

4062570

骨芽細胞の増殖と分化に対する放射線の影響に関する研究

(11671972)

平成11年度～平成12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13年3月

研究代表者 西村 泰一

（旭川医科大学医学部講師）

骨芽細胞の増殖と分化に対する放射線の影響に関する研究

(11671972)

平成11年度～平成12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13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

本研究は第一に放射線照射によって骨芽細胞の増殖・分化、特に分化がどのような影響を受けるのか、第二に骨形成過程における放射線照射時期の違いによって放射線の影響に違いがあるのかということを知解するためにラット胎児の頭蓋骨から採取した培養骨芽細胞を用いて照射後の骨芽細胞の細胞数、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性、石灰化面積を調べ、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11年度 2,200 千円

平成12年度 900 千円

計 3,100 千円

研究発表

(1) 学会発表

西村泰一：Effects of radiation on proliferation and differentiation of osteoblast

82nd American Association of Oral and Maxillofacial Surgions Annual Meeting 2000年9月21日

西村泰一：「骨芽細胞の増殖と分化に対する放射線の影響に関する研究」

第45回日本口腔外科学会総会、平成12年10月12日

(研究 成 果)

緒 言

一般に放射線照射後に新鮮自家骨移植などによる顎骨一次再建は行われていない。その理由は放射線照射をすると移植床の血管障害と骨芽細胞障害によって骨形成が障害されると考えられているからである。

細胞に対する放射線の作用としては細胞の増殖と分化への作用があり、細胞の増殖は放射線照射によって抑制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影響は未だ明らかではない。細胞分化とは細胞が機能的または形態的に特殊化することを意味する。増殖した細胞は接触している周囲の細胞や細胞外基質あるいは細胞内からの分化因子などのシグナルに応答してそれぞれの形態と機能をもったものに分化する。培養している線維芽細胞は増殖中はあまりコラーゲンを合成しないが、細胞密度が高くなって増殖が低下するにつれてたくさんコラーゲンを作り出す。また増殖因子で刺激すると増殖が盛んになると同時にコラーゲン合成が抑制されるという報告がある。細胞の分化は細胞周期のG₁期（あるいはG₀期）で誘導され、細胞が分化するためには細胞周期が止まること、すなわちG₁ arrestが必要である。ところで増殖細胞に放射線照射をするとp53依存性のG₁ arrestが生じることは知られているが、このことは放射線照射によって細胞分化が誘導されるという可能性を示唆している。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たという報告がなされているが、これらの報告はこの可能性を支持する。

そこで本研究では第一に放射線照射によって骨芽細胞の増殖・分化、特に分化がどのような影響を受けるのか、第二に骨形成過程における照射時期の違いによって放射線の影響に違いがあるのかということを知りたいとすることを解明するためにラット胎児の頭蓋骨から採取した培養骨芽細胞を用いて検討した。

方 法

1. 骨芽細胞の増殖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コラーゲナーゼ

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（骨芽細胞画分）を一つにまとめフラスコ内で10%FBSを含んだ α MEM培地で培養し、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 2×10^4 cells/wellの細胞密度で接種し、10%FBSを含んだ α MEM培地で1週間培養後、培養液を100 μ g/ml ascorbic acidと5mM β -glycerophosphateと10%FBSを含んだ α MEMに交換した。照射群は5 Gy、10Gy、15Gyの3群に分け、培養液交換後4、11、18日目にLinacを用いて各線量を1回照射し、培養液交換日および交換後4、7、14、21、28日目に骨芽細胞の細胞数、ALP活性を14、21、28日目に石灰化面積を測定し、非照射群と照射群を比較検討した(Fig. 1)

（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0.1Mクエン酸/0.1%クリスタル紫液で細胞膜を溶かすとともに核を染色して、血球計算板を用いて細胞数を数えた。

（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 $MgCl_2$ 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 $^{\circ}C$, 10分間 incubation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 μ mol p-nitrophenol produced /min/mg proteinで表した。

