

平成12年度
厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
研 究 報 告 書

廃用性骨萎縮のメカニズムと治療法の開発

平成13年3月

主任研究者 池田 恭治

平成12年度 研究報告書 目次

1. 総括研究報告書 1

廃用性骨萎縮のメカニズムと治療法の開発 2

国立長寿医療研究センター

老年病研究部 部長

池田 恭治

2. 分担研究報告書 9

1. 骨細胞が発現する遺伝子群の同定と機能解析 10

国立長寿医療研究センター

老年病研究部 部長

池田 恭治

2. 骨細胞における遺伝子発現と機能解析 15

神奈川歯科大学

口腔生化学教室 講師

高垣 裕子

3. 荷重刺激に対する骨形成反応における iNOS の役割 20

産業医科大学

整形外科教室 教授

中村 利孝

1. 総括研究報告書

厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)
総括研究報告書

廃用性骨萎縮のメカニズムと治療法の開発

主任研究者 池田恭治(長寿医療研究センター 老年病研究部長)

研究要旨

ラット頭蓋冠から単離した骨細胞の cDNA ライブラリーを作成し、レトロウイルスを用いたシグナルシーケンストラップ法により、148クローン63種類の遺伝子(うち4種類が新規)を同定した。さらにこれまで定法とされてきた頭蓋冠由来骨細胞に加えて、機械的負荷への反応性がより高いと考えられる骨細胞のソースとして、ラットおよびマウスの長管骨から骨細胞を単離する方法を開発した。iNOS ノックアウトマウスを用いて、荷重刺激に対する骨形成反応に骨芽細胞の iNOS が産生する NO が必須の役割を果たすことを明らかにした。

キーワード: 骨粗鬆症、寝たきり、力学的負荷、骨細胞、遺伝子、NO

池田 恭治 長寿医療研究センター
老年病研究部
部長

高垣 裕子 神奈川歯科大学
口腔生化学教室
講師

中村 利孝 産業医科大学
整形外科学教室
教授

それらが果たす機能については(硬組織に埋没した骨細胞を単離することの困難さゆえ)ほとんど知られていない。したがって、骨における機械的刺激の受容の程度を体外から診断し、骨細胞の機能を賦活化するような薬物も存在しない。

本研究の目的は、高純度で単離した骨細胞の cDNA ライブラリーから、レトロウイルスを用いたシグナルシーケンストラップ法によって、骨細胞に特異的に発現する遺伝子群、とりわけ膜・分泌蛋白を同定し、ノックアウトマウスを作成して、細胞のみならず組織レベルでの機能解析を行うことである。これらの研究と並行して、NOS、COX などのノックアウトマウスを用い、NO やプロスタグランジンが mechanotransduction に果たす役割を *in vivo* で明らかにすることも計画した。

A. 研究目的

高齢者における運動低下や寝たきり状態は、骨の粗鬆化を加速させる大きな要因であるが、臥床時の免荷や運動・重力による荷重などの機械的刺激が、どのようなメカニズムで骨で感知され、どのようなシグナル伝達系を介して骨代謝を調節しているかはほとんど解明されておらず謎のままである。とりわけ、骨にもっとも多く存在し、機械的刺激を受ける上で主要な細胞と考えられている骨細胞(osteocyte)が発現する遺伝子群と

B. 研究方法

1. 骨細胞が発現する遺伝子群の探索

cDNA ライブラリー(N 末側)とシグナルシーケンスを欠いた恒常的活性化型 thrombopoietin receptor の C 末側(C 末側)の

融合蛋白を、レトロウィルスを用いて、IL-3 依存的な増殖を示す Ba/F3 cell (pro B cell)に発現させる。cDNA が signal sequence を有する場合、融合蛋白は常時活性化型 thrombopoietin receptor の C 末側中の transmembrane domain を介して Ba/F3 cell の細胞膜にアンカーされる。この常時活性化型 thrombopoietin receptor は細胞膜にアンカーされることによって、細胞増殖シグナルを発するため、IL-3 非依存的な増殖が可能となる。シグナルシーケンストラップ (SST-REX) 法は、IL-3 非存在下での増殖を指標にシグナルシーケンスをもつ遺伝子、すなわち細胞膜蛋白質や分泌蛋白質の cDNA を単離する方法である。

具体的には、ラット頭蓋冠の骨片より outgrowth してきた細胞を骨細胞として得、骨調製した mRNA から cDNA ライブラリーを作製し、pMX-SST ベクター (N 末端側の cDNA と signal sequence を欠いた恒常的活性化型 thrombopoietin receptor の融合蛋白を発現するベクター) に組込んだ。

IL-3 非存在下で増殖した細胞を回収し、調製した genomic DNA から、pMX ベクタープライマーを用いた PCR により、Ba/F3 cell に導入された cDNA 由来の部位を増幅後、sequencing を行った。そのうち未知の蛋白質をコードする遺伝子について、得られた cDNA を用いてノーザンブロッティングを行い組織発現および遺伝子サイズを決定するとともに、EST 検索及び RT-PCR によって cDNA 全長を取得し、コード蛋白を決定した。

2. 高純度で骨細胞を単離する方法の開発

これまでは、主に仔ラット頭蓋冠より単離した骨細胞を用いてきたが、この骨細胞は長管骨骨細胞とは発生学的に由来が異なり、しかも頭蓋冠はあまり負荷を受けない骨であるため、骨細胞の主たる機能である力学的負荷に対する応答と情報伝達を研究する際に問題となる。そこで、これまでの方法をマウスおよびラットの大腿骨に応用し、骨細胞の単離を試みた。生後一日の動物より大腿骨を取り出し、軟組織と骨髓を

除去後、0.2mg/ml のシグマ DNase を含む細胞分散用コラゲナーゼ溶液 (1mg/ml) 25ml 中、37 度で振盪する。30 分後取り出してピペッティング操作をくりかえして骨片を洗浄し、静置培養する。事前に Matrigel を薄くコートし手早く乾燥させた 100 mm の培養皿をもちいる。1 週間後外生した細胞がフィブロブラストの形態を示すときは、骨片を集めて 0.25% トリプシンで 20 分ほど振盪し、再びピペッティング操作をくりかえして骨片を洗浄して 100 mm の培養皿に移す。数週間後外生した細胞が突起をたくさん出現させていればサンプルとして回収する。サブコンフルエントとなっても、その細胞密度は、骨芽細胞の到達する密度より 1 桁以上低い。必要に応じてこの操作を繰り返す。別にカバーガラスの上にシリコンゴムでできた枠を載せることにより、小さな培養用 well を作製、その後 10^4 cells/ml に調整した細胞を少量播種、通常通りに長期間培養することができる。同一の培養条件で、1) Ca イメージングの実験、2) パッチクランプ法による解析、3) 微量のサンプルを用いる RT-PCR 法などの解析には後者を供する。なおこの方法はヒト下顎骨及び大腿骨より得た海綿骨にもそのまま応用できる。

