

変えたり、利尿作用を有するペプチドを合成したり遺伝子発現を変換させ、新たな筋線維が合成されると同時に、既存の筋線維構成分子のアイソフォームも変化する¹⁵⁾。

細胞の伸展刺激を感知する受容体は複数あると考えられているが、そのすべてが特定されているわけではない。現在、候補として考えられているのは、イオンチャネルとインテグリンである。

以下に、心肥大に関与すると考えられている受容体やシグナル伝達系について述べる。

1.1 インテグリン

メカニカルストレスを感知する受容体としては、インテグリンが非常に重要な役割を担っていると考えられている。

インテグリンは、すべての細胞の細胞膜に存在し、 α サブユニットと β サブユニットが非共有結合した二量体の膜貫通型の細胞接着受容体である。細胞増殖、分化、細胞死などに関与し、細胞外基質と直接接合し、細胞内で細胞外骨格と結合している¹⁶⁾。

細胞外部からの刺激をインテグリンは種々の化学的シグナルに変換し、複数のシグナル分子を介して最終的に遺伝子の発現を誘導して、外部のストレスに応答する。さらに、外部からの刺激により細胞内部に影響を与えるだけでなく、逆に細胞内部からもインテグリンの活性は調節され、細胞の接着性が制御されている¹⁶⁾。

細胞と基質の接着部分には、インテグリンが凝集して接着斑を形成する。メカニカルストレスを感知したインテグリンは、接着斑に存在するFAKやSrcファミリーなどのチロシンキナーゼを活性化する¹⁸⁻²⁰⁾。メカニカルストレスはインテグリンにより細胞内シグナルに変換され、細胞骨格に伝達される(図2)^{18,21)}。

次に、心肥大に関与するシグナル伝達系の比較的上位に位置する低分子量GタンパクであるRhoファミリーと、その下流に位置するMAPK系について以下に述べる(図3)^{22,23)}。

1.2 低分子量Gタンパク Rhoファミリー

心筋は増加した負荷に対応して細胞の容積を増やし、さらに筋線維を合成して筋線維の量を増やすことで負荷に対応する。この筋線維の発現・形成の制御には低分子量Gタンパク Rhoファミリーが関与している。

低分子量Gタンパクは、複数の上流のシグナル分子から刺激を受けて活性化し、複数の下流分子の活性を調節する。Rhoファミリーは、相同性を有するRho, Rac, Cdc42のサブファミリーからなり、さらに各サブファミリーには複数のアイソフォームが存在する¹⁵⁾。

青木らは、以下のようなモデルを考えている(図4)¹⁵⁾。Rhoファミリーは、その下流のMAPキナーゼおよび転写因子GATA4を介して、心臓にかかる負荷を減らすための心房性ナトリウム利尿因子

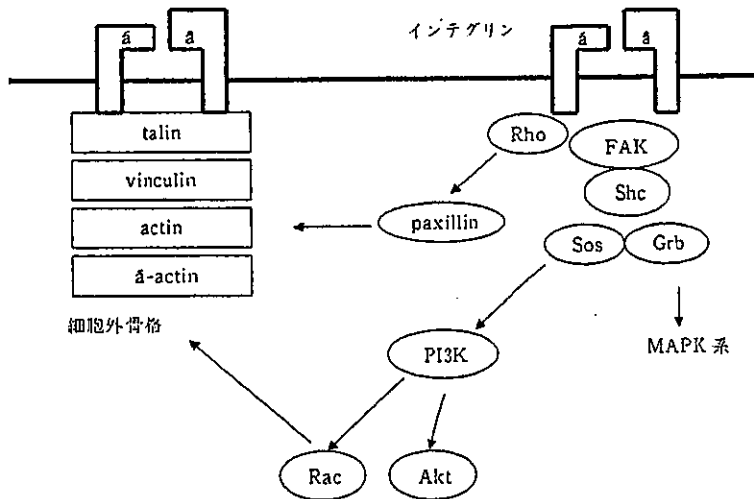


図2 伸展刺激による細胞内シグナリング

(永井敏雄: 医学のあゆみ, Vol. 201, No. 7, pp. 435-487, 図1, 2002およびR. S. Ross, et al., 2001²¹⁾の図を改変)

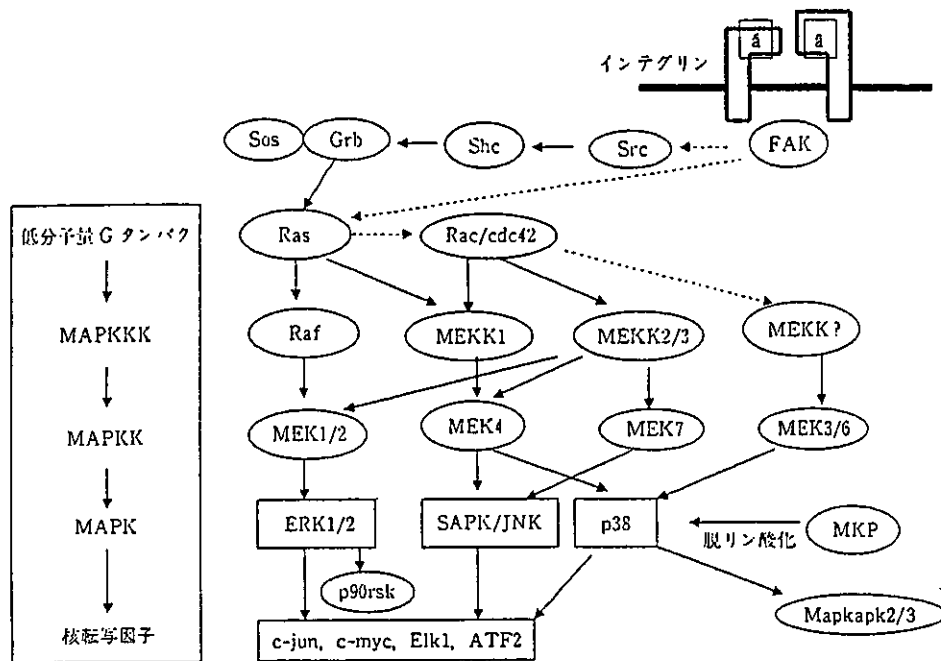


図3 インテグリンを介した細胞内情報伝達機構

(長谷川洋：医学のあゆみ, Vol. 201, No. 7, pp. 455-458, 図1, 2002およびC. Ruw Hof, et al., 2000²³⁾の図を改変)

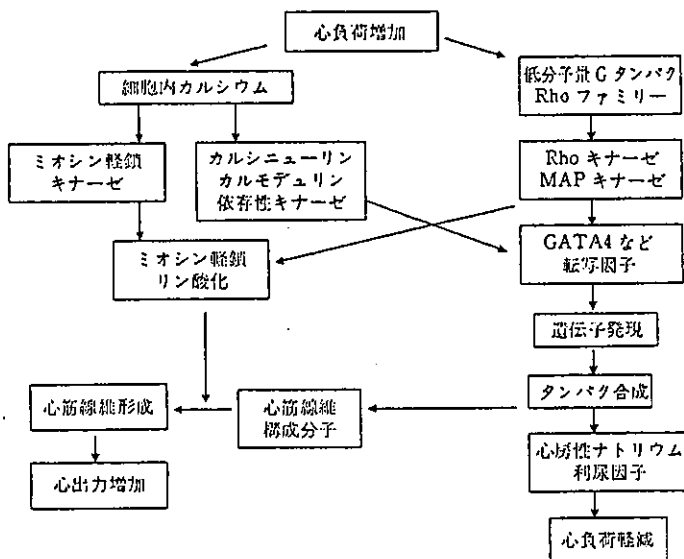


図4 伸展刺激による細胞内シグナリング

(青木浩樹：医学のあゆみ, Vol. 201, No.7, pp. 467-471, 図5, 2002を引用)

(ANF)の発現制御を行っていると考えられている。さらにミオシン軽鎖キナーゼを活性化して、新たな心筋線維形成を促進し、心筋の出力を増加させる。この両者の制御においてRhoファミリーはカルシニューリン、カルモデュリン依存性キナーゼ、ミオシン軽鎖キナーゼと相互作用していると考えられる

(図4)¹⁵⁾。

1.3 MAPKファミリー

心肥大のシグナル伝達は、MAPK (mitogen-activated protein kinase)系およびJAK/STAT (janus kinase/signal transducers and activators

of transcription) 系が担っていることが知られている²²⁾。ここでは、インテグリンを介するシグナル伝達系の下流に位置する MAPK ファミリーについて述べる。

低分子量 G タンパクや他の分子の下流に、MAPKKK が、その下流に MAPKK、さらに下流に MAPK が存在している (図 3)^{22,23)}。MAPK はセリン/スレオニンキナーゼである。MAPK ファミリー

は、細胞内シグナル伝達において不可欠のものであり、3段階のリン酸化カスケードを形成している²²⁾。

MAPK には ① ERK (extracellular signal-regulated kinase), ② SAPK (stress-activated protein kinase)/JNK (c-Jun N terminal kinase), ③ p38, ④ ERK/BMK1 (big MAP kinase 1) の4群が存在し、通常不活性型で存在するが、刺激に responding して活性型に変化する。この中で心肥大に関与するのは、ERK, JNK, p38 の3つである。MAPKKK の上流の制御や、JAK/STAT などの他の伝達系との相互作用については完全には理解されていない²²⁾。

また、メカニカルストレスは心筋細胞においてイオンチャネルやインテグリンを介して細胞内のシグナルを活性化し、さらに血管作動因子の遺伝子発現を活性化することにより、アンジオテンシノーゲン、アンジオテンシン変換酵素などの遺伝子発現を促進する。その結果、アンジオテンシン II, エンドセリンの産生が増加し、心肥大を促進すると考えられている (図 5)¹⁷⁾。

1.4 伸展活性化イオンチャネル

心筋細胞には、細胞膜の伸展に伴って開口し、非特異的に陽イオンおよび陰イオンを透過させる複数のイオンチャネルの存在が報告されてきた¹⁸⁾。この

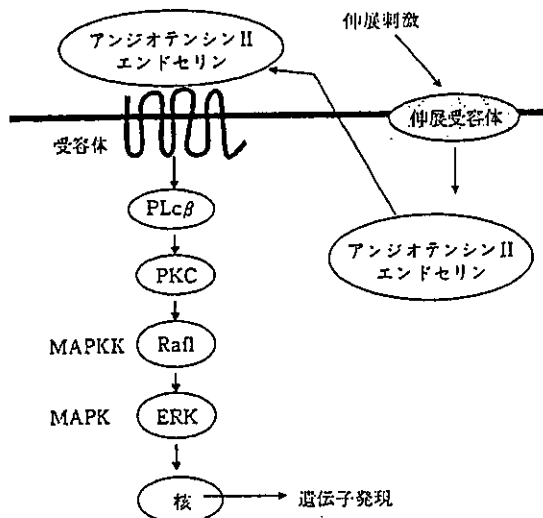


図 5 伸展刺激に誘導される液性因子による細胞内情報伝達 (久藤純代, 他: 医学のあゆみ, Vol. 192, No. 13, pp. 1207-1210, 図 1, 2000 を引用)

