

7) 破骨細胞による破骨作用の阻害評価

(独) 農研機構 九州沖縄農業研究センター 倉田 理恵

はじめに

骨量は骨を作る骨芽細胞と骨を壊す破骨細胞のバランスでコントロールされている。骨粗鬆症は骨量が減少し骨が弱くなり骨折しやすくなる病気で、高齢になると骨芽細胞より破骨細胞が活発化することで骨量が減少するため起こる。そのため、破骨細胞の増殖や破骨前駆細胞から破骨細胞への成熟を阻害・抑制することは、骨粗鬆症の抑制および発症後の症状を遅延させることに有効と考えられている。近年、骨髄細胞からM-FCS (Macrophage Colony Stimulating Factor) とRANKL (Receptor Activator of NF kappa-B Ligand) を用いることにより、破骨細胞へと誘導する培養細胞系が確立された。また、骨芽細胞のマーカー酵素はアルカリホスファターゼであるに対して、破骨細胞のマーカー酵素は酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (Tartrate- Resistant Acid Phosphatase ; TRAP) であることを利用し、形成した破骨細胞の染色が可能である。さらに必要であれば、象牙切片を培養初期より使用することで、培養した破骨細胞が作る骨吸収窩を確認できる。そのため、これらを用いて破骨細胞による破骨作用の阻害評価を行う方法を紹介する。

準備するもの

1. 実験器具

- ・ クリーンベンチ
- ・ CO₂ インキュベーター (37℃・5%CO₂に設定)
- ・ 倒立顕微鏡
- ・ 顕微鏡写真撮影装置 (もしくは顕微鏡用デジタルカメラ)
- ・ 冷蔵庫 (培地等保存)
- ・ 液体窒素容器 (細胞を保存)
- ・ フリーザー (-20℃以下, サンプル類を保存)
- ・ オートクレーブ
- ・ ウォーターバス
- ・ セルカウンター
- ・ 96 well 細胞培養用平底マイクロプレート
- ・ ピペットエイド
- ・ 10ml, 5ml 滅菌済みディスポピペット
- ・ 遠心機 (スウィングローター, 15ml チューブ用)

- ・ 1ml, 100 もしくは 200 μ l, 2 μ l マイクロピペット (ギルソンなど)
- ・ ピペットチップ
- ・ 15ml コニカル遠心チューブ (滅菌済み)
- ・ 培地トラップ付きアスピレーター (培地除去用)
- ・ 滅菌済み使い捨てシリンジ
- ・ 0.45 μ m 以下のフィルター (サンプル滅菌用)
- ・ 滅菌済みチューブ (1.5ml プラスチックチューブ等：滅菌後のサンプル保存用)
- ・ 使い捨て手袋 (パウダーフリー)

2. 試薬

1) 細胞と培養液

- ・ 破骨細胞培養キット (コスモバイオ株式会社：株式会社プライマリーセル (Primary Cell Co., Ltd.) (旧：株式会社ホクドー) 製) を使用する。破骨前駆細胞はラットもしくはマウス由来の選択ができ、 2×10^6 cell /凍結バイアルを得ることができる。細胞のみ必要な場合、株式会社プライマリーセルより入手が可能である。

(注意) 細胞はドライアイス梱包で輸送されるので、届き次第すぐに取り出し、液体窒素容器に移し保存すること。液体窒素保存ができない場合には、すぐに細胞を融解し、培養を開始すること。また、破骨前駆細胞は液体窒素中で保存しても有効期限が 6 ヶ月とされているため、早期の開始が望ましい。

- ・ 破骨細胞培養キットにはその他に、洗浄用メディウム、培養用メディウム (M-CSF 50ng/ml, RANKL 50ng/ml 含有) および象牙切片 (150 μ m 厚×直径 6mm, 滅菌済み) が含まれている。培地は使用するまで -20 $^{\circ}$ C で保存し、象牙切片は 4 $^{\circ}$ C で保存する。