3. 力学的負荷に対する骨反応に果たす iNOS の役割

8 週齢の雄性、iNOS ノックアウトマウス (-/-) と wild type マウス (+/+) を用いた。海綿骨量の変化に関しては、heterozygous マウス (+/-) も用いた。尾部懸垂により、1 週間の非荷重、その後 2 週間の再荷重実験を行い、週齢をマッチさせた正常荷重群と比較した。スタート時、処置後 1、3 週の時点で屠殺した。実験のプロトコールは、産業医科大学動物実験倫理委員会において承認されている。

骨動態に対する iNOS の影響を知るために、脛骨近位二次海綿骨での骨形態計測を行った。骨量 (BV/TV)、骨石灰化速度 (MAR)、骨形成率 (BFR/BS)、破骨細胞数

(Oc.N/BS)、破骨細胞骨接触面(Oc.S/BS)を調べた。尾部懸垂後の骨髄における骨芽細胞の分化増殖に対するiNOSの影響を知るために、脛骨から骨髄細胞を採取した。Dexamethazone、ascorbic acid 存在下の α -MEMで細胞培養し、培養21日目にmineralized noduleの形成を測定した。

C. 研究結果と考察

1. 骨細胞が発現する遺伝子群の探索

シグナルシーケンストラップ法により、148クローン63種類を単離した。うち4種が新規遺伝子、144個59種が既知の遺伝子であった。既知遺伝子の内訳は、85遺伝子(57%)19種が分泌蛋白、34遺伝子(23%)18種が膜蛋白、6遺伝子(4%)4種が小胞体蛋白、1遺伝子がゴルジ体蛋白、12遺伝子(8%)11種が細胞質蛋白、1遺伝子が核蛋白、4遺伝子(3%)4種が局在不明な蛋白をそれぞれコードするもので、1遺伝子がPseudogeneであった。細胞質蛋白などのsignal sequenceを持たない蛋白をコードする遺伝子が単離された原因としては、単一Ba/F3 cellへのレトロウィルスの重複感染が考えられる。

既知遺伝子と相同性が認められない4クローン(OSYSST35, 46, 83, 108)中、ノーザンブロットイングにより発現が確認できたのは2クローン(OSYSST46, 83)であった。OSYSST46は約2.5kb, 5.0kbのmRNAが肝と腎で、OSYSST83は約0.8kbのmRNAが肝で発現していることが確認された。この2クローンについては、EST検索とRT-PCRにより全長と考えられるそれぞれ2297bp, 733bpを決定した。OSYSST46は528アミノ酸の蛋白をコードすること、この蛋白はhypotetical proteinであるDKFZp564J102(human)、KIAA0974(human)とそれぞれ対応する領域において67%, 32%のホモロジーを持つことが確認され、ファミリーを形成していることが考えられたが、signal sequenceはか有意なモチーフは認められなかった。OCYSST83についてはORFが確認されなかった。また、この2クローンはいずれもRT-PCRにより、KUSA-A1(骨芽細胞)、MC3T3-E1(骨芽

細胞)、C2C12(筋芽細胞)、ST2(ストローマ細胞)細胞株における発現がみられ、骨細胞に特異的な発現をするものではなかった。得られたクローンはかなりの比率(148クローン中32クローン:22%)でコラーゲン、オステオポンチン等の初期または中期骨芽細胞マーカーを含んでいることから、今回用いたラット骨細胞由来のSST-REX cDNAライブラリーには骨芽細胞由来のものが混在している可能性が考えられた。

2. 高純度で骨細胞を単離する方法の開発

今回新たに開発した方法で外生させた細胞を、順次骨細胞 I, II, III.....と呼ぶが、数を増すにつれてアルカリフォスファターゼの発現レベルを低下させ、オステオカルシンの発現レベルを上昇させる。2-3ヶ月の間はこの方法でより骨細胞的な形態の細胞サンプルを採取し続けることができる。得られた細胞は、伸展刺激に応答してIGF-Iやオステオカルシンのメッセージレベルを上昇させることが確認された。

3. 力学的負荷に対する骨反応に果たすiNOSの役割

海綿骨量は、非荷重後1週で、iNOS(+/-)、(+/-)、(-/-)は同程度に有意に減少した。再荷重で、iNOS(+/-)は、正常荷重群レベルまで増加したのに対し、(-/-)は低下したままであった。iNOS(+/-)は、(+/-)と(-/-)の中間の値まで増加した。骨形成率は、非荷重後1週で、iNOS(+/-)と(-/-)は同程度に低下した。再荷重で、iNOS(+/-)は、正常荷重群レベルまで増加したのに対し、(-/-)は低下したままであった。破骨細胞数および破骨細胞骨接触面は、非荷重後1週で、iNOS(+/-)と(-/-)は同程度に増加した。再荷重で、iNOS(+/-)は、正常荷重群レベルまで低下したのに対し、(-/-)は増加したままであった。

非荷重後の再荷重時の骨量増加、骨形成率の増加、破骨細胞骨接触面の低下にiNOS由来のNOが必須であるか否かを確認するた

めに NO ドナーと NO 産生阻害薬を用いた。再荷重時に、iNOS(+/+)に NOS inhibitor である aminoguanidine を投与すると、骨量と骨形成率は低下したままであった。破骨細胞骨接触面は増加したままであった。一方、iNOS(-/-)に NO donor である nitroglycerin を投与すると、骨量、骨形成率、破骨細胞骨接触面は、正常荷重群レベルになった。

骨髓細胞培養実験で、mineralized nodule の形成は、非荷重後 1 週の脛骨から採取した骨髓細胞では、iNOS(+/+)と(-/-)は同程度に低下した。再荷重の脛骨から採取した骨髓細胞では、iNOS(+/+)は正常荷重群レベルまで増加したのに対し、(-/-)は低下したままであった。