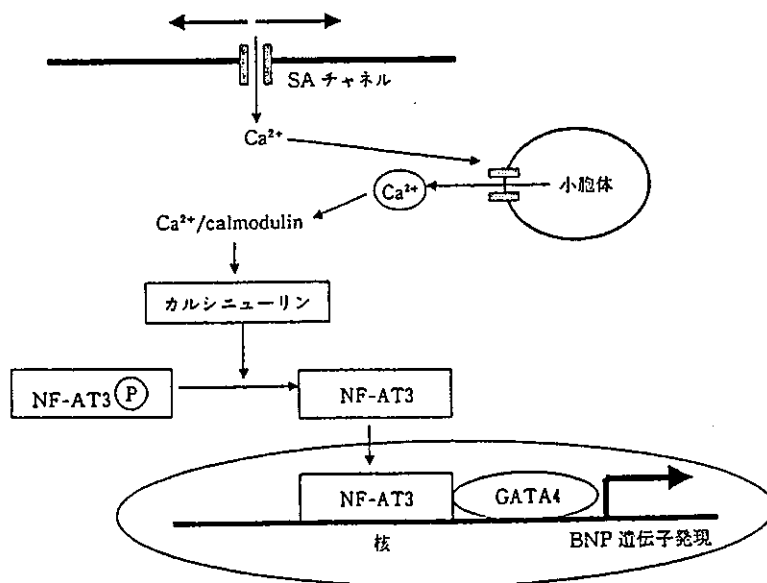


図 6 カルシニューリンを介した心肥大形成の情報伝達系 (久藤純代, 他: 医学のあゆみ, Vol. 192, No. 13, pp. 1207-1210, 図 3, 2000 を引用)

伸展活性化イオンチャネルが、伸展刺激を感知して心肥大の形成に関わっていると考えられていた。そして近年、このイオンチャネルによるシグナル伝達経路上に存在するカルシニューリンが、心肥大の誘導に重要な役割を担っていると考えられるようになった²⁴⁾。カルシニューリンはCa²⁺によって活性化される脱リン酸化酵素である。そのモデルを以下に紹介する。

細胞膜に伸展刺激が作用した結果、細胞膜に存在するCa²⁺チャネルが開閉し、細胞内にCa²⁺が流入する。流入したCa²⁺がさらに小胞体からCa²⁺を放出させ、細胞内のCa²⁺結合タンパク質カルモデュリンが活性化され、次いで脱リン酸化酵素であるカルシニューリンが活性化される。活性型カルシニューリンは転写因子NF-AT3 (nuclear factor of activated T cell 3) と結合して、NF-AT3を脱リン酸化して核内に移行させる。核内に移行したNF-AT3は、転写因子GATA4 (心臓の発生・分化において重要であり、恒常的に発現している) と協調して脳型ナトリウム利尿ペプチド (BNP) 遺伝子を制御し、心肥大を形成させる (図6)^{17,25)}。

以上の結果から、シグナル伝達系において重要な役割を担うカルシニューリンを抑制することで、心筋肥大が抑制され、心不全を防ぐことができると考

えられている^{17,25)}。

2. 血管内皮細胞のシェアストレスに対する細胞応答

血管内皮細胞の機能はホルモン、サイトカインなどにより制御されているとされてきたが、さらにメカニカルストレスも血管内皮細胞の機能を制御していることが明らかとなってきた。血流にさらされている血管内皮細胞は、血流が引き起こすシェアストレスの負荷を常に受けている。その血流のシェアストレスを鋭敏に感知して、その変化に応じた細胞応答を行うことで、血管および循環器全体の恒常性を維持している¹⁶⁾。

シェアストレスを感知する受容体についても、現在は完全な理解は得られていないが、その候補としては細胞膜に存在するイオンチャネルや、接着分子であるインテグリンおよびPECAM-1や細胞骨格が考えられている。インテグリンについては心肥大とともに述べたのでここでは省略する。

2.1 PECAM-1

PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD31) は分子量130 kDaの膜タンパ

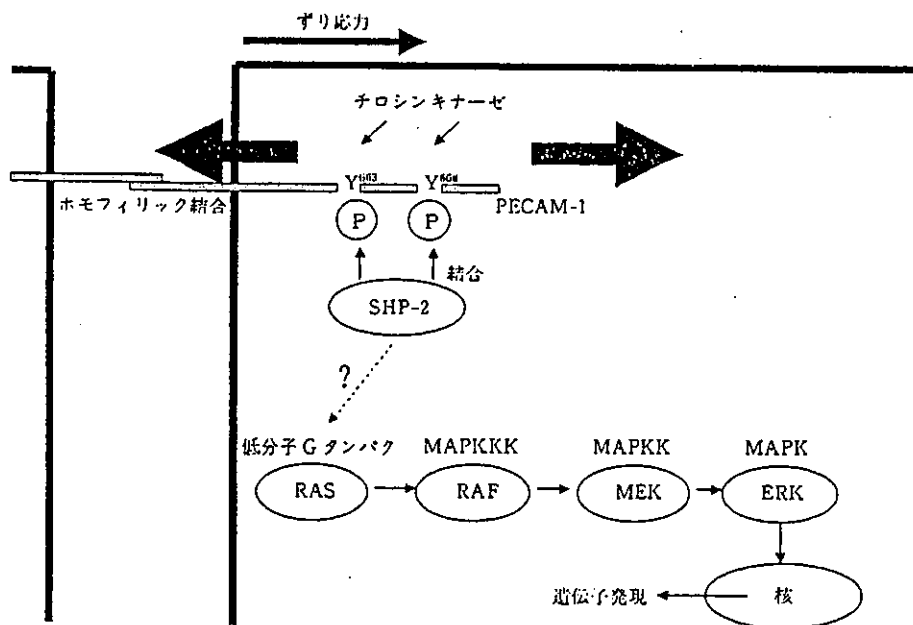


図7 内皮細胞における PECAM-1 を介した細胞内情報伝達
(増田道隆, 他: 医学のあゆみ, Vol. 192, No. 13, pp. 1228, 図1, 2000 を引用)

ク質である。複数の血球細胞に存在するが、とくに血管内皮細胞で発現量が高い²⁶⁾。PECAM-1は隣接する細胞間を結合させているが、情報伝達分子としても機能し、リン酸化により制御されていると考えられている。

増田らは、その制御機構は以下のようなものであると推定している²⁷⁾。血管内皮細胞にシェアストレスが作用し、PECAM-1に張力がかかるとPECAM-1の立体構造が変化する。この構造の変化がPECAM-1のC末端側に存在するチロシン残基のリン酸化を引き起こし、さらにSHP-2が結合する^{27,28)}。SHP-2の脱リン酸化酵素活性の賦活化により、低分子GタンパクであるRASが活性化される。次いでRASの下流に存在する3段階のMAPKカスケードシステムにシグナルが伝わる(図7)²⁷⁾。

2.2 イオンチャネルを介したシェアストレス感知機構

安藤らは、血管内皮細胞に流れ刺激を加えると、 Ca^{2+} の濃度が上昇することから、流れ刺激に伴うシェアストレスを感知する機構に、細胞内への Ca^{2+} の流入が関与すると考えている^{29,30)}。さらに、細胞外に Ca^{2+} が存在しないと流れ刺激に対する反応が起こらないことから、細胞外 Ca^{2+} の細胞内への流入が不可欠であると考えられている^{16,29)}。

ATPによって機能する陽イオンチャネルのプリノセプターP2XのサブタイプであるP2X4が、ATP存在下の流れ刺激で引き起こされるカルシウムイオン流入反応に関わる分子として特定されている^{16,31,32)}。P2X4が欠損するとシェアストレスが作用しても細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が発生しなくなり、シェアストレスに無反応の細胞にP2X4を発現させると細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が発生することが確認されている³¹⁾。

また、内皮細胞に流れ刺激をかけてシェアストレスを作用させることで、 K^+ チャネルが開口して細胞膜の過分極が発生し、 Ca^{2+} の細胞内への流入を引き起こすという現象も報告されている³¹⁾。

第5節 骨組織における機械刺激に対する細胞応答

メカニカルストレスが骨組織に作用すると、骨組織は負荷に対して適切な骨形成を行うことが知られている。その作用機序はいまだ明らかにはなっていない。メカニカルストレスが骨組織にかかると骨芽細胞が骨形成を促し、破骨細胞による骨吸収を抑制することで骨量が増加する³³⁾。

骨には軟骨細胞、骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞などが存在し、増殖因子やサイトカインに反応して、各細胞の機能を発揮する。骨芽細胞は骨形成を、破骨細胞は骨吸収を担っている。

オステオポンチンは骨基質中に存在する分泌性のリン酸化糖タンパク質で、細胞間伝達物質としても機能し、さらに細胞の接着にも関わり、骨に対して多様な作用を示すと考えられている。オステオポンチンは骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞において発現しているが³³⁾、その発現はメカニカルストレスにより影響を受ける。オステオポンチンは、骨芽細胞におけるメカニカルストレスを感知するシグナル伝達機構を担う因子の一つとして機能していると考えられ、骨形成がメカニカルストレスにより維持されることに関与していると考えられている³⁴⁾。

オステオポンチンは、細胞膜に存在するインテグリンを介して骨芽細胞を刺激すると考えられているが、骨の再構成において具体的にどのような影響及ぼしているかはいまだ明らかにされていない³⁵⁾。Duncanらは以下のようなモデルを提唱している³⁶⁾。

骨細管や骨小腔には細胞外液が存在しているが、メカニカルストレスが骨に作用すると、その細胞外液に流れが発生する。この細胞外液の流れ刺激が、骨細胞や骨芽細胞に複数の物質を分泌させる。それらの物質により、骨芽細胞はI型コラーゲンやオステオポンチンをさらに放出する(図8)^{33,36)}。メカニカルストレスが作用してからオステオポンチンの発現が増加するまで時間がかかることから、メカニカルストレスが直接オステオポンチンの発現を制御している可能性は低く、メカニカルストレスの作用により迅速に発現が促進される物質が、オステオポンチンを増加させると考えられている³³⁾。すなわち、

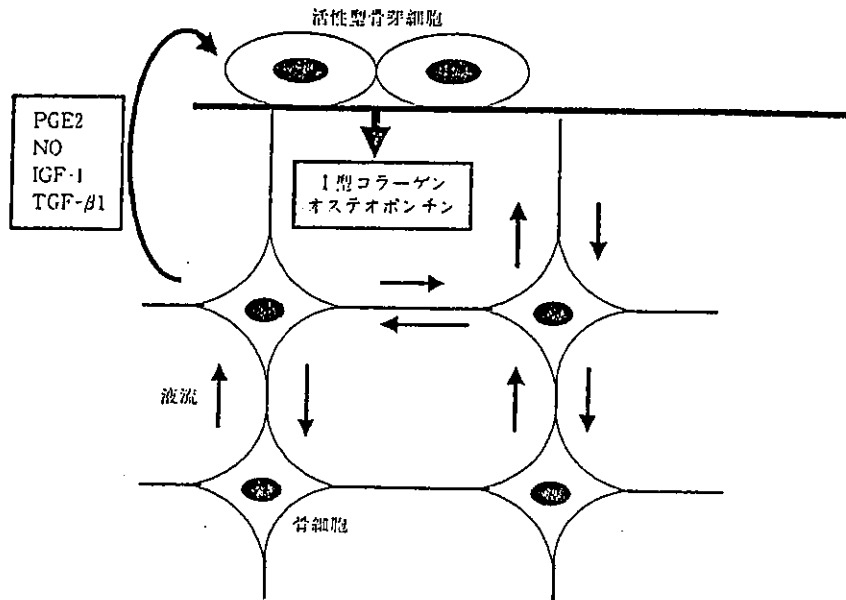


図8 骨におけるメカニカルストレスの働き
(大澤一郎：医学のあゆみ，Vol. 192，No. 13，pp. 1231-1232，図1，2000を改変)

