

原著

## 過酸化水素処理による骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 の bone nodule 形成への影響 - 石灰化物の結晶学的検索 -

佐藤 俊紀<sup>1)</sup>・寒河江 登志朗<sup>2,5,6)</sup>・田中 陽子<sup>3,5)</sup>・安孫子 宜光<sup>4,5,6)</sup>・妻鹿 純<sup>3,5)</sup>

<sup>1)</sup> 日本大学大学院松戸歯学研究科 障害者歯科学専攻

<sup>2)</sup> 日本大学松戸歯学部 組織・発生・解剖学講座

<sup>3)</sup> 日本大学松戸歯学部 障害者歯科学講座

<sup>4)</sup> 日本大学松戸歯学部 生化学・分子生物学講座

<sup>5)</sup> 日本大学松戸歯学部 口腔科学研究所

<sup>6)</sup> 日本大学量子科学研究所 電子線利用研究施設

### Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-derived free radicals on mineral crystallinity of bone nodules

Toshinori Sato<sup>1)</sup>, Toshiro Sakae<sup>2,5,6)</sup>, Yoko Tanaka<sup>3,5)</sup>, Yoshimitsu Abiko<sup>4,5,6)</sup>, Junichi Mega<sup>3,5)</sup>

<sup>1)</sup> Dentistry for the Disabled, Nihon University Graduate School of Dentistry at Matsudo, Chiba, 271-8587, Japan

<sup>2)</sup> Department of Histology, Cytology and Developmental Anatomy, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, 271-8587, Japan.

<sup>3)</sup> Department of Dentistry for the Disabled, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, 271-8587, Japan.

<sup>4)</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, 271-8587, Japan.

<sup>5)</sup> Research Institute of Oral science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, 271-8587, Japan.

<sup>6)</sup> Institute of Quantum Science, Nihon University, 274-8501 Japan.

Abstract: The ability of osteoblasts to form bone greatly diminishes with aging, which may be due to the rise of oxygen-derived free radical formation. However, changes that occur in the mineral crystallinity of bone nodules formed by osteoblasts under conditions of oxidative stress have not been sufficiently clarified. The aim of this study was to elucidate the effects of oxidative stress on osteogenesis. We investigated bone nodule formation in an osteoblast-like cell line, MC3T3-E1, using von Kossa staining and micro-X-ray diffraction (micro-XRD). For the micro-XRD examinations, the bone nodules were analyzed after removal from the culture plate and placed on a slide glass or a silver membrane filter. We found that nodule formation was lower on day 30 following treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and mineral crystallinity in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells was also lower than in the controls. These results suggest that osteoblasts damaged by oxygen free radicals produced during the aging process show a decline in their bone nodule formation ability.

Key words: osteoblast cell, bone nodule, hydrogen peroxide, X-ray diffraction, aging

### 緒言

スーパーオキシドや過酸化水素などの活性酸素種 (ROS) は、DNA、タンパク質、および脂質への傷害をもたらす。ミトコンドリアの電子伝達系などの正常な細胞の代謝またはサイトカイン、紫外線などの環境の刺激から正常な酸化還元バランスは乱れ、細胞は酸化ストレスを受ける<sup>1)</sup>。この酸化ストレスが老化の主な原因の1つであるということが示唆されている<sup>2,3)</sup>。

骨組織では、胎児期から老年期まで生涯を通じて骨芽細胞による骨形成と、破骨細胞による骨吸収が常に行われている。正常な生体では骨形成と骨吸収のバランスが保たれているが、加齢とともに骨量が減退していくことはよく知られている<sup>2,4)</sup>。近年、加齢における骨量減退の原因として活

性酸素による老化が関与していることが示唆されている<sup>3,5,6)</sup>。

これまで加齢における骨量の変化についての報告として bone mineral density (BMD) を用いた研究<sup>3-5)</sup>が盛んに行われている。近年、Akkus<sup>10,11)</sup>らはラットにおいて加齢により骨の結晶性が変化することから BMD のみでなく骨の評価法として結晶性の検討の必要性を報告している。しかしながら老化による骨の結晶性の変化についてはまだ不明な点が多い。

そこで本研究は、生体内で常時発生される活性酸素の一つである過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) で骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞を処理し、Von Kossa 染色法、micro X-ray diffraction (micro-XRD)<sup>12)</sup> を用い、細胞層に形成される bone nodule 形成及び結晶性に及ぼす酸化ストレスの影響

