

44001949

骨膜の骨形成細胞に対する放射線照射の影響と照射後骨移植の最適時期に関する研究

(09672033)

平成9年度～平成10年度科学研究費補助金（基盤研究（c）（2））研究成果報告書

平成11年3月

研究代表者 西村 泰一  
(旭川医科大学医学部講師)

骨膜の骨形成細胞に対する放射線照射の影響と照射後骨移植の最適時期に関する研究

(09672033)

平成9年度～平成10年度科学研究費補助金（基盤研究（c）（2））研究成果報告書

平成11年3月

研究代表者 西村 泰一  
（旭川医科大学医学部講師）

## は し が き

本研究は骨膜の骨形成細胞のうち骨芽細胞の表現形質を備えている骨膜内層の骨芽細胞様細胞に注目し、その増殖能、分化度が放射線照射によってどのような影響を受けるのか、すなわち放射線照射によって骨芽細胞様細胞の増殖能だけが障害されるのか、あるいは表現形質の発現も障害され骨芽細胞の分化も抑制されるのかを解明すること、ならびに骨芽細胞様細胞の放射線障害からの回復過程を解明することによって照射後の骨移植の最適時期をみつけることを目的として、ラット胎児の頭蓋骨から採取した培養骨芽細胞様細胞を用いて照射後の骨芽細胞様細胞の細胞数、アルカリフォスファターゼ活性、PTH依存性cAMPの産生量を調べ、非照射群をコントロールとして両群を比較検討し、若干の知見を得たので報告する。

### 研究組織

研究代表者：西村泰一（旭川医科大学医学部講師）

研究分担者：竹川政範（旭川医科大学医学部助手）

### 研究経費

平成9年度 2,000 千円

平成10年度 600 千円

計 2,600 千円

### 研究発表

(1) 学会誌

(2) 口頭発表予定

西村泰一、北進一、他：「骨芽細胞の増殖・分化に対する放射線の影響」

第44回日本口腔外科学会総会、平成11年10月7日

## (研究 成 果)

### 緒 言

口腔領域の悪性腫瘍の外科的治療に際し、下顎骨切除を要することはしばしば経験される。このうち区域切除などで下顎骨の連続性が失われると形態的にも機能的にも著しい障害を生じるため可能ならば下顎骨一次再建が望まれるが、良性腫瘍の場合と異なり一般には新鮮自家骨移植などによる下顎骨一次再建は行われていない。この最大の理由として術前の放射線治療のため移植床の条件が悪いことがあげられる。放射線照射を受けた移植床では一般に放射線による循環障害と骨膜の骨形成細胞障害のため新生骨形成が障害されると考えられている。

細胞に対する放射線の作用としては細胞の増殖能と分化への作用があり、細胞の増殖能は放射線照射によって障害されることはよく知られているが、細胞の分化に対する放射線の作用はほとんど知られていない。細胞分化とは細胞・組織が機能的に特殊化すること、または形態的に特殊化することを意味し、これまでは分化という現象は形態学的特徴によって判定されてきた。しかし最近では細胞の表現形質の発現を調べることによってその細胞の分化度を知ることができるようになった。骨芽細胞への分化はアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、副甲状腺ホルモン(PTH)受容体の発現、オステオカルシン(bone Gla protein : BGP)産生能などの表現形質の発現を解析することによって評価できる。放射線照射による骨形成細胞障害に関しては放射線照射によって骨芽細胞が障害されるために骨芽細胞の表現形質のひとつであるALP活性が低下し、骨形成障害が生じると推測されているが、この推測は放射線照射によって骨芽細胞の分化度(成熟度)が影響されるということを示唆している。しかしわれわれはラットの頭蓋骨に放射線照射後、新鮮自家骨移植を行い骨形成過程を組織学的に観察し、骨膜の未分化間葉系細胞数の減少や血管の奇形は認めたが、骨芽細胞の形態変化は認めなかった。このことは放射線照射によって骨形成細胞や骨芽細胞の増殖能は障害されるが、分化度は影響されないことを示唆している。

そこで本研究では骨膜の骨形成細胞のうち骨芽細胞の表現形質を備えている骨膜内層の骨芽細胞様細胞に注目し、その増殖能、分化度が放射線照射によっ

てどのような影響を受けるのか、すなわち放射線照射によって骨芽細胞様細胞の増殖能だけが障害されるのか、あるいは表現形質の発現も障害され骨芽細胞の分化が抑制されるのか、またどのように回復するのかを培養骨芽細胞様細胞を用いて検討した。