メカニカルストレスは間接的にオステオポンチンの産生を制御していることになる。オステオポンチンの発現を促す物質は、プロスタグランジン (PG) E_2 や一酸化窒素 (NO)，インスリン様増殖因子 (IGF)-1，トランスフォーミング増殖因子 (TGF)- β 1 などだと考えられている^{33,36)}。

謝辞：本報告は厚生労働省厚生労働科学研究費補助金萌芽的先端医療技術推進研究事業によりまとめたものである。

参考・引用文献

- 1) Y. C. Fung: "Where are the sources of fresh water to irrigate our field? — Message from Prof. Y. C. Fung." 日本機械学会誌, Vol. 98, pp. 885-887 (1995).
- 2) 林紘三郎, 瀬口靖幸: バイオメカニクスとは. 日本機械学会 (編), バイオメカニクス概説. オーム社, pp. 1-8 (1993).
- 3) 日本機械学会 編: 生体機械工学. 日本機械学会 (1997).
- 4) 林紘三郎: 生体組織の・器官のバイオメカニクス—研究活動の現状. Jap. J. Sports Sci., Vol. 12, No. 1, pp. 25-31 (1993).
- 5) 林紘三郎: バイオメカニクス—現状と展望. BME, Vol. 9, No. 1, pp. 17-23 (1995).
- 6) 林紘三郎: バイオメカニクスの現状と将来. 日本機械学会論文集 (A編), Vol. 61, pp. 1689-1694 (1995).
- 7) 林紘三郎: バイオメカニクス. コロナ社, pp. 50-51 (2000).
- 8) 曾我部正博, 成瀬恵治, 宮津/井上真寿美: 内皮細胞における形態知覚と形態形成の分子機構医学のあゆみ, Vol. 192, No. 13, pp. 1201-1205 (2000).
- 9) F. Guharay and F. Sachs: "Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle." J. Physiol., Vol. 55, pp. 685-701 (1984).
- 10) H. Iida, et al.: "Mid1, a novel *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a plasma membrane protein — is required for Ca^{2+} influx and mating." Mol. Cell. Biol., Vol. 14, pp. 8259-8271 (1994).
- 11) 飯田秀利, 小島 至, 佐藤主税, 曾我部正博: 伸展活性化 Ca^{2+} 透過チャネル Mid1 の遺伝子の単離と機能解析. 医学のあゆみ, Vol. 192, No. 13, pp. 1211-1215 (2000).
- 12) 萩原誠久: 伸展感受性 Cl-チャネル医学のあゆみ, Vol. 192, No. 13, pp. 1229-1230 (2000).
- 13) 萩原誠久, 他: 心筋細胞の容積調節に伴う膜電流変化. 心臓, Vol. 26, pp. 886-894 (1994).
- 14) E. K. Hoffmann, et al.: "Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells." Physiol. Rev., Vol. 69, pp. 315-377 (1989).

- 15) 青木浩樹: 心筋肥大における Rho ファミリーと筋線維形成の分子機構. 医学のあゆみ, Vol. 201, No. 7, pp. 467-471 (2002).
- 16) 安藤譲二, 山本希美子: 内皮細胞のシェアストレス感知機構. 医学のあゆみ, Vol. 192, No. 13, pp. 1217-1221 (2000).
- 17) 久藤純代, 小室一成: 心肥大形成時におけるメカニカルストレス受容機序. 医学のあゆみ, Vol. 192, No. 13, pp. 1207-1210 (2000).
- 18) 永井敏雄: メカニカルストレス受容体としてのインテグリン. 医学のあゆみ, Vol. 201, No. 7, pp. 485-487 (2002).
- 19) D. Schlaepfer et al.: "Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase." *Nature*, Vol. 372, pp. 786-791 (1994).
- 20) 相川竜一: メカニカルストレス受容機構としてのインテグリン. 医学のあゆみ, Vol. 193, No. 13, pp. 1227 (2000).
- 21) R. S. Ross and T. K. Borg: "Integrins and the myocardium." *Circ. Res.*, Vol. 88, No. 11, pp. 1112-1119 (2001).
- 22) 長谷川洋: 心肥大にかかわる MAPK ファミリー. 医学のあゆみ, Vol. 201, No. 7, pp. 455-458 (2002).
- 23) C. Ruwhof and A. van der Laarse: "Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways." *Cardiovasc. Res.*, Vol. 47, pp. 23-37 (2000).
- 24) J. D. Molkentin: "A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy." *Cell*, Vol. 93, pp. 215-228 (1998).
- 25) 大塚正史, 小室一成: 心肥大形成における遺伝子発現に関する Ca^{2+} . 医学のあゆみ, Vol. 201, No. 7, pp. 463-466 (2002).
- 26) P. J. Newman et al.: "The biology of PECAM-1." *J. Clin. Invest.*, Vol. 99, pp. 3-8 (1997).
- 27) 増田道隆, 大澤正輝: シェアストレス受容伝達における PECAM-1 の役割. 医学のあゆみ, Vol. 192, No. 13, p. 1228 (2000).
- 28) M. Masuda, et al.: "Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 is a major SH-PTP2 binding protein in vascular endothelial cells." *FFBS Lett.*, Vol. 408, pp. 331-336 (1997).
- 29) J. Ando: "Cytoplasmic calcium response to fluid shear stress in cultured vascular endothelial cells." *In vitro cell dev. Biol.*, Vol. 24, pp. 871-877 (1988).
- 30) J. Ando, et al.: "Effect of extracellular ATP level on flow-induced Ca^{2+} response in cultured vascular endothelial cells." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 179, pp. 1192-1199 (1991).
- 31) K. Yamamoto, et al.: P2X2 receptors functions as the predominant ATP-gated cation channels in vascular endothelial cells. *FASEB J.*, Vol. 13, pp. A861 (1999).
- 32) 安藤譲二: 内皮細胞のメカニカルストレス感知・応答機構. 実験医学, Vol. 20, No. 8, pp. 1200-1206 (2002).
- 33) 大湾一郎: メカニカルストレスによるオステオポンチンの発現. 医学のあゆみ, Vol. 192, No. 13, pp. 1231-1232 (2000).
- 34) 野田政樹, 他: 骨代謝制御シグナルとしてのオステオポンチン. 実験医学, Vol. 20, No. 17 (増刊), pp. 2465-2476 (2002).
- 35) 米田俊之: 成長を続ける骨研究. 実験医学, Vol. 20, No. 17 (増刊), pp. 2432-2440 (2002).
- 36) R. L. Duncan and C. H. Turner: "Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain." *Calcif. Tissue Int.*, Vol. 57, pp. 344-358 (1995).

〈柳 楽 勤/土屋 利江〉

ラット頭蓋冠由来骨芽細胞の ALPase 活性を促進する

硫酸化ヒアルロン酸の効果

信州大学繊維学部 長幡 操・寺本 彰・阿部康次
 国立医薬品食品衛生研究所療品部 中岡竜介・土屋利江

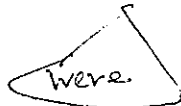
Enhancement action of sulfated hyaluronan on the ALPase activity of
 rat calvarial osteoblasts

Misao Nagahata^{*1,2}, Ryusuke Nakaoka^{*2}, Toshie Tsuchiya^{*2}, Akira Teramoto^{*1} and Koji Abe^{*1}

^{*1} Department of Functional Polymer Science, Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda 386-8567, Japan

^{*2} Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan

Abstract : The purpose of this study was to clarify the effect of hyaluronan (Hya) and sulfated hyaluronan (SHya) on rat calvarial osteoblast (rOB) cells proliferation and differentiation *in vitro*. rOB cells were cultured in the presence of Hya with different molecular weights (0.2, 2, 30, 90, 120 x 10⁴) for 10days. Hya did not affect the proliferation of rOB cells. However, SHya suppressed the proliferation of rOB cells. The alkaline phosphatase (ALPase) activity of rOB cells cultured with SHya for 10 days was significantly enhanced in comparison with control (in the absence of polysaccharides) and with Hya. Hya suppressed the ALPase activity of rOB cells. As a result, SHya can control rOB cells proliferation and differentiation. SHya suppressed the rOB cells proliferation in a few culture days and promoted the differentiation. It was suggested that these effects ~~are~~ based on the sulfate groups of SHya. Therefore, it is considered that SHya is useful for the biomedical material, which promotes the differentiation of rOB cells.



織の再生は望めない。そこで、生体材料と増殖因子の組み合わせによる組織再生の方法が、近年多く報告されている[7, 8]。しかし、これらの増殖因子はたんぱく質であり、生体内での寿命が短く、不安定であるため、増殖因子を保持する担体が必要である。GAGの構成成分であるヒアルロン酸(Hya)は、高分子量で保水性、粘弾性に富み、細胞の遊走、接着、増殖、組織修復などの細胞機能を促進することが知られている[9-11]。本研究では、骨再生用材料の開発を目的として、生体適合性の高い多糖類を用いて骨組織の再生を試みた。本研究では、ヒアルロン酸と硫酸化多糖の機能を併せ持ち、高分子量の硫酸化多糖を作製し、ラット頭蓋冠由来骨芽細胞[rat calvarial osteoblast (rOB cells)]の初期分化マーカーである Alkaline phosphatase (ALPase) に対する影響について検討を行った。

1. 緒言

硫酸化多糖であるヘパリン(Hep)やヘパラン硫酸(Hep)は heparin-binding growth factors (HBGFs) と複合体を形成し、組織が損傷を受けた場合、速やかに HBGFs を放出して、周辺の組織を活性化することが明らかとなっている[1-3]。HBGFsは、骨の修復にも重要な役割を果たしていることが知られ、骨芽細胞の増殖や分化の過程でオートクライン、パラクライン的に骨の形成や吸収を制御する[4-6]。骨が大きく欠損した場合、細胞が増殖、分化するための足場が失われるため、仮の足場が必要となる。しかし、足場が優れていても細胞の数が少ないと十分な組

2. 実験方法

2.1 材料

SHya は以前に報告した方法にて合成した[12]. 使用した硫酸化多糖の硫酸化度 (D.S.; 2 糖残基当たり硫酸基の量) を Table 1 に示した. HyaX (X は分子量を示す) の分子量は 0.2, 2, 30, 90, 120 $\times 10^4$ のものを使用した. Hya, SHya, コンドロイチン硫酸 typeC (Chs-C), Hep は 0.5 mg/1 の濃度になるように培地に溶解し, 0.22 μm の孔径を有する filter で滅菌をおこなった. Hya および SHya の構造式を Fig. 1 に示した.