今回の骨形態計測、骨髓細胞培養の結果から、尾部懸垂による非荷重では、iNOS 遺伝子の有無に関係なく、骨量減少、骨形成低下、骨吸収亢進が認められた。一方、再荷重に対する骨形成ないし骨吸収抑制反応は、iNOS(-/-)で欠如し、nitroglycerin の投与で回復、wild type においても aminoguanidine 投与により抑制されたことから、iNOS 遺伝子由来の NO は、非荷重後の再荷重における骨反応に必須であることが明らかとなった。

Chow らの報告 (J Bone Miner Res 13, 1998) では、椎体への力学刺激により骨形成率が増加すること、NO donor の投与によりさらに増加すること、さらにその力学刺激 15 分前に NO inhibitor の L-NMMA 投与により椎体の骨形成の増加が抑制されること、力学刺激 6 時間後の L-NMMA 投与では効果がみられないことが示されている。本実験の結果と合わせて考えると、in vivo で、力学刺激による骨形成の増加には、NO の存在は必須と考えられる。NO 合成酵素の 3 つの isoform のうち、iNOS と eNOS が骨組織に認められている。今回、RT-PCR の実験データを示していないが、非荷重ならびに再荷重時に、iNOS(+/+)と(-/-)のマウス脛骨で、有意差なく恒常的に eNOS mRNA の発現を認めた。Turner らの報告 (Bone 21, 1997) では、eNOS の抑制は骨形成に変化を与えなかった。力学刺激が及ぼす骨

動態の変化に、eNOS の関与はないようである。通常の荷重状態における iNOS の関与はいまだ不明な点が多いが、iNOS inhibitor の aminoguanidine 投与によりラット脛骨の骨形成が低下したと Turner ら (Bone 21, 1997) は報告している。本実験でも、aminoguanidine を投与した正常荷重マウスにおいて、骨形成率が減少していた。通常の荷重状態における骨形成の維持にも iNOS は重要な役割を演じている可能性がある。

D. 結論

骨細胞の cDNA ライブラリーにおいて、レトロウイルスを用いたシグナルシーケンストラップ法により、148 クローン 63 種類の遺伝子 (うち 4 種類が新規) を同定した。今後、機械的負荷への反応性がより高いと考えられる骨細胞のソースとして、ラットおよびマウスの長管骨から骨細胞を単離する方法を開発した。iNOS ノックアウトマウスを用いて、荷重刺激に対する骨形成反応に骨芽細胞が発現する iNOS が産生する NO が必須の役割を果たすことを明らかにした。

E. 研究発表

主任研究者

1. 論文発表

Masuda Y, Sasaki A, Ikeda K, Watanabe K. Dlxin-1, a novel protein that binds Dlx5 and regulates its transcriptional function. J Biol Chem 2001 in press

Sasaki A, Masuda Y, Ikeda K, Watanabe K. Filamin associates with Smads and regulates TGF- β signaling. J Biol Chem 2001 in press

池田恭治: 退行期骨粗鬆症の病態生理 ホルモンと臨床 48:4-12, 2000

池田恭治: 骨粗鬆症の予防と治療 Geriatric

Medicine 38:1663-1669, 2000

池田恭治: 21世紀の骨粗鬆症研究を考える
Aging & Health

2. 学会発表

柴田 猛、白石綾子、佐藤卓也、正木敏美、
佐々木文、増田芳子、東佐由美、内田泰弘、
斉藤元男、伊東昌子、尾形悦郎、渡辺 研、
池田恭治 活性型ビタミンDの骨吸収に及
ぼす in vivoでの効果 第18回日本骨代謝
学会 平成12年7月19日~22日 広島

佐々木文、増田芳子、池田恭治、渡辺 研
アクチン結合蛋白 Filamin による Smad シ
グナル経路の制御 第18回日本骨代謝学
会 平成12年7月19日~22日 広島

綿貫 誠、酒井昭典、阪田武志、鶴上 浩、
三輪政夫、内田泰弘、渡辺 研、池田恭治、
中村利孝 非荷重後の再荷重における骨形
成の亢進は NO に依存する
第18回日本骨代謝学会 平成12年7
月19日~22日 広島

Sasaki A, Ohta Y, Ikeda K, and Watanabe K.
Filamin, a Cytoskeletal Actin-binding
Protein is a Potential Regulator of
Smad-mediated Signaling. The 22nd
Annual Meeting of American Society for
Bone and Mineral Research, Toronto,
Canada, September 22-26, 2000

Shibata T, Shira-ishi A, Sato T, Masaki T,
Sasaki A, Masuda Y, Higasi S, Uchida Y,
Saito M, Ito M, Ogata E, Watanabe K, and
Ikeda K. Active Vitamin D Inhibits
Osteoclastogenesis In Vivo by Decreasing the
Pool of Osteoclast Precursors in Bone
Marrow. The 22nd Annual Meeting of
American Society for Bone and Mineral
Research, Toronto, Canada, September 22-26,
2000

Watanuki M, Sakai A, Sakata T, Tsurumi H,
Miwa M, Uchida Y, Watanabe K, Ikeda K,

and Nakamura T. Evidence for Essential
Role of NO in the Osteogenic Response to
Mechanical Loading In Vivo: Studies in
iNOS Knockout Mice. The 22nd Annual
Meeting of American Society for Bone and
Mineral Research, Toronto, Canada,
September 22-26, 2000

分担研究者

高垣 裕子

1. 論文発表

1. Miyauchi, A., Notoya, K., Mikuni-Takagaki,
Y., Takagi, Y., Goto, M., Miki, Y.,
Takano-Yamamoto, T., Fujii, Y., Jinnai, K.,
Takahashi, K., Kumegawa, M., Chihara, K.,
and Fujita, T.: Parathyroid
hormone-activated volume sensitive calcium
influx pathways in mechanically loaded
osteocytes. J. Biol. Chem., 275:3335-3342,
2000.
2. Naruse, K., Mikuni-Takagaki, Y., Azuma, Y.,
Ito, M., Oota, T., Kameyama, K. and Itoman,
M.: Anabolic response of
mouse-bone-marrow-derived stromal cell
clone ST2 cells by low-intensity pulsed
ultrasound. Biochem. Biophys. Res. Comm.,
268:216-220, 2000
3. Satoyoshi, M., Kawata, A., Koizumi, T.,
Inoue, K., Itohara, S., Teranaka, T. and
Mikuni-Takagaki, Y.,.: Matrix
metalloproteinase-2 in dentin matrix
mineralization. J. Endodontics, in press.