について検討した。

## 材料および方法

### 細胞及び継代培養法

細胞は、Kodamaらによりマウスの頭蓋骨から採取し株化され、他の細胞系への分化能をもたない骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞<sup>13)</sup> を用いた。

培養は 75 cm<sup>2</sup> 組織培養フラスコ (Corning, U.S.A.) を用い、37°C に保持し、5% の CO<sub>2</sub> を含むインキュベーター内で行った。培地には、10% 牛胎児血清 (FBS) 及び 5 mM HEPES、抗生物質: 50 mg/ml ゲンタマイシン硫酸塩 (Sigma, U.S.A.)、0.3 mg/ml アンホテリシン B (Flow Laboratories, USA)、100 units/ml ペニシリン G カリウムを含む a-MEM (Gibco, U.S.A.) を用い、培養液は週 3 回交換した。

### von Kossa 染色

24 well plate の 1 well に細胞を 1 × 10<sup>5</sup> 細胞播種した。24 時間後コンフルエントに達したところで、400 mM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 3 時間作用させ、石灰化培地として 10% FBS と抗生物質、50 mg/ml の アスコルビン酸 (VC) と 10 mM b-グリセロリン酸 (b-GP) を含む a-MEM 培地にて 30 日間培養を継続した。その後、von Kossa 法<sup>14)</sup> を用いて bone nodule を染色した。30 日間培養後、上清を取り除き PBS (-) (Gibco, U.S.A.) にて細胞を 2 回洗浄した後、10% 中性ホルマリンを 30 分間作用させ固定した。精製水にて 3 回洗浄したのち、10 分間遮光下にて 5% 硝酸銀水溶液 (Sigma, Japan) と反応させた。さらに精製水にて 3 回洗浄した後、蛍光灯下にて 30 分間感光させた。

染色された bone nodule は、実体顕微鏡 (Olympus, Japan) 下に倍率 40 倍にて観察し、画像はデジタルカメラにて撮影した。

### micro-XRD

MC3T3-E1 細胞を、100mm<sup>2</sup> 細胞培養プレートに 1 × 10<sup>6</sup> 細胞播種した。24 時間後コンフルエントに達したところで、前述の方法により H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理を行い、前述した石灰化培地にて 30 日間培養した。30 日間の培養後、上清を取り除き PBS (-) にて細胞を 2 回洗浄した後、10% 中性ホルマリンを 30 分間作用させ固定した。精製水にて 3 回洗浄した後、各 bone nodule は以下に述べる 2 つの方法にて micro 帽 RD 回折実験を行った。

第 1 の方法では、bone nodule を慎重に培養プレートから剥がしとり、スライドガラス上に載せたものを用い bone nodule を解析した。

第 2 の方法では、bone nodule を慎重に培養プレートから剥がしとり、銀メンブレンフィルター (milipore, U.S.A) 上に載せたものを用い<sup>15)</sup>、銀による特異的なピークに対する bone nodule におけるハイドロキシアパタイトのピークの比較を行った。

micro-XRD は、RINT 500 湾曲 PSPC 型微小部 X 線回折装置 (Rigaku, Japan) を用い、測定及び回折実験を行っ

た。

X 線発生装置: リガク回転対陰極型強力 X 線発生装置、対陰極: Cu、加速電流: 300 mA、X 線モノクロメーター: グラファイト結晶、X 線波長: 1.542 Å (CuKα)、試料揺動; 入射 X 線方向に対する傾き (w): 18 度固定、w に直交方向の傾き (c): -20.0 度 ~ 20 度、試料回転 (f): -1.0 度 ~ 1.0 度、検出器: リガク湾曲 PSPC (Position Sensitive Proportional Counter)、測定角度範囲: 0 度 ~ 160 度 (2θ)、PHA (Pulse Height Analyzer): 標準設定、計測時間: 20 分、データ解析ソフト: JADE Ver.5.0+ (MDI, U.S.A) を用いた。

なお、スライドガラス上の bone nodule に対し、直径 30 mm の楕円形 (X 線ビーム径 30 mm、入射角度 18 度) の X 線ビームコリメーターを用い計測時間を 90 分とした。また銀メンブレンフィルター上の bone nodule の回折実験には直径 100 mm の楕円形 X 線ビーム径 100 mm、入射角度 18- ) の X 線ビームコリメーターを使用し計測時間を 20 分とした。