Table 1 Characteristics of polysaccharides

Polysaccharides	Number of sulfate groups per two saccharide rings	MW ($\times 10^4$)
Hya	0	0.2-120
1.2SHya	1.2	55
2.1SHya	2.1	20
3.4SHya	3.4	5
Chs-C	1	0.5
Hep	2.5	1

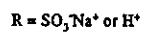
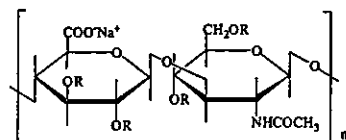
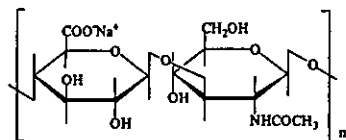


Fig. 1 Structure of hyaluronan and sulfated hyaluronan

2.2 細胞培養

生後 48 時間以内のウイスター系ラット (Charles River) の頭蓋冠から、酵素消化法により rOB cells を分離した [13]. その後, 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Nissui-seiyaku) を用いて, 初代培養を行った. 3 日毎に培地を交換しながら通常の継代培養を行い, 継代数 4-6 の rOB cells を実験に使用した.

2.3 細胞増殖

多糖類と 10% FBS を含む DMEM を用いて調整した rOB cells (1×10^4 cells/well, 24 multiwell plate) を播種し, 5% CO₂ 下, 37°C で培養した. 所定時間培養後の細胞数を, 下記のタンパク質量測定によって計測した. 上澄みを除去し, well を phosphate-buffered salines (PBS; pH7.6) で 3 回洗浄した. 0.04% nonidet P-40 (NP-40,

Nacalai tesque) を含む 1ml PBS を各 well に添加し, 37°C で 10 分間インキュベートした. 懸濁液を超音波破砕機を用いてホモジナイズした後, 1000rpm, 4°C, 5 分間遠心を行った. この上澄液を細胞溶液として, Bio-Rad protein assay (protein assay, Bio-Rad Lab.) 法により, 595nm の吸光度を EIA READER を使って総タンパク質量を, 測定した. 細胞数とタンパク質量の検量線を作成し, 検量線により総タンパク質量から細胞数を算出した. 検量線の作成法を以下に示す. 0, 1, 5, 10, 30 $\times 10^5$ cells/ml に調整した細胞懸濁液を各試験管に入れ, 1000rpm, 4°C, 5 分間遠心を行った. 上澄みを除去し, 0.04% NP-40 を含む 1ml PBS を各試験管に入れ, 総タンパク質量を求め, 細胞数と総タンパク質量の検量線を作成した.

2.4 Alkaline phosphatase (ALPase) 活性

ALPase 活性の測定は以下のようにして行った. 細胞増殖の測定時に得られた細胞溶解液 0.1ml と基質水溶液 0.4ml (16mM p-nitrophenylphosphate disodium salt hexahydrate) を混合して, 30 分間, 37°C でインキュベートした. その後, 反応を停止するため, 混合液に 0.2N NaOH 水溶液を 0.5ml 添加し, 410nm の吸光度を EIA READER を用いて測定した. 総タンパク質量は Bio-Rad protein assay によって測定し, Albumin (Bovine Albumin Fraction V) の検量線から算出した.

3. 結果

分子量の異なる Hya を添加した rOB cells の増殖曲線を, Fig. 2 に示した. 培養 7 日目までは, Hya の分子量に関係なく rOB cells は増殖し, コンフルエントに達した. しかし, 培養 10 日目になると, 高分子量の Hya を添加した rOB cells において, わずかに細胞数の増加が示された.

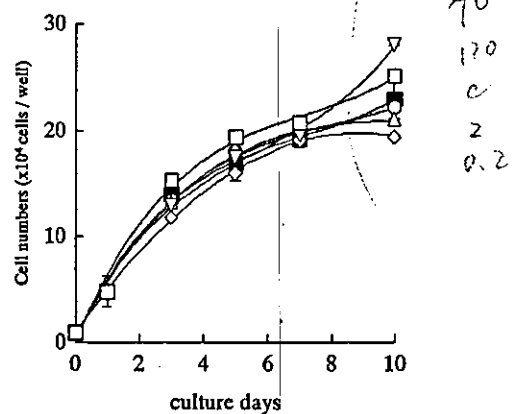


Fig. 2 Effect of 0.5 mg/ml hyaluronan on the proliferation of rOB cells.

■ none ○ Hya0.2 △ Hya2 ◇ Hya30 ▽ Hya90 □ Hya120

Fig. 3に、硫酸化度の異なるSHyaを添加したrOB cellsの増殖曲線を示した。Hyaを添加した場合と異なり、SHyaを添加したrOB cellsは、培養3日目から非添加系に比べて増殖が抑制された。SHyaの硫酸基の導入率が高くなるほど、rOB cellsの増殖は抑制された。これに対し、同じ硫酸基を有する多糖類であってもChs-Cではほとんど影響は見られず、Hepでも抑制効果は小さかった。

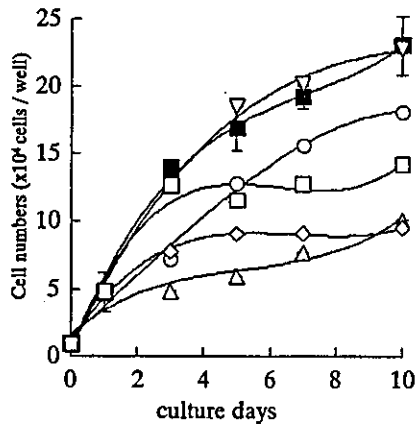


Fig.3 Effect of 0.5 mg/ml sulfated polysaccharides on the proliferation of rOB cells.

■ none ○ 1.2SHya △ 2.1SHya ◇ 3.4SHya ▽ Chs-C □ Hep

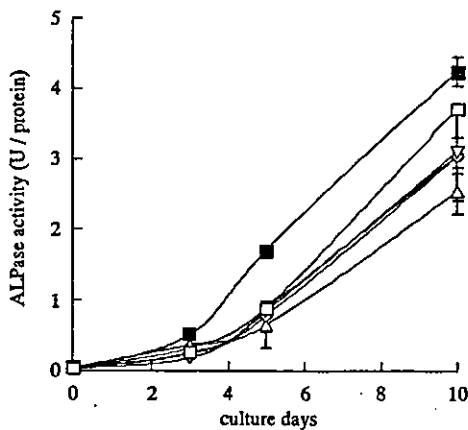


Fig.4 Effect of 0.5 mg/ml hyaluronan on the ALPase activity of rOB cells

■ none ○ Hya0.2 △ Hya2 ◇ Hya30 ▽ Hya90 □ Hya120

Fig. 4に、Hyaを添加したrOB cellsのアルカリフォスファターゼ(ALPase)活性の経時変化を示した。Hyaは分子量の違いには依存せず、骨芽細胞の初期分化マーカーであるALPaseの活性は非添加系に比べて低い値を示した。Fig. 5に、硫酸化度の異なるSHyaを添加したrOB cellsのALPase活性を示した。SHyaを添加したrOB cellsのALPase活性は非添加系に比べて上昇が認められた。特に、高硫酸化度になるほど、ALPase活性の上昇率

は高かった。Fig. 6に、rOB cellsの増殖とALPase活性に対する2.1SHyaの添加濃度の影響を示した。高濃度のSHyaはrOB cellsの増殖を抑制し、ALPase活性を促進させ、低濃度のSHyaは増殖を促進し、ALPase活性を抑制させた。

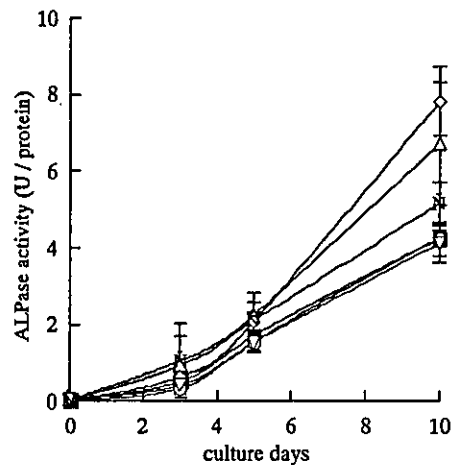


Fig.5 Effect of 0.5 mg/ml hyaluronan on the ALPase activity of rOB cells.

sulfated polysaccharides

■ none ○ 1.2SHya △ 2.1SHya ◇ 3.4SHya ▽ Chs-C □ Hep

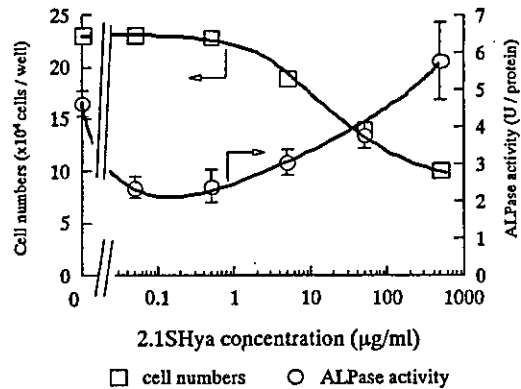


Fig.6 Dose-dependence of 2.1SHya on the proliferation and ALPase activity of rOB cells after 10 days.

