

軟骨細胞株 ATDC5 を用いた関節軟骨維持成分 および骨成長・修復成分のスクリーニング系

中谷祥恵*1 真野 博*2 古旗賢二*3

*1 城西大学 薬学部 薬科学科 助教

*2 城西大学 薬学部 医療栄養学科 教授

*3 城西大学 薬学部 薬科学科 教授

軟骨細胞株 ATDC5 を用いた関節軟骨維持成分 および骨成長・修復成分のスクリーニング系

中谷祥恵, 真野 博, 古旗賢二
Sachie Nakatani, Hiroshi Mano, Kenji Kobata

1 原理

長管骨は手足を構成している円筒状の骨で、長管骨と長管骨の接続面は関節軟骨で覆われている。これら長管骨および関節軟骨は共に内軟骨性骨化の過程を経て形成される。内軟骨性骨化では、軟骨細胞が増殖・凝集し、骨の鋳型を形成する。軟骨細胞の凝集後、細胞は、成熟軟骨、肥大化軟骨、石灰化軟骨へと分化する。その後、石灰化軟骨に血管が侵入し、骨芽細胞と破骨細胞によって骨組織に置換される。内軟骨性骨化は胎児期における長管骨形成のほか、成長板軟骨における骨伸長および長管骨骨折の回復時にも生じる。このように、軟骨細胞の増殖・分化・石灰化は骨形成にとっても重要な役割を担っている。

一方、関節軟骨では、軟骨細胞が増殖後、分化し、主に成熟軟骨になった段階で分化を停止する。関節軟骨の特徴である弾性や圧縮抵抗性は、成熟軟骨細胞が軟骨特有の細胞外基質を産生することで担われている。軟骨細胞の代表的な細胞外基質として、II型コラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸などがある。軟骨細胞外では、II型コラーゲンおよびエラスチンなどの弾性繊維の間を、ヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸など抱水性を有するグリコサミノグリカン (GAG) が充填されていることで軟骨機能が維持されている。したがって、関節軟骨の軟骨細胞は、成熟軟骨細胞の段階で軟骨分化が維持され、肥大化軟骨細胞や石灰化軟骨の割合が増加しないことが重要である。

前駆軟骨細胞 ATDC5 は、渥美ら¹⁾がマウス EC 細胞から単離した細胞株で、内軟骨性骨化過程を再現できる培養細胞として広く利用されている。培養する過程で、軟骨細胞が増殖後、凝集し、成熟軟骨細胞および肥大化軟骨細胞へと分化後、石灰化軟骨となってノジュールを形成する(図1)。成熟軟骨細胞まで分化した細胞は、II型コラーゲン、エラスチン、GAGを産生する。また、石灰化軟骨への準備段階として、軟骨細胞は分化初期から少しずつアルカリホスファターゼ (ALP) を産生している。ALP はピロリン酸を加水分解して2分子の無機リン酸を生成・供

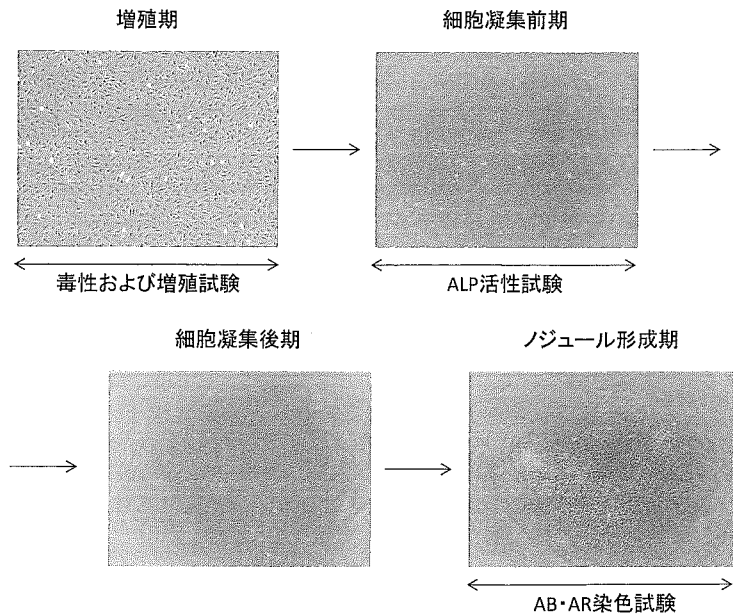


図1 前駆軟骨細胞株 ATDC5 の増殖期からノジュール形成期までの細胞形態

給することで、軟骨細胞の石灰化に深く関与している。ALP 活性は増殖軟骨細胞では低いですが、肥大化軟骨細胞では最も高くなることが知られている。

我々は ATDC5 を用いて、関節軟骨の維持に重要な成分および骨伸長や骨修復に有用な成分を一度にスクリーニングできる系を確立^{2,3)}したので、本稿で紹介する。