## 結果

### von Kossa 染色

von Kossa 法を用いて染色された bone nodule 像を 図 1 に示した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用群およびコントロール群ともに bone nodule の形成が認められた。しかし、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用群において、コントロール群と比較し bone nodule 数の少ないことが認められた。

### micro-XRD

本実験における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用群とコントロール群の bone nodule の X 線回折パターンにみられるピークは、ともに Rogers らの示した生体骨の X 線回折パターン<sup>16)</sup> と類似していた。しかし、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用群とコントロール群には、出現したアパタイトの回折ピークに強度の違いが認められた。

図 2 に、スライドガラス上の bone nodule における micro-XRD パターンを示した。26-(002)、32-(211、112、300) はハイドロキシアパタイト結晶の特異的な回折ピーク<sup>17)</sup> である。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用群の 26- 及び 32- の回折ピークはコントロール群に比べ低く、さらに H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用群の 26- の回折ピークは不明瞭であることが認められた。

図 3 に銀メンブレンフィルター上の bone nodule における micro-XRD 回折パターンを示した。銀に特有のピークである 38-、44-、64- のピークが、コントロール群に比べ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用群において高かった。また、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用群においてハイドロキシアパタイトに特有のピークである 32- の回折ピークは、コントロール群に比べ低いことが認められた。

## 考察

本研究は老化の過程において重要な働きを考えると考えられている酸化ストレスの骨形成に対する影響を解明するために行ったものであり、骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞を用いて、酸化ストレスである H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理が bone nodule

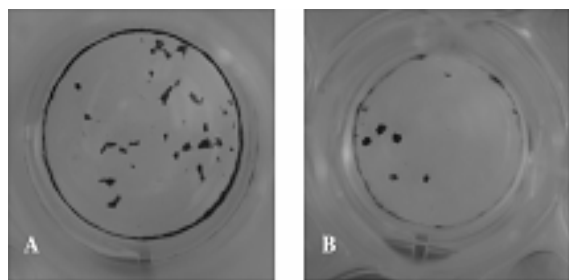


図1 . bone nodule 形成数への影響 .bone nodule 形成数は von Kossa 染色により観察した。(A) コントロール群、(B)  $H_2O_2$  処理群における等倍像。  $H_2O_2$  処理した MC3T3-E1 細胞により形成された bone nodule 数はコントロール群に比べ少なかった。

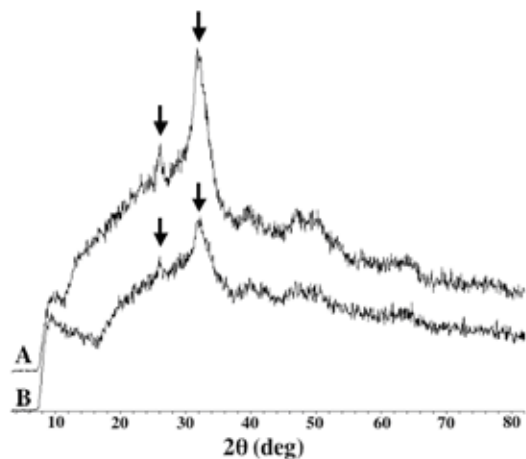


図2 . スライドガラス上の bone nodule における Micro-XRD 回折パターン。(A) コントロール群、(B)  $H_2O_2$  処理群。

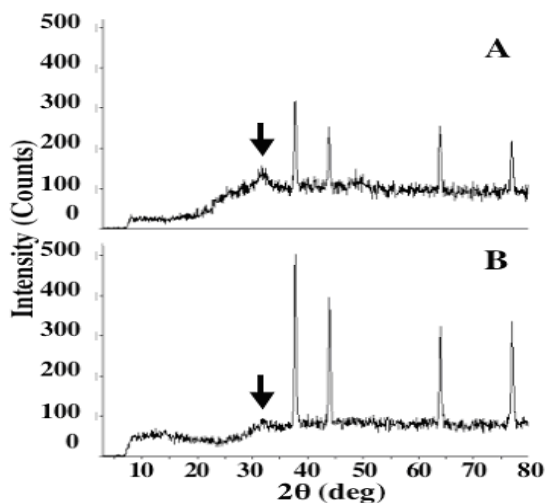


図3 . 銀メンブレンフィルター上の bone nodule における Micro-XRD 回折パターン。(A) コントロール群、(B)  $H_2O_2$  処理群。

