



骨膜由来線維芽細胞の細胞外基質および塩基性線維芽細胞増殖因子産生に及ぼす機械的刺激(牽引刺激)の影響

坂井, 毅
佐浦, 隆一
良川, 昌鳳

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 61(1/2/3):61-68

(Issue Date)

2000-12

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00044695>



骨膜由来線維芽細胞の細胞外基質および塩基性線維芽細胞 増殖因子産生に及ぼす機械的刺激（牽引刺激）の影響

坂 井 毅・佐 浦 隆 一・良 川 昌 鳳

神戸大学医学部整形外科

（指導：水野耕作教授）

連絡先：坂 井 毅

神戸大学医学部整形外科学教室

兵庫県神戸市中央区楠町7-5-1

電話 番 号：078-341-7451

F A X 番 号：078-351-6930

（平成12年10月27日受付）

要 約

ウサギ骨膜由来線維芽細胞（骨膜細胞）に牽引刺激を加え、骨折治癒過程に及ぼす機械的刺激の影響を検討した。まず、骨膜細胞に牽引刺激を加えると非刺激時に比較して $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ の取り込みで示される軟骨性細胞外基質の産生が増加した。一方、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）を添加すると、機械的刺激と同様に $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ の取り込みは増加した。また、牽引刺激により骨膜細胞のbFGF産生が増強されたことから、骨膜細胞の軟骨性細胞外基質の産生促進には機械的刺激による骨膜細胞のautocrine/paracrineなbFGF産生が関与している可能性が示唆された。一方、骨芽細胞ではProtein Kinase C（PKC）を介した、細胞内情報伝達機構が重要な役割を演じていることが知られている。PKC活性化剤である12-O-tetradecanoylphorbol-13acetate（TPA）を骨膜細胞に添加すると細胞外基質の産生が促進されるが、PKCの活性阻害剤である1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine（H-7）の存在下に骨膜細胞に機械的刺激を与えると細胞外基質産生が抑制された。すなわち、牽引刺激は骨膜細胞内PKCの活性化を介して軟骨性細胞外基質の産生を促進している可能性が明らかとなった。以上から、骨折治癒過程において機械的刺激は、骨膜細胞の軟骨性細胞外基質の産生を促進することにより内軟骨性骨化の発現に重要な役割を演じていることが明らかとなった。

緒 言

骨折治癒過程は骨膜細胞の増殖と硝子軟骨形成を伴う内軟骨性骨化を特徴とするが、プロスタグランディンやサイトカインあるいは様々な成長因子がこの過程を制御している¹⁾。このような液性因子は骨折部に形成される血腫に含まれる血小板や血球細胞あるいは骨髓内から誘導される末分化間葉系細胞から放出される。また骨皮質にも種々の成長因子が蓄積されており、様々な刺激により骨折部局所において活性化される¹⁾。

この骨折の治癒過程を制御する生物学的因子の産生および放出については様々な刺激が報告されている²⁾。臨床的に長管骨骨折の治療の際に長軸方向の荷重が仮骨形成を促進させる事³⁾⁻⁵⁾や、逆に不十分な固定により生じる異常可動性が骨折治癒を遅らせることから⁵⁾⁻⁶⁾、骨折部に対する機械的刺激が局所における種々の細胞間の微小環境を変化させる可能性がある。その結果、機械的刺激が何らかの生物学的反応を介して、骨折部の膜性骨化あるいは軟骨性仮骨の骨化を促進あるいは抑制すると考えられる。

このように機械的刺激が骨折治癒過程に影響していることが明らかであるが、その詳細なメカニズムに関しての報告は少ない^{5), 7)}。そこで今回我々は骨折治癒過程に及ぼす機械的影響を検討する目的で、ウサギ骨膜細胞を用いて、軟骨性細胞外基質および塩基性線維芽細胞増殖因子（basic fibroblast growth factor：bFGF）の産生に及ぼす機械的刺激の影響について検討した。また、骨芽細胞では機械的刺激により細胞内Protein kinase C（PKC）が活性化され、種々

Key Words：骨膜細胞，機械的刺激，内軟骨性骨化，塩基性線維芽細胞増殖因子，Protein Kinase C.