4. 考察

病気やケガなどで損傷した骨組織を修復するために、人工骨や人工関節などの人工材料が用いられている。しかし、これらの人工材料は様々な問題があり、近年組織工学的手法を用いた骨再生が期待されている。この手法を用いて骨組織の再生に利用される細胞は、骨組織を形成する骨芽細胞である。骨芽細胞は間葉系由来の細胞で、未分化な間葉系の細胞から骨原性細胞を経て次第に成熟した骨芽細胞へと分化する。骨は常に破壊(骨吸収)と新生(骨形成)を活発に行い、生体のカルシウム濃度調節を司る主要な器官である。骨形成とは、骨芽細胞が分泌し

た骨基質タンパク質にリン酸カルシウムが沈着して形成された骨が増す現象をさす。一方、骨吸収とは、破骨細胞がプロテアーゼや酸を分泌して骨基質を融解する現象である。従って、骨芽細胞の分化の制御は骨形成において重要な働きを担う。

Hya は、眼球、関節をはじめとする多くの結合組織に存在し、ECM の構成成分として、組織の創傷治癒や形態発生に重要な働きをしていることが報告されている。近年、Hya のレセプターとして CD44 が発見されて以来、Hya を介した生物学的機能の研究が盛んに行われている [14-16]。Pilloni らは、骨芽細胞の前駆細胞である間葉系細胞を用いて、分子量の異なる Hya の影響を検討しており [17]、Hya は骨芽細胞の石灰化を促進すると報告している。しかし、細胞の増殖性、分化マーカーについての詳細な検討は行っていない。従って我々は、分子量の異なる Hya を骨芽細胞に添加し、骨芽細胞の増殖と ALPase 活性について検討した。分子量 2000 から 120 万の Hya を rOB cells に添加したところ、非添加系とほとんど変わりなく増殖し、分子量の違いは見られなかった (Fig. 2)。しかし、ALPase の活性は分子量に関係なく非添加系に比べてすべて低いため (Fig. 4)、Hya は rOB の分化を抑制することが示唆された。Hep, HS は細胞外あるいは細胞表面に広く存在し、多くの種類のタンパク質と特異的な相互作用を示すことが知られている [18]。特に、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) は、細胞と ECM の相互作用や細胞同士の相互作用を介して、接着、凝集、シグナル伝達などに関与している。このように、多岐にわたる HSPG の機能の中で、増殖因子との相互作用については多くの報告があり、注目されている [1-3]。FGF, transforming growth factor- β (TGF- β), bone morphogenetic protein (BMP) などの細胞増殖因子は、Hep や HS などの硫酸化多糖と相互作用し、細胞の増殖を抑制することが報告されている [18-21]。Hep, HS, Chs の分子量は、Hya に比べて非常に小さい。そこで本研究では、高分子量である SHya の骨再生用材料への応用を目的として、SHya 単独での rOB cells に対する影響を検討した。SHya の硫酸化度が高くなるにつれ、細胞の増殖は抑制され、Hep もある程度の抑制効果を示した (Fig. 3)。ALPase 活性に対しては、硫酸化度が高くなるにつれて活性が上昇した (Fig. 5)。これより、硫酸化多糖は細胞の増殖を抑制し、分化を促進させることが示された。次に、影響が最も大きく現れた 2.1SHya を用いて、濃度依存性について検討を行った。Fig. 6 より、2.1SHya は低濃度では細胞の増殖を促進し、高濃度になるにつれ増殖を抑制した。これに対して ALPase 活性は低濃度では活性が低く、高濃度になるにつれ上昇した。これより、2.1SHya は濃度を変化させることで、rOB の機能を制御することが可能であることが示された。Hep, HS と増殖因子との協同的な作用の細胞の増殖に対する影響も、濃度によって大きく異なることが報告されている。Blanquaert らは、Hep 及び

硫酸化多糖の RGTA (Heparin-like polymers derived from dextran) と増殖因子との協同作用による、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞 MC3T3-E1 への影響を報告している [1]。RGTA は増殖因子と共に用いることで、増殖に対しては抑制的に働き、ALPase の活性が上昇することを明らかにした。この作用は RGTA のみでも影響が現れるが、増殖因子が存在することにより、さらに顕著に影響が現れた。今回、我々は SHya 単独の影響を検討したが、彼らの結果と一致する結果が得られた。以上の結果から、Hya に硫酸基を導入することにより、SHya は骨芽細胞の増殖や分化機能を制御することが可能であると示された。

5. 結論

rOB cells に Hya を添加すると、rOB cells の増殖は促進され、分化は抑制された。しかし、SHya を添加すると、rOB cells の増殖は抑制され、分化の促進が示された。SHya の効果は SHya の硫酸化度、濃度に大きく依存した。従って、SHya は骨芽細胞の機能を制御することが明らかとなった。骨形成促進作用を持っている BMP, FGF2, TGF- β などの増殖因子を臨床応用に用いる場合、これらの増殖因子に適した担体の開発が必要である。SHya は分子量が高く、粘性があるため、増殖因子を保持する能力は Hep, HS などの他の硫酸化多糖に比べて高いことが考えられる。今後、SHya と増殖因子との相互作用について検討を行うことにより、SHya の骨再生用材料への応用が期待される。

文献

1. F. Blanquaert, D. Barritault and J. P. Caruelle, J. Biomed. Mater. Res., 44, 63 (1999)
2. E. Ruoslahti and D. Yamaguchi, Cell, 64, 867 (1991)
3. O. Saksela, D. Moscatelli, A. Sommer and D.B. Rifkin, J. Cell Biol., 107, 743 (1988)
4. D. J. Baylink, R. D. Finkelstein and S. E. Mohan, J. Bone Miner. Res., 8, S565 (1993)
5. W. T. Bourque, M. Gross and B. K. Hall, Int. J. Dev. Biol., 37, 573 (1993)
6. M. E. Joyce, S. Jingushi, S. P. Scully and M. E. Bolander, Preg. Clin. Biol. Res., 365, 391 (1991)
7. H. Ueda, L. Hong, M. Yamamoto, K. Shigeno, M. Inoue, T. Toba, M. Yoshitani, T. Nakamura, Y. Tabata and Y. Shimizu, Biomaterials, 23, 1003 (2002)
8. C. H. Tang, R. S. Yang, H. C. Liou and W. M. Fu, J. Biomed. Mater. Res., 63, 577 (2002)
9. P. H. Weigel, V. C. Hascall and M. Tammi, J. Biol. Chem., 272, 13997 (1997)
10. W. Zhang, C. E. Watson, C. Liu, K. J. Williams and V. P. Werth, Biochem. J., 349, 91 (2000)

11. L. S. Liu, C. K. Ng, A. Y. Thompson, J. W. Poser and R. C. Spiro, *J. Biomed. Mater. Res.*, **62**, 128 (2002)
12. M. Nagahata, T. Tsuchiya, T. Ishiguro, N. Matsuda, Y. Nakatsuchi, A. Teramoto, A. Hachimori and K. Abe, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **315**, 603-611 (2004)
13. T. Hamano, D. Chiba, K. Nakatsuka, M. Nagahata, A. Teramoto, Y. Kondo, A. Hachimori and K. Abe, *Polym. Adv. Technol.*, **13**, 46 (2002)
14. L. Sherma, J. Sleeman, P. Herrlich and H. Ponta, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **6**, 726 (1994)
15. P. W. Kincade, Z. Zheng, S. Katoh and L. Hanson, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **9**, 635 (1997)
16. J. Entwistle, C. L. Hall and E. A. Turley, *J. Cell Biochem.*, **61**, 569 (1996)
17. A. Piloni and G. W. Bernard, *Cell Tissue. Res.*, **294**, 323 (1998)
18. E. Ruoslahti, *Ann. Rev. Cell. Biol.*, **4**, 229 (1988)



Available online at www.sciencedirect.com



Biomaterials

Biomaterials 1 (2005) 511-518

www.elsevier.com/locate/biomaterials

The response of normal human osteoblasts to anionic polysaccharide polyelectrolyte complexes

Misao Nagahata^{a,b,1}, Ryusuke Nakaoka^{a,*,1}, Akira Teramoto^b, Koji Abe^b, Toshie Tsuchiya^a

^aDivision of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-81-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^bDepartment of Functional Polymer Science, Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda 386-8567, Japan

Received 10 September 2004; accepted 7 January 2005

Abstract

Polyelectrolyte complexes (PEC) were prepared from chitosan as the polycation and several synthesized functional anion polysaccharides, and their effects on cell attachment, morphology, proliferation and differentiation were estimated using normal human osteoblasts (NH₂Ost). After a 1-week incubation, PEC made from polysaccharides having carboxyl groups as polyanions showed low viability of NH₂Ost on it although the NH₂Ost on it showed an enhancement in their differentiation level. On the other hand, NH₂Ost on PEC made from sulfated or phosphated polysaccharides showed similar attachment and morphology to those on the collagen-coated dish. When the number of NH₂Ost was estimated after 1 week, the number on the PEC was ranged from 70% to 130% of those on the collagen-coated dish, indicating few effects of these PEC on cell proliferation. In addition, NH₂Ost on PEC films made from sulfated polysaccharides differentiated to a level very similar to that observed on the collagen-coated dish, indicating that these PEC films maintain the normal potential of NH₂Ost to both proliferate and differentiate. Measurement of gap junctional intercellular communication of NH₂Ost on PEC revealed that PEC did not inhibit communication, suggesting that PEC films have few effects on cell homeostasis. Thus, PEC made from the sulfated polysaccharide may be a useful material as a new scaffold for bone regeneration.

© 2005 Published by Elsevier Ltd.

Keywords: Polyelectrolyte complex; Normal human osteoblasts; Cell proliferation; Cell differentiation; Gap junctional intercellular communication

1. Introduction

The extracellular matrix (ECM) provides an essential three-dimensional (3D) environment for cells to construct several kinds of tissues. The ECM, consisting of numerous kinds of molecules such as proteins, polysaccharides and proteoglycans regulates the behavior of surrounding cells to form tissues and organs precisely [1,2]. For tissue regeneration trials using in vitro

techniques, therefore, it is indispensable to develop a synthetic ECM scaffold that functions similarly to the native ECM. For more than a decade, engineering of new tissues by using selective cell transplantation on polymer scaffolds as an artificial ECM instead of tissue transplantation to other living bodies has been studied [3,4]. Recently, many studies on developing a scaffold for tissue regeneration have been done using ECM proteins such as collagen and gelatin [5-7], biodegradable synthetic polymers [8-10] and polysaccharides [11,12]. Because proteins derived from human tissues have many problems such as antigenicity or potential for infection, a biocompatible synthetic polymer or polysaccharide may be preferable for tissue regeneration.

*Corresponding author. Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan. Tel.: +81 3 3700 9264; fax: +81 3 3707 6950.

E-mail addresses: nagahata@nihs.go.jp (M. Nagahata), nakaoka@nihs.go.jp (R. Nakaoka).

¹These authors contributed equally to this work.

1 A polyelectrolyte complex (PEC) is a compound made
 3 from an electrically neutralized molecular complex of
 5 polyanions and polycations [13]. PEC can be prepared
 7 in various forms such as a film (2D) and a hydrogel, a
 9 microcapsule or a sponge (3D), which can be used as a
 11 scaffold in tissue regeneration studies. The effects of
 13 PEC films composed of polysaccharides on cell behavior
 15 have been studied, and we have already reported that
 17 PEC can stimulate differentiation of osteoblasts and
 19 periodontal ligament fibroblasts [14-16]. These studies
 suggest that PEC can be used as a biomaterial for
 repairing or regenerating tissues. In addition, because
 the PEC are composed of polysaccharides, PEC is
 expected not to elicit immune responses against it and to
 have better biocompatibility with the human body,
 although this is yet to be proved. Therefore, it is
 necessary to study the interactions between PEC and
 cells, especially human-derived, to clarify the usefulness
 of PEC as a biomaterial.