(注意) メディウム類は -20 $^{\circ}$ C で 6 ヶ月、4 $^{\circ}$ C で 3 ヶ月が有効期限である。象牙切片についても 4 $^{\circ}$ C で 6 ヶ月の有効期限となっている。

2) 酒石酸抵抗性酸性フォスフォターゼ染色 (TRAP 染色)

- ・ TRAP 染色キット (コスモバイオ株式会社：株式会社プライマリーセル (Primary Cell Co., Ltd.) (旧：株式会社ホクドー) 製) を使用する。
- ・ 50 mM 酒石酸含有緩衝液 pH 5.0 と発色基質 3 mg×10 本がセットされている。
- ・ 固定液として 10% 中性緩衝ホルマリン液 (和光純薬等) を使用する。

3) その他試薬

- ・ 消毒用エタノール
- ・ 脱脂綿
- ・ 必要であれば、エタノールもしくはジメチルスルホキシド (DMSO) (サン

プル溶解用)

- ・ PBS (-)
- ・ 超純水

4) Pit Formation Assay 法

- ・ 1M アンモニア水
- ・ マイヤー ヘマトキシリン液 (和光純薬等)

プロトコール

1. サンプルの調整

- 1) サンプルは終濃度が1/100になることを考慮した各濃度で作成する。
- 2) サンプル溶液は添加直前に作成した水溶液が望ましいが、水に溶けない場合はエタノールもしくはDMSOに溶解させる。この場合、若干細胞増殖に影響がある場合があるので、溶解液のみの比較対照区を設定すること。このエタノールおよびDMSOも低濃度の方が細胞増殖への影響が少ない。
- 3) 調整したサンプルはあらかじめ0.45 μm 以下のフィルターで滅菌を行い、滅菌チューブに保存し、コンタミネーションを防ぐ。

2. 細胞培養方法 (コスモバイオ株式会社および株式会社プライマリーセルHP: 破骨細胞培養キット (旧: 株式会社ホクドー製) の使用方法に準ずる)

- 1) 37°Cにあらかじめ設定しておいたウォーターバスにて洗浄用メディウムと培養用メディウムを解凍する。
- 2) 解凍した洗浄用メディウムは消毒用エタノールを含ませた脱脂綿にてボトルを滅菌後クリーンベンチ内に持ち込み、15mlコニカル遠心チューブに10ml滅菌済みディスポピペットとピペットエイドを用い、10ml添加しておく。
- 3) 破骨前駆細胞 1 本を、37°Cのウォーターバスにて、すばやく解凍する。
- 4) 解凍した破骨前駆細胞液は2)と同様に消毒し、クリーンベンチ内で、2)で準備したチューブへマイクロピペットを用いて全量を加え入れ緩やかに混合する。
- 5) 混合したチューブは4°Cで1000rpm×5分間遠心する。
- 6) 上清をデカントで除去し、洗浄用メディウムを新たに10mlピペットで加え、穏やかに再懸濁後、再び4°Cで1000rpm×5分間遠心する。
- 7) 上清をデカントで除去し、培養用メディウムを2.5~5ml 加え緩やかに再懸濁後、細胞浮遊液を調製する。培養用メディウムに含まれるM-CSFとRANKLにより、破骨細胞へと成熟の誘導が始まる。
- 8) 96 well細胞培養用平底マイクロプレートに、1 wellあたり100 μl ずつ播種する (培養液を5ml 加えた場合96 wellマイクロプレートの約半分量約50 well分となる)。