## 方 法

1. 骨芽細胞様細胞の増殖能および分化に対する放射線照射の影響に関する検討  
(方法) 妊娠SDラットから胎児の頭蓋骨を摘出し、1.37mg/mlコラゲナーゼType 1と0.05%トリプシン含有の消化液で1回20分間、5回連続消化して骨膜細胞を5つのフラクションに分けた。フラクション3～5(骨芽細胞様細胞画分)を一つにまとめ、10%FBSを含んだ $\alpha$ -MEM培地で培養した。

confluent後、0.1%トリプシン/0.02%EDTA液を加えて細胞をプレート壁から遊離し、24穴プレートへ $2 \times 10^4$  cells/wellの細胞密度で接種し、10%FBSを含んだ $\alpha$ -MEM培地で培養した。confluent後(4日後)、培地を100 $\mu$ g/ml ascorbic acidと5mM  $\beta$ -glycerophosphateと10%FBSを含んだ $\alpha$ -MEM培地(アスコルビン酸群)または100 $\mu$ g/ml ascorbic acidと5mM  $\beta$ -glycerophosphateと10%FBSを含んだ $\alpha$ -MEMに $10^{-6}$ Mのデキサメタゾンを加えた培地(デキサメタゾン群)に変更し培養した。また10%FBSを含んだ $\alpha$ -MEM培地で続けて培養した群を非石灰化群とした。照射群は5Gy、10Gy、15Gyの3群に分け、培地変更日にLinacを用いて各線量を1回照射し、照射後3、7、14日目に骨芽細胞の細胞数、ALP活性、PTH依存性cAMP産生量を測定し、非照射群と照射群を比較検討した。

### (細胞増殖)

ふらん器より培養フラスコを取り出し、培地を除いた後0.1%トリプシン/0.02%EDTA液を加えて、細胞をプレート壁から遊離し、血球計算板を用いて細胞数を数えた。

### (アルカリフォスファターゼ (ALP)活性)

1. wellの培地を捨てた後、CMF-PBSで細胞層を洗い、0.1%Triton-X-100含有50 mM Tris-HCl, pH7.5 0.5mlを各wellに注入し、scrapして細胞をマイクロチューブに集めた。次に氷水中で15分間超音波処理後、10000r.p.m., 5分間遠心し、上清を集めた。

2. 10mM p-nitrophenyl phosphate (基質)と0.5mM MgCl<sub>2</sub>を含む1M

diethanolamine buffer, pH9.8を混合した基質緩衝液に1で採集した上清を加えて37°C,10分培養後、1N NaOHを加えて反応をストップし、405nmで吸光度を測定した。各サンプルのタンパク質量はBCA protein assay kitで定量し、ALP活性は $\mu\text{mol p-nitrophenol produced /min/mg protein}$ で表した。

(PTH依存性cAMP産生量)

培養細胞に0.5% BSA と1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine を含んだ $\alpha$ -MEM (binding buffer) を加え37°C、15分間培養後、 $10^{-7}\text{M}$ のラットPTH(1-34)を含んだ binding buffer で15分間培養した。培地を吸引除去後、冷却した5% トリクロロ酢酸 (TCA) 1mlを加えてcAMPを抽出し、抽出液を3倍容の水飽和エーテルで処理してTCAを除去した。すなわち抽出液 (約1ml)に3mlの水飽和エーテルを加え、よく混合して遠心分離 (3000r.p.m., 4°C, 5分間) 後、エーテル層をアスピレーターで除去した。この水飽和エーテル処理をさらに2回繰り返し、試料をmicro tube に集めた。cAMP 量の測定はヤマサのcAMP RIA kitを用いて測定した。

## 結 果

骨膜の骨形成細胞のうち骨芽細胞の表現形質を備えている骨膜内層の骨芽細胞様細胞に注目し、その増殖能、表現形質の発現が放射線照射によってどのような影響を受けるのかをラット胎児の頭蓋骨から採取した骨芽細胞様細胞を用いて検討し下記の結果を得た。

### 1. 骨芽細胞様細胞の増殖能に関する検討。

培地の種類に関わらず、非照射群では経日的に細胞数が増加したが、照射群では照射線量が5Gy,10Gy,15Gyと増加するにつれ、細胞増殖は線量依存的に有意に抑制された。また5Gy群、10Gy群では経日的に回復傾向が認められたが、15Gy群では照射後14日経っても回復傾向は認められなかった(Fig. 1)。