21 In this study, normal human osteoblasts (NH₂Ost)
 23 were cultured on various PEC prepared on a tissue
 25 culture plate from chitosan as the polycation and
 27 modified chitins or hyaluronan as the polyanion. It
 29 should be generally agreed that estimating not only
 31 functional advantages but also safety and biocompat-
 33 ibility of biomaterials is important to develop them for
 35 clinical use, but the latter is not always studied.
 37 Therefore, we measured changes in gap junctional

intercellular communication (GJIC) as well as the cell
 number and differentiation. GJIC is very important
 function for almost all cells to maintain their home-
 ostasis [17]. During this decade, we have studied the
 effects of model biomaterials on the GJIC of cells
 cultured on them and suggested a possibility that
 changes in the GJIC can be used as an index of
 biocompatibility of biomaterials [18-21]. Therefore, we
 measured changes in GJIC of NH₂Ost on PEC in order
 to estimate the biocompatibility of PEC from their
 effects on these cell functions.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Fig. 1 shows the chemical structures of the polyanions
 and the polycation. Chitosan as the cationic polysac-
 charide and carboxymethylated chitin [CM-Chitin:
 degree of substitution (DS) = 1.0 (1.0 anionic site/
 saccharide ring)] were purchased from Katokichi Co.,
 Ltd. (Kagawa, Japan). Sulfated chitin (S-Chitin:
 DS = 1.5), phosphated chitin (P-Chitin: DS = 1.6),
 hyaluronan (HA), and sulfated hyaluronan (SHA:
 DS = 1.05) were prepared as previously reported
 [14-16,22].

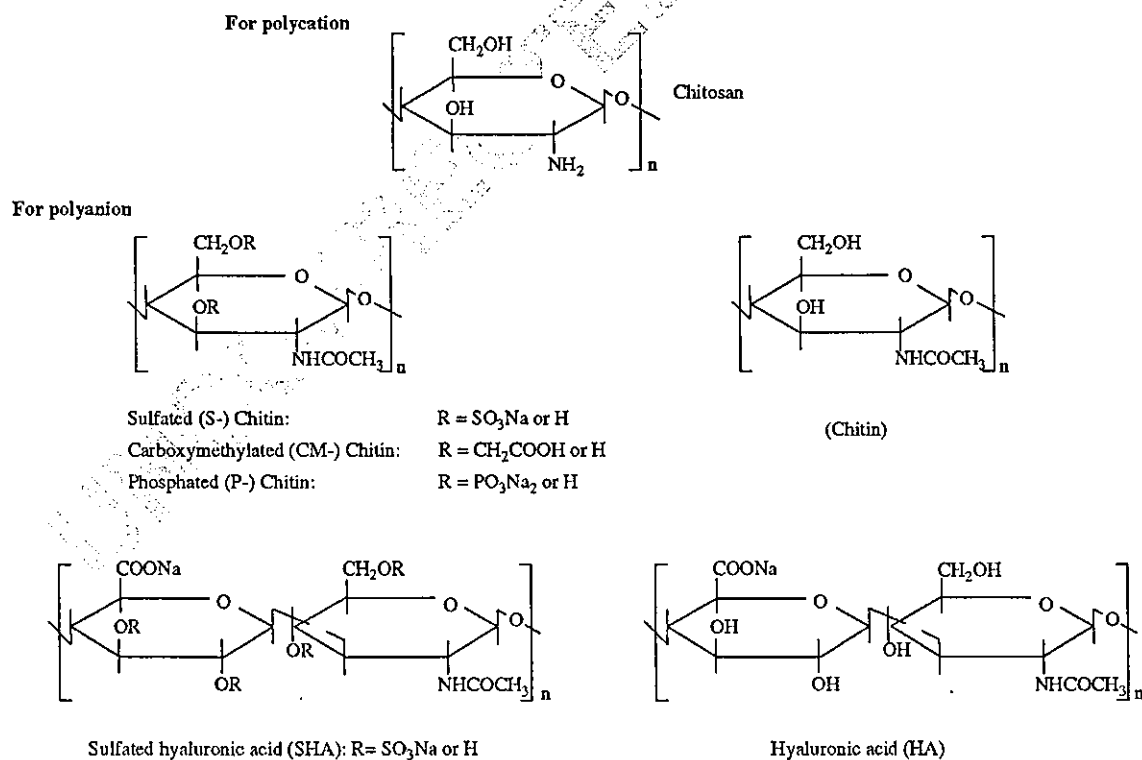


Fig. 1. Polymers for polyelectrolyte complex (PEC) in this study.

1 2.2. Preparation of PEC and PEC-coated dishes

3 Polyanions were dissolved individually in distilled
5 water (final concentration = 5×10^{-4} mol of ionic sites/
7 l), and the pH of the solutions was adjusted to 7.4 by
9 adding aqueous HCl or NaOH. Chitosan was dissolved
11 in aqueous 0.5% acetic acid solution and the pH
13 adjusted to 6.0. The ratio of the solutions of polyanions
15 and polycation was adjusted in each combination to
17 neutralize the charge balance of PEC. This mixed
19 solution (1 ml/35 mm tissue culture dish) was allowed
21 to stand overnight at room temperature. After removing
23 the supernatant solution, the dish was dried and
annealed at 65°C in an oven. Then, the dishes were
washed with distilled water and oven-dried again to
form the PEC-coated dish. This dish was sterilized for
3 min in a microwave oven. Water contact angles of
PEC films were measured with the sessile drop method
[23], and their zeta potentials were measured by Otsuka
Electronics Co., Ltd. (Osaka, Japan).

23 2.3. Cell culture

25 NHOst were purchased from BioWhittaker Inc.
27 (Walkersville, MD). The standard culture of NHOst
29 was performed using alpha minimum essential medium
31 (Gibco, Grand Island, NY) containing 20% fetal calf
33 serum (FCS) (Kokusai Shiyaku Co., Ltd., Tokyo
35 Japan). The cells were maintained in incubators under
37 standard conditions (37°C, 5% CO₂-95%-air, satu-
39 rated humidity). All assays were performed using alpha
minimum essential medium containing 20% FCS,
supplemented with 10 mM beta-glycerophosphate.
NHOst cells (1×10^5 cells/dish/2.5 ml medium) were
cultured on PEC-coated dishes to evaluate the effects
of their interaction with PEC. In each experiment, the
medium was changed three times before GJIC of the
cells was measured and their differentiation level was
evaluated after a 1-week incubation.

41 2.4. Estimation of differentiation level of NHOst cultured 43 on PEC films

45 The proliferation of NHOst cells cultured on PEC
47 films was estimated by Tetracolor One assay (Seikagaku
49 Co., Tokyo, Japan), which incorporates an oxidation-
51 reduction indicator based on detection of metabolic
53 activity. After a 1-week incubation, 50 µl of Tetracolor
55 One solution was added to each test dish, followed by a
further 2 h incubation. The absorbance of the super-
natant at 450 nm was estimated by µQuant spectro-
photometer (Bio-tek Instruments, Inc., Winooski, VT).
Estimation of alkaline phosphatase (ALP) activity was
performed according to an original procedure by
Ohya et al. [24]. After estimating the proliferation
of the NHOst cells cultured on PEC films, the cells were

57 washed by phosphate-buffered saline (PBS(-)), fol-
59 lowed by addition of 1 ml of 0.1 M glycine buffer (pH
61 10.5) containing 10 mM MgCl₂, 0.1 mM ZnCl₂ and
63 8 mM *p*-nitrophenylphosphate sodium salt. After in-
65 cubating the cells at room temperature for 7 min, the
67 absorbance of the glycine buffer was detected at 405 nm
69 using µQuant to evaluate the ALP activity of the test
71 cells. The amounts of calcium deposited by the cell
during a 1-week incubation were evaluated as follows:
after fixing the cells in PBS(-) containing 3% for-
maldehyde and washing the cells with PBS(-), 0.5 ml of
0.1 M HCl was added to each well. The amounts of
calcium dissolved in HCl were estimated using a calcium
detecting kit (Calcium-C test Wako, Wako, Osaka,
Japan) according to manufacturer's instruction.

73 2.5. Measurements of GJIC activity

75 NHOst cultured on PEC films were subjected to
77 fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)
79 analysis to estimate the inhibitory activity of these films
81 on the GJIC. FRAP analysis was carried out according
83 to the procedure of Wade et al. [25] with some
85 modifications [21]. Briefly, NHOst were plated on
87 PEC-coated dishes and incubated for 1 or 7 days. The
89 cells were incubated for 5 min at room temperature in
91 PBS(-) containing Ca²⁺ and Mg²⁺ (PBS(+)) and a
93 fluorescent dye, 5,6-carboxyfluorescein diacetate. After
95 washing off excess extracellular dye with PBS(+), the
cells in PBS(+) contacting at least two other cells were
subjected to FRAP analysis under a Ultima-Z confocal
microscope (Meridian Instruments, Okemos, MI) with a
10 × objective lens at room temperature. The cells were
photobleached with a 488 nm beam, and recovery of
fluorescence intensity was subsequently monitored at 1-
min intervals for a total of 4 min. The data obtained
from more than seven independent cells were expressed
as the average ratio of the fluorescence recovery rate to
the rate obtained from NHOst cultured on a collagen-
coated dish.

97 2.6. Statistic analysis

99 All data were expressed as mean values ± standard
101 deviation of the obtained data. The Fisher-Tukey
103 criterion was used to control for multiple comparisons
105 and to compute the least significant difference between
means.

107 3. Results and discussion

109 When NHOst were cultured on five kinds of PEC
111 films, their morphology and attachment to the film
differed with the composition of the PEC. Fig. 2 shows
the morphologies of the NHOst adhering to PEC films.

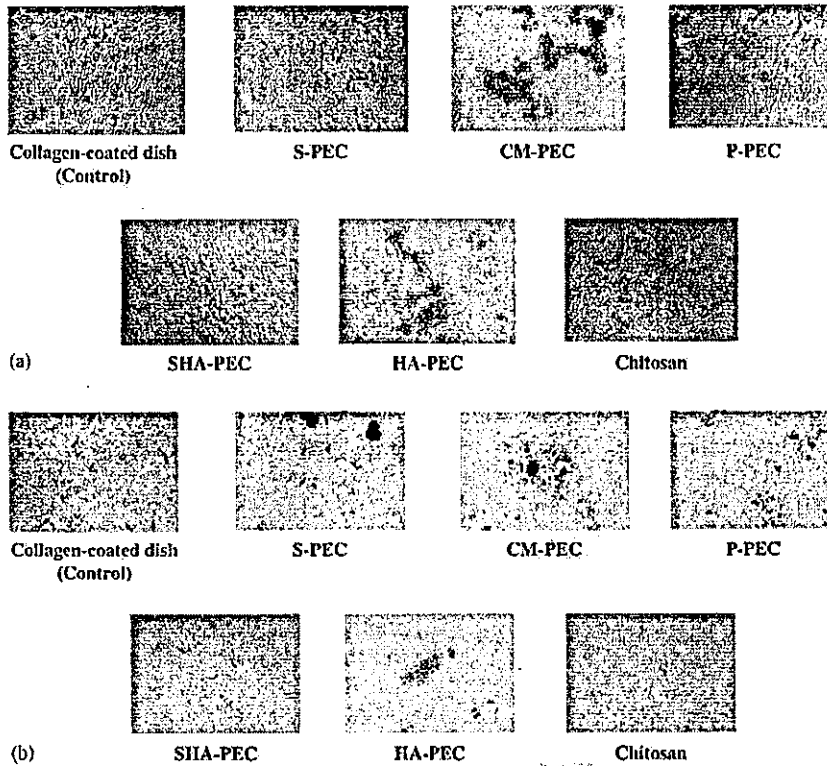


Fig. 2. Light micrographs of normal human osteoblasts (NHOst) on various PEC films after a 2-day incubation: (a) and 1-week incubation, (b). (Original magnification: $\times 100$).