4. Satoyoshi, M., Koizumi, T., Teranaka, T., Saito, S. and Mikuni-Takagaki, Y.: Matrix Metalloproteinase-2 in Dentinogenesis. Proceedings for the VIth International Conference on the Chemistry and Biology of the Mineralized Tissues. American Association of Orthopedic Surgeons, Rosemont, IL, in press.

2. 学会発表

1. 宮内章光, 能登谷浩平, 高木康行, 千原和夫, 藤田拓男, 高垣裕子: 骨細胞におけるメカニカルストレス伝達機構の解析 (PTH による cAMP 系を介した Ca 流入促進) 第 73 回日本内分泌学会, 2000.

2. 成瀬康治, 高垣裕子, 泉 敏弘, 糸満盛憲, 亀山孝三: 低出力超音波パルスのオステオカルシン発現増加の機序. 第 3 回超音波骨折治療研究会, 2000.

3. Naruse, Y. Mikuni-Takagaki, K. Kameyama, T. Tominaga, Y. Onuki, T. Izumi, and M. Itoman: Rat bone marrow cells respond to low-intensity, pulsed ultrasound. 8th INTERNATIONAL CONFERENCE ON TISSE BANKING, 2000.

4. 関谷秀樹, 瀬戸皖一, 近藤壽郎, 高垣裕子: 顎骨細胞の機械的外力負荷に対する応答は、PTH と常に相乗的に働く. 第 18 回日本骨代謝学会, 2000.

5. 宮内章光, 能登谷浩平, 岡部幸司, 高木康行, 三木善樹, 山本照子, 久米川正好, 千原和夫, 藤田拓男, 高垣裕子: 骨細胞におけるメカニカルストレス初期応答としての PTH による cAMP-PKA 系を介した Ca 流入促進. 第 18 回日本骨代謝学会, 2000.

6. Mikuni-Takagaki, H. Sekiya, T. Kondoh, K. Seto: Synergistic Effect of PTH on Mechanical Response of Human Long Bone Osteocytes is Distinct from that of Mandibular or Alveolar Bone.

7. A. Miyauchi, K. Notoya, K. Okabe, M. Goto, Y. Takagi, Y. Miki, T. Takano-Yamamoto, K. Jinnai, K. Takahashi, M. Kumegawa, K. Chihara, T. Fujita, Y. Mikuni-Takagaki, PTH activates Volume-sensitive Calcium Influx Pathways through the Activation of Adenyl cyclase in Mechanically Loaded Osteocytes.

8. K. Okabe, F. Okamoto, H. Kajiya, T. Tuzuki, K. Notoya, Y. Mikuni-Takagaki, H. Soeda, A. Miyauchi: CLC-3 Chloride Channels Function of Mechanosensing Molecule in Stretched Rat Osteocytes.

9. 高垣裕子: メカニカルストレスに対する細胞応答としての骨・軟骨形成作用 第 4 回超音波骨折治療研究会, 2001

中村 利孝

1. 論文発表

Watanuki M, Sakai A, Sakata T, Tsurukami H, Miwa M, Uchida Y, Watanabe K, Ikeda K, Nakamura T: Critical role of nitric oxide generated through iNOS in the skeletal adaptation to mechanical loading in vivo. 投稿中

2. 学会発表

1. T. Nakamura, et al. Recovery of bone mass, trabecular bone turnover and marrow cell development in mice tibia by reloading after tail-suspension. The 2nd International Workshop on Musculoskeletal Interactions. Delphi, Greece. 2000 年 5 月

2. 綿貫誠、中村利孝ほか. 非荷重後の再荷重にける骨形成の亢進は NO に依存する: iNOS ノックアウトマウスを用いた in vivo における解析. 第 18 回日本骨代謝学会 広島. 2000

年 7 月

3. M. Watanuki, T. Nakamura, et al. Evidence for essential role of NO in the osteogenic response to mechanical loading in vivo: studies in iNOS knockout mice. 22nd Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Toronto, Canada. 2000 年 9 月

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

2. 分 担 研 究 報 告 書

厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)
分担研究報告書

骨細胞が発現する遺伝子群の同定と機能解析

分担研究者 池田恭治(長寿医療研究センター 老年病研究部長)

研究要旨

ラット頭蓋冠から単離した骨細胞の cDNA ライブラリーを作成し、レトロウイルスを用いたシグナルシーケンストラップ法により、148クローン63種類の遺伝子(うち4種類が新規)を同定した。

キーワード: 力学的負荷、骨細胞、遺伝子

A. 研究目的

加齢に伴う運動低下や寝たきりの状態は、骨の粗鬆化を加速させる大きな要因であるが、免荷や荷重がどのようなメカニズムで骨組織に感知され、どのようなシグナル伝達系を介していかなるターゲット細胞・分子に伝えられるかは不明である。とりわけ、骨組織に最も多く存在し、機械的刺激を受ける主要な細胞と考えられている骨細胞 osteocyte が発現する遺伝子とその産物の機能についても(硬組織に埋没した骨細胞を単離することの困難さゆえ)殆ど分かっていない。本研究では骨細胞に発現する遺伝子群の同定を目的として、ラット骨細胞由来の cDNA library を用いた Signal Sequence Trap-Retroviral Expression (SST-REX) 法によるスクリーニングを行った。

B. 研究方法

SST-REX 法では、cDNA (N 末側) と signal sequence を欠いた恒常的活性化型 thrombopoietin receptor の C 末側の融合蛋白を、レトロウイルスを用いて、IL-3 依存的な増殖を示す Ba/F3 cell (pro B cell) に発現させる。cDNA が signal sequence をコードしている場合、融合蛋白は常時活性化型 thrombopoietin receptor の C 末側中の transmembrane domain を介して Ba/F3 cell の細胞膜にアンカーされる。この常時活性化

型 thrombopoietin receptor は細胞膜にアンカーされることによって、細胞増殖シグナルを発するため、IL-3 非依存的な増殖が可能となる。この IL-3 非存在下での増殖を指標に signal sequence を含む遺伝子、すなわち、細胞膜蛋白質や分泌蛋白質の cDNA を単離することを試みた。