の生物学的反応を示すことが報告されている⁸⁾。そこで、機械的刺激による骨膜細胞の活性化に関する細胞内情報伝達機構を解明する目的で、主なる細胞内情報伝達機構のひとつであるPKCの機械的刺激による骨膜細胞の活性化における役割について検討した。

方 法

1. 動物骨折モデルの骨折部における bFGF の局在の検索

骨折治癒過程には、Bone morphogenetic proteins (BMP), 血小板由来成長因子 (PDGF) や bFGF が重要な役割を演じている。中でも bFGF は骨皮質をはじめとして骨折部局所に大量に存在し、骨折治癒過程の中心的な役割を果たす成長因子のひとつである¹⁾⁻²⁾。

そこで、ネブタール投与による全身麻酔下にウイスター系ラット (体重約300g) の脛骨を徒手的に骨折させた骨折モデルを作製し、bFGF の骨折部における局在を検討した。骨折後7日目に、ラットをネブタール大量投与により安楽死させ、骨折部を含む脛骨を摘出した。骨折部周囲の軟部組織を取り除き10%中性ホルマリンを用いて固定後、20%EDTAにて脱灰した。得られた標本をパラフィン包埋後、6 μ Mに薄切し連続切片を作成した。この切片をHE染色および抗 bFGF 抗体 (Promega, Madison, WC) を用いた免疫染色を行い、光学顕微鏡下にラット脛骨骨折部における bFGF の局在を検討した。

2. 骨膜細胞の培養

骨折部に対する機械的刺激の影響を検討する目的で、骨折治癒過程において重要な役割を演じる骨膜細胞を分離培養し、機械的刺激を加えた。実験に用いた骨膜細胞は、成熟日本家兎 (体重: 約3000g) の骨膜より O'Driscoll らの方法に準じて採取した⁹⁾。

家兎脛骨の前内側近位部より無菌的に採取した骨膜の cambium layer を 2 mm角に刻み、外科的メスにて傷を付けたプラスチック培養皿 (Corning, N.Y.) に接着させ、10% fetal calf serum (BIOWHITTAKER Inc., Walkersville, ML) およびL-グルタミンを含む α modification of eagles medium (α -MEM: 大日本製薬) を用いて器官培養した。培養の過程において、この cambium layer より遊走、増殖してきた付着性の細胞を単層培養した。この初代培養細胞がコンフルエントに達する約2週間後に、トリプシン処理により骨膜由来細胞を回収し、I型コラーゲンでコーティングした5 cm²のWellを6個有する培養プレート

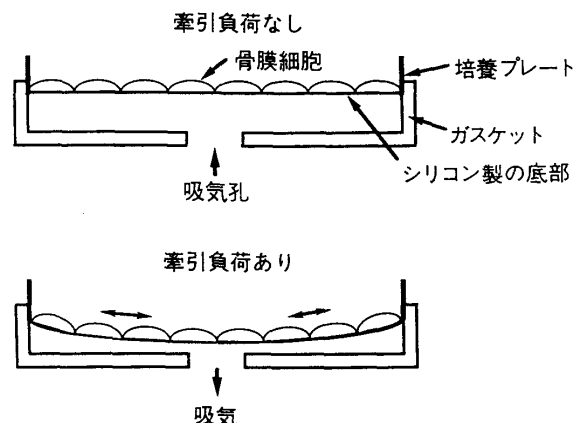


図1. Flexercell strain unitの模式図

FLEX I 培養プレートは可撓性を有する底面を持ち、陰圧を加えることにより底面が変形し、接着している細胞に牽引負荷をかけることができる。陰圧は Flexercell strain unit によりコンピューター制御されており、任意の条件で細胞に牽引負荷をかけることができる。

(FLEX I / II: FLEXCELL INTERNATIONAL CORP.) (図1) に 2.5×10^5 個ずつ播種した。FLEX I 培養プレートは可撓性を有する底面を持ち、吸気口を持つガスケット内に設置し、陰圧をかけることで底面が変形し接着している細胞に牽引負荷をかけることができる。細胞が接着する48時間後、周期的牽引負荷装置 (Flexercell strain unit: FLEXCELL INTERNATIONAL CORP.) を用い、Nishioka¹⁰⁾らの方法に準じて平均伸長率15%, 6cpmで牽引刺激を与え、骨膜細胞の軟骨性細胞外基質と bFGF 産生に及ぼす影響を検討した。