After 2-day incubation, the NHOst on PEC composed of chitosan and either sulfated chitin (S-PEC) or sulfated hyaluronan (SHA-PEC) showed morphologies similar to those on a normal culture plate. When cells were cultured on PEC of chitosan and phosphated chitin (P-PEC), some of them formed small aggregates, while the rest showed morphologies similar to those on S-PEC and SHA-PEC. On the other hand, NHOst cultured on PEC from chitosan and either carboxymethyl chitin (CM-PEC) or hyaluronan (HA-PEC) did not adhere well and showed aggregation. Similar morphologies of the cells on the PEC were observed after 1 day of incubation (data not shown). Even after 1 week of incubation, the morphologies and attachment of the cells on the PEC films did not change (Fig. 2). Only cells grown on cationic polysaccharide chitosan-coated culture dishes preserved morphology of very similar to NHOst grown on collagen-coated cultured dishes, indicating that these morphological differences are ascribable to differences in the anionic polysaccharides of which the PEC is composed.

It has been reported that cell attachment, morphology, and response are influenced by physico-chemical properties of the material surface [23,26]. To clarify what properties of PEC control the attachment and morphology of the cell, the contact angle and zeta

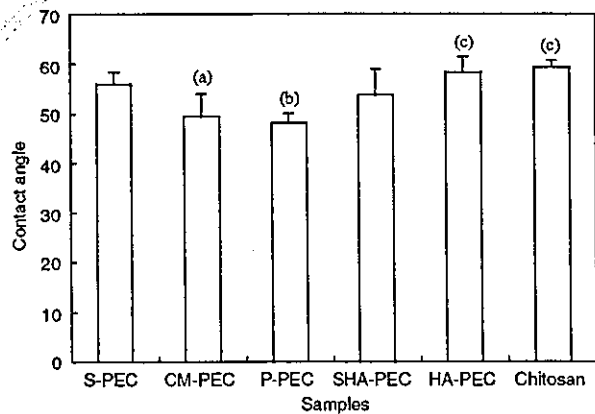


Fig. 3. Contact angles of PEC films studied: (a) $p < 0.05$ against S-PEC, (b) $p < 0.01$ against S-PEC, (c) $p < 0.01$ against both CM-PEC and P-PEC.

potential of PEC films were estimated. Although their compositions are different, large differences in their contact angles were not observed (Fig. 3). On the other hand, a measurement of zeta potentials of the PEC showed interesting results (Table 1). The measurement revealed that S-PEC and SHA-PEC have negative zeta potentials, whereas PEC films made of polysaccharides

Table 1
Zeta potentials of various PEC prepared on a culture dish

	Culture	S-PEC	CM-PEC	P-PEC	SHA-PEC	HA-PEC
Zeta potential (mV)	-58.7	-28.0	34.5	24.9	-5.7	29.5

Table 2
The cell number and differentiation of NHOst cultured on various PEC films after 1 week

Samples	The cell number (percent against control)	ALP activity The cell number (ratio)	Ca amount The cell number ($\mu\text{g}/\text{ratio}$)
Collagen-coated dish	100.0 \pm 17.0	1.00 \pm 0.15	3.4 \pm 0.5
S-PEC	82.2 \pm 6.1	0.98 \pm 0.11	10.7 \pm 3.6
CM-PEC	6.0 \pm 2.6*	0.05 \pm 0.08*	27.4 \pm 3.0*
P-PEC	130.4 \pm 6.3	0.02 \pm 0.01*	2.5 \pm 0.8
SHA-PEC	71.4 \pm 22.1	1.35 \pm 0.48	2.1 \pm 1.0
HA-PEC	8.1 \pm 3.0*	0.52 \pm 0.31	38.3 \pm 12.3*
Chitosan	79.5 \pm 25.0	0.93 \pm 0.13	2.7 \pm 2.0

* $p < 0.01$ against collagen-coated dish.

with a carboxyl group, such as HA-PEC and CM-PEC, showed positive zeta potentials. In addition, P-PEC showed a positive potential less than that of HA-PEC. These data indicate that attachment of NHOst on surfaces with positive zeta potentials is reduced, suggesting the zeta potential of a PEC film partially controls cell attachment and morphology. Although all PEC were prepared by mixing anionic and cationic polysaccharides to neutralize their charge, zeta potential of each PEC film was ranged from -30 to 35 mV as shown in the table. This might indicate that not all anionic and cationic chemical groups were interacted to make PEC and their main chain composition and type of chemical groups may influence their side chain mobility, resulting in different surface zeta potential of each PEC. Details of surface properties of PEC films and their relationship to cell attachment will be reported in the near future.

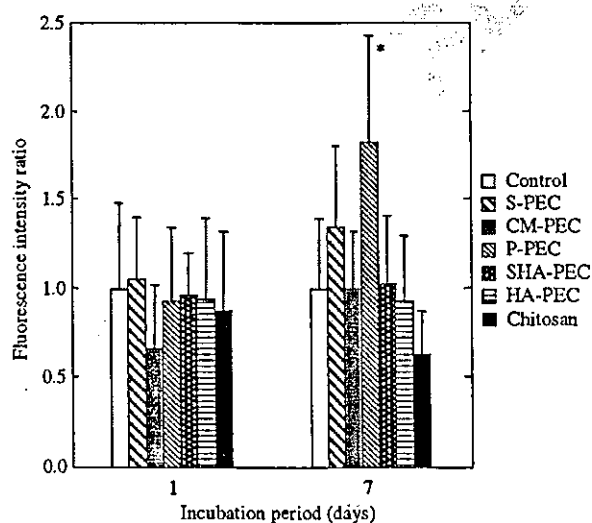
After 1-week of incubation on various PEC films, the differentiation level of NHOst was estimated by measuring proliferation, alkaline phosphatase (ALP) activity and the amounts of calcium deposited. Table 2 shows the proliferation and ALP activity of NHOst cultured on various PEC films as well as the amounts of calcium deposited on the PEC. The proliferation of NHOst on the PEC is expressed as a percentage of proliferation of NHOst on a normal culture dish. The ALP activity was also calculated as a percentage of the control and normalized using the results of proliferation. In addition, the amount of calcium detected was normalized using the proliferation results as well. After a 1-week incubation, many dark spots, presumably calcium deposits, were observed on the collagen-coated dish and other PEC films (Fig. 2). When NHOst were cultured on CM-PEC or HA-PEC, it was observed that

the NHOst aggregates were covered by the calcium deposits. It was reported that a surface with carboxyl group could induce calcium deposition after its incubation in SBF. However, when the PEC were incubated in the medium without NHOst, no calcium deposition was detected. In addition, zeta potential estimation suggests less carboxyl groups are appeared on a surface of the PEC. These indicate that calcium deposition occurred only on aggregated NHOst but not on surfaces lacking NHOst. Therefore, normalization is necessary to estimate the capacity of PEC films to induce NHOst differentiation, although the raw values of deposited calcium or ALP activity are low. In fact, CM-PEC or HA-PEC films show a capacity to induce NHOst differentiation comparable to the collagen-coated dish and other PEC films, judging from the normalized values of deposited calcium shown in the table, even though the ratio of NHOst number on them was only 6-8% of that on a collagen-coated dish. Their ALP activities were, however, much lower than those on the collagen-coated dish. Incubation of the PEC films without NHOst for 1 week resulted in no calcium deposition, irrespective of their composition, suggesting that the PEC films themselves had no effect on calcium deposition. Thus, enhancement of calcium deposition on the PEC films may be ascribed to enhancement of NHOst functions related to their differentiation even though their ALP activity was suppressed. The reason for this inconsistency observed between calcium deposition and ALP activity must be investigated further.

When sulfated polysaccharides were used to prepare PEC films, proliferation of NHOst on the PEC films was 70-80% of that on a collagen-coated dish, and ALP activity was very similar to that on the collagen-coated dish. This suggests that sulfated polysaccharide PEC

1 does not affect NHOst functions. Actually, there were
 2 no statistical differences in the amounts of calcium
 3 deposited between NHOst on the PEC and the collagen-
 4 coated dish although NHOst on S-PEC showed higher
 5 average calcium deposition. Thus, it is suggested that
 6 the PEC films made from sulfated polysaccharides are
 7 comparable substrates to a collagen-coated dish for cell
 8 culture. When compared to a normal culture dish, it has
 9 been reported that S-PEC can induce aggregation of
 10 cultured human fibroblasts and enhance their DNA
 11 synthesis in an earlier stage of cell culture by activation
 12 of the ERK pathway [27]. Since we used a collagen-
 13 coated dish as a control in this study, it is expected that
 14 the pathway of NHOst on the dish may be already
 15 activated through integrin molecules on the NHOst
 16 membrane. Therefore, the results in this study suggest
 17 the PEC from sulfated polysaccharides have a potential
 18 to proliferate and differentiate NHOst very similar to
 19 that of collagen.

20 To assess the effects of PEC films on cell function, gap
 21 junctional intercellular communication (GJIC), which is
 22 an important function of cells for maintenance of
 23 homeostasis [17], of NHOst on the films were measured.
 24 As shown in Fig. 4, GJIC of NHOst on PEC films did
 25 not show statistically significant differences compared to
 26 those grown on a collagen-coated dish. Although the
 27 GJIC of NHOst on CM-PEC showed a decrease after 1
 28 day of incubation, it had recovered after 1 week. This
 29 result suggests that most PEC films have the potential to
 30 maintain homeostasis of attached cells although they
 31 showed different influences on the number and the
 32 differentiation of NHOst. On the other hand, NHOst on
 33 chitosan, which was used as the polycation for all PEC,
 34 showed suppression of GJIC after 1 week. This suggests



35
37
39
41
43
45
47
49
51
53
55
Fig. 4. Gap junctional intercellular communication activity of NHOst on various PEC films estimated by FRAP analysis technique. (* $p < 0.01$ against control).

57 that chitosan disturbs homeostasis maintenance of
 58 NHOst, but improve its biocompatibility by forming
 59 PEC films with other anionic polysaccharides. There-
 60 fore, PEC might be used as a biocompatible material for
 61 medical devices and tissue engineering scaffolds.

63 65 67 69 71 73 75 77 79 81 83 85 87 89 91 93 95 97 99

4. Conclusion
 PEC films composed of various polysaccharides were prepared, and their effects on NHOst functions were evaluated. Attachment, morphology, growth and differentiation of NHOst were influenced by the composition of the PEC on which they were grown. NHOst attachment decreased and their aggregates were observed on PEC prepared from polysaccharides containing a carboxyl group (CM- and HA-PEC). ALP activity of NHOst was suppressed on these PEC films although calcium deposition was observed more frequently than on other PEC films. In addition, these PEC films strongly suppressed proliferation of NHOst. PEC prepared from phosphated chitin and chitosan (P-PEC) showed low ALP activity and calcium deposition, although the number of NHOst was highest after 1-week incubation. These indicate unsuitability of these three PEC for usage in tissue engineering. On the other hand, NHOst adhered to and proliferated well on PEC films when sulfated polysaccharides were used as the polyanion (S- and SHA-PEC). Moreover, these PEC films showed almost the same suitability as the collagen-coated dish in all cell functions studied, indicating that these PEC films, especially S-PEC can be used as a scaffold for bone regeneration. Further studies, especially in vivo studies, are needed to clarify the usefulness of PEC films for tissue engineering.