（石灰化面積）

Von Kossa染色：wellの培地を捨てCMF-PBSで細胞層を2回洗浄後、10%ホルマリンで30分間固定。3回水洗し、自然乾燥後、1%硝酸銀を加え直射日光下で15分間放置。2回水洗後5%チオ硫酸ナトリウム水溶液を加え2～5分間放置。3回水洗後Van Giesonで5分間後染色。CMF-PBSで1回洗浄後95%エタノールで2回洗浄し自然乾燥。Von Kossa染色によって茶色～黒色に染まった部分の面積をscannerとAdobe Photoshop 5.0 Jを使用して測定した。

結 果

骨芽細胞の増殖、分化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を用いて検討し下記の結果を得た。

1. 骨芽細胞の増殖に対する放射線照射の影響。

非照射群では経日的に細胞数が増加したが、照射群ではday4,11,18のどの時期に照射をしても細胞増殖は線量依存的に有意に抑制された(Fig. 2a,2b,2c)。

2. 骨芽細胞のALP活性に対する放射線照射の影響。

1) 非照射群ではALP活性は経日的に上昇した。

2) day4 に照射をするとALP活性は線量依存的に抑制された(Fig. 3a)。

3) day11に照射をするとALP活性はday21, 28 に非照射群よりも有意に上昇した(Fig. 3b)。またday18 に照射をした場合もday11に照射したときと同じようにALP活性はday21, 28 に有意に上昇した(Fig. 3c)。

3. 石灰化面積に対する放射線照射の影響。

1) Confluence後、骨芽細胞は活発に細胞外基質を形成し、day10頃には石灰化が認められた。非照射群では石灰化面積は時間の経過とともに増加した。

2) day4 に照射をすると細胞数やALP活性と同じようにほぼ線量依存的に抑制された(Fig. 4a)。

3) day18に照射をすると興味深いことに5Gy 群ではday28 に石灰化面積は非照射群に比較して有意に増加した(Fig. 4c)。

考 察

一般に放射線照射後に新鮮自家骨移植などによる顎骨一次再建は行われていない。その理由は放射線照射をすると移植床の血管障害と骨芽細胞障害によって骨形成が障害されると考えられているからである。しかし、骨芽細胞の増殖や分化に対する放射線照射の影響に関しては未だ明らかではない。そこでわれわれはラット胎児の頭蓋骨から採取した培養骨芽細胞を用いて骨形成過程のいろいろな時期に照射を行い、骨芽細胞の増殖と分化に対する放射線照射の影響に関して検討した。

放射線照射によって細胞の増殖が抑制されることは知られているが、本研究でも骨芽細胞の増殖は骨形成過程のどの時期に照射を行っても線量依存的に抑制された。

一方、骨芽細胞の分化の指標となるALP活性は骨芽細胞の増殖が盛んなday4に照射すると線量依存的に抑制されたが、細胞の増殖活性が低下し、細胞外基質の形成が活発な時期であるday11あるいは石灰化期であるday18に照射すると非照射群と比較して有意に上昇した。また骨芽細胞の最終分化段階の指標となる石灰化面積もALP活性と同様に細胞増殖期に照射すると抑制されたが、興味深いことに石灰化期に照射すると5Gy群のみ有意に増加した。