具体的には、摘出、細断したラット頭蓋冠を 0.75mg/mL コラゲナーゼ振盪処理し、残留している結合組織および骨芽細胞を除去した骨片を 10%FBS-alphaMEM (アスコルビン酸添加) 培地中で培養し、その骨片より outgrowth してきた細胞を骨細胞として得た。骨細胞より調製した mRNA から cDNA を作製し、それを pMX-SST ベクター N 末端側の cDNA と signal sequence を欠いた恒常的活性化型 thrombopoietin receptor の C 末側の融合蛋白を発現するベクター) に組込み、cDNA ライブラリー化した。

2×10^6 cells/6cm dish の PLAT-E packaging cell を 10%FCS-DMEM (puromycin 不含、blasticidin 不含) でまきこみ、24 時間後に pMX-SST cDNA ライブラリー 3 μ g を FuGENE reagent を用いて transfection し、その 19 時間後から 48 時間後の培養上清をレトロウイルス液として回収した。このレトロウイルス液を 10%FCS-RPMI1640 で 20 倍希釈した培地 (IL-3 不含) 10mL 中で 5×10^6 cells/10cm dish の Ba/F3 cell を培養した。ウイルス液の希釈倍率は、予め

pMX-GFP(GFP 発現ベクター)を用いて、感染効率10-

を採用した。その24時間後、ウイルス感染させたBa/F3 cellを、96 well plateに 7×10^3 cells/wellで播きかえIL-3 非存在下で培養した。8日後、well 面積の40%以上増殖した細胞を24 well plateにまき換え、さらにその2日後に細胞を回収した。回収した細胞より調製した genomic DNA から、pMX ベクタープライマー(Forward: ggggggtggaccatcctcta、Reverse: cgcgagctgtaaacggtag)を用いた PCR により、Ba/F3 cellに導入されたcDNA由来の部位を増幅後、sequencingを行った。そのうち未知の蛋白質をコードする遺伝子について、得られたcDNAを用いてノーザンブロッティングを行い組織発現および遺伝子サイズを決定するとともに、EST 検索及び RT-PCR によって cDNA 全長を取得し、コード蛋白を決定した。

C. 研究結果

本法により、148クローン63種類を単離した。うち4個4種が新規遺伝子、144個59種が既知の遺伝子であった。既知遺伝子の内訳は、85遺伝子(57%)19種が分泌蛋白、34遺伝子(23%)18種が膜蛋白、6遺伝子(4%)4種が小胞体蛋白、1遺伝子がゴルジ体蛋白、12遺伝子(8%)11種が細胞質蛋白、1遺伝子が核蛋白、4遺伝子(3%)4種が局在不明な蛋白をそれぞれコードするもので、1遺伝子がPseudogeneであった。細胞質蛋白などの signal sequenceを持たない蛋白をコードする遺伝子が単離された原因としては、単一 Ba/F3 cell へのレトロウィルスの重複感染が考えられる。

既知遺伝子と相同性が認められない4クローン(OSYSST35, 46, 83, 108)中、ノーザンブロッティングにより発現が確認できたのは2クローン(OSYSST46, 83)であった。OSYSST46は約2.5kb, 5.0kbのmRNAが肝と腎で、OSYSST83は約0.8kbのmRNAが肝で発現していることが確認された。この2クローンについては、EST 検索と RT-PCR により全長と考えられるそれぞれ2297bp, 733bpを決定した。OSYSST46は528アミノ酸の蛋白をコードする

こと、この蛋白はhypotetical proteinであるDKFZp564J102(human)、KIAA0974(human)とそれぞれ対応する領域において67%, 32%のホモロジーを持つことが確認され、ファミリーを形成していることが考えられたが、signal sequenceほか有意なモチーフは認められなかった。OCYSST83についてはORFが確認されなかった。また、この2クローンはいずれもRT-PCRにより、KUSA-A1(骨芽細胞)、MC3T3-E1(骨芽細胞)、C2C12(筋芽細胞)、ST2(骨髄ストローマ) cell lineにおける発現がみられ、骨細胞特異的発現をするものではないことが確認された。得られたクローンはかなりの比率(148クローン中32クローン:22%)でコラーゲン、オステオポンチン等の初期または中期骨芽細胞マーカーを含んでいることから、今回用いたラット骨細胞由来のSST-REX cDNA ライブラリーには骨芽細胞由来のものが混在している可能性が考えられた。

D. 考察

本スクリーニングにより、148個、63種のクローンを単離された。うち144個59種が既知の遺伝子であった。その内訳は分泌蛋白85個19種、膜蛋白34個18種、細胞質蛋白12個11種、他13個11種である。新規遺伝子は4個単離されたが、その内、ORFが認められた1クローンはシグナルシーケンスを持たず、骨細胞特異的な発現もみられなかった。また、単離されたクローンは骨芽細胞マーカーを含んでいたことから、ライブラリーを作成する際の細胞ソースである骨細胞の純度が低いことが予想された。今後は、骨細胞調製法に変更を加え、より純度の高い骨細胞群を単離し、新たにcDNAを作製してスクリーニングを行う予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

Masuda Y, Sasaki A, Ikeda K, Watanabe K
Dlxin-1, a novel protein that binds Dlx5
and regulates its transcriptional function.
J Biol Chem 2001 in press

Sasaki A, Masuda Y, Ikeda K, Watanabe K
Filamin associates with Smads and
regulates TGF- β signaling. **J Biol Chem**
2001 in press

池田恭治: 退行期骨粗鬆症の病態生理 ホル
モンと臨床 48:4-12, 2000

池田恭治: 骨粗鬆症の予防と治療 Geriatric
Medicine 38:1663-1669, 2000

池田恭治: 21世紀の骨粗鬆症研究を考える
Aging & Health

2. 学会発表

柴田 猛、白石綾子、佐藤卓也、正木敏美、
佐々木文、増田芳子、東佐由美、内田泰弘、
斉藤元男、伊東昌子、尾形悦郎、渡辺 研、
池田恭治 活性型ビタミンDの骨吸収に及
ぼす in vivo での効果 第18回日本骨代謝
学会 平成12年7月19日~22日 広島

佐々木文、増田芳子、池田恭治、渡辺 研
アクチン結合蛋白 Filamin による Smad シ
グナル経路の制御 第18回日本骨代謝学会
平成12年7月19日~22日 広島

綿貫 誠、酒井昭典、阪田武志、鶴上 浩、
三輪政夫、内田泰弘、渡辺 研、池田恭治、
中村利孝 非荷重後の再荷重における骨形
成の亢進は NO に依存する
第18回日本骨代謝学会 平成12年7月
19日~22日 広島

Sasaki A, Ohta Y, Ikeda K, and Watanabe K.
Filamin, a Cytoskeletal Actin-binding Protein
is a Potential Regulator of Smad-mediated
Signaling. The 22nd Annual Meeting of
American Society for Bone and Mineral
Research, Toronto, Canada, September 22-26,
2000

Shibata T, Shira-ishi A, Sato T, Masaki T,
Sasaki A, Masuda Y, Higasi S, Uchida Y, Saito
M, Ito M, Ogata E, Watanabe K, and Ikeda K.