### 2. 骨芽細胞様細胞の表現形質の発現に関する検討。

- 1) アスコルビン酸を除去した培地 (10% F B S を含んだ  $\alpha$ -MEM培地)で培養した群ではアルカリフォスファターゼ活性、PTH依存性cAMP産生量は細胞接種後18日目 (照射後14日目) までの期間、ほとんど増加は認められなかった。また照射群と非照射群との間に有意差は認められなかった(Fig. 2)。
- 2) アスコルビン酸群とデキサメタゾン群の非照射群ではアルカリフォスファターゼ活性は経日的に増加し、培地変更後14日目頃最大になった。またアルカリフォスファターゼ活性はアスコルビン酸群よりもデキサメタゾン群で高かった。一方、アスコルビン酸群とデキサメタゾン群の照射群では照射線量が5Gy,10Gy,15Gyと増加するにつれ、アルカリフォスファターゼ活性はほぼ線量依存的に抑制された(Fig. 3)。

## 考 察

一般に放射線照射によって細胞の増殖能が障害されることは知られているが、本研究でも骨芽細胞様細胞の増殖能は線量依存的に抑制された。またある線量以下では経日的に回復することが示唆された。

骨芽細胞様細胞の分化に対する放射線の影響に関してはアスコルビン酸を除去した培地で培養した場合、非照射群、照射群とも細胞接種後18日目（照射後14日目）までの期間、アルカリフォスファターゼ活性、PTH依存性cAMP産生量の増加はほとんど認められず、また照射群と非照射群との間に有意差は認められなかった。アスコルビン酸はcollagen合成に必要なlysylおよびprolyl hydroxylase活性の発現に必須であり、その除去によりcollagen合成が阻害される。骨芽細胞様細胞の分化は自らが合成・分泌するcollagenとの接触を介して促進されると考えられているため、アスコルビン酸を除去した培地を用いると骨芽細胞様細胞の分化は障害されその表現形質はほぼ一定に保持されると考えられるが、今回の結果もそのことを支持する結果であった。また放射線照射によって骨芽細胞様細胞の表現形質に変化がみられなかったことから照射前に保持していた表現形質は照射によって障害されにくいことが示唆された。すなわち照射によって照射前の分化度が低下しないことが示唆された。

アスコルビン酸を含んだ培地あるいはアスコルビン酸とデキサメタゾンを含んだ培地で培養した場合、非照射群ではアルカリフォスファターゼ活性は経日的に増加した。一方、照射群ではアルカリフォスファターゼ活性の増加はほぼ線量依存的に抑制された。このことから増殖期の骨芽細胞様細胞に放射線照射を行うと骨芽細胞様細胞の分化が抑制されることが示唆された。これは放射線照射によって細胞増殖が抑制されたためにコラーゲンなどの細胞外基質蛋白の合成が抑制され、その結果、骨芽細胞様細胞の分化が抑制されたものと思われる。ところで細胞の放射線感受性に関しては細胞分裂の頻度の高いものほど、また形態および機能において未分化のものほど放射線感受性が高いということが一般に認められている。このことは骨芽細胞様細胞の増殖・分化に対する放射線の影響は骨芽細胞様細胞の生体内での動態によって違うということを示唆している。すなわち、休止期、増殖期、細胞外基質蛋白の合成期、石灰化期の骨芽細胞様細胞の増殖・分化に対する放射線の影響は違うと考えられる。今回の研究では増殖期の骨芽細胞様細胞に放射線照射を行い、骨芽細胞様細胞の増殖・分化は線量依存的に抑制されたが、臨床で術前照射時、大部分の骨芽細胞



様細胞は休止期にあると考えられる。今回、休止期の骨芽細胞様細胞に対する放射線の影響に関しては検討できなかったため放射線照射後の骨移植の最適時期を決めることはできなかった。最近、培養細胞を用いた実験で人の神経芽細胞腫細胞や線維芽細胞の最終分化段階が照射によって誘導されるという報告がなされている。このことは照射を行うと細胞の増殖が障害されるばかりでなく、照射時期によっては細胞の分化が誘導されることを示唆している。今後、骨芽細胞の生体内の動態によって骨芽細胞の増殖・分化に対する放射線の影響がどう違うのかを検討していく予定である。