Acknowledgements

This work was partially supported by Health and Labour Sciences Research Grants for Research on Advanced Medical Technology and Risk Analysis Research on Food and Pharmaceuticals by Ministry of Health, Labour and Welfare, Health and Labour Sciences Research Grants for Research on Health Sciences focusing on Drug Innovation by the Japan Health Sciences Foundation, and Grant-in-Aid for 21st Century COE Program "Advanced Fiber Engineering" and Grant-in-Aid for Scientific Research (B), 2002 (14350495) by Ministry of Education, Science, Sports and Culture.

1 References

- 3 [1] Adams JC, Watt FM. Regulation of development and differ-
5 entiation by the extracellular matrix. *Development* 1993;117:1183–98.
- 7 [2] Peterson WJ, Tachiki KH, Yamaguchi DT. Extracellular matrix
9 alters the relationship between thymidine incorporation and
11 proliferation of MC3T3-E1 cells during osteogenesis in vitro.
13 *Cell Prolif* 2002;35:9–22.
- 15 [3] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*
17 1993;260:920–6.
- 19 [4] Mooney DJ, Mikos AG. Growing new organs. *Sci Am*
21 1999;280:38–43.
- 23 [5] Hori Y, Nakamura T, Matsumoto K, Kurokawa Y, Satomi S,
25 Shimizu Y. Tissue engineering of the small intestine by acellular
27 collagen sponge scaffold grafting. *Int J Artif Organs*
29 2001;24:50–4.
- 31 [6] Yamamoto M, Takahashi Y, Tabata Y. Controlled release by
33 biodegradable hydrogels enhances the ectopic bone formation of
35 bone morphogenetic protein. *Biomaterials* 2003;24:4375–83.
- 37 [7] Gamez E, Ikezaki K, Fukui M, Matsuda T. Photoconstructs of
39 nerve guidance prosthesis using photoreactive gelatin as a
41 scaffold. *Cell Transplant* 2003;12:481–90.
- [8] Lavik E, Teng YD, Snyder E, Langer R. Seeding neural stem cells
on scaffolds of PGA, PLA, and their co-polymers. *Method Mol
Biol* 2002;198:89–97.
- [9] Lieb E, Tessmar J, Hacker M, Fischbach C, Rose D, Blunk T,
Mikos AG, Gopferich A, Schulz MB. Poly(D,L-lactic acid)-
poly(ethylene glycol)-monomethyl ether diblock copolymers
control adhesion and osteoblastic differentiation of marrow
stromal cells. *Tissue Eng* 2003;9:71–84.
- [10] Shin M, Ishii O, Sueda T, Vacanti JP. Contractile cardiac grafts
using a novel nanofibrous mesh. *Biomaterials* 2004;25:3717–25.
- [11] Alsberg E, Anderson KW, Albeiruti A, Rowley JA, Mooney DJ.
Engineering growing tissues. *Proc Nat Acad Sci*
2002;99:12025–30.
- [12] Chang CH, Liu HC, Lin CC, Chou CH, Lin FH. Gelatin-
chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue
engineering. *Biomaterials* 2003;24:4853–8.
- [13] Tsuchida E, Abe K. Interactions between macromolecules in
solution and intermacromolecular complexes. *Adv Polym Sci*
1982;45:1–119.
- [14] Hamano T, Teramoto A, Iizuka E, Abe K. Effects of polyelec-
trolyte complex (PEC) on human periodontal ligament fibroblasts
(HPLF) function. I. Three-dimensional structure of HPLF
cultured PEC. *J Biomed Mater Res* 1998;41:257–69.
- [15] Hamano T, Teramoto A, Iizuka E, Abe K. Effects of polyelec-
trolyte complex (PEC) on human periodontal ligament fibroblasts
(HPLF) function. II. Enhancement of HPLF differentiation and
aggregation on PEC by L-ascorbic acid and dexamethasone. *J
Biomed Mater Res* 1998;41:270–7.
- [16] Hamano T, Chiba D, Nakatsuka K, Nagahata M, Teramoto A,
Kondo Y, Hachimori A, Abe K. Evaluation of a polyelectrolyte
complex (PEC) composed of chitin derivatives and chitosan,
which promotes the rat calvarial osteoblast differentiation. *Polym
Adv Technol* 2002;13:46–53.
- [17] Maio AD, Vaga VL, Contreras JE. Gap junctions, homeostasis,
and injury. *J Cell Physiol* 2002;191:269–82.
- [18] Tsuchiya T, Hata H, Nakamura A. Studies on the tumor-
promoting activity of biomaterials: inhibition of metabolic
cooperation by polyetherurethane and silicone. *J Biomed Mater
Res* 1995;29:113–9.
- [19] Tsuchiya T, Takahara A, Cooper SL, Nakamura A. Studies on
the tumor-promoting activity of polyurethanes: depletion of
inhibitory action of metabolic cooperation on the surface of a
polyalkyleneurethane but not a polyetherurethane. *J Biomed
Mater Res* 1995;29:835–41.
- [20] Nakaoka R, Tsuchiya T, Sakaguchi K, Nakamura A. Studies on
in vitro evaluation for the biocompatibility of various biomater-
ials: inhibitory activity of various kinds of polymer microspheres
on metabolic cooperation. *J Biomed Mater Res* 2001; 279–84.
- [21] Nakaoka R, Tsuchiya T, Nakamura A. The inhibitory mechan-
ism of gap junctional intercellular communication induced by
polyethylene and the restorative effects by surface modification
with various proteins. *J Biomed Mater Res* 2001;57:567–74.
- [22] Nagahata M, Tsuchiya T, Ishiguro T, Matsuda N, Nakatsuchi Y,
Teramoto A, Hachimori A, Abe K. A novel function of N-
cadherin and connexin 43: marked enhancement of alkaline
phosphatase activity in rat calvarial osteoblast exposed to sulfated
hyaluronan. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;315:603–11.
- [23] Tamada Y, Ikada Y. Fibroblast growth on polymer surfaces and
biosynthesis of collagen. *J Biomed Mater Res* 1994;28:783–9.
- [24] Ohyama M, Suzuki N, Yamaguchi Y, Maeno M, Otsuka K, Ito
K. Effect of enamel matrix derivative on the differentiation of
C2C12 cells. *J Periodontol* 2002;73:543–50.
- [25] Wade MH, Trosko JE, Schlindler M. A fluorescence photo-
bleaching assay of gap junctional-mediated communication
between human cells. *Science* 1986;232:525–8.
- [26] Kato S, Akagi T, Sugimura K, Kishida A, Akashi M. Evaluation
of biological responses to polymeric biomaterials by RT-PCR
analysis IV: study of c-myc, c-fos and p53 mRNA expression.
Biomaterials 2000;21:521–7.
- [27] Matsuda N, Horikawa M, Yoshida M, Watanabe M, Nagahata
M, Teramoto A, Abe K. Enhanced DNA synthesis accompanied
by constitutive phosphorylation of the ERK pathway in human
fibroblasts cultured on a polyelectrolyte complex. *Biomaterials*
2003;24:4771–6.



4-Hydroxynonenal modulates the long-term potentiation induced by L-type Ca^{2+} channel activation in the rat dentate gyrus in vitro

Tatsuhiko Akaishi^{a,b}, Ken Nakazawa^b, Kaoru Sato^b, Yasuo Ohno^b, Yoshihisa Ito^{a,*}

^a Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Nihon University, 7-7-1 Narashinodai, Funabashi-shi, Chiba 274-8555, Japan

^b Division of Pharmacology, National Institute of Health Sciences, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Received 15 June 2004; received in revised form 23 July 2004; accepted 8 August 2004

Abstract

Increased oxyradical production and membrane lipid peroxidation (MLP) occur under physiological and degenerative conditions in neurons. We investigated whether 4-hydroxynonenal (4HN), one of the membrane lipid peroxidation products, affects long-term potentiation (LTP) in the rat dentate gyrus in vitro. Treatment of hippocampal slices with 4HN (10 μM) enhanced LTP without affecting basal evoked potentials. The enhancement was completely inhibited by 2 μM nifedipine, a blocker of L-type Ca^{2+} channels. In cultured dentate gyrus neurons, treatment of the cells with 4HN for 24 h resulted in a significant amount of cell death that was detoxified by glutathione, whereas short-term treatment with 4HN (≤ 6 h) had no effect. Nifedipine partially but significantly suppressed the 4HN-induced cell death. These results suggest that 4HN modulates LTP and induces delayed cell death through L-type Ca^{2+} channel activation in the dentate gyrus. 4HN thereby plays an important role in both physiological and pathophysiological events in the hippocampus.

© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: 4-Hydroxynonenal; Oxidative stress; Long-term potentiation; Ca^{2+} channel; Hippocampus; Dentate gyrus

Oxidative stress is implicated in a variety of physiological and pathophysiological processes such as immune defense, ischemia, and neurodegenerative diseases (e.g., Alzheimer's disease, AD) [7,8,17,23]. It has been shown that levels of membrane lipid peroxidation (MLP) and thiobarbituric-acid-reactive substances are elevated in AD brains [16,18]. Several reports have shown that one of the MLP products, 4-hydroxynonenal (4HN), is generated in response to oxidative insults and is found in association with many different neurodegenerative diseases, such as AD [14,17], Parkinson's disease [24], and sporadic amyotrophic lateral sclerosis [22]. We have recently reported that oxidative stress affects the activity of voltage-gated Ca^{2+} channels (VGCCs), and that the currents through VGCCs are significantly increased by treatment with 4HN in cultured dentate granule cells [1,2]. These results suggest that 4HN activates VGCCs in the dentate granule cells, and that this

action is linked to both physiological and pathophysiological events.

Long-term potentiation (LTP) in the hippocampus is a form of synaptic plasticity and is thought to be one of the cellular mechanisms underlying learning and memory. LTP is induced by high-frequency stimulation (HFS), and it requires activation of *N*-methyl-d-aspartate (NMDA) receptors and consequent Ca^{2+} entry into the postsynaptic neurons at least in area CA1 of the hippocampus and the dentate gyrus [5]. Recent studies have demonstrated that not only Ca^{2+} influx through NMDA receptors, but also that through VGCCs or store-operated Ca^{2+} channels play important roles in the induction or regulation of LTP [4,6]. Recently, a link between oxidative stress and modulation of synaptic plasticity has been proposed. It has been demonstrated that physiologically relevant concentrations of hydrogen peroxide (H_2O_2), a membrane-permeable form of reactive oxygen species, modify synaptic plasticity in the hippocampal CA1 region in rats [13]. However, the involvement of 4HN in synaptic plasticity in the hippocampus has yet to be elucidated. To address this

* Corresponding author. Tel.: +81 474 65 5832; fax: +81 474 65 5832.
E-mail address: yoshiito@pha.nihon-u.ac.jp (Y. Ito).