

原 著

デキサメサゾンによる脊椎靭帯由来細胞の
骨芽細胞系への分化誘導村田 秀則
(指導: 河合 伸也教授)

山口大学医学部整形外科学講座 宇部市南小串1-1-1 (〒755-8505)

Key words : 脊椎靭帯骨化, 骨芽細胞, 分化, デキサメサゾン

緒 言

脊椎靭帯骨化症 (Ossification of the spinal ligament: OSL) は脊椎靭帯が骨化と肥厚とを呈し, 脊髓や神経根などを圧迫した結果, 脊髓症, 神経根症などをきたす疾患で, その発症のメカニズムとしては, 遺伝的要因を背景にして, 様々な全身性あるいは局所性因子が作用した結果, 本来線維芽細胞へと分化すべき脊椎靭帯内の細胞が, 骨原性細胞へと分化することが推測されている¹⁾.

OSLの成因に関する基礎的研究として, OSL患者のヒト主要組織適合抗原 (HLA) ハプロタイプの調査^{2,3)}や靭帯組織内の骨形成因子 (bone morphogenetic protein: BMP) 受容体の局在⁴⁾など様々な方面からのアプローチがされているが, 脊椎靭帯組織内の細胞に対して基礎的研究を行った報告は少ない^{5,7)}.

糖質コルチコイドであるデキサメサゾンは未分化骨芽細胞系細胞の骨形成マーカーの発現を強力に促進し⁸⁾, また培養ヒト骨髄間質細胞においては, 骨形成マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) の発現や, 副甲状腺ホルモン反応性サイクリックアデノシン3', 5'-リン酸 (cAMP) の発現量, 細胞外基質へのミネラルの沈着をそれぞれ促進することが報告されている⁹⁾. これらデキサメサゾンの骨形成促進作用は様々な細胞培養系で認められ, デキサメサゾン単独で, あるいはビタミンD₃などの他の糖質コルチコイドとの相互作用で, 骨芽細胞系細

胞の分化を促進させるとの報告がなされている^{10,12)}.

今回, このデキサメサゾンのOSL成因への関与を検討するため, 脊椎靭帯由来細胞を培養し, デキサメサゾン存在下での骨芽細胞形質マーカーを測定して一定の知見を得たので報告する.

材料と方法

1. 材料

使用した材料の購入先は以下の如くである. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), TRIzol™ Reagent および RT-PCR用試薬: Gibco BRL, Life Technologies, Inc. (Rockville, MD米国). 培養容器: Assist Co.(東京). デキサメサゾン: Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO 米国). MTT アッセイキット: Chemicon International Inc. (Temecula, CA米国); アルカリフォスファターゼ活性測定用試薬: Sigma diagnostics (St. Louis, MO米国).

2. 細胞培養

非OSL症例15例の脊椎手術時に黄色靭帯を採取し, それぞれ周囲組織を十分に除去したのち細切して, 10% 胎児ウシ血清 (FCS) を含む培養液 (DMEM) 内で培養して脊椎靭帯由来細胞をoutgrowthさせた.

細胞がconfluentに達する前に, これらをトリプシンを用いて回収して新しいplateに移し, 同じ培養液中でデキサメサゾン存在下または非存在下でのアッセイに用いた. 添加したデキサメサゾンは粉末をエタノールに溶解保存したものを使用した.

平成12年11月12日受理

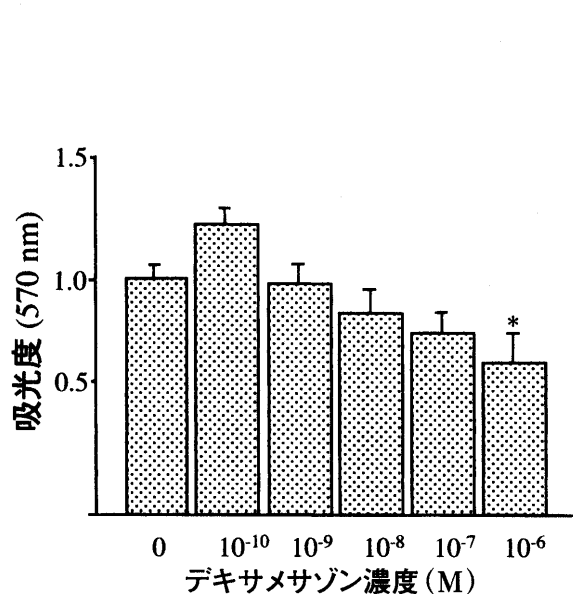


図1 デキサメサゾンの培養細胞増殖能に与える影響

靱帯由来細胞は 10^{-6} Mから 10^{-10} Mまでの濃度のデキサメサゾン存在下または非存在下で48時間培養し、MTT assayによって、各群の細胞増殖能を検討したところ、 10^{-6} Mのデキサメサゾン添加により、培養細胞の増殖能は有意に抑制された。* $p < 0.01$ vs control(0)

3. MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasolium bromide) assay

靱帯細胞の増殖能に対するデキサメサゾンの効果を検討するため、96-well plateに細胞を 10^2 /wellの密度で播種し、培養液中にコントロール液(0.1% エタノール)または 10^{-6} Mから 10^{-10} Mまでの濃度のデキサメサゾンを添加して48時間培養した。さらに各培養液中に $10 \mu\text{l}$ のMTTを加え、 37°C で4時間培養を続けたのち、 0.1 ml のisopropanol/HCl溶液を加えて570nmの吸光度を測定した¹³⁾。

4. アルカリフォスファターゼ活性の測定

靱帯由来細胞を 10 cm^2 のplateに播種し、培養液中に種々の濃度のデキサメサゾンを添加して、細胞がconfluentに達するまで培養したのち、細胞を搔爬して回収し、これを0.01% sodium dodecyl sulphate (SDS)を含むphosphate buffered saline (PBS)内で破碎してその上清中のALP活性をp-nitrophenylphosphate法にて測定した¹⁴⁾。また細胞破碎液中の蛋白濃度をBradford¹⁵⁾の方法に準じて測定し、得られたALP活

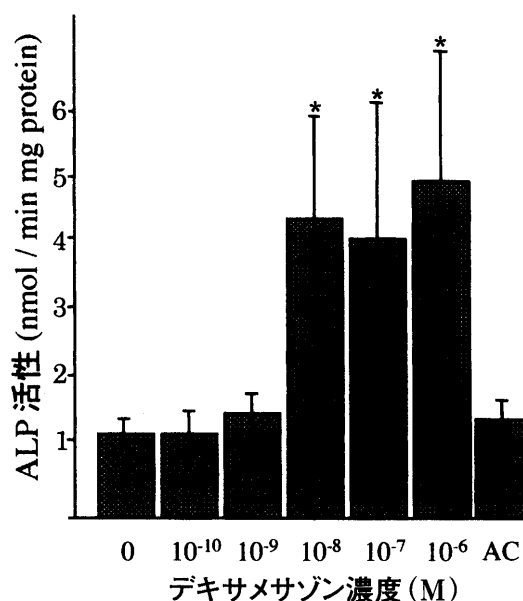


図2 デキサメサゾンによるALP活性の変化

靱帯由来細胞を培養初日から 10^{-6} Mから 10^{-10} Mまでの濃度のデキサメサゾンを含む培地内でconfluentに達するまで培養し、細胞内ALP活性を測定した。図中ACは、培養初期にはデキサメサゾンを含まない培地で培養し、細胞がconfluentに達したのちに 10^{-6} Mの濃度になるようにデキサメサゾンを添加した群を意味する。デキサメサゾン添加によるALP活性の上昇は、培養初日から 10^{-6} Mのデキサメサゾンを添加した群で有意となり、それ以上の高濃度で添加した群においては、 10^{-6} M添加群とは有意差は認められなかった。* $p < 0.01$ vs control (0)

性を各細胞破碎液中の蛋白濃度で除し、比活性で表した。

5. Northern blot analysis

培養靱帯細胞からTRIzol™ Reagentを用いてtotal RNAを調製し、 65°C で10分間変性させたのち、0.2% formaldehydeを含む1% agarose gel内で電気泳動を行い、これをnylon membraneにtransferした。このmembraneに吸着したRNAは 42°C で16時間prehybridizationを行ったのち、human ALP cDNA probe¹⁷⁾またはrat pro- $\alpha 1(\text{I})$ collagen cDNA probe¹⁸⁾を添加したhybridization溶液(5×SSC, 10×Denharts' solution, 10 mM Na_2PO_4 , 0.5% SDS, 50% formamide, 0.1 mg/ml ssDNA)中で 42°C 下16時間hybridizationを行った。各probeのlabelingにはFeinbergら¹⁹⁾の方法(random primers法)を採用した。Membrane上でhybridizeしたprobeの放射性活性はautoradiographyによって検出

