

破骨細胞分化抑制作用の評価

三重県農業研究所 藤田 絢香
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門 小堀 真珠子

【はじめに】

骨は骨芽細胞から新たに形成され、破骨細胞により吸収されるというリモデリングを繰り返している¹⁾。骨のリモデリングは性ホルモンを始めとする様々なホルモン等で調節されており、加齢により、そのバランスが崩れて骨量の減少がおこる。骨量の減少は骨を脆くし、骨粗鬆症や骨折の原因となる。そのため、破骨細胞の過剰な分化を抑制し、骨吸収を抑制することは骨量の維持に寄与すると考えられる。Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)は、破骨細胞分化誘導因子 (osteoclast differentiation factor (ODF)) とも呼ばれる、破骨細胞の分化に必須の因子である。骨芽細胞などの破骨細胞形成支持細胞表面に発現し、細胞接触を介して前駆細胞にシグナルを伝達して、破骨細胞への分化を誘導する。本項では、破骨細胞前駆細胞であるマウス由来マクロファージ様細胞 RAW264 を RANKL で刺激して破骨細胞へと分化誘導し、破骨細胞のマーカー酵素である酒石酸抵抗性ホスファターゼ (Tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP) を測定する簡易評価法を用いて、破骨細胞分化抑制作用を評価する²⁾。

【準備するもの】

1. 実験器具・機器

- ・クリーンベンチ
- ・吸引アスピレーター (培地の除去に用いる)
- ・パストゥールピペット (培地の除去に用いる。滅菌缶に入れ乾熱滅菌したもの)
- ・オートピペット (ピペットエイド等。培地の添加、細胞の播種に用いる)
- ・培養ピペット (培地の添加、細胞の播種に用いる。滅菌済みディスプレイピペットまたはガラスピペットを滅菌缶に入れ乾熱滅菌したもの)
- ・CO₂ インキュベーター (CO₂ ボンベ (レギュレーター付き))
- ・倒立顕微鏡 (位相差。細胞観察用)
- ・卓上遠心機 (50ml、15ml チューブ用。細胞の回収用)
- ・冷蔵庫 (培地等保存用)

以上の機器類は同一室内に近接して配置する。

- ・ディープフリーザー (-80°C、細胞を保存)
- ・液体窒素容器 (細胞を保存)
- ・フリーザー (-20~-30°C、血清やサンプルを保存)
- ・オートクレーブ (ディスプレイ器具廃棄用)
- ・セルカルチャーディッシュ (Corning 100mm スタンダードディッシュノントリートメント 353003 等)
- ・コンカルチューブ (50ml、15ml Corning 352070、IWAKI 2325-015 等)

その他の器具

- ・マイクロプレートリーダー (測定波長 400-450nm、参照波長 600nm 以上で測定できるもの)
- ・96 ウェルマイクロプレート (Corning 353072 等。細胞培養用)

- ・96 ウェルマイクロプレート (吸光度測定用)
- ・血球計算盤 (ノイバウエル計算盤等)
- ・マイクロピペット (0.5 μ l~1000 μ l で使用)
- ・マルチチャンネルピペット (8 チャンネル。10 μ l が分注可能なもの。100~200 μ l が分注可能なもの)
- ・ピペットチップ (滅菌済み、またはオートクレーブ滅菌したもの)
- ・ピペッティングリザーバー (8 チャンネルピペットで細胞の播種等に使用)
- ・マイクロチューブ (1.5ml、サンプル濃度調製用。オートクレーブ滅菌したもの)
- ・試験管ミキサー (マイクロチューブに調製したサンプルの攪拌に用いる)
- ・耐圧瓶 (PBS、蒸留水のオートクレーブ滅菌及び細胞に用いる)
- ・プレートシール

2. 細胞・培地・試薬

- 1) RAW264 マウスマクロファージ様細胞 (理化学研究所 バイオリソースセンター RIKEN CELL BANK RCB0535) ³⁾

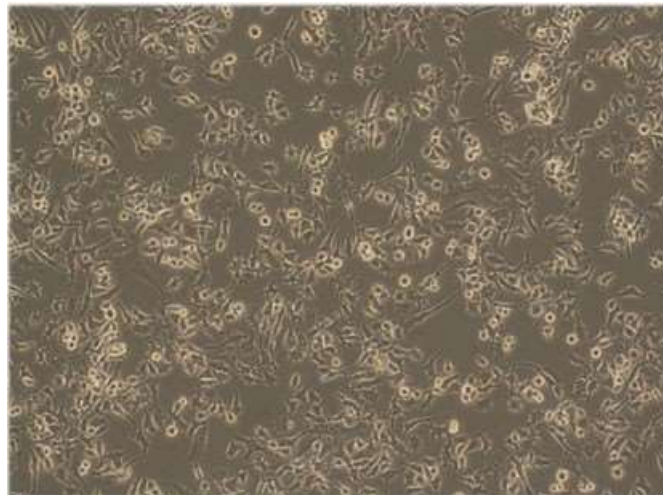


図1 RAW264 細胞 (RCB0535)

