast-like cell line MC3T3-E1. *Life Sciences* 1991 ; 49 : 1103-1109.
21. Tatakis DN, Schneeberger G, Dziak R. Recombinant interleukin-1 (IL-1) stimulates prostaglandin E2 production by osteoblastic cells: Role of calcium, calmodulin, and cAMP. *Lymph Cyto Res* 1991 ; 10 : 95-99.
22. Smith WL. The eicosanoids and their biochemical mechanism of action. *Biochim J* 1989 ; 259 : 315-324.
23. Jaken S, Tashjian AH, Blumberg PM. Characterization of phorbol ester receptors and their down-modulation in GH₄C₁ rat pituitary cells. *Cancer Res* 1981 ; 41 : 2175-2181.
24. Sando JJ, Hilfiker ML, Salmon DS, et al. Specific receptor for phorbol esters in lymphoid cell populations: Role in enhanced production

- of T-cell growth factor. *Proc Natl Acad Sci* 1981 ; 78 : 1189-1193.
25. Farndale RW, Sanday SJ, Atkinson SR, et al. Parathyroid hormone and prostaglandin E2 stimulate both inositol phosphates and cyclic AMP accumulation in mouse osteoblast cultures. *Biochem J* 1988 ; 252 : 263-268.
26. Ueda K, Saito A, Nakano H, et al. Cortical hyperostosis following long term administration of prostaglandin E2 in infant with cyanotic congenital heart disease. *J Pediat* 1980 ; 97 : 834-836.
27. Li XJ, Jee WSS, Li LY, et al. Transient effects of subcutaneously administered prostaglandin E2 on cancellous and cortical bone in young adult dogs. *Bone* 1990 ; 11 : 353-364.
28. Mori S, Jee WSS, Li XJ. Production of new trabecular bone in osteopenic ovariectomized rats by prostaglandin E2. *Calcif Tissue Int* 1992 ; 50 : 80-87.
29. Morita I, Toriyama K, Murota S. Effects of prostaglandin E2 on phenotype on osteoblast-like cells. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res* 1989 ; 19 : 419-422.
30. Aronson J. The biology of distraction osteogenesis. Maiocchi AB, Aronson J. Operative principles of Ilizarov. In: Baltimore: Williams & Wilkins, 1991 ; 42-52.
31. Turek SL. Physiology and mineralization of bone. Third edition. Philadelphia, Lippincott, 1977.
32. 高橋栄明, 骨折の病態生理: 須田立雄編. 骨の科学. 東京: 医歯薬出版, 1985 ; 212-221.