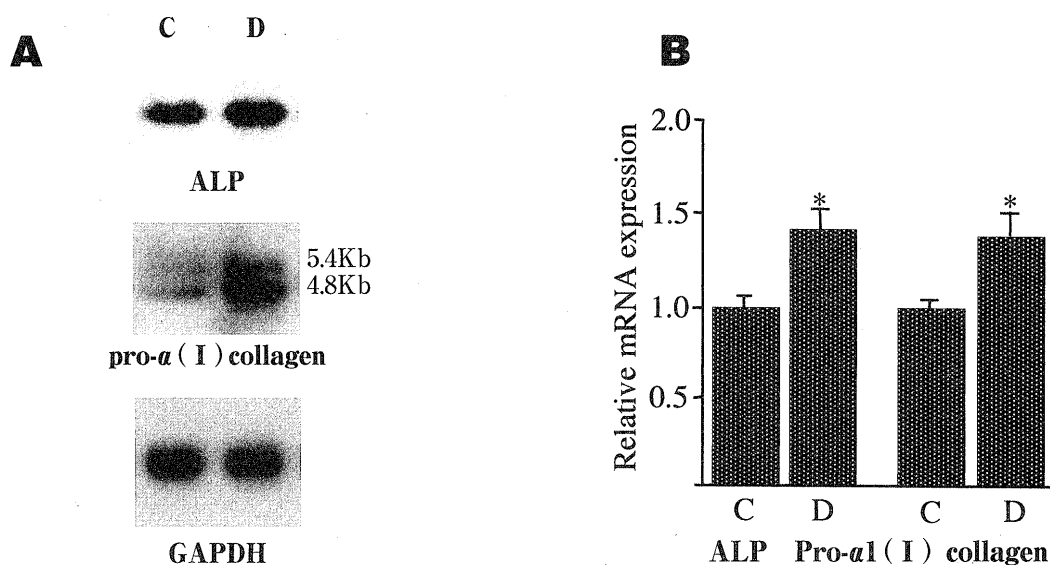


図3 骨形成マーカーのmRNA発現に対するデキサメサゾンの効果

A: 靭帯細胞をデキサメサゾン存在または非存在下で7-8日間培養し, total RNAを抽出したのちhuman ALP cDNA probeおよびrat pro- α (I) collagen cDNA probeを用いてNorthern blot analysisを行った。

B: NIH imageを用いてmRNA発現量の定量的解析を行った。Housekeeping geneであるglyceraldehyde-6-phosphate dehydrogenase (GAPDH)をinternal controlとしてmRNAの発現量をnormalizeした。 10^{-8} Mになるようにデキサメサゾンを添加した細胞群では, 骨形成マーカーであるALP, pro- α (I) collagenのいずれのmRNA発現量も増加した。C: control, D:デキサメサゾン (10^{-8} M) * $p < 0.05$ vs control

し, さらにNIH imageを用いて定量した。

考 察

結 果

培養脊椎靭帯細胞において, デキサメサゾンの添加は容量依存性に細胞増殖能を抑制すると思われる(図1), 有意な細胞増殖抑制はデキサメサゾンを 10^{-6} Mになるように添加した細胞群で認められた。

培養細胞のALP活性はデキサメサゾンの添加により上昇し, 10^{-8} M以上の濃度になるようにデキサメサゾンを添加した群で有意な増加を示した。培養細胞がconfluentに達したのちに 10^{-8} Mのデキサメサゾンを添加した群ではALP活性の増加は認められなかった(図2)。

Northern blot analysisを用いて培養靭帯細胞における骨芽細胞系細胞の形質マーカーであるALPとpro- α 1(I) collagenとのmRNAの発現を検討したところ, デキサメサゾンの添加によりいずれも有意な増加が認められ, ALP活性の変化とよく相関した(図3)。

靭帯組織を構成する細胞の骨芽細胞系への分化は, 靭帯の骨化を招来するものと推測され, 靭帯骨化症発症の主要な要因をなすものと考えられる。本報告ではデキサメサゾンはヒト脊椎靭帯由来細胞の骨形成マーカーの発現を促進し, 靭帯細胞を骨芽細胞へと分化させ得るという知見を得た。デキサメサゾンが強力な骨誘導能を持つことを考え合わせ, 靭帯骨化症発症の一因となり得ることが示唆された。

靭帯由来細胞の増殖抑制には比較的高濃度のデキサメサゾンを要したものの, MTT assayの結果は, 骨芽細胞の分化に先立って増殖が抑制されるという過去の報告²⁰⁾と一致する。

骨芽細胞へと分化した細胞は, 高いALP活性を示すことが知られており, 骨芽細胞系への分化のマーカーとして最もよく利用されている²¹⁾。この過去の報告に基づいて, 培養細胞内のALP活性を測定し, 靭帯細胞を骨芽細胞へと分化させるデキサメサゾンの至適濃度および添加の至適タイミングの決定を行