2 準備

- ・ ATDC5 (RIKEN BRC)
- ・ Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 (DMEM/F12) medium (Life Technologies Japan)
- ・ 牛胎児血清 (fetal bovine serum : FBS)
- ・ ペニシリン (明治製菓)
- ・ ストレプトマイシン (明治製菓)
- ・ Dulbecco's phosphate-buffered saline(-) (PBS(-)) (日本製薬)
- ・ 0.25% Trypsin-EDTA solution
- ・ インスリン-トランスフェリン-亜セレン酸ナトリウム (ITS) 添加剤 (ロシュ・ダイアグノスティックス)
- ・ WST-1 reagent (ロシュ・ダイアグノスティックス)

- ・ホルマリン
- ・2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP) (ナカライテスク)
- ・Naphthol AS-BI phosphate (Sigma-Aldrich)
- ・Fast red violet LB salt (Sigma-Aldrich)
- ・Alcian blue solution (武藤化学)
- ・酢酸
- ・塩酸
- ・Alizarin red solution (Sigma-Aldrich)

3 試験操作

(1) 細胞培養方法

- ① ATDC5はDMEM/F12に5% FBSおよび抗生物質(50 U/mL ペニシリン, 50 mg/mL ストレプトマイシン)を添加した培地中で、37°C, 5% CO₂条件下で培養を行う。
- ② 継代はPBS(-)で洗浄後、0.25% Trypsin-EDTA solutionを用いて細胞を浮遊させた後、約 $2\sim 2.5 \times 10^3$ cells/cm²の密度で播種を行う。継代は約2~3日ごと、約90%コンフルエントの段階で行う。

(2) 細胞毒性試験

- ① ATDC5を96 well plateに 5.0×10^3 cells/well播種する。
- ② 24時間後、接着細胞の割合が約100%コンフルエントの状態サンプル含有培地へ交換する。
- ③ さらに24時間培養後、10% WST-1 試薬を含んだ培地に培地交換し、37°Cで4時間インキュベート後、440 nmの吸光度を測定する。

(3) 細胞増殖試験

- ① ATDC5を96 well plateに 2.0×10^3 cells/well播種する。
- ② 24時間後、接着細胞の割合が約60%の状態サンプル含有培地へ交換する。
- ③ さらに48~72時間培養後(最も増殖したサンプルのプレートが約100%コンフルエントになった時点)、10% WST-1 試薬を含んだ培地に培地交換し、37°Cで4時間インキュベート後、440 nmの吸光度を測定する。

(4) アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性染色

- ① ATDC5を96 well plateに 5.0×10^3 cells/well播種する。

- ② 24時間後、接着細胞の割合が約100%コンフルエントの状態サンプル含有培地へ交換する。
- ③ 2日後に培地交換を行い、サンプル添加から4日間培養した後、100 μ Lの20%ホルマリン溶液で20分間室温で固定する。
- ④ 固定後の細胞は2回水洗した後、水に浸漬し、室温で15分間静置する。
- ⑤ 水を除去後、100 μ LのALP染色液を入れ、37 $^{\circ}$ Cで20分間静置する。

ALP染色液は、0.05 M AMP緩衝液 (pH 9.8) に、10 mM naphthol AS-BI phosphate および1 mM Fast red violet LB salt を溶解させたものを用いる。0.05 M AMP緩衝液は冷蔵保存 (約3か月保存可) したものを室温に戻してから用いる。ALP染色液は用事調整する。
- ⑥ 染色後、染色液を取り除き、5回以上水洗する。

(5) アルシアンブルー (AB) 染色

AB染色は軟骨細胞外基質のGAGを青色に染色する手法である。染色液のpHを調節することで、総GAG (ヒアルロン酸およびコンドロイチン硫酸等) と硫酸基特異的GAG (コンドロイチン硫酸およびケラタン硫酸等) を染め分けることができる。

