

## バイブレーションによる加速度負荷に対する骨芽細胞及び破骨細胞の応答

鈴木信雄<sup>1</sup>, 北村敬一郎<sup>2</sup>, 根本 鉄<sup>2</sup>, 服部淳彦<sup>3</sup>

<sup>1</sup>〒927-0553 鳳珠郡能登町小木 金沢大学環日本海域環境研究センター, 臨海実験施設; <sup>2</sup>〒920-0942 金沢市小立野 金沢大学大学院医学系研究科; <sup>3</sup>〒272-0827 千葉県市川市国府台 東京医科歯科大学 教養部

Nobuo SUZUKI<sup>1</sup>, Kei-Ichiro KITAMURA<sup>2</sup>, Tetsu NEMOTO<sup>2</sup>, Atsuhiko HATTORI<sup>3</sup>: Response of osteoblasts and osteoclasts to acceleration loading by vibration

魚類のウロコは、膜性骨に似た硬組織であり<sup>1)</sup>、I型コラーゲンからなる線維層とヒドロキシアパタイトから構成される骨質層の上に、骨芽細胞と破骨細胞が共存し、骨代謝を行っている。そこで我々はウロコの特徴に注目し、キンギョのウロコを用いて培養システムを開発した。キンギョの場合、1個体からほぼ均一な細胞活性をもつウロコを約100枚もサンプリングでき、ホルモン<sup>2, 3)</sup>、内分泌攪乱化学物質<sup>4, 5)</sup>、重金属<sup>6)</sup>等の様々な物質に対する影響を容易に解析できる。したがってウロコを用いると、株細胞や初代培養細胞では再現できない骨芽細胞と破骨細胞の相互作用が、生体内に近い状態で再現できる。そこで本研究では、バイブレーションによる加速度の影響を解析した。

材料としてキンギョ (*Carassius auratus*) を用い、以下2種類の実験を行った。

実験1：バイブレーションによる加速度負荷の骨芽細胞及び破骨細胞に及ぼす影響

材料としてキンギョ (メス、体重50-80 g) を用いた。これらのキンギョをMS-222で麻酔し、キンギョからウロコを取った。そのウロコを1.5 ml用のエッペンドルフチューブ (BM機器) に入れた。次にそのチューブにHEPES (20 mM)

(pH 7.0) 及び抗生物質 (1%) を含む培地 (MEM、ICN Biomedicals Inc.) を500 µl加え、ウロコが回転により動かなくするために、綿球 (直径1 cm) を入れてウロコを固定した。このチューブをFig.1の装置にセットし、0.5, 1, 2, 4, 6Gで5及び10分間処理し、その後6及び24時間培養し、ウロコの骨芽細胞及び破骨細胞の活性を測定した。骨芽細胞及び破骨細胞の活性の測定方法は Suzuki and Hattori (2002) により行った。

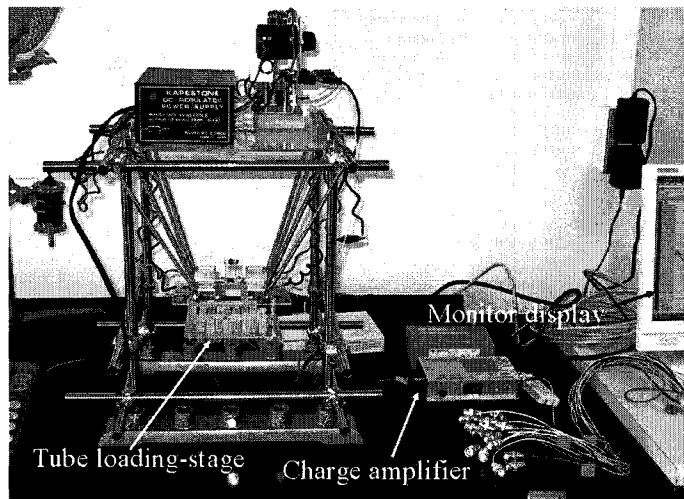


Fig. 1 Photograph of a custom-made G-load apparatus, providing a sine wave of acceleration ranging from 0.5-G to 12-G.