Active Vitamin D Inhibits Osteoclastogenesis
In Vivo by Decreasing the Pool of Osteoclast
Precursors in Bone Marrow. The 22nd
Annual Meeting of American Society for Bone
and Mineral Research, Toronto, Canada,
September 22-26, 2000

Watanuki M, Sakai A, Sakata T, Tsurumi H,
Miwa M, Uchida Y, Watanabe K, Ikeda K, and
Nakamura T. Evidence for Essential Role of
NO in the Osteogenic Response to Mechanical
Loading In Vivo: Studies in iNOS Knockout
Mice. The 22nd Annual Meeting of American
Society for Bone and Mineral Research,
Toronto, Canada, September 22-26, 2000

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用案登録

なし

3. その他

なし

単離された遺伝子

No.	単離された遺伝子断片長 (kb)	BLAST (E value)	単離された遺伝子	クローン数	膜/分泌
分泌蛋白			85/148 (57%)		
1	0.7-1.9	0.000000	type I collagen alpha1 chain (mouse)	20	分泌
2	0.6-1.2	0.000000	osteopontin(sialoprotein) (rat)	10	分泌
3	0.4-0.7	0.000000	SPARK (mouse), osteonectin (rat)	9	分泌
4	0.8-1.2	0.000000	folistatin-related protein precursor (rat)	7	分泌
5	0.4-0.8	0.000000	Gremlin (mouse), DRM protein (rat)	7	分泌
6	0.7-1.4	0.000000	type III collagen alpha1 chain (mouse)	6	分泌
7	0.9-2.1	0.000000	type IV collagen alpha1 chain (mouse)	5	分泌
8	1.0-1.5	0.000000	type V collagen alpha1 chain (rat)	4	分泌
9	0.9-1.3	0.000000	M-CSF (mouse), CSF-1 (rat)	3	分泌
10	0.5	0.000000	lysyl oxidase (rat)	2	分泌
11	1.0-2.0	0.000000	type I collagen alpha2 chain (rat)	2	分泌
12	1.1-1.5	0.000000	type IV collagen alpha2 chain (mouse)	2	分泌
13	1-1.1	0.000000	type V collagen alpha2 chain (mouse)	2	分泌
14	1.4	0.000000	biglycan (rat)	1	分泌
15	0.9	0.000000	Insulin-like growth factor binding protein 4 (rat)	1	分泌
16	2.3	(N) 2e-16	Insulin-like growth factor-binding protein 5 (rat)	1	分泌
17	9.3	0.000000	Insulin-like growth factor-binding protein 6 (rat)	1	分泌
18	1.15	0.000000	lumican (rat)	1	分泌
19	0.5	0.000000	osteoglycin (Ogn) (mouse)	1	分泌
膜蛋白			34/148 (23%)		
20	0.9-1.4	0.000000	beta-APP (mouse), amyloidogenic glycoprotein (rat)	7	膜
21	1.3-1.5	0.000000	PDGF receptor beta (rat)	4	膜
22	1.0-1.2	0.000000	thrombospondin 1 (Thbs1) (mouse)	4	膜
23	1.1-1.4	0.000000	endoglin (Eng) (mouse)	2	膜
24	0.4-0.5	0.000000	O-acetyltransferase milk fat globule membrane protein他 (rat)	2	膜
25	1.3	0.000000	PDGFRL (human)	2	膜
26	0.8	0.000000	syndecan 1 = heparan sulfate proteoglycan core protein (rat)	2	膜
27	1	0.000000	CD166/ALCAM(human,mouse), HB2(rat)	1	膜
28	1.1	0.000000	decay accelerating factor soluble-form precursor (DAF) (rat)	1	膜
29	1.1	0.000000	entactin/nidogen 1 (rat)	1	膜
30	0.9	0.000000	fibronectin (rat)	1	膜
31	1.1	0.000000	mama (rat), peptidylprolyl isomerase C-associated protein (mouse)	1	膜
32	0.9	0.000000	nucleobindin 2 (Nucb2) (mouse), NEFA(mouse)?	1	膜
33	0.5	0.000000	oncoprotein induced transcript 2 (mouse), ion channel homolog RIC (mouse)	1	膜
34	1.2	0.000000	osteonectin(rat), putative transmembrane glycoprotein(mouse)	1	膜
35	1.2	0.000000	perlecan (heparan sulfate proteoglycan 2) (mouse)	1	膜
36	0.6	0.000001	syndecan 2/ryudocan (rat)	1	膜
37	1.5	0.000000	voltage-gated potassium channel KCNQ5 (mouse)	1	膜

単離された遺伝子 (2)