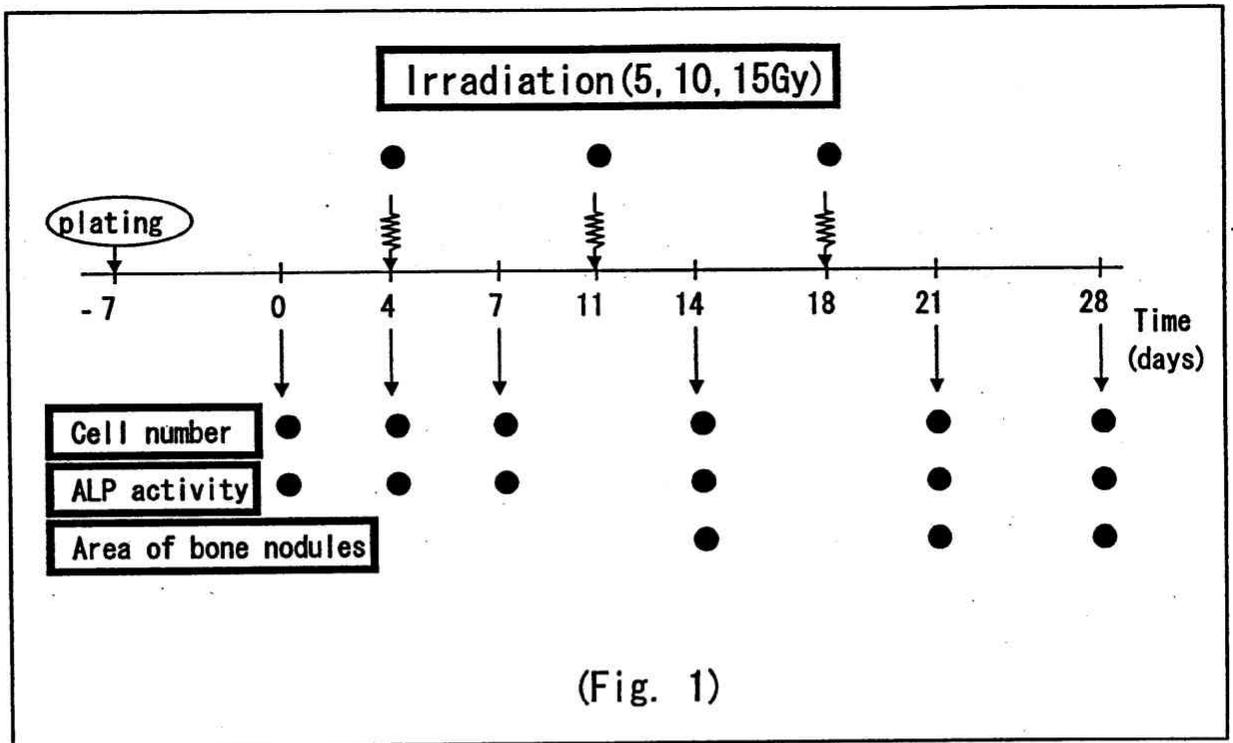
放射線照射をすると骨芽細胞のゲノムDNAに傷害（2本鎖DNAの切断）が起こる。このDNAダメージによりp53蛋白質は修飾を受け活性化する。活性化には2通りあり、1つはp53の安定化による増量、もうひとつは安定化を必ずしも伴わない質的活性化であるが、両者を含む活性化もありうる。DNAダメージにより活性化されたp53は各種遺伝子のプロモーターに作用し転写を制御する。p53のターゲットとして転写活性化される遺伝子を機能別に分類すると、1、細胞周期の停止に関連する遺伝子、2、DNA修復関連遺伝子、3、アポトーシス誘導関連遺伝子、4、腫瘍の増殖・転移の阻害に関連する遺伝子、5、上記以外の、あるいは機能が不明の遺伝子、となる。放射線照射によってDNAに傷害が起こるとp53によって細胞分裂を停止する遺伝子が転写活性化され、細胞周期が一時的に止められ（G₁ arrest）、同時にDNAの修復に関与する遺伝子が転写活性化され、DNAの修復が行われる。しかし、DNAの傷害が修復不可能か、あるいは生物体にとってその細胞が死ぬほうがよい場合にはp53によって細胞死（アポトーシス）に関与する遺伝子が転写活性化され、アポトーシスが誘導される。このようにp53は細胞周期の停止、DNA修復、アポトーシスなどにおいて重要な役割を果たしてい