- 2) MEM α 培地 (和光純薬 135-15175 等)
- 3) MEM α 培地 (フェノールレッド不含) (和光純薬 134-17225 等)
- 4) ウシ胎児血清 (Fetal Calf Serum (FCS)、和光純薬等)

まとめて購入し、実験の途中でロットが変わらないようにする。数種類のロットで、増殖等を比較するロットチェックを行った方がよい。56 $^{\circ}$ Cで30分間非働化したのち、50mlのコニカルチューブに小分けして、フリーザーで凍結保存する。使用前日には冷蔵庫に移して解凍しておく。

- 5) 0.25%トリプシン-EDTA (1x) フェノールレッド含有 (ThermoFisher Scientific、25200-056)
- 6) PBS (-) (粉末、日水製薬 05913 等)
- 7) 酢酸ナトリウム (特級)
- 8) 酢酸 (特級)

- 9) 硫酸アンモニウム鉄 (II) 六水和物
- 10) 塩化カリウム (特級)
- 11) Triton X-100 (Sigma-Aldrich、X100 等)
- 12) L(+)-アスコルビン酸ナトリウム (Sigma-Aldrich、11140)
- 13) (+)-酒石酸ナトリウム二水和物 (和光純薬、196-03452)
- 14) p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物 (特級、和光純薬、147-02343 等)
- 15) 水酸化ナトリウム
- 16) トリパンブルー染色液、0.4% (ThermoFisher Scientific 15250061、細胞数測定用)
(0.22 μ m フィルター (メルクミリポア マイレクス GP 孔径 0.22 μ m))
- 17) sRANKL (Human sRANKL、オリエンタル酵母工業、1mg/ml、20 μ g)
1 μ g ずつストック溶液として冷凍保存 (-70 $^{\circ}$ C以下) する。
- 18) Cell Counting Kit-8 (WST-8 試薬) (和光純薬 347-07621 (500 回用)、343-07623 (2500 回用))
WST-8 を含む 1 液タイプ。500 回用で約 5ml。冷蔵 (4 $^{\circ}$ C) 保存で約 12 ケ月間使用可能。
長期保存する場合は、測定に必要な量を分注して冷凍 (-20 $^{\circ}$ C) 保存する。

3. 調合・調整

- 1) 基本培地 (培養用)
 - ・MEM α 培地に 10%ウシ胎児血清 (Fetal Calf Serum (FCS)) を添加したもの。500ml の培地に 50ml のウシ胎児血清を添加し、冷蔵庫に保存しておく。室温に戻して使用する。
- 2) 分化誘導用培地
 - ・MEM α 培地 (フェノールレッド不含) に 10%ウシ胎児血清 (Fetal Calf Serum (FCS)) を添加したもの。500ml の培地に 50ml のウシ胎児血清を添加し、冷蔵庫に保存しておく。室温に戻して使用する。
- 3) PBS (-) (粉末の場合)
 - ・PBS(-)粉末 9.6g を蒸留水に溶解して全量を 1l とし、121 $^{\circ}$ C で 15 分間オートクレーブ滅菌する。
- 4) トリパンブルー染色液
 - ・同量の PBS で希釈し、0.22 μ m フィルターで濾過して、0.2%溶液とする。
- 5) 0.1M 酢酸緩衝液 (pH5.2)
 - ・0.1M 酢酸ナトリウム溶液 (A 液、1.666g/200ml) 及び 0.1M 酢酸溶液 (B 液、0.574ml/100ml) を調製する。A 液に B 液を加えて pH5.2 に調整し、0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液を調製する。
- 6) 0.1M 硫酸アンモニウム鉄 (II) 六水和物
 - ・0.1M 硫酸アンモニウム鉄 (II) 六水和物溶液 (39.41mg/ml) を調製する。
- 7) 基質溶解用緩衝液の調製