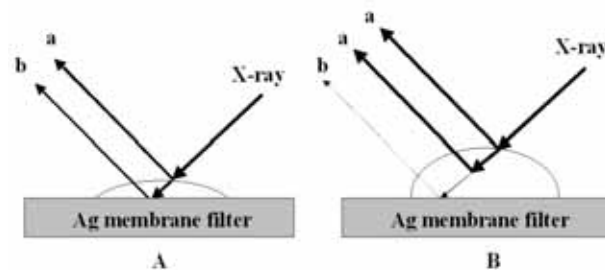


図4 . 銀メンブレンフィルターによる X 線回折法の原理。(A) 厚さの薄い bone nodule の場合、(B) 厚さの厚い bone nodule の場合 (a) bone nodule の回折 X 線、(b) 銀メンブレンフィルターの回折 X 線。(A) タイプの bone nodule の場合、回折 X 線 (a) は (A) タイプよりも大きい、回折 X 線 (b) は小さくなる。

形成能及び結晶性に及ぼす影響を検討した。

従来 bone nodule の定量は、von Kossa 法を用いて行われてきた<sup>18-20)</sup>。しかし、近年 Bonewald らは、石灰化物の判定として von Kossa 法のみでは不十分であると報告している<sup>22)</sup>。von Kossa 法は不溶性のカルシウム、特にリン酸カルシウムの検出法であるが、硝酸銀水溶液を加えることで、カルシウムがカルシウムイオンとして溶出し、銀で置換され炭酸銀を生じさせる。次の段階で炭酸銀を、濃褐色に強く着色する金属銀の微粒子に還元させる方法であるため、直接的なハイドロキシアパタイト結晶の検出法ではなく、リンを検出することによる間接的な検出法である<sup>22)</sup>。ゆえに、この方法では bone nodule の形成数は測定できるが、直接的に結晶性の比較をすることは困難である。そこで本実験において、従来の bone nodule 測定法として von Kossa 染色法を用い、さらに染色、溶解などの前処理なく結晶性を比較する方法として micro-XRD を用いることとした。

本実験において von Kossa 法の結果から bone nodule 形成数は  $H_2O_2$  により抑制されることが示された ( 図 1 )。micro-XRD による解析結果は、コントロール群及び  $H_2O_2$  作用群の bone nodule は、ともにハイドロキシアパタイト骨様石灰化物であることが示された。しかしながら、図 2.3 においてコントロール群と  $H_2O_2$  作用群では、微小部 X 線回折パターンに回折ピークの大小及び明瞭性に違いがみられた。micro-XRD の特性として X 線回折パターンに反映される結晶の大きさは、X 線が同時に回折を生じる領域のこと<sup>12)</sup>であり、回折ピークの強度として現れる。一方、微小部 X 線回折パターンの明瞭性は結晶性を反映する。よって、今回の微小部 X 線回折パターン結果から  $H_2O_2$  作用群の bone nodule 内に存在するハイドロキシアパタイト結晶の大きさ、量及び成熟性は、コントロール群と比べ低いことが示された。

銀の回折 X 線は bone nodule を透過することにより検出される ( 図 4 )。図 3 より銀メンブレンフィルター上の bone nodule の X 線回折パターンは、コントロール群よりも  $H_2O_2$  作用群の方が銀の X 線回折ピークが高く、ハイドロキシアパタイトのピークが低かった。これは、 $H_2O_2$  作

用群の bone nodule 中の結晶密度がコントロール群よりも密度が低いことを示している。つまり、銀及び生体アパタイトの X 線回折ピークの結果は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用群における bone nodule 内の結晶性はコントロール群と比べ低いことを示している。以上の結果から、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を作用させることで MC3T3-E1 細胞において bone nodule 形成能は低下し、さらに形成された bone nodule の成熟度が低下することが示され、酸化ストレスが骨芽細胞の骨形成能に障害を及ぼす可能性が示唆された。

### 謝辞

今回利用した微小部エックス線解析装置は日本大学量子科学研究所電子線利用研究施設 (LEBRA) に設置したものである。佐藤 勇 教授、早川 建 教授、田中 俊成 教授、早川 恭史 助教授をはじめ LEBRA の関係者各位に深く謝意を表す。