No.	単離された遺伝子断片長 (kb)	E _{BLAST} (E value)	単離された遺伝子	クローン数	膜/分泌
小胞体蛋白					
				6 /148 (3%)	
38	0.6-1.7	0.000000	PDI (protein disulfide isomerase) (rat)	3	(膜)
39	1.2	0.000000	Calumenin(mouse), CBP-50 (Ca ²⁺) binding protein) (rat)	1	(膜)
40	1.2	0.000000	GTP-binding protein homologue (mouse), SAR1(human)	1	(膜)
41		0.000000	PDI-related protein (ERp72) (mouse), calcium-binding protein, intestinal(Cai) (rat)	1	(膜)
ゴルジ体蛋白					
				1 /148 (1%)	
42	1.1	0.000000	p58 (cis-Golgi membrane protein) (rat)	1	膜
核蛋白					
				1 /148 (1%)	
43	1.3	0.000000	lamin A (rat)	1	
細胞質蛋白					
				12 /148 (8%)	
44	1-1.1	0.000000	type I procollagen C-proteinase enhancer protein(PCPE) (mouse, rat)	2	細胞質
45	1.7	0.000000	filamin (actin binding protein-280) (human)	1	細胞質
46	1.3	0.000000	galactokinase(Galk) (mouse)	1	細胞質
47	0.9	0.000000	glutamate dehydrogenase (glud1) (rat)	1	細胞質
48	0.6	0.000000	phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (mouse), PkB kinase(rat)	1	細胞質
49	0.2	0.000000	ribosomal protein L38 (mouse)	1	細胞質
50	0.6	0.000000	ribosomal protein S17 (rat)	1	細胞質
51	1	0.000000	RNA binding motif protein 3 (RBM3)	1	細胞質
52	0.9	0.000000	translation repressor NAT1 (mouse), translation initiation factor 4...	1	細胞質
53	1.3	0.000000	uridine kinase (rat)	1	細胞質
54	2.1	0.000000	nucleolar phosphoprotein of 140kD (Nopp140) (rat)	1	細胞質、核
偽遺伝子					
				1 /148 (1%)	
55	0.6	0.000000	Tn(transposon)-like element mRNA (human)	1	(偽遺伝子)
不明					
				4 /148 (3%)	
56	0.3	3-e13, 7e-14	matrilin3 (mouse), chaperon containing TCP-1 eta subunit (mouse) ?	2	(?)
57	0.6	0.000000	IgK chain (S6) chain intron with insertion/deletion mutation (mouse)	1	?
58	1.4	0.000000	leukemia virus gag (rat)	1	?
59	0.3-0.4	0.000000	selenoprotein (human)	1	(?)
NEW? protein					
				4 /148 (3%)	
60	0.5		OCYSST35	1	
61	0.4		OCYSST46	1	
62	0.7		OCYSST63	1	
63	0.5		OCYSST108	1	

厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)
分担研究報告書

骨細胞における遺伝子発現と機能解析

分担研究者 高垣 裕子(神奈川歯科大学 講師)

研究要旨

これまで骨細胞の研究に用いられてきたラット頭蓋冠骨細胞は、長管骨骨細胞とは発生学的に由来が異なることと頭蓋冠が荷重を受けない骨であるため、骨細胞の主たる機能である力学的負荷に対する応答と情報伝達を研究する際の問題点であった。そこで、長管骨由来の骨細胞を単離する実験条件をあみだした。骨片の洗浄と細胞の外生を繰り返すことにより、純度の高い分化した長管骨骨細胞が採取された。今後、これらを用いて骨細胞の機能解析実験を行う。

キーワード: 骨形成、力学的刺激、骨細胞、分化

A. 研究目的

骨内で最も数の多い細胞は骨細胞(オステオサイト)であり、骨1立方センチメートルには 10^6 個以上の骨細胞が個々の骨小腔内で生きている。骨小腔同志は多数の骨細管と呼ばれる管構造を通じて連絡しており、細胞体から放射状に伸展した樹状の細胞突起が骨細管を占めている。このようにして骨内ネットワークが形成されているのは骨細胞と骨細胞の間だけではなく、骨基質形成に携わっている骨表面の骨芽細胞、あるいは休止状態の lining cell との間にも、それ等の細胞

から伸びる比較的短い突起の先端で gap junction が形成されている。gap junction は細胞間接着装置の中でも化学物質を透過させるいわばトンネルであるから、骨内ネットワークが情報伝達システムであることを物語っている。骨細胞はさらに破骨細胞とも接触可能であり、また骨髓間質細胞、骨芽細胞を経由して毛細血管の周皮細胞とすら間接的に繋がっている。骨細胞が骨の置かれた環境、特に力学的環境のセンサーとして化学物質の情報を発信するなら、骨の細胞全体にその情報が伝わる。骨細胞は骨の代謝を調節

する機能を司る重要な細胞であると考えられるに至った。

骨細胞は、間葉系幹細胞由来の骨芽細胞が骨形成に際して自ら分泌した基質（マトリックス）中に囲まれていく過程で分化し細胞突起を発達させた細胞で、徐々に増殖能を失う。この新たに骨細胞へと分化した（コミットした）細胞から見ると、骨形成面、即ち血流からの物質の補給が可能な骨表面は、一日に約1 μ mずつ離れて行く。したがって骨細胞は、それと同じスピードで突起と骨細管を伸長させながら骨表面（骨芽細胞）との接触を保つ。分化したばかりの骨細胞は未石灰化骨基質である類骨を挟んで複数の骨芽細胞と細胞突起により接触しており、更に深部へと移行するにつれ、その距離は長くなる。成熟骨細胞はより小型になり、核の占める割合が大きく細胞小器官の数も少なくなる。従って骨形成時には、このように分化のレベルの異なる細胞が連続的に存在する訳で、それぞれの機能分担が考えられる。

例えば我々の実験では、仔ラット頭蓋冠より単離した分化段階の異なる骨の細胞の伸展刺激に対する応答を検討したところ、約0.4%（4,000mE）前後の伸展に骨芽細胞はアナボリックには反応せず、一番反応性の高いのが、成熟骨芽細胞よりも分化した、幼若骨細胞に該当する、突起の出現し始めの細胞であることが判明した。このことを手がかりに、力学的負荷、あるいは免荷の骨内情報伝達経路、関与する遺伝子を明らかにしつつ、免荷の状態で行わせる方法の開発に結びつけることを本研究の最終的な目標とする。