3. 細胞外基質産生の測定

内軟骨性骨化過程では硝子軟骨形成が観察される。そこでまず骨膜細胞の bFGF の硝子軟骨形成に及ぼす影響を検討するために、10ng/ml の bFGF (Progen Biotechnik GmbH Heidelberg) の存在下で骨膜細胞を48時間培養し、細胞内および細胞外基質への $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ の取り込みを塩化セチルピリミジウム沈殿法¹¹⁾を用いて測定した。また同時に、牽引刺激の骨膜由来細胞への影響を検討するために、牽引刺激下48時間培養後の $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ の取り込みを測定し軟骨性細胞外基質産生の指標とした¹²⁾⁻¹⁴⁾。bFGF 非刺激群あるいは牽引刺激非負荷群を対照群とし、軟骨性細胞外基質の産生は対照群との%で示した。

4. bFGF の測定

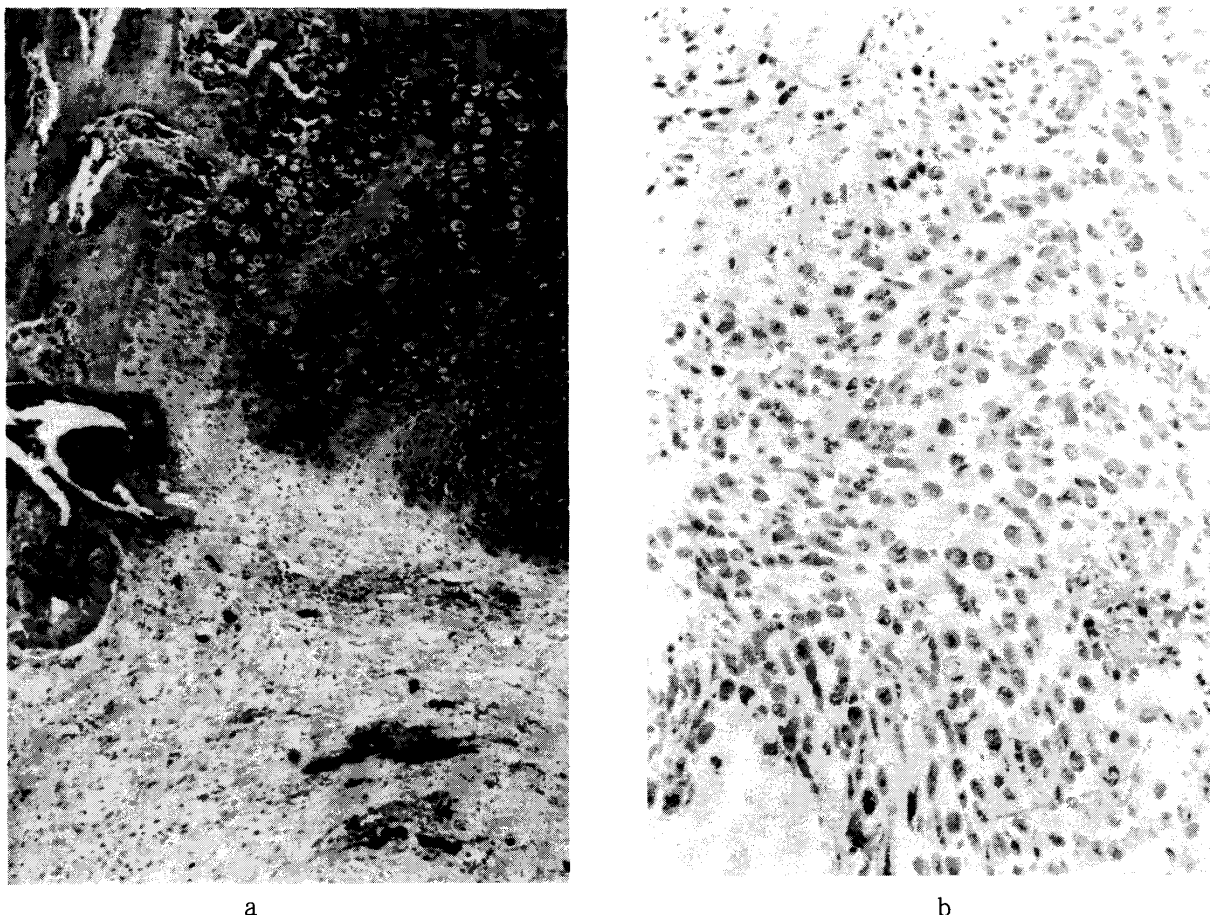


図2. 動物骨折モデルの骨折部におけるbFGFの局在

a: 骨折後7日目の動物骨折モデルの骨折部周辺には、旺盛な硝子軟骨形成を伴う軟骨性仮骨の形成が観察される(HE染色, Original magnification: $\times 20$)。

b: 骨折部周辺に形成された軟骨仮骨内の軟骨細胞およびその周囲に増殖した骨膜細胞内には抗bFGFと反応し、ABC法(Avitin-Biotin-peroxidase complex method)で染色されるbFGFが認められる(Original magnification: $\times 50$)。