る。

ところで細胞の分化とは細胞が機能的または形態的に特殊化することを意味する。増殖した細胞は接触している周囲の細胞や細胞外基質あるいは細胞内からの分化因子などのシグナルに応答してそれぞれの形態と機能をもったものに分化する。細胞の分化は細胞増殖の停止したG₀期（あるいはG₁期上のある時期）に誘導される、すなわち細胞が分化するためには細胞周期が停止することが必要である。放射線照射をするとp53依存性のG₁ arrestが起こるため、放射線照射によって細胞分化が誘導される可能性がある。最近、人の線維芽細胞や神経芽細胞を用いた培養実験において放射線照射によって最終分化段階が誘導されたという報告がなされているが、今回の結果も放射線照射によって分化が誘導されることを支持している。ただし、増殖期に照射をしても骨芽細胞の分化は誘導されず、細胞外基質の形成期、あるいは石灰化期に照射をすると骨芽細胞の分化が誘導されたことから、細胞周期が止められたときに骨芽細胞が分化できる環境が整っていれば、DNAの修復やアポトーシスばかりでなく分化も誘導されるのではないかとおもわれる。

一方、p53は骨芽細胞の分化と骨の発育に重要な役割を担っていて、骨芽細胞の分化過程で安定化あるいは活性化され、しかも骨芽細胞の分化能力がp53の量に依存するという報告がなされている。放射線照射をするとp53が安定化し、活性化されることから骨芽細胞の分化が誘導されやすくなる可能性があるが、今回の結果はこの可能性を支持している。しかしながら、骨芽細胞の分化過程におけるp53の作用機序に関しては未だ明らかでなく、今後の研究が期待される。

今回の研究結果をまとめると骨形成過程の細胞増殖期に照射をすると骨芽細胞の増殖・分化はともに抑制されるが、細胞外基質の成熟期あるいは石灰化期に照射をすると骨芽細胞の増殖は抑制されるが、分化は誘導される可能性が示唆された。



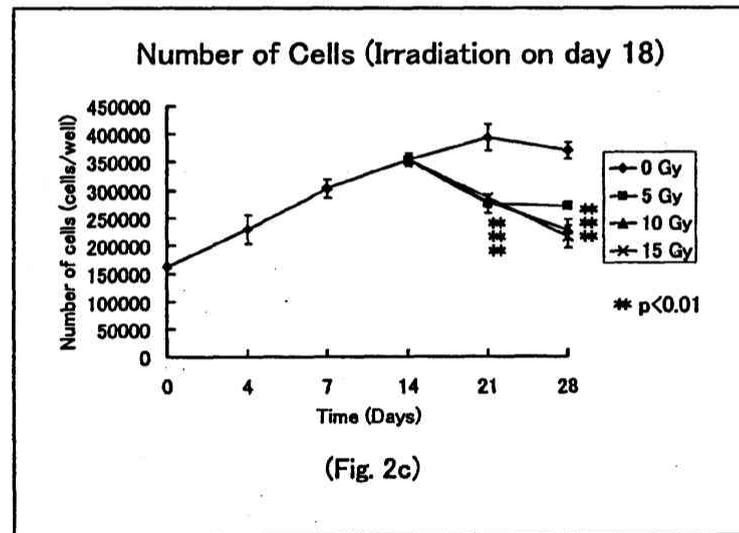
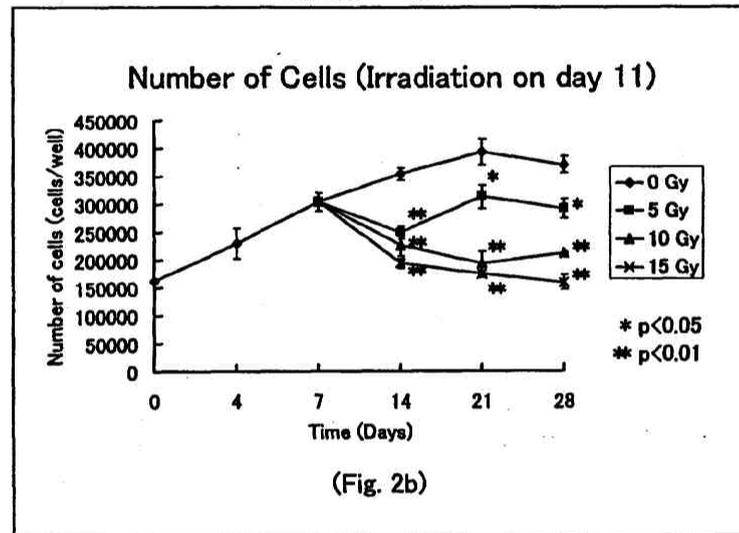
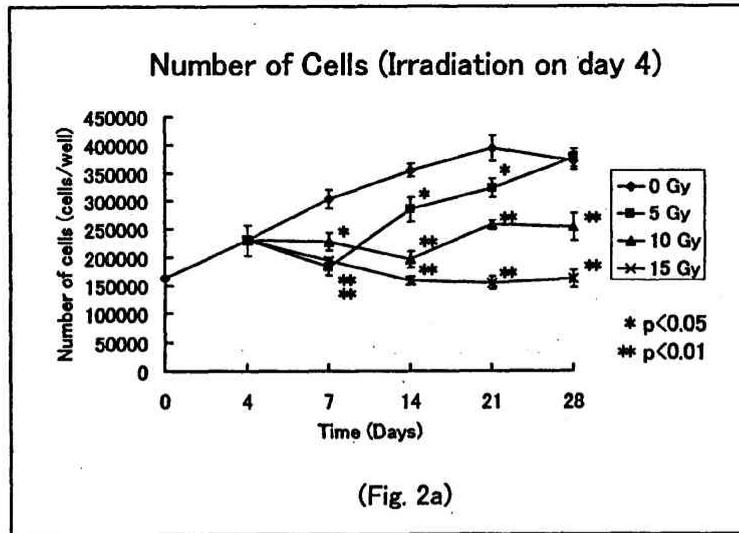