- ① ATDC5を24 well plateに 2.0×10^4 cells/well播種する。
- ② 24時間後、サンプル含有培地に交換する。
- ③ 播種から5日後、ITS含有培地 (終濃度 5 μ g/mL インスリン, 5 μ g/mL トランスフェリン, 5 ng/mL 亜セレン酸ナトリウム) に交換する。

ITS添加前は2~3日ごと、ITS添加後は1~2日ごとに培地交換を行う。
- ④ 播種から約15日後 (ノジュール形成確認後)、細胞を20%ホルマリン溶液を用いて室温で20分間固定する。
- ⑤ 3回水洗後、以下のいずれかの処理を行う。

総GAGの染色

- ⑥ 3%酢酸に5分浸漬後、AB染色液 (pH 2.5) で60分間室温で静置する。
- ⑦ 静置後、3%酢酸で5回 (染色液の色が酢酸溶液中に溶出しなくなるまで) 洗浄する。
- ⑧ 3回水洗後、顕微鏡で観察する。

硫酸基特異的GAGの染色

- ⑥ 0.1 M 塩酸に5分浸漬後、AB染色液 (pH 1.0) で60分間室温で静置する。
- ⑦ 静置後、0.1 M 塩で約5回 (染色液の色が酢酸溶液中に溶出しなくなるまで) 洗浄する。
- ⑧ 3回水洗後、顕微鏡で観察する。

(6) アリザリンレッド (AR) 染色

AR染色は軟骨の石灰化部分を赤色に染色する手法である。

- ① ATDC5 を 24 well plate に 2.0×10^4 cells/well 播種する。
- ② 24 時間後，サンプル含有培地に交換する。
- ③ 播種から 5 日後，ITS 含有培地（終濃度 $5 \mu\text{g/mL}$ インスリン， $5 \mu\text{g/mL}$ トランスフェリン， 5 ng/mL 亜セレン酸ナトリウム）に交換する。
ITS 添加前は 2~3 日ごと，ITS 添加後は 1~2 日ごとに培地交換を行う。
- ④ 播種から約 15 日後（ノジュール形成確認後），細胞を 20% ホルマリン溶液を用いて室温で 20 分間固定する。
- ⑤ 3 回水洗後，1% AR 染色液（pH 6.3）を添加し，室温で 60 分静置する。
- ⑥ 染色後，約 5 回（染色液の溶出がなくなるまで）水洗する。

4 データ処理・評価

評価方法を図 2 にまとめた。まず，細胞毒性試験を用いて，サンプル添加濃度を検討する。低濃度で毒性が生じた場合は，サンプル候補から除外する。次に，細胞増殖試験，ALP 染色，AB 染色，AR 染色を順次行う。細胞増殖が促進された成分で，ALP 活性および AR 染色が促進された場合は，強力な骨伸長および修復補助成分候補となりうる。一方，細胞増殖が促進され，ALP および AR 染色が変化なしもしくは抑制され，AB 染色が促進された成分は，関節軟骨維持成分候補となる。

細胞増殖を促進させなかった成分も，軟骨細胞の増殖には影響を与えないが，軟骨分化を調節することが多々あるため，少なくとも ALP 活性試験までは実施する。上記と同様に，ALP および AR 染色を促進させた成分は，軟骨細胞数に影響を与えないにも関わらず，軟骨の分化調節を