骨折治癒の全過程においてbFGFが骨折部局所に観察されることが報告されている¹⁾。そこで骨膜細胞のbFGF産生を検討するために、骨膜細胞を牽引刺激下48時間培養後に1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)および1% Tween 20(和光純薬)を含むリン酸緩衝食塩水(PBS)にて可溶化し、細胞内bFGF量をEIA法(Perseptive Biosystems)を用いて測定し、対照群と比較検討した。

5. PKC活性化剤及びPKC活性阻害剤の存在下における機械的刺激の軟骨性細胞外基質産生に及ぼす影響

機械的刺激による骨膜細胞の活性化に関して細胞内情報伝達機構のひとつであるPKCに注目し¹⁵⁾、機械的刺激による細胞外基質産生におけるPKCの役割についても検討した。骨膜細胞にPKC活性化剤である12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)¹³⁾を種々の濃度で添加し、48時間培養後の $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ の取り

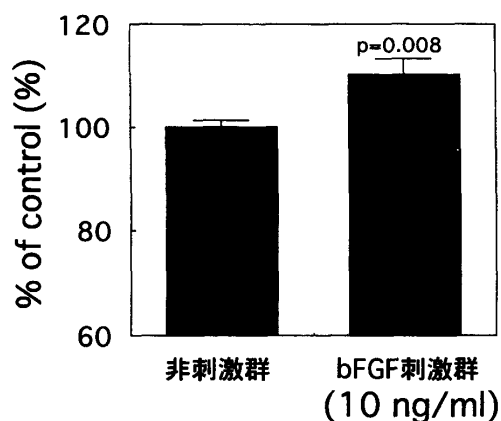


図3. ウサギ骨膜細胞の細胞外基質産生に及ぼすbFGFの影響

成熟日本家兎骨膜より採取した培養骨膜細胞を10ng/mlのbFGFの存在下で48時間培養すると、細胞内および細胞外基質への $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ の取り込みはbFGF非刺激群(取り込まれた $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ の比放射活性, 385309 $\pm$ 5558.48cpmを100%とする)と比較して10.2 $\pm$ 3.25%増加していた(Student's t検定: $p=0.008$)。

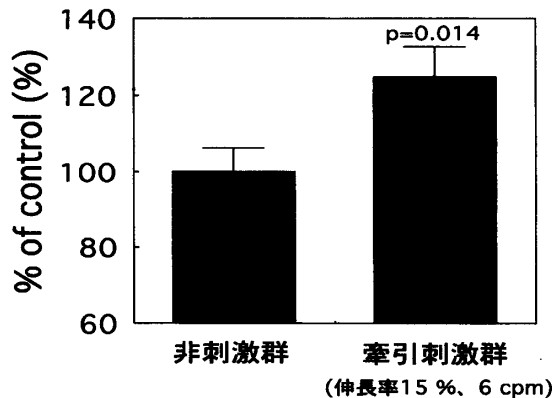


図4. ウサギ骨膜細胞の細胞外基質産生に及ぼす牽引刺激の影響

ウサギ骨膜細胞を FLEX I/II 培養プレートを用いて牽引刺激（平均伸長率15%，6cpm）を加え48時間培養した。牽引刺激群では非刺激群（取り込まれた $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ の比放射活性， 48053.6 ± 3011.94 cpmを100%とする）に比較して骨膜細胞の細胞内および細胞外基質への $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ の取り込みは， $24.7 \pm 8.22\%$ 増加していた（Student's t 検定： $p=0.014$ ）。

表1. ウサギ骨膜由来細胞の bFGF 産生に及ぼす牽引刺激の影響

機械的刺激の有無	bFGF産生量(mean±SD) (ng/2.5×10 ⁵ cells)	p value (Student's t-test)
牽引刺激なし	7.37±0.577	----
牽引刺激あり (平均伸長率 15%, 6cpm)	8.82±0.654	0.045