なおこの加速度発生装置は、サンプルステージに直接加速度計を設置し、それを増幅し、モニターにおいてリアルタイムで表示し、実際にチューブに加わっている加速度を計測しながら実験を行った。

実験2：ウロコの骨芽細胞及び破骨細胞で発現している遺伝子に対する加速度負荷の影響

キンギョのウロコを取り、実験1と同様にFig.1の装置にチューブをセットし、0.5, 1, 2, 4, 6Gで

5及び10分間処理し、その後6及び24時間培養した。そのウロコからアイソゲン（ニッポンジーン）によりmRNAを抽出し、タカラのキットを用いてcDNAを合成した。骨芽細胞のマーカであるestrogen receptor (ER) 及び破骨細胞のマーカであるtartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)の発現をRT-PCRにより解析した。

ウロコの骨芽細胞は1Gという低強度の重力刺激にも応答し、強度が上昇すると共に骨芽細胞の活性も上昇し、6Gで最も高くなった。なお、骨芽細胞の応答は主に6時間培養で有意に変化し、24時間培養では6Gのみ有意に上昇した。一方破骨細胞も0.5及び1Gという低強度の重力刺激でも反応し、6時間培養では変化せず、24時間でその活性が低下した。2Gで最も破骨細胞の活性抑制作用が強く、6及び24時間でも反応した。4及び6Gでは有意差が認められたが、徐々に破骨細胞の活性抑制作用が低下し、6時間培養でのみ有意差が認められた。

これらの細胞活性の変化は、骨芽及び破骨細胞のマーカであるER mRNAとTRAP mRNAの変化ともほとんど一致した。即ち、ER mRNAの発現は6時間培養において2、4及び6Gの負荷で有意に上昇し、TRAP mRNAの発現は、低強度（0.5及び1G）では24時間培養後に低下し、2、4及び6Gでは6時間培養で低下することが判明した。

本研究により得られた骨芽細胞と破骨細胞の反応は、骨芽細胞と破骨細胞の相互作用により行われている可能性が高く、今後遺伝子発現を中心に調べていく予定である。

#### 引用文献

- 1) 田畑 純, 鈴木信雄, 服部淳彦: 魚鱗—硬組織研究と再生研究のフロンティア. 細胞, 39: 55-57 (2007)
- 2) Suzuki, N., Suzuki, T. and Kurokawa, T.: Suppression of osteoclastic activities by calcitonin in the scales of goldfish (freshwater teleost) and nibbler fish (seawater teleost), Peptides, 21: 115-124 (2000)
- 3) Suzuki, N. and Hattori, A.: Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. J. Pineal Res., 33: 253-258 (2002)
- 4) Suzuki, N. and Hattori, A.: Bisphenol A suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the cultured scales of goldfish, Life Sci., 73: 2237-2247 (2003)
- 5) Suzuki, N., Tabata, M.J., Kambegawa, A., Srivastav, A.K., Shimada, A., Takeda, H., Kobayashi, M., Wada, S., Katsumata, T. and Hattori, A.: Tributyltin inhibits osteoblastic activity and disrupts calcium metabolism through an increase in plasma calcium and calcitonin levels in teleosts, Life Sci., 78: 2533-2541 (2006)
- 6) Suzuki, N., Yamamoto, M., Watanabe, K., Kambegawa, A. and Hattori, A.: Both mercury and cadmium directly influence calcium homeostasis resulting from the suppression of scale bone cells: the scale is a good model for the evaluation of heavy metals in bone metabolism, J. Bone Miner. Metab., 22: 439-446 (2004)

#### 謝辞

本研究の一部は、科学研究費補助金（基盤研究（C）No. 18500375、代表：鈴木信雄）及び（財）日本宇宙フォーラム（第8回選定 宇宙環境利用に関する公募地上研究、代表：鈴木信雄）の援助により行われた。