・0.1M 酢酸緩衝液 (pH5.2)	9.0ml
塩化カリウム	112.4mg
Triton X-100	10 μ l
L(+)-アスコルビン酸ナトリウム	2.0mg
0.1M 硫酸アンモニウム鉄 (II) 六水和物溶液	10 μ l
(+)-酒石酸ナトリウム二水和物	23.2mg

- 0.1M 酢酸緩衝液 (pH5.2) で 10ml に定容する。用時調製する。
- 8) 基質溶液の調製
- ・ p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物 (Wako、特級、147-02343)
- 上記の基質溶解用緩衝液 10mL に p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物 37.115mg を溶解し、基質溶液を調製する。用時調製する。
- 9) 反応停止液
- ・ 0.3N 水酸化ナトリウム溶液 (1.2g/100ml) を調製する。

【プロトコール】

< 1 日目 >

1. 細胞懸濁液の調製
 - 1) 対数増殖期にある細胞を用いる。
 - 2) CO₂ インキュベーターから、培養中のカルチャーディッシュを出し、パスツールピペットで培地を吸引除去する。
 - 3) PBS(-) を 5~10ml 添加して、細胞表面を洗ったのち、PBS(-) を吸引する。
 - 4) 0.25% トリプシン-EDTA 溶液 1ml を加えて、全体に行き渡らせた後、CO₂ インキュベーターで 1~2 分間インキュベーションする。
 - 5) 倒立顕微鏡で細胞が剥離し、浮遊しているのを確認する。
 - 6) 細胞が丸くなって剥離し始めていれば、インキュベーションを終了し、シャーレに基本培地 (MEM α 培地+10%FCS) 9ml を加え、細胞懸濁液を 15ml コニカルチューブに回収する。
 - 7) 1000rpm、5 分間遠心する。
 - 8) パスツールピペットで上清を除去した後、5~10mL の基本培地 (MEM α 培地+10% FCS) を加えて、静かに細胞を懸濁する。
 - 9) マイクロピペットで 50~100 μ l の細胞懸濁液をマイクロチューブまたは 96 ウェルマイクロプレートのウェルにとり、同量の 0.2% トリパンブルーと混合する。
 - 10) 血球計算盤に細胞懸濁液をのせ、細胞数をカウントする。
 - 11) 最終濃度 (5 x 10⁴ cells/ml) に合わせて、基本培地で希釈する。
2. 細胞の分注
 - 1) よく攪拌した細胞懸濁液をリザーバーに移し、8 チャンネルピペットを用いて、96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに 100 μ l ずつ手早く分注する。なお、この時ブランクとして、培地 (MEM α 培地+10%FCS) のみをいれるウェルも用意しておく。
(サンプル数×希釈濃度数+2 (無処理及び sRANKL 処理のみ))×反復数(n) (n=3 または 4) ×2 個のウェルを準備する。
 - 2) 平面上でかるく揺らして液を混合する。培養を開始する前に、顕微鏡下で細胞の状態を確認する。
 - 3) CO₂ インキュベーターで 37°C、24 時間培養する。

< 2 日目 >

3. サンプル添加培地の調製
 - 1) sRANKL (1mg/ml) を分化誘導培地 (MEM α 培地(フェノールレッド不含)+10%FCS)

で希釈し、終濃度 100ng/ml となるように溶解する。

- 2) それぞれのサンプルを、調製した培地 ((MEM α 培地(フェノールレッド不含)+10% FCS) +sRANKL (100ng/ml)) で希釈し、最終濃度の溶液を 100 μ l \times 反復数(n)+ α 作成する。反復数は 3 または 4 程度 (n=3 または 4)。この時コントロールとして何も加えない培地のみと、sRANKL のみを溶解させた培地 (+ sRANKL) を準備する。
4. サンプルの添加及び sRANKL 刺激による分化誘導
 - 1) 24 時間前培養した 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルからアスピレーターに接続したパスツールピペットで培地を吸引除去する。
 - 2) 各ウェルに 100 μ l ずつサンプル添加培地を加える。この時コントロールとして何も加えない培地のみと、sRANKL のみを溶解させた培地 (+sRANKL) も同様に 100 μ l ずつ添加する。
 - 3) CO₂ インキュベーターで 37°C、48 時間培養する。