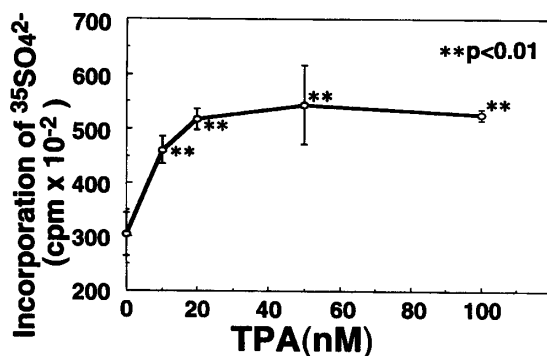


図5. 骨膜細胞の細胞外基質産生に及ぼす PKC 活性化剤の影響

ウサギ骨膜細胞にPKC活性化剤であるTPAを種々の濃度で添加し，48時間培養後の $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ の取り込みを測定した。骨膜細胞の細胞内および細胞外基質への $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ の取り込みは，添加したTPAの濃度依存性に促進され，50nMの濃度で最大77%の促進効果がみられた。

込みを測定した。また，PKC 活性阻害剤である1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine(H-7)¹⁶⁾を添加し牽引刺激下48時間培養後の $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ の取り込みを測定した。

6. 統計学的検討

異なる3個のWellから得られた骨膜細胞の細胞外基質およびbFGF産生量の平均値の検討はStudent's t 検定を用いて行い， $p<0.05$ を統計学的有意差ありとした。

結 果

1. 動物骨折モデルの骨折部における bFGF の局在および bFGF の骨膜細胞の細胞外基質産生に及ぼす影響

動物骨折モデルの骨折部を組織学的に検索すると骨折後7日目の脛骨骨折部周辺には，旺盛な硝子軟骨形成を伴う軟骨性仮骨の形成が観察され，軟骨細胞およびその周囲に増殖した骨膜細胞内にはbFGFの局在が示された（図2）。

そこで，このbFGFの軟骨性仮骨の形成に及ぼす影響を検討するために，10ng/mlのbFGFの存在下で骨膜細胞を48時間培養すると，細胞内および細胞外基質への $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ の取り込みはbFGF非刺激群と比較して $10.2 \pm 3.25\%$ 増加していた（図3）。すなわち，bFGFは骨折部局所において骨膜細胞を刺激することにより軟骨性細胞外基質の産生を促進し，内軟骨性骨化に重要な役割を演じている可能性が示唆された。

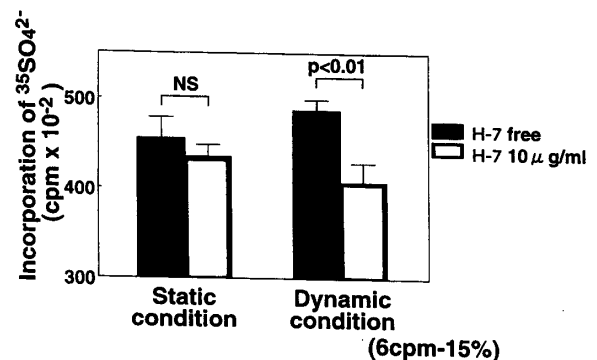


図6. 牽引刺激による骨膜細胞の細胞外基質産生促進に及ぼす PKC 阻害剤の影響

PKCの酸素活性阻害剤であるH-7(10μg/ml)を添加し，牽引刺激および非牽引刺激下48時間培養後の $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ の取り込みを測定したところ，H-7非存在下には機械的刺激により明らかな細胞外基質産生の促進が観察されたが，H-7を添加することによりこの機械的刺激による細胞外基質産生促進作用は，もとのレベルにまで抑制された。

2. 骨膜細胞の細胞外基質産生に及ぼす牽引刺激の影響

次に、骨膜細胞の細胞外基質産生に及ぼす牽引刺激の影響を検討するために、底面がシリコン製 (FLEX I) 培養プレートを用いて、骨膜細胞に牽引刺激 (平均伸長率15%, 6 cpm) を加えた。牽引刺激下に48時間培養後の骨膜由来細胞の細胞内および細胞外基質への $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ の取り込みは、底面がプラスチック製 (FLEX II) 培養プレートを用いて培養した非牽引刺激群に比較して $12.1 \pm 1.60\%$ 増加していた (図4)。