- (注意)・短期間で破骨細胞形成したい場合は、細胞密度を高くして培養する。
・Pit Formation Assay を行う場合は、あらかじめwellへ象牙切片を入れてから細胞を播種する。
- 9) そのまま5%CO₂, 37℃インキュベーターで3日間培養し、細胞をプレートに接着させる。
 - 10) 3日後に培養用メディウム100 μl を交換し、この時、破骨細胞形成阻害を検討するサンプルを1μl / wellマイクロピペットにて添加する。
 - 11) 阻害効果が認められない場合、5日後程から数個の細胞が融合した破骨細胞が観察され始め、抑制効果が認められる場合ではそれらが認められない(図 1 A, B 参照)。
 - 12) なお、酒石酸抵抗性酸性フォスフォターゼ染色 (TRAP 染色) を行う場合には7日間培養し、Pit Formation Assayを行う場合には約14日間培養する。
3. 酒石酸抵抗性酸性フォスフォターゼ染色 (TRAP 染色) 法 (コスモバイオ株式会社および株式会社プライマリーセルHP: TRAP染色キット (旧: 株式会社ホクド一製) の使用方法に準ずる)
- 1) 破骨前駆細胞を96 wellマイクロプレートで培養し破骨細胞を形成後、培養液をアスピレーターにて除去し、PBS(-)100μl を各wellに加え洗浄する。
 - 2) 1 well あたり固定液である10%中性緩衝ホルマリン液を50 μl 加え、室温で5 分間固定する。
(注意) 固定時間を5 分以上行った場合、検出できなくなる可能性があるため素早く行う。
 - 3) 固定液を除去し、超純水250 μlを各wellに加え、3回洗浄する。
 - 4) TRAP染色キットの発色基質1 本に緩衝液5 mlを加え溶解し、1 well あたり50 μl 添加する。
(注意) 溶解済みの発色基質は保存できないため、直前調整し使い切ること。
 - 5) 37℃で20~60 分インキュベートする。図 1 Cに示すように、破骨細胞のTRAP 活性によって赤く染色される。
 - 6) 十分な発色を確認後、超純水でwell内を洗浄し反応を止める。顕微鏡にて、各処理区の破骨細胞の細胞数を計測する。また、写真を撮影し画像解析を行う。
(注意) 長時間加温した場合、発色基質に沈殿が生じるため、沈殿形成前に反応を止めること。
(補足) 可能であれば、画像解析装置で赤色を抽出し破骨細胞の形成面積を測定する。

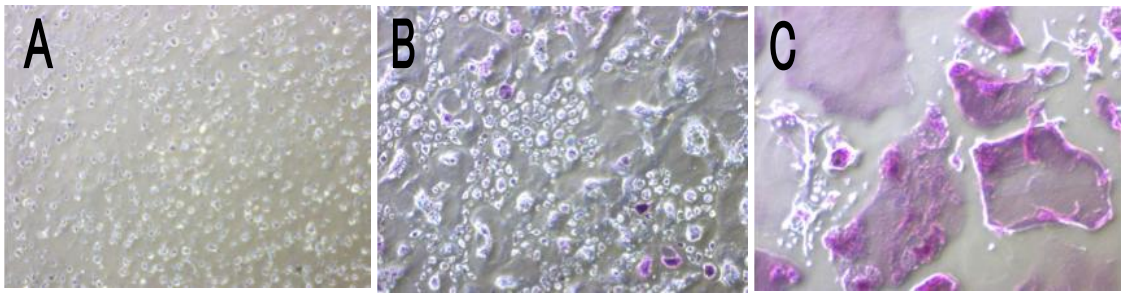


図 1 TRAP染色後の破骨細胞写真（培養7日後，×40倍のデジタル画像）
A；破骨細胞形成阻害強度，B；破骨細胞形成阻害中程度，C；阻害活性なし
破骨細胞はTRAP 活性によって赤く染色される。

4. Pit Formation Assay 法（破骨細胞による骨吸収後の小窩の観察）

1) 染色法

- (1) 破骨前駆細胞を象牙切片上で約14 日間培養する。
- (2) その後，切片を回収し，5ml の1M アンモニア水中で超音波処理し細胞を破壊する。
- (3) 処理した切片はアンモニア水から取り出し，直接，マイヤーのヘマトキシリン液で1 分間染色し，水洗，乾燥させた後，破骨細胞によって形成された吸収窩の総面積を測定する（図 2 参照）。