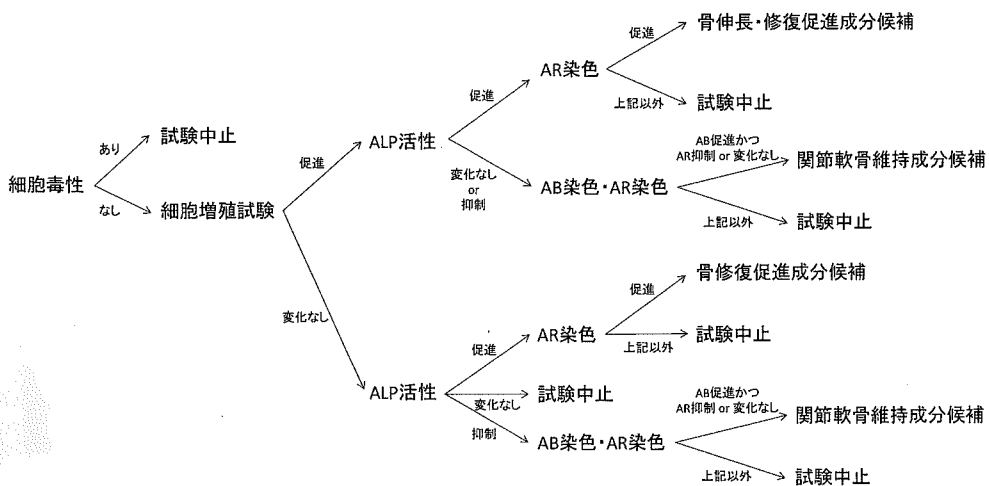


図 2 前駆軟骨細胞株 ATDC5 を用いたスクリーニング評価法フローチャート

経て石灰化を促進させるため、骨修復促進補助成分候補となりうる。一方、軟骨細胞の増殖に影響を与えず、AB染色を促進させ、かつALP活性およびAR染色を抑制した成分は、関節軟骨の石灰化を抑制し、GAG産生を促進することから、強力な関節軟骨維持成分候補となりうる。

本スクリーニング系でスクリーニングされた成分は、その後、RT-PCR法やELISA法を用いてALP活性およびGAG産生能調節作用を検証する。

5 試験のポイント, その他注意点

- ・ ATDC5はコンタクトインヒションが生じない接着細胞で、細胞同士が凝集後、重なりあって増殖する。筆者が所属する研究室では、ATDC5の接着面積率が100%コンフルエントになった状態で継代を行うと、細胞の形質転換が起こり、ALP染色が易陽性となるため、サンプルの影響が確認できにくくなることを経験している。一方、細胞密度が低い状態で継代すると、細胞の増殖効率が著しく低下し、細胞の形質転換の原因となる。したがって、継代は細胞をディッシュ内に均等に播種し、適切なタイミングで行うことが重要である。
- ・ ATDC5のノジュール形成までの培養期間は、FBSのメーカーおよびロットで前後するため、目視でノジュールの形成が確認できるまで培養を継続する(図3)。
- ・ サンプルの作用点がInsulin-like growth factorなど添加剤として用いているITSと類似の作用点を介していることが疑われる場合は、ITSを添加せずに培養を行う。この場合、ノジュール形成までに約28~35日かかる。また、細胞がディッシュから剥がれやすくなるため、慎重に培地交換をする。

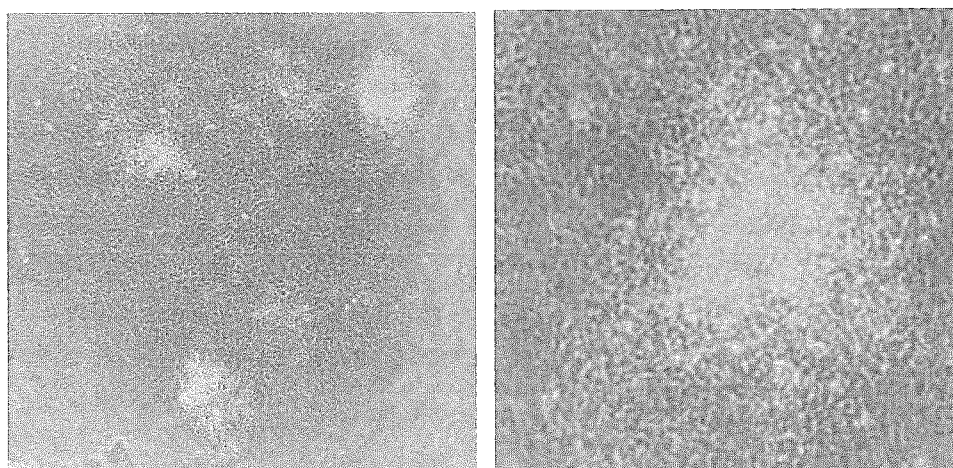


図3 前駆軟骨細胞株ATDC5のディッシュ上でのノジュール形成写真(左)とノジュール拡大写真(右)

文 献

- 1) T. Atsumi *et al.*, *Cell Differ. Dev.*, **30**, 109 (1990)
- 2) S. Nakatani *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 433 (2007)
- 3) S. Nakatani *et al.*, *Osteoarthr. Cartil.*, **16**, 1620 (2009)