3. 骨膜細胞のbFGF産生に及ぼす牽引刺激の影響

骨膜細胞のbFGF産生に及ぼす牽引刺激の影響を検討するために、骨膜細胞内のbFGF量を測定した。骨膜細胞をFLEX II培養プレートを用いて48時間培養すると非牽引刺激下では $7.37 \pm 0.577\text{ng}/2.5 \times 10^5$ cells のbFGFの産生が観察された。一方、FLEX I培養プレートを用いて平均伸長率15%, 6cpmの牽引刺激下に骨膜細胞を48時間培養するとbFGFの産生は $8.82 \pm 0.654\text{ng}/2.5 \times 10^5$ cells へ増加していた (表1)。

4. 骨膜細胞の細胞外基質産生に及ぼすTPAおよびH-7の影響

細胞内情報伝達機構のひとつであるPKCの役割について検討するために、PKC活性化剤であるTPAを種々の濃度で添加し、48時間培養後の $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ の取り込みを測定した。骨膜細胞の細胞内および細胞外基質への $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ の取り込みは、添加したTPAの濃度依存性に促進され、50nMの濃度で最大77%の促進効果がみられた (図5)。一方、PKCの酵素活性阻害剤であるH-7 ($10\mu\text{M}/\text{ml}$) を添加し、牽引刺激および非牽引刺激下48時間培養後の $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ の取り込みを測定したところ、H-7非存在下には機械的刺激により明かな細胞外基質産生の促進が観察されたが、H-7を添加することによりこの機械的刺激による細胞外基質産生促進作用は、もとのレベルにまで抑制された (図6)。すなわち、骨膜細胞の細胞外基質産生にはPKCの活性化が重要であり、機械的刺激はこのPKCの活性化を介して、細胞外基質産生の促進を行っていると考えられた。

考 察

骨折治癒過程において骨膜細胞や骨髄末分化間葉系細胞などの細胞成分が重要な役割を演じており、これらの細胞成分の増殖や分化を調節する種々の成長因子

やサイトカインの存在が明らかにされている^{1~2)}。また、これらの因子に加えて適切な機械的刺激が骨折治癒過程に重要であることも明らかになってきている^{4, 17)}。

これまで、臨床的には機械的刺激が骨折治癒過程を促進させたり、あるいは遅延させたりすることが報告されているが^{3, 5, 6, 17)}、その機構については不明な点が多い。骨折治癒過程に対する機械的刺激の影響については、Flexercell strain unitによる周期的牽引刺激により骨芽細胞様細胞のDNA合成やコラーゲン性蛋白の合成が促進する事が報告されている¹⁰⁾。また、周期的牽引刺激がこの細胞のALP活性を増加させること¹⁰⁾から、機械的刺激が骨芽細胞の代謝を調節し、骨折治癒過程において膜性骨化を促進している可能性が大きい。

一方、内軟骨性骨化に及ぼす機械的刺激の影響については、ラット関節円盤に対する機械的刺激が硝子軟骨の主要構成成分であるコンドロイチン6硫酸の産生を増加させること¹²⁾や、ラット頭蓋骨由来骨芽細胞に対する間欠的静水圧圧迫刺激がTransforming growth factor- β (TGF- β) の産生を促進すること¹⁸⁾から、機械的刺激が骨折治癒過程において膜性骨化ばかりでなく軟骨性仮骨形成も促進する可能性がある。

今回のウサギ培養骨膜由来細胞を用いた検討では、培養細胞に平均伸長15%, 6cpmの牽引刺激を加えると、骨膜由来細胞からのbFGFの産生が刺激されると同時に $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ の取り込みで示される軟骨性細胞外基質の産生が増強した。骨折治癒過程におけるbFGFの作用については、bFGF mRNAが骨折治癒過程全般にわたり骨折部に発現していることが報告されている¹⁾。また、bFGF投与により骨折治癒過程は促進されない²⁾が骨折部での仮骨形成量が増加すること¹⁹⁾や、bFGFは鶏胚由来の幼若軟骨細胞のsyndecan-3 (bFGF受容体) の発現を増強することにより軟骨細胞の増殖を促進し内軟骨性骨化過程を制御している²⁰⁾ことから、bFGFは骨折仮骨形成およびその骨化過程に重要な役割を演じていることが示唆される。これまでに機械的刺激によるbFGFの産生調節に関しては、血管平滑筋細胞が3次元コラーゲン培養下の圧迫刺激によりautocrineあるいはparacrineのbFGF産生を介して細胞増殖が促進されること²¹⁾が報告されているが、骨膜細胞に関する報告はない。