<4 日目>

5. サンプル添加培地の調製
 - 1) 2 日目 3 の 1~2)と同様に、sRANKL を分化誘導培地 (MEM α 培地(フェノールレッド不含)+10%FCS) で希釈し、終濃度 100ng/ml となるように溶解する。それぞれのサンプルを、最終濃度となるように調製した培地 (+sRANKL) で希釈して作成する。この時コントロールとして何も加えない培地のみと、sRANKL のみを溶解させた培地 (+ sRANKL) を準備する。
6. サンプルの添加及び sRANKL 刺激による分化誘導
 - 1) 48 時間前培養した 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルからパスツールピペットで培地を吸引除去する。
 - 2) 各ウェルに 100 μ l ずつサンプル添加培地を加える。同濃度のウェルが n 個になるように細胞に添加すると共に、空いているウェル n 個にもサンプル添加培地を加えて測定 (バイアビリティ、TRAP 活性) の際のブランクとする。
 - 3) CO₂ インキュベーターで 37°C、72 時間培養する。

<7 日目>

7. TRAP 活性測定用の基質溶液の調製
 - 1) 試薬調製の項で示した配合により、基質溶解用緩衝液を調製する。
 - 2) 調製した基質溶解用緩衝液 10ml に p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物 37.115mg を溶解し、基質溶液を調製する。
8. サンプル添加培地の採取
 - 1) 培養した 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルから TRAP 活性測定用に培養上清を 50 μ l 採し、吸光度測定用の 96 ウェルマイクロプレートに添加する。
9. TRAP 活性の測定
 - 1) 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに培養上清 (サンプル添加培地) を 50 μ l ずつ添加

- する。
- 2) 各ウェルに調整した基質溶液（用時調製）50 μ l を加え混和し、プレートをしールした後、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートする。
 - 3) 各ウェルに反応停止液（0.3N 水酸化ナトリウム溶液）を50 μ l ずつ添加して反応を停止する。
 - 4) マイクロプレートリーダーで405nmの吸光度を測定する。
10. 細胞生存率（バイアビリティ）の測定
- 1) 培養用96ウェルマイクロプレートからTRAP活性測定用の培養上清（50 μ l）を採取した後、WST-8試薬を各ウェルに10 μ l ずつ添加する。
 - 2) プレートをCO₂インキュベーターに入れ、1時間培養する。
 - 3) 1時間後プレートをとり出し、再度、顕微鏡で細胞の状態を観察しておく。
 - 4) マイクロプレートリーダーで450nm（405-450nm）、参照波長650nm（600nm以上）の吸光度を測定する。

【プロトコルのポイント・注意点】

1. 細胞懸濁液の調製
RAW264細胞は浮遊系細胞であるが、シャーレの底に接着しやすいため、浮遊細胞用シャーレ（細胞培養用の表面処理をしていないもの）を用いて培養する。基本培地を用いて、3~5日毎に継代培養する。継代は、細胞の密度をみて50~80%コンフルエントの時期に行う。100%コンフルエントになるまで増殖した細胞は分化能力が低下して使えなくなるので注意する。
MEM α 培地で培養したRAW264細胞は、浮遊細胞用のRPMI1640培地で培養した場合よりも接着力が強くなっているため、継代時は37 $^{\circ}$ Cで1分30秒間インキュベーションしてトリプシンの処理を行い、ピペッティングを丁寧に行って細胞を回収して細胞懸濁液とする。
2. 細胞の分注
細胞は、均一になるようによく攪拌しながら手早く分注する。
3. サンプル添加培地の調製
細胞を添加しない、サンプルと培地のみのブランクを同数作成するため、反復数の2倍量を準備する。最終濃度ではDMSO濃度が0.1%以下になるようにする。DMSO濃度が0.1%を超えるときは、DMSOのみ添加したコントロールをおき、DMSOの影響がないことを確認する。
4. サンプルの添加及びsRANKL刺激による分化誘導
パスツールピペットをウェルの底面に当てると細胞が剥がれるので、底面に当てないように注意する。過度に吸い過ぎて細胞が乾いたり、培地を残し過ぎてサンプル濃度に影響を及ぼしたりしないように注意する。
サンプル溶液が着色している場合は、細胞の入っていないウェルに各濃度のサンプル溶液を入れて測定の際のブランクとし、測定にサンプルの色が影響しないことを確認する。
5. サンプルの添加及びsRANKL刺激による分化誘導
1)及び2)は4. 1)及び2)と同様に行う。
6. TRAP活性測定用の基質溶液の調製
基質溶解用緩衝液及び基質溶液は用時調整する。
7. サンプル添加培地の採取