本研究費の一部は、文部科学省平成 13 年度学術フロンティア推進事業、および平成 17 年度大学院高度推進事業 (学生分) によった。

### 文献

1. Finkel, T and Holbrook N.J: Oxidants, oxidative stress and biology of ageing. *Nature* 408: 147-39, 2000
2. Tolmasoff JM, Ono T, cutler RG: Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* 77: 2777-2781, 1980
3. Sohal RS, Allen RG: Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis. *Exp. Gerontol.* 25(6): 499-522, 1990
4. Hernandez CJ, Beaupre GS, Carter DR: A theoretical analysis of the relative influences of peak BMD, age-related bone loss and menopause on the development of osteoporosis. *Osteoporos Int.* Oct;14(10):843-7, 2003
5. Blain H, Vuillemin A, Blain A, Guillemin F, Talanc ND, Doucet B, Jeandel C.J: Age-related femoral bone loss in men: evidence for hyperparathyroidism and insulin-like growth factor-1 deficiency. *Gerontol A Biol Sci Med Sci.* Dec;59(12):1285-9, 2004
6. Knopp E, Troiano N, Boussein M, Sun BH, Lostritto K, Gundberg C, Dziura J, Insogna K: The effect of aging on the skeletal response to intermittent treatment with parathyroid hormone. *Endocrinology.* Apr;146(4):1983-90, 2005
7. Bai XC, Lu D, Bai J, Zheng H, Ke ZY, Li XM, Luo SQ: Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun.* Jan 30;314(1):197-207,2004
8. Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL: Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med.* Aug 15;31(4):509-19, 2001
9. Akkus O, Adar F, Schaffler MB: Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. *Bone. Mar;*34(3):443-53, 2001 ]
10. Akkus O, Polyakova-Akkus A, Adar F, Schaffler MB: Aging of microstructural compartments in human compact bone. *J Bone Miner Res.* Jun;18(6):1012-9, 2003
11. Declercq HA, Verbeeck RM, De Ridder LI, Schacht EH, Cornelissen MJ: Calcification as an indicator of osteoinductive capacity of biomaterials in osteoblastic cell cultures. *Biomaterials.* Aug;26(24):4964-74, 2005
12. Warren BE: *X-ray Diffraction*, Dover Pub, New york 251-275, 1969
13. Kodama H, Amagi Y, Sudo H, Kasai S, Yamamoto S: Establishment of clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria *Jpn J Oral Biol.* 23, 899-901, 1981
14. Clark G: *Staining procedures.* 4th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 121. 1981
15. Dufresne A, Loosereewanich P, Begin R, Dion C, Ecobichon D, Muir DC, Ritchie AC, Perrault G: Tentative explanatory variable of lung dust concentration in gold miners exposed to crystalline silica. *J Expo Anal Environ Epidemiol.* Jul-Sep;8(3): 375-98, 1998
16. Rogers K.D, Daniels P: An X-ray diffraction study of the effects of heat treatment on bone mineral microstructure. *Biomaterials.* Jun;23(12):2577-85, 2002
17. Ohgushi H, Dohi Y, Katuda T, Tamai S, Tabata S, Suwa Y: In vitro bone formation by rat marrow cell culture. *J Biomed Mater Res.* Nov;32(3):333-40, 1996
18. Itoh F, Aoyagi S, Furihata-Komatsua H, Aoki M, Kusama H, Kojima M, Kogo H: Clodronate stimulates osteoblast differentiation in ST2 and MC3T3-E1 cells and rat organ cultures. *European Journal of Pharmacology.* 477: 9- 16, 2003:
19. Maeda H, Wada N, Nakamuta H, Akamine A: Human periapical granulation tissue contains osteogenic cells. *Cell Tissue Res.* Feb;315(2):203-8, 2004
20. Leskela HV, Risteli J, Niskanen S, Koivunen J, Ivaska KK, Lehenkari P. Osteoblast recruitment from stem cells does not decrease by age at late adulthood. *Biochem Biophys Res Commun.* Nov 28;311(4):1008-13, 2003
21. Bonewald LF, Harris SE, Rosser J, Dallas MR, Dallas SL, Camacho NP, Boyan B, Boskey A: von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation. *Calcif Tissue Int.* May;72(5):537-47, 2003
22. Puchtler H, Meloan SN. Demonstration of phosphates in calcium deposits: a modification of von Kossa's reaction. *Histochemistry.* Jul 12;56(3-4):177-85, 1978