った。

デキサメサゾンの骨芽細胞誘導能については、これまで種々の培養細胞において報告がなされている。Leboyら²¹⁾はラットの骨髄間質細胞を用いて、デキサメサゾン添加によるosteopontinやALP、ビタミンD誘導性osteocalcinといった骨形質マーカーのmRNA発現量の増加を報告し、またKasugaiら²²⁾はデキサメサゾンがラットの骨髄細胞において骨の主要細胞外基質蛋白であるtype I collagenの発現を促進したと報告している。一方、デキサメサゾンなどの糖質コルチコイドが骨形成抑制的に作用することを示唆した報告もいくつか散見される^{23,25)}。これらの相違はデキサメサゾン添加時の濃度、添加のタイミング、作用時間、またはそれぞれの細胞の特性に由来すると考えられている²⁶⁾。さらに培養細胞を構成する細胞の多様性もデキサメサゾンに対する反応の相違に大きく影響するものと推測される。

デキサメサゾンを始めとする糖質コルチコイドが種々の細胞を骨芽細胞系細胞へと分化させる際の詳細な機序は今のところ不明である。培養骨芽細胞において、糖質コルチコイドはBMP(bone morphogenetic protein)-6の発現量を増加させ、同時にBMP-6 antisense oligonucleotideを添加することにより、デキサメサゾンによるbone nodule formationが阻害されたという報告がされ²⁷⁾、デキサメサゾンの作用機序における、BMP-6の重要な関与が示唆されている。今回培養靭帯細胞中のBMP-6について検討を加えていないが、靭帯細胞に対する、デキサメサゾンの効果はBMP-6などの内因性の因子によってなんらかの修飾を受けている可能性も推測される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました河合伸也教授に深謝致します。また本研究遂行に際し、直接御指導下さった整形外科科学講座 田中浩博士、生化学第二講座野間隆文博士、ならびに整形外科科学講座教室員各位に心より謝意を表します。

文 献

- 1) Pascal-Mousselard H, Smadja D, Cabre P, Raynaud M, Catonne Y. Ossification of the ligamenta flava with severe myelopathy in black patient. *Spine* 1998; **23**: 1607-1608.
- 2) Sakou T, Taketomi E, Matsunaga S, Yamaguchi M, Sonoda S, Yashiki S. Genetic study of ossification of the posterior longitudinal ligament in the cervical spine with human leukocyte antigen haplotype. *Spine* 1991; **16**: 1249-1252.
- 3) Koga H, Hayashi K, Taketomi E, Matsunaga S, Yashiki S, Fujiyoshi T, Sonoda S, Sakou T. Restriction fragment length polymorphism of genes of the $\alpha 2(XI)$ collagen, bone morphogenetic protein-2, alkaline phosphatase, and tumor necrotic factor- α among patients with ossification of posterior longitudinal ligament and controls from the Japanese population. *Spine* 1996; **21**: 469-473.
- 4) Yonemori K, Imamura T, Ishidou Y, Okano T, Matsunaga S, Yoshida H, Kato M, Sampath TK, Miyazono K, Dijke PT, Sakou T. Bone morphogenetic protein receptors and activin receptors are highly expressed in ossified ligament tissues of patients with ossification of the posterior longitudinal ligament. *Am J Pathol* 1997; **150**: 1335-1347.
- 5) Ishida Y, Kawai S. Effects of bone-seeking hormones on DNA synthesis, cyclic AMP level, and alkaline phosphatase activity in cultured cells from human posterior longitudinal ligament of the spine. *J Bone Miner Res* 1993; **8**: 1291-1300.
- 6) Kon T, Yamazaki M, Tagawa M, Goto S, Terakado A, Moriya H, Fujimura S. Bone morphogenetic protein-2 stimulates differentiation of cultured spinal ligament cells from patients with ossification of the posterior longitudinal ligament. *Calcif Tissue Int* 1997; **60**: 291-296.
- 7) Goto K, Yamazaki M, Tagawa M, Goto S, Kon T, Moriya H, Fujimura S. Involvement of insulin-like growth factor I in development of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Calcif Tissue Int* 1998; **62**: 158-165.