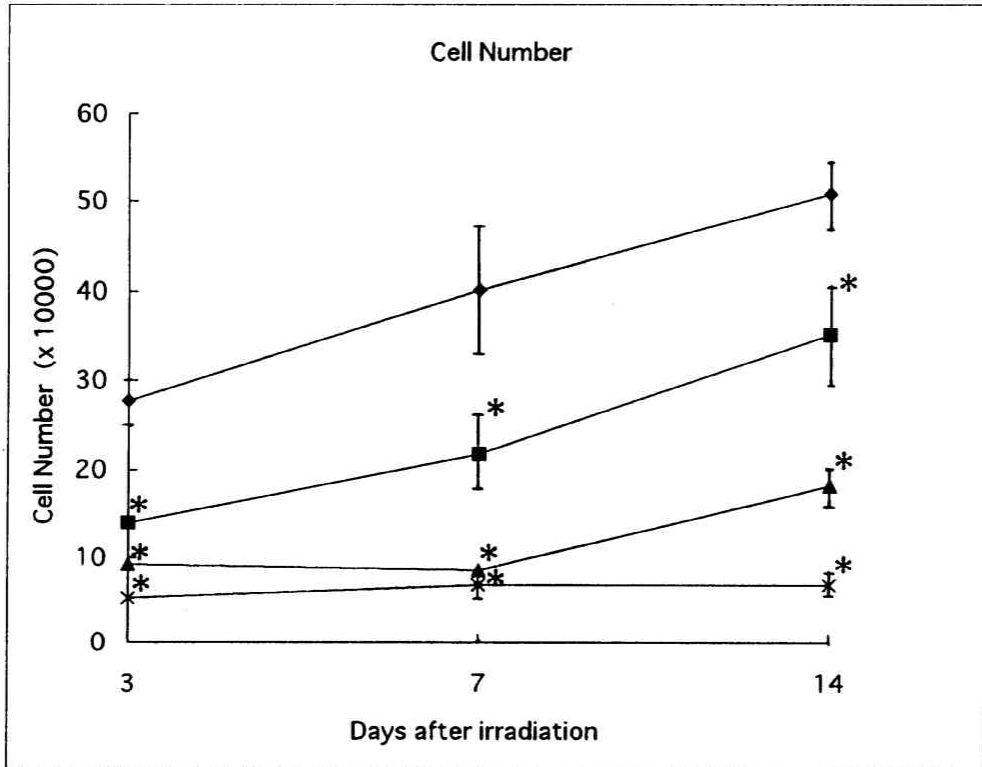


Fig. 1. Time courses of changes in cell number. The cells were cultured in  $\alpha$ -MEM supplemented with 10% FBS. 0 Gy (◆); 5 Gy (■); 10 Gy (▲); 15 Gy (x). \*P < 0.05 against the value in the 0 Gy group (analysis of variance).