B. 研究方法

これまで我々の実験では、主に仔ラット頭蓋冠より単離した分化段階の異なる骨の細胞を基底膜由来のマトリックス（マトリゲル）上で培養する事により積極的に増殖を停止させて分化を誘導すると同時に、生理的と考えられるレベルの細胞の変形を設定した。Flexercell 負荷装置を利用し、伸展力を均一にするために辺縁部にのみ細胞を配置した。その結果、約0.4%（4,000mE）前後の伸展には骨芽細胞はあまり反応せず、それより分化した、幼若骨細胞に該当する、突起の出現し始めの細胞が良く反応した。刺激直後にcAMP濃度は上昇し、オステオカルシンやIGF-Iのタンパク量（刺激開始後36h）も増加、mRNAレベルも明らかに上昇（初期及び24h後）、ミネラルの蓄積量も増加した。研究の系としては一応満足できるものである。しかし、この骨細胞は長管骨骨細胞とは発生学的に由来が異なり、しかも頭蓋冠はあまり負荷を受けない骨であるため、骨細胞の主たる機能である力学的負荷に対する応答と情報伝達を研究する際に問題となる。そこで、これまでの方法をマウスおよびラットの大腿骨に応用し、骨細胞の単離を試みた。概略は、以下のとおりである。生後一日の動物約30匹より大腿骨を取り出し、軟組織と骨髓を除去後、0.2mg/mlのシグマDNaseを含む細胞分散用コラゲナーゼ溶液（1mg/ml）25ml中、37度で振盪する。30分後取り出してピペティング操作をくりかえして骨片を洗浄し、静置培養する。事前にMatrigelを薄くコートし手

早く乾燥させた100mmの培養皿をもちいる。焼く1週間後外生した細胞がフィブロブラストの形態を示すときは、骨片を集めて0.25%トリプシンで20分ほど振盪し、再びピペッティング操作をくりかえして骨片を洗浄して100mmの培養皿に移す。数週間後外生した細胞が突起をたくさん出現させていればサンプルとして回収する。サブコンフルエントとなっても、その細胞密度は、骨芽細胞の到達する密度より1桁以上低い。必要に応じてこの操作を繰り返す。別にカバーガラスの上にシリコンゴムでできた枠を載せることにより、小さな培養用wellを作製、その後 10^4 cells/mlに調整した細胞を少量播種、通常通りに長期間培養することができる。同一の培養条件で、1) Ca イメージングの実験、2) パッチクランプ法による解析、3) 微量のサンプルを用いる RT-PCR 法などの解析には後者を供する。なおこの方法はヒト下顎骨及び大腿骨より得た海綿骨にもそのまま応用できる。

C. 研究結果

この方法で外生させた細胞を、順次骨細胞 I, II, III.....と呼ぶが、数を増すにつれてアルカリフォスファターゼの発現レベルを低下させ、オステオカルシンの発現レベルを上昇させる。2-3ヶ月の間はこの方法でより骨細胞的な形態の細胞サンプルを採取し続けることができる。得られた細胞は、伸展刺激に応答して IGF-I やオステオカルシンのメッセージレベルを上昇させることが確認

された。

● D. 結論

長管骨骨細胞を単離培養した。今後の実験により、骨細胞に特異的な機能を解析することができる。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyauchi, A., Notoya, K., Mikuni-Takagaki, Y., Takagi, Y., Goto, M., Miki, Y., Takano-Yamamoto, T., Fujii, Y., Jinnai, K., Takahashi, K., Kumegawa, M., Chihara, K., and Fujita, T.: Parathyroid hormone-activated volume sensitive calcium influx pathways in mechanically loaded osteocytes. *J. Biol. Chem.*, 275:3335-3342, 2000.
2. Naruse, K., Mikuni-Takagaki, Y., Azuma, Y., Ito, M., Oota, T., Kameyama, K., and Itoman, M.: Anabolic response of mouse-bone-marrow-derived stromal cell clone ST2 cells by low-intensity pulsed ultrasound. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 268:216-220, 2000
3. Satoyoshi, M., Kawata, A., Koizumi, T., Inoue, K., Itohara, S., Teranaka, T. and Mikuni-Takagaki, Y.,.: Matrix metalloproteinase-2 in dentin matrix mineralization. *J. Endodontics*, in press.

1. Satoyoshi, M., Koizumi, T., Teranaka, T., Saito, S. and Mikuni-Takagaki, Y.: Matrix Metalloproteinase-2 in Dentinogenesis. Proceedings for the Vith International Conference on the Chemistry and Biology of the Mineralized Tissues. American Association of Orthopedic Surgeons, Rosemont, IL, in press.
2. 学会発表
 1. 宮内章光, 能登谷浩平, 高木康行, 千原和夫, 藤田拓男, 高垣裕子: 骨細胞におけるメカニカルストレス伝達機構の解析 (PTH による cAMP 系を介した Ca 流入促進) 第 73 回日本内分泌学会, 2000.
 2. 成瀬康治, 高垣裕子, 泉 敏弘, 糸満盛憲, 亀山孝三: 低出力超音波パルスのおステオカルシン発現増加の機序. 第 3 回超音波骨折治療研究会, 2000.
 3. Naruse, Y. Mikuni-Takagaki, K. Kameyama, T. Tominaga, Y. Onuki, T. Izumi, and M. Itoman: Rat bone marrow cells respond to low-intensity, pulsed ultrasound. 8th INTERNATIONAL CONFERENCE ON TISSE BANKING, 2000.
 4. 関谷秀樹, 瀬戸皖一, 近藤壽郎, 高垣裕子: 顎骨細胞の機械的外力負荷に対する応答は、PTH と常に相乗的に働く. 第 18 回日本骨代謝学会, 2000.
 5. 宮内章光, 能登谷浩平, 岡部幸司, 高木康行, 三木善樹, 山本照子, 久米川正好, 千原和夫, 藤田拓男, 高垣裕子: 骨細胞におけるメカニカルストレス初期応答としての PTH による cAMP-PKA 系を介した Ca 流入促進. 第 18 回日本骨代謝学会, 2000.
 6. Mikuni-Takagaki, H. Sekiya, T. Kondoh, K. Seto: Synergistic Effect of PTH on Mechanical Response of Human Long Bone Osteocytes is Distinct from that of Mandibular or Alveolar Bone.
 7. A. Miyauchi, K. Notoya, K. Okabe, M. Goto, Y. Takagi, Y. Miki, T. Takano-Yamamoto, K. Jinnai, K. Takahashi, M. Kumegawa, K. Chihara, T. Fujita, Y. Mikuni-Takagaki, PTH activates Volume-sensitive Calcium Influx Pathways through the Activation of Adenyl cyclase in Mechanically Loaded Osteocytes.
 8. K. Okabe, F. Okamoto, H. Kajiya, T. Tuzuki, K. Notoya, Y. Mikuni-Takagaki, H. Soeda, A. Miyauchi: CLC-3 Chloride Channels Function of Mechanosensing Molecule in Stretched Rat Osteocytes.