さて、機械的刺激に対する細胞内情報伝達機構として、軟骨細胞や骨肉腫由来骨芽細胞では機械的刺激による細胞表面のインテグリン分子の分布変化とこのイ

ンテグリン分子を介した細胞内へのシグナル伝達機構が報告されている²²⁻²³⁾。またラット骨芽細胞を用いた検討では、PKCの活性化を介して、このシグナルが伝達されることが明らかにされている⁸⁾。

関節軟骨細胞を用いた検討では、PKCの直接的な活性化により細胞外基質 (Glycosaminoglycan) の産生が増加することが報告されている¹⁴⁾。今回の検討において骨膜細胞の細胞外基質の産生は、TPAによる細胞内PKCの活性化によって、TPAの濃度依存性に促進された。また、PKC活性化阻害剤であるH-7の添加により阻害された。これらの実験結果から、骨膜細胞においても細胞外基質の産生調節にはPKCの活性化が関与していることが示唆された。

一方、bFGFも受容体のチロシンキナーゼの活性化を介して細胞内へ情報を伝達するが、この場合にもPKCの活性化を伴っている²⁴⁾ことから、本研究において観察された牽引刺激による骨膜細胞の細胞外基質産生の増加は、機械的刺激による直接的な膜表面接着分子の分布変化を介したPKCの活性化およびbFGFのautocrine/paracrineな産生を介して引き起こされている可能性があり、この点についてはさらに今後の検討を要する。

結 語

1. 機械的刺激は骨膜細胞のbFGF産生を増強するばかりでなく、軟骨性細胞外基質の産生を促進し、骨折治癒過程における内軟骨性骨化過程に重要な役割を演じていることが示唆された。

2. 軟骨性細胞外基質の産生調節において、PKCを介する細胞内情報伝達系が重要な役割を果たしている。

謝 辞

この研究に対して多くのご教示を頂いた整形外科科学講座の水野耕作教授に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Bolander, M.E.: Regulation of fracture repair by growth factors. *Pro. Soc. Exp. Bio. Med.* 200 : 165-170, 1992.
- 2) Bland, Y.S., Critchlow, M.A., Ashhurst, D.E.: Exogenous fibroblast growth factors-1 and -2 do not accelerate fracture healing in the rabbit. *Acta.Orthop. Scand.* 66 : 543-548, 1995.
- 3) Sarmiento, A.: Functional bracing of tibial fractures. *Clinical Orthop.* 105 : 202-219, 1974.
- 4) 大野拓也, 並木 脩, 西山嘉信: 骨折治癒過程における骨膜性仮骨の関与に関する研究 骨膜性仮骨形成を賦活化したモデルを中心に 骨折, 18 : 629-634, 1996.
- 5) Goodship, A.E., Kenwright, J.: The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures. *J. Bone Joint Surg.* 67B : 650-655, 1985.
- 6) Wray, J.B.: Factors in the pathogenesis of Non-Union. *J. Bone Joint Surg.* 47A : 168-173, 1965.
- 7) Hasegawa S.: Mechanical stretching increases the number of cultured bone cells synthesizing DNA and alters their pattern of protein synthesis. *Calcifi. Tissue Int.* 37 : 431-436, 1985.
- 8) Carvalho, R.S., Scott, E.J., Suga, D.M., Yen, E.H.K.: Stimulation of signal transduction pathways in osteoblasts by mechanical strain potentiated by parathyroid hormone. *J. Bone Miner. Res.* 9 : 999-1011, 1994.
- 9) O'Driscoll, S.W., Recklies, A.D., Poole, A.R.: Chondrogenesis in periosteal explants. *J. Bone Joint Surg.* 76A : 1042-1051, 1994.
- 10) Nishioka, S., Fukuda, K., Tanaka, S.: Cyclic stretch increases alkaline phosphatase activity of osteoblast-like cells : a role for prostaglandin E2. *Bone and Mineral.* 21 : 141-150, 1993.
- 11) Kato, Y., Nomura, Y., Daikuhara, Y., Nasu, N., Tsuji, M., Asada, A., Suzuki, F.: Cartilage-derived factor (CDF): Stimulation of proteoglycan synthesis in rat and rabbit costal chondrocytes in culture. *Exp. Cell Res.* 130 : 73-81, 1980.
- 12) Carvalho, R.S., Yen, E.H.K., Suga, D.M.: Glycosaminoglycan synthesis in the rat articular disk in response to mechanical stress. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 107 : 401-410, 1995.
- 13) Arner, E.C., Pratta, M.A.: Modulation of interleukin-1-induced alterations in cartilage proteoglycan metabolism by activation of protein kinase C. *Arthritis Rheuma.* 34 : 1006-1013, 1991.
- 14) 木村琢也, 藤岡宏幸, 松原 司, 伊藤宏: 培養関