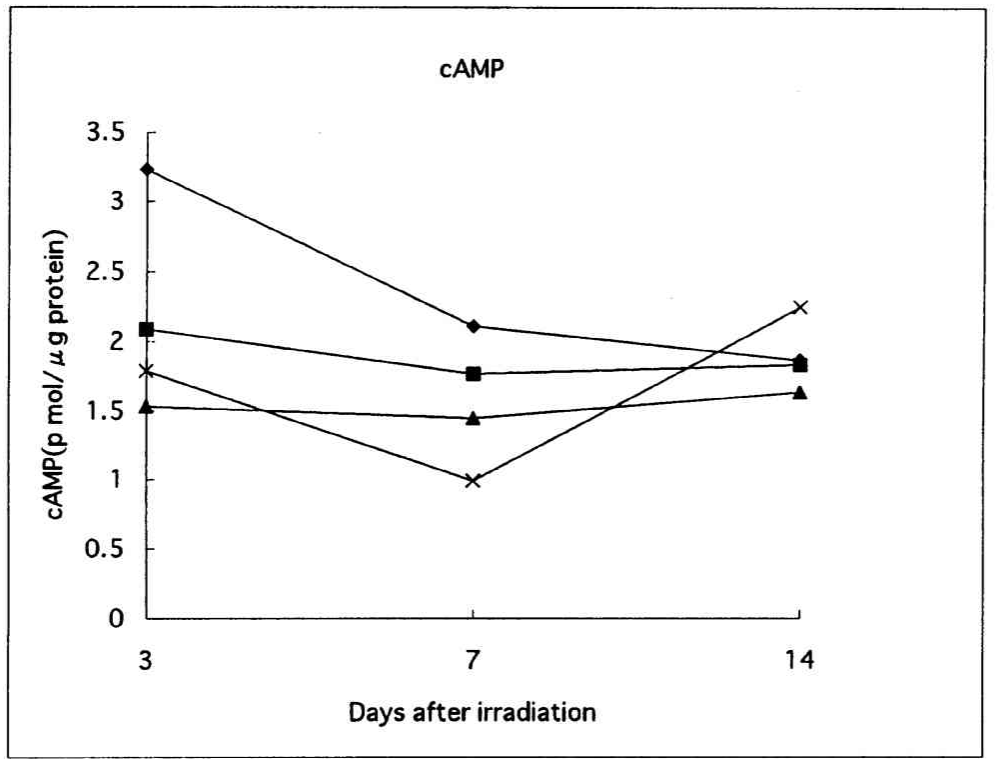
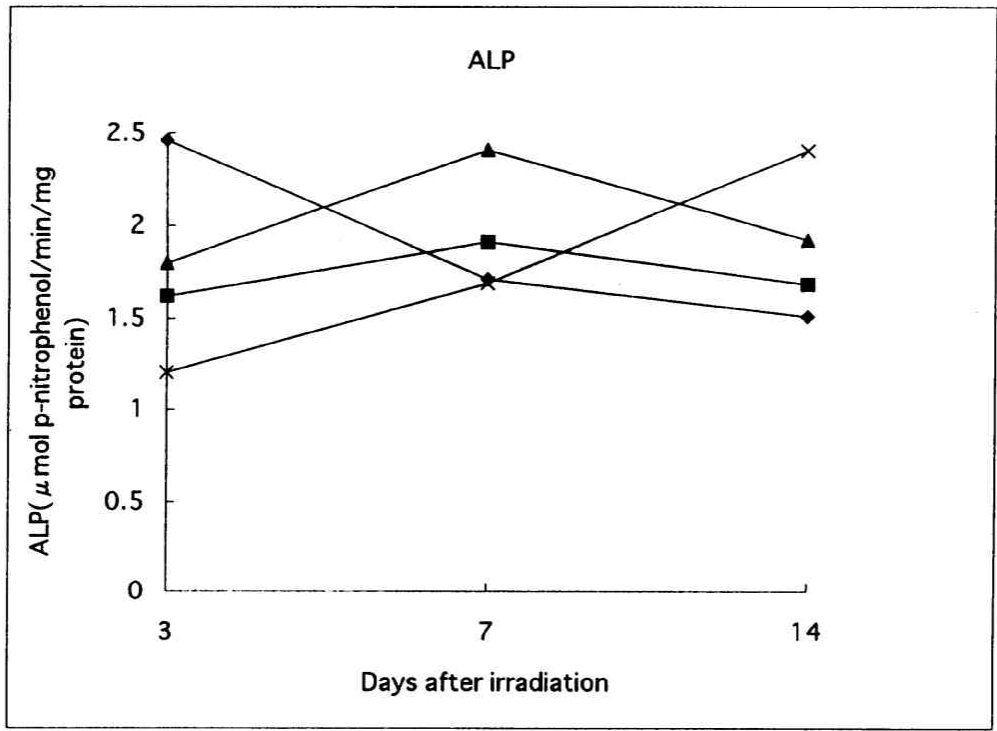


Fig. 2. Time courses of changes in ALP activity (A), PTH mediated cAMP production (B) measured as described in Materials and Methods. The cells were cultured in  $\alpha$ -MEM supplemented with 10% FBS. 0 Gy (◆); 5 Gy (■); 10 Gy (▲); 15 Gy (x).