- 8) Rickard DJ, Sullivan TA, Shenker BJ, Leboy PS, Kazhdan I. Induction of rapid osteoblast differentiation of rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol* 1994; **161**: 218-228.
- 9) Cheng AL, Yang JW, Rifas L, Zhang SF, Avioli LV. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro : Induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 1994; **134**: 277-286.
- 10) Nishimoto SK, Salka C, Nimni ME. Retinoic acid and glucocorticoids enhance the effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on bone γ -carboxyglutamic acid protein synthesis by rat osteosarcoma cells. *J Bone Miner Res* 1987; **2**: 571-577.
- 11) Kim HT, Chen TL. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ interaction with dexamethasone and retinoic acid: effects on procollagen messenger ribonucleic acid levels in rat osteoblast-like cells. *Mol Endocrinol* 1989; **3**: 97-104.
- 12) Ng KW, Manji SS, Young MF, Findlay DM. Opposing influences of glucocorticoid and retinoic acid on transcriptional control in preosteoblasts. *Mol Endocrinol* 1989; **3**: 2079-2085.
- 13) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; **65**: 55-63.
- 14) Leboy PS, Vaias L, Uschmann B, Golub E, Adams SL, Pacifici M. Ascorbic acid induces alkaline phosphatase, type X collagen, and calcium deposition in cultured chick chondrocytes. *J Biol Chem* 1989; **264**: 17281-17286.
- 15) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248-254.
- 16) Howlett CR, Cav'e J, Williamson M, Farmer J, Ali SY, Bab I, Owen ME. Mineralization in in vitro cultures of rabbit marrow stromal cells. *Clin Orthop* 1986; **213**: 251-263.
- 17) Weiss MJ, Henthorn PS, Lafferty MA, Slaughter C, Raducha M, Harris H. Isolation and characterization of a cDNA encoding a human bone/liver/kidney-type alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1986; **83**: 7182-7186.
- 18) Genovese C, Rowe D, Kream B. Construction of DNA sequences complementary to rat $\alpha 1$ and $\alpha 2$ collagen mRNA and their use in studying the regulation of type I collagen synthesis by 1,25-dihydroxy D. *Biochemistry* 1984; **23**: 6210-6216.
- 19) Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983; **132**: 6-13.
- 20) Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein G. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 1990; **143**: 420-430.
- 21) Leboy PH, Beresford JN, Devlin C, Owen ME. Dexamethasone induction of osteoblast mRNAs in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol* 1991; **146**: 370-378.
- 22) Kasugai S, Todescan R, Nagata T, Yao KL, Butler WT, Sodek J. Expression of bone matrix proteins associated with mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in vitro: Inductive effects of dexamethasone on the osteoblastic phenotype. *J Cell Physiol* 1991; **147**: 111-120.
- 23) Wong GL. Basal activities and hormone responsiveness of osteoblast-like and osteoclast-like bone cells are regulated by glucocorticoids. *J Biol Chem* 1979; **254**: 6337-6340.
- 24) Peck WA, Brandt J, Miller I. Hydrocortisone-induced inhibition of protein synthesis and asidine incorporation in isolated bone cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1967; **57**: 1599-1606.
- 25) Chen TL, Aronow L, Feldman D. Glucocorticoid receptors and inhibition of bone cell growth in primary culture. *Endocrinology* 1977; **100**: 619-628.

- 26) Wong MM, Rao LG, Ly H, Hamilton L, Tong J, Sturtridge W, McBroom R, Aubin JE, Murray TM. Long-term effects of physiologic concentrations of dexamethasone on human bone-derived cells. *J Bone Miner Res* 1990; **5**: 803-813.
- 27) Boden SD, Hair G, Titus L, Racine M, Mccuaig K, Wozney JM, Nanes MS. Glucocorticoid-induced differentiation of fetal rat calvarial osteoblast is mediated by bone morphogenetic protein-6. *Endocrinology* 1997; **138**: 2820-2828.

Osteogenic Differentiation of the Spinal Ligament Derived Cells by Dexamethasone

Hidenori MURATA

Department of Orthopedic Surgery.

Yamaguchi University School of Medicine, 1-1-1, Minami-Kogushi, Ube,

Yamaguchi 755-8505, Japan

SUMMARY

Given the pathogenesis of ossification of the spinal ligament has been shown to be associated with osteogenic differentiation of spinal ligament cells, cells derived from human yellow ligament of the spine were investigated for their ability to develop osteoblast phenotypic markers in the presence of dexamethasone. Growth of the ligament cells was suppressed by the addition of dexamethasone at a high concentration (10^6 M). Dexamethasone increased alkaline phosphatase activity and mRNA levels of alkaline phosphatase and pro- α (I) collagen, suggesting that human spinal ligament consists of a heterogeneous population of cells including immature multipotential cells as well as committed fibroblasts, and that dexamethasone has a possible involvement in the osteoblastic differentiation of the former cells.