Fig. 2. Effect of radiation on cell growth. The cells were exposed to various doses of radiation on day 4(a), day 11(b), or day 18(c). The cell number was measured on day 0, 4, 7, 14, 21, and 28, respectively. Data are means \pm standard errors of four samples. Significant difference was observed compared with control. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$. 0 Gy (◆); 5 Gy (■); 10 Gy (▲); 15 Gy (×).

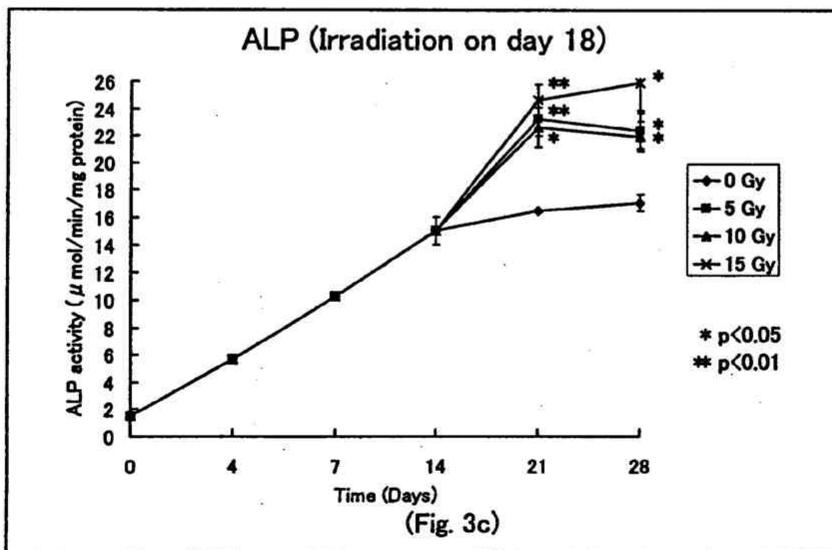
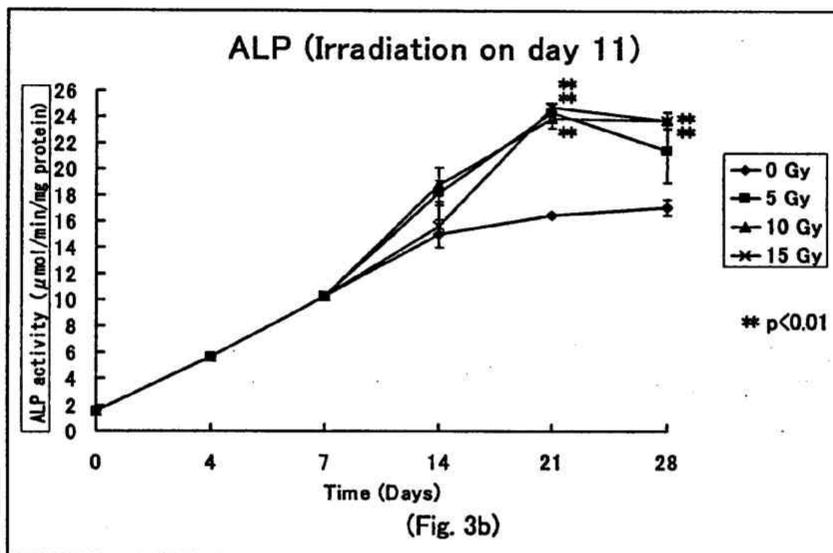
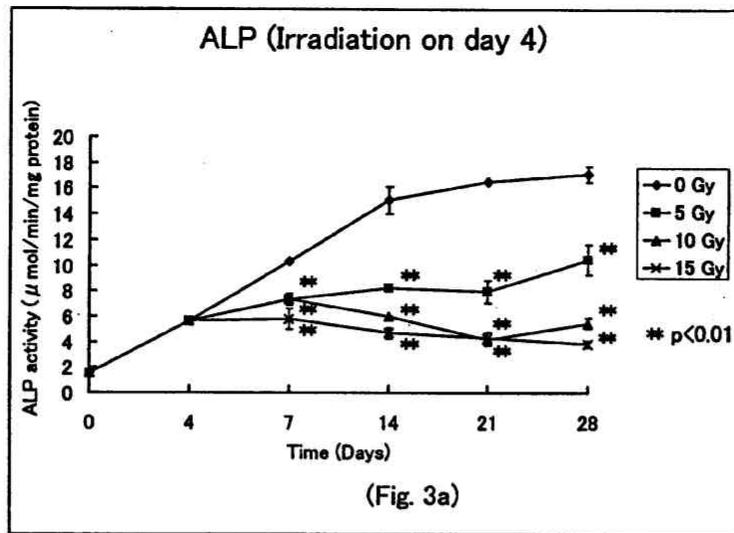


Fig. 3. Time courses of ALP activity after irradiation. The cells were exposed to various doses of radiation on day4(a), day11(b), or day18(c). The ALP activity was measured on day0, 4, 7, 14, 21, and 28, respectively. Data are means \pm standard errors of four samples. Significant difference was observed compared with control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. 0 Gy (\blacklozenge); 5 Gy (\blacksquare); 10 Gy (\blacktriangle); 15 Gy (\times).