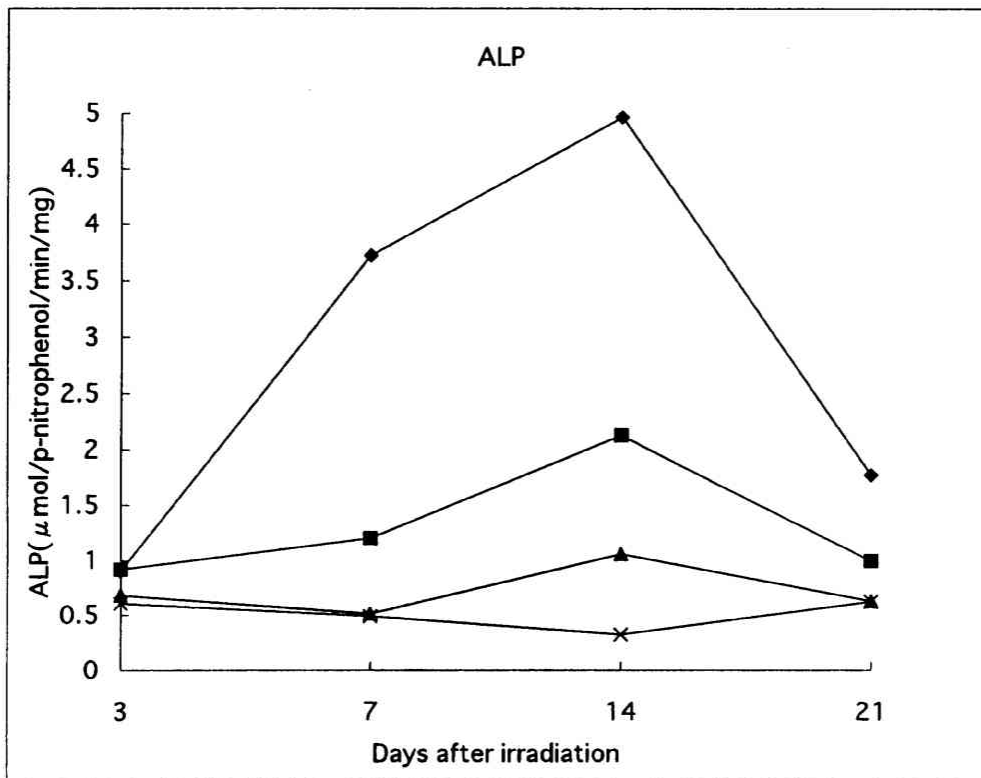
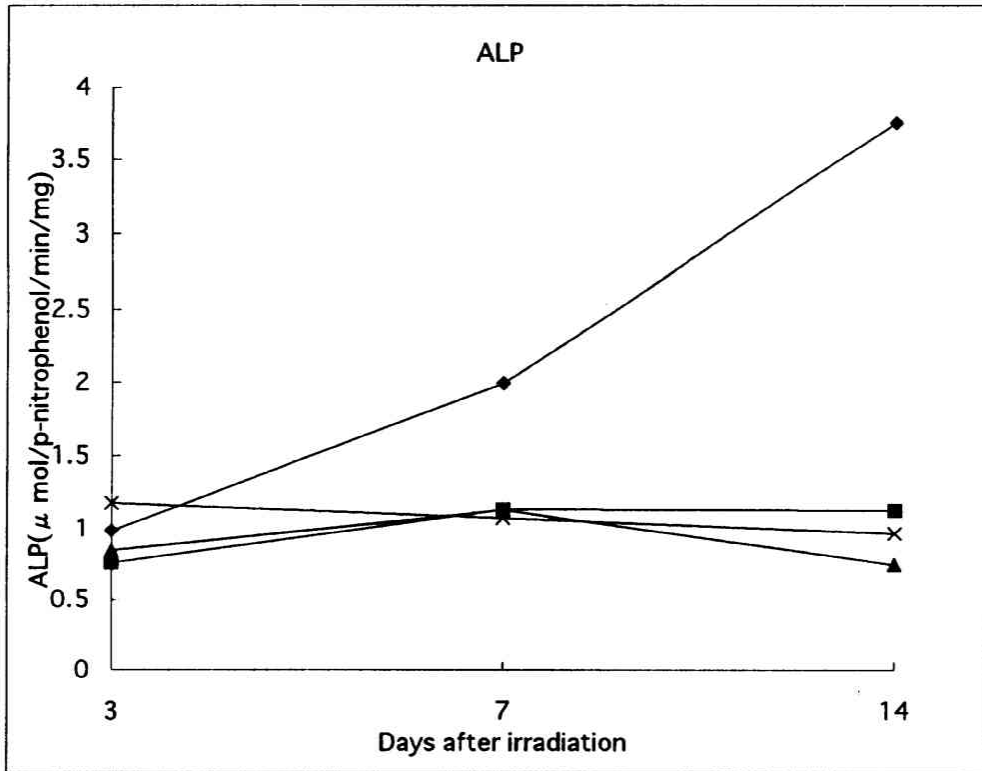


Fig. 3. Time courses of changes in ALP activity. The cells were cultured in  $\alpha$ -MEM supplemented with 10% FBS, 100  $\mu$ g/ml ascorbic acid, 5mM  $\beta$ -glycerophosphate (A),  $\alpha$ -MEM supplemented with 10% FBS, 100  $\mu$ g/ml ascorbic acid, 5mM  $\beta$ -glycerophosphate, 10<sup>-6</sup>M dexamethasone (B). 0 Gy (◆); 5 Gy (■); 10 Gy (▲); 15 Gy (x).