2) 走査型電子顕微鏡（SEM）法（；補足）

- (1) 鮮明な吸収窩（Pit）画像を必要とする場合は，象牙切片を上記の染色法と同様に一連の操作を行い，乾燥した切片の表面を走査型電子顕微鏡（SEM）で観察し吸収窩の面積を計測する。

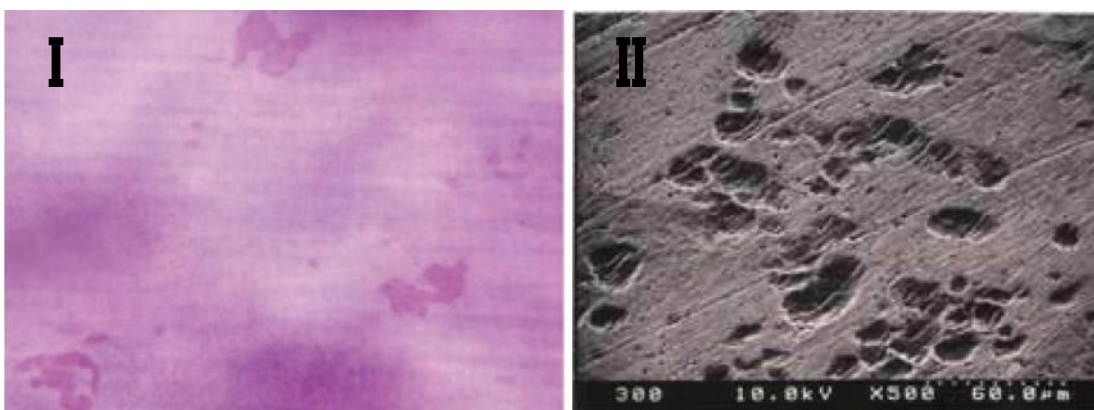


図 2 Pit Formation Assay 法で染色された象牙切片写真（破骨細胞による骨吸収後の小窩）. I；染色法後．濃ピンクが吸収窩．II；SEM写真（コスモバイオHPより抜粋）

おわりに

本法は高価ではあるが、キットで簡易化されており、短期間で結果を得ることができ、有望な素材についての効果の確認には適していると思われる。また今回は、破骨細胞による破骨作用の阻害評価のみを紹介したが、骨代謝は骨芽細胞と破骨細胞のバランスにより行われているため、合わせて骨芽細胞分化誘導活性の評価（食品機能性評価マニュアル集 第Ⅱ集参照）等により骨芽細胞への影響も検討されることをお勧めしたい。

参考文献

- 1) Takesita, S., Kaji, K. and Kudo, A., Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.*, **15**, 1477-1488 (2000).
- 2) Scheven, B.A.A., Milne, J.S. and Robins, S.P., A sequential culture approach to study osteoclast differentiation from nonadherent porcine bone marrow cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* July-August Animal, **34**, 568-577 (1998).
- 3) Somerman, M.J., Berry, J.E., Khalkhali-Ellis, Z., Osdoby, P. and Simpson, R.U., Enhanced expression of α_v integrin subunit and osteopontin during differentiation of HL-60 cells along monocytic pathway. *Exp. Cell Res.*, **216**, 335-341 (1995).
- 4) Itonaga, I., Sabokbar, A., Neale, S.D. and Athanasou, N.A., 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and prostaglandin E₂ act directly on circulating human osteoclast precursors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264**, 590-595 (1999).
- 5) Takayanagi, H., Ogasawara, K., Hida, S., Chiba, T., Murata, S., Sato, K., Takaoka, A., Yokochi, T., Oda, H., Tanaka, K., Nakamura, K. and Taniguchi, T. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signaling cross-talk between RANKL and IFN- γ . *Nature*, **408**, 600-605 (2000).