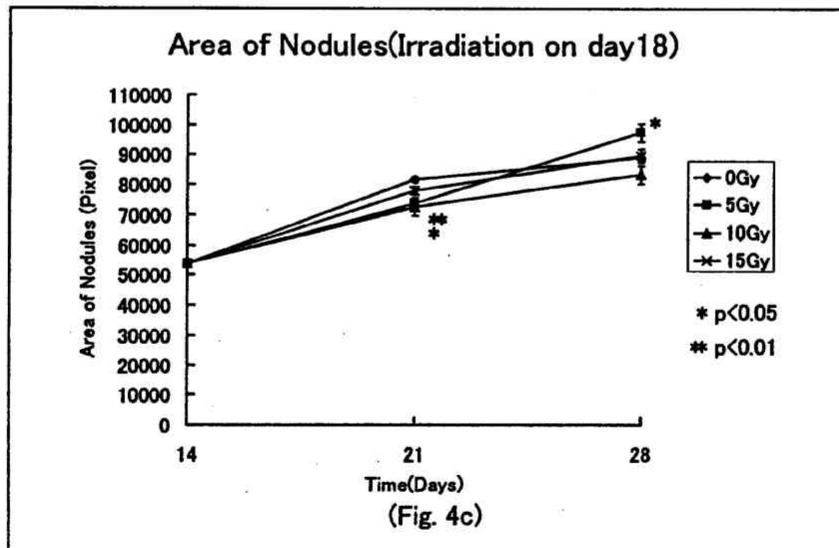
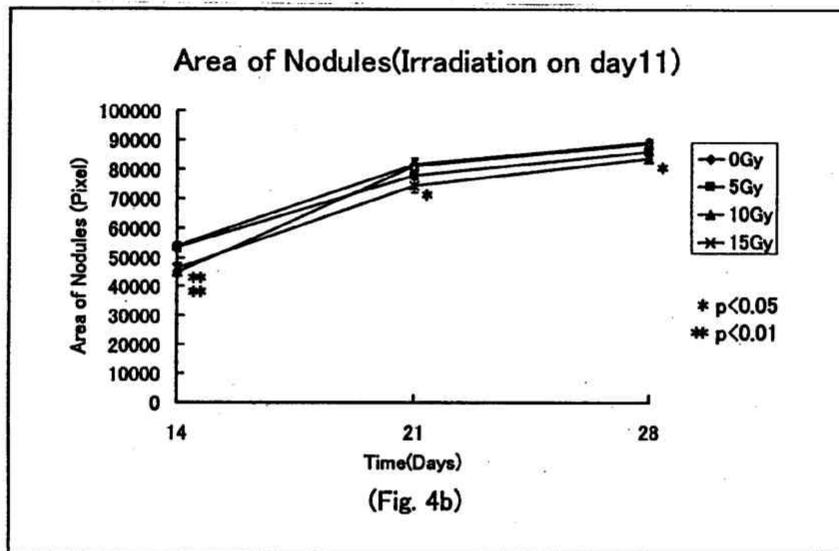
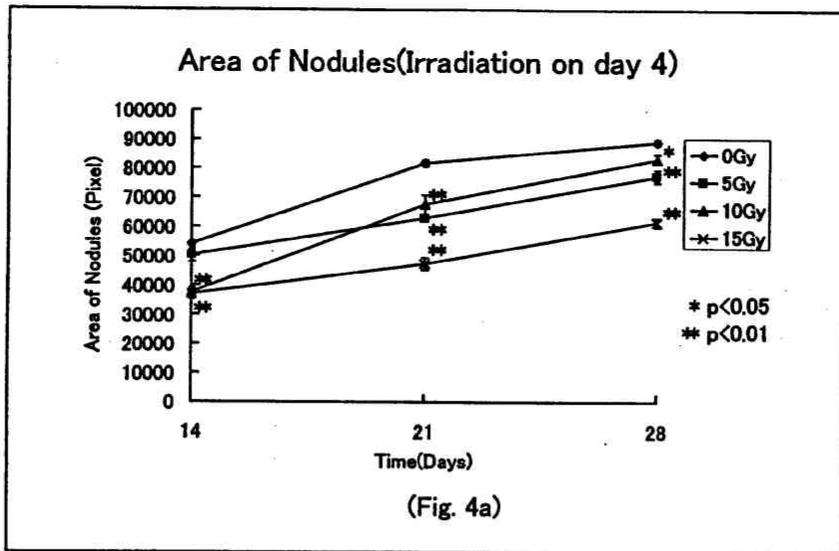


Fig. 4. Time courses of the area of mineralized bone nodules after irradiation. The cells were exposed to various doses of radiation on day4(a), day11(b), or day18(c). The area of mineralized bone nodules was measured on day14, 21, and 28, respectively. Data are means \pm standard errors of six samples. Significant difference was observed compared with control. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.
 0 Gy (\blacklozenge); 5 Gy (\blacksquare); 10 Gy (\blacktriangle); 15 Gy (\blacktimes).