測定前に顕微鏡下で細胞の状態を確認しておく。

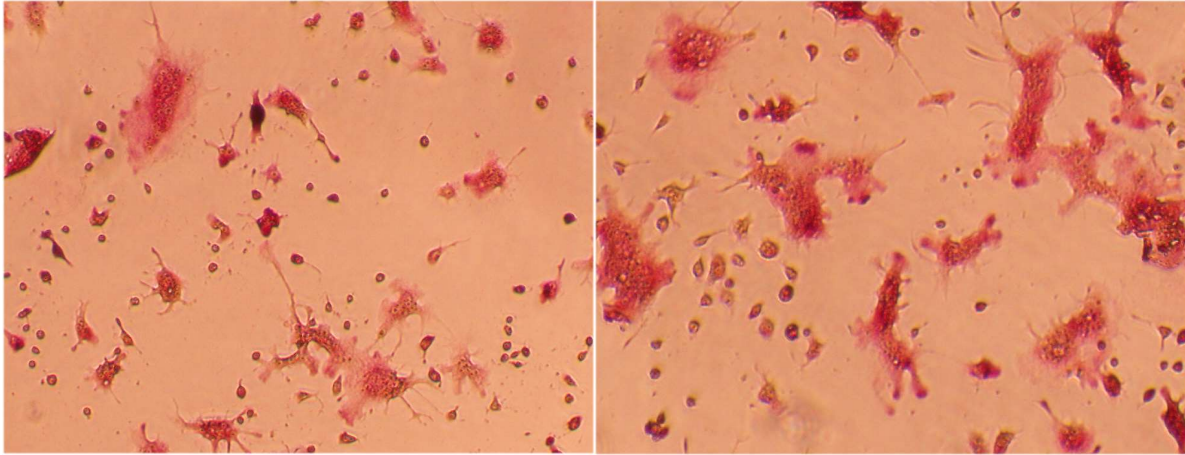


図2 分化誘導された RAW264 細胞

TRAP は市販の染色キットを用いて染色した。

8. データの計算

ブランクの値を引いた吸光度又は吸光度の比を TRAP 活性の指標とし、バイアビリティ（細胞生存率）と合わせてグラフ化し、バイアビリティに影響を及ぼさない濃度での破骨細胞分化抑制作用を検討する。

9. 細胞生存率（バイアビリティ）の測定

WST-8 試薬添加前に、顕微鏡下で細胞の状態を確認しておく。ウェルに残っている気泡は、吸光度の値に影響するため、チップの先等で除く。

10. データの計算

- 1) サンプルと培地のみブランクが培地のみブランクと同程度であることを確認する。
サンプルと培地のみブランクの値が、培地のみブランクに比べて著しく高い場合には、血球計算盤を用いてカウントする等、他の方法を用いて測定する。また顕微鏡下の観察結果と併せて結果を確認する。
- 2) 細胞を添加した各ウェルの吸光度からブランクの平均値を引き、細胞のみのコントロールを 100%として各濃度での細胞生存率（バイアビリティ）を計算する。
$$\text{細胞生存率(\%)} = [(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})] \times 100$$

A_{sample} : サンプルの吸光度（細胞、サンプル液及び Cell Counting Kit-8 溶液）
 A_{control} : 陰性対照の吸光度（細胞及び Cell Counting Kit-8 溶液（サンプル液なし））
 A_{blank} : ブランク吸光度（培地及び Cell Counting Kit-8 溶液（細胞なし））
- 3) 計算値をグラフにして結果を考察する。

【おわりに】

食品成分等に破骨細胞分化抑制作用が認められた場合には、吸収、代謝等の体内動態を考慮し、動物モデルでの作用を検討する等して、その効果を確認する。分化誘導作用が弱い場合には、細胞の

形質変化や分化誘導剤である sRANKL の劣化等が考えられる。入手した細胞は継代回数の少ない段階で凍結保存し、必要に応じて、融解して使用する。

本項は兵庫県立農林水産技術総合センター 北部農業技術センター 廣田智子さんの協力の元に作成した。

【参考文献】

- 1) SC, Manolagas, and RL, Jilka. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. N. Engl. J. Med., 332(5), 305-11 (1995).
- 2) 藤田絢香, 破骨細胞への分化抑制効果を評価する簡易手法の開発, 三重県農業研究所成果情報 (2015)
- 3) <http://www2.brc.riken.jp/lab/cell/search.php> (Dec. 16, 2016)