- 節軟骨細胞の基質合成におけるプロテインキナーゼCの役割, 臨床リウマチ, 5 : 240-246, 1994.
- 15) Nishizuka, Y.: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 308 : 693-698, 1984.
 - 16) Kawamoto, S., Hidaka, H.: 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) is a selective inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125 : 258-264, 1984.
 - 17) Lanyon, L.E., Rubin, C.T.: Static vs dynamic loads as an influence on bone remodelling. *J.Biomech.* 17 : 897-905, 1984.
 - 18) Klein-Nulend, J., Roelofsen, J., Sterck, J.G.H., Semeins, C.M., Burger, E.H.: Mechanical loading stimulates the release of transforming growth factor- β activity by cultured mouse calvariae and periosteal cells. *J.Cell Physiol.* 163 : 115-119, 1995.
 - 19) Kawaguchi, H., Kurokawa, T., Hanada, K., Hiyama, Y., Tamura, M., Ogata, E., Matumoto, T.: Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology.* 135 : 774-781, 1994.
 - 20) Shimazu, A., Nah, H.D., Kirsch, T., Koyama, E., Leatherman, J.L., Golden, E.B., Kosher, R.A., Pacifici, M.: Syndecan-3 and the control of chondrocyte proliferation during endochondral ossification. *Exp. Cell. Res.* 229 : 126-136, 1996.
 - 21) Cheng, G.C., Libby, P., Grodzinsky, A.J., Lee, R.T.: Induction of DNA synthesis by a single transient mechanical stimulus of human vascular smooth muscle cells. Role of fibroblast growth factor-2. *Circulation* 93 : 99-105, 1996.
 - 22) Carvalho, R.S., Yen, E.H.K., Suga, D.M.: A molecular mechanism of integrin regulation from bone cells stimulation by orthodontic forces. *Eur. J. Orthod.* 18 : 227-235, 1996.
 - 23) Holmval, K. Camper, L., Johansson, S., Kimura, J. H., Lundgren-Akerlund, E.: Chondrocyte and chondrosarcoma cell integrins with affinity for collagen type II and their response to mechanical stress. *Exp.Cell.Res* 221 (2) : 496-503, 1995.
 - 24) Shaoul, E., Reich-Slotky, R., Berman, B., Ron, D.: Fibroblast growth factor receptors display both common and distinct signaling pathways. *Oncogene* 10 : 1553-1561, 1995.

The effect of mechanical stress on the extracellular matrix and
basic fibroblast growth factor synthesis by
periosteum derived fibroblasts in vitro

Tsuyoshi Sakai, Ryuichi Saura, Masaho Yoshikawa

Department of Orthopaedic Surgery . Kobe University School of Medicine

Abstract

The effect of mechanical stress on periosteum was examined using a computerized, pressure-operated instrument that physically deforms the cells in vitro. Mechanical stress stimulated glycosaminoglycan (GAG) synthesis as shown by increased incorporation of $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ and also stimulated the production of basic fibroblast growth factor (bFGF) measured by EIA. Similar enhancement was obtained by addition of exogenous bFGF into the cultures. It is, therefore, suggested that bFGF has a critical role in the increase of GAG synthesis by periosteum. It is known that dentoalveolar osteoblasts respond to mechanical stress through increasing protein kinase C (PKC) activity. To elucidate the role of PKC in signal transduction mediating mechanical stress on periosteum derived cells, the effect of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), an activator of PKC on GAG synthesis was investigated. TPA increased GAG synthesis by periosteum in a dose-dependent manner. On the other hand, mechanical stress-induced enhancement of GAG synthesis were reduced almost to the control level by addition of 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7), an inhibitor of PKC. Thus, these results suggest that mechanical stress-induced enhancement of GAG synthesis by periosteum may be regulated by activation of PKC. It is reported that PKC activation is mediated by interaction of matrix molecule and integrins during mechanical stress. Therefore further experiments are required for detecting the precise mechanism of matrix-cell interaction mediating mechanical stress in GAG synthesis.