

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

2. 実用新案登録
なし

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

3. その他
なし

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

荷重刺激に対する骨形成反応における iNOS の役割

分担研究者 中村 利孝(産業医科大学整形外科学教室 教授)

研究要旨

機械的刺激による骨代謝の調節に果たす NO および iNOS の役割を明らかにする目的で、iNOS ノックアウトマウスの尾部懸垂を行い、非荷重と再荷重に対する骨代謝動態を解析した。非荷重による骨形成の抑制は、iNOS ノックアウトマウスでも野生型と同程度に認められたが、再荷重に対する骨形成の活性化は、iNOS ノックアウトマウスでは欠如していた。免疫組織化学で iNOS の染色を検討したところ、再荷重によって活性化された骨芽細胞に iNOS の発現が認められた。以上の結果より、荷重刺激に対する骨芽細胞の活性化に、iNOS が産生する NO が必須の役割を果たしていることが示唆された。

キーワード: 尾部懸垂モデル、荷重、非荷重、NO

A. 研究目的

力学的負荷の消失が、骨量減少を引き起こし、その後、再荷重すると、いったん減少した骨量が回復することが知られている。In vitro の実験系で、fluid shear stress が、骨細胞と骨芽細胞の nitric oxide(NO)産生を増加させるという報告がある。また、NO により骨芽細胞の分化誘導が生じることが報告されている。NO 合成酵素には、3 つの isoform がある。誘導型の inducible NO synthase(iNOS)、血管型 eNOS、神経型 nNOS である。誘導型 iNOS は、各種サイトカインによって誘導されることが知られており、後者2つは恒常的に発現している。

本研究の目的は、尾部懸垂による後肢非荷重モデルマウスの脛骨を用いて、iNOS の、非荷重と再荷重時における骨髓基質細胞から骨芽細胞および骨細胞の分化過程に及ぼす影響を、組織と細胞レベルで明らかにすることである。特に、本年度は、非荷重後の再荷重時における、骨量と骨形成の増加には、iNOS 由来の NO が必須であるか否かを明らかにする。

B. 研究方法

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、heterogenous type 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。尾部懸垂した状態でも、ケージ内をある程度自由に移動でき、摂食、飲水は自由に可能である。摂餌量はすべての実験群間でマッチさせた。なお、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。

組織形態計測: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。

骨髄細胞培養: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

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 補充と NO 阻害実験を行った。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。

骨髄細胞培養実験で、mineralized nodule の形成は、非荷重後1週の脛骨から採取した骨髄細胞では、iNOS(+/+)と(-/-)は同程度に低下した。再荷重の脛骨から採取した骨髄細胞では、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。

D. 考察

今回の骨形態計測、骨髄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。一方で、再荷重に対する骨形成ないし骨吸収反応は、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。

E. 結論

1. 非荷重による骨量減少、骨形成低下、骨吸収増加は、iNOS に依存しない。
2. 尾部懸垂後の再荷重時の骨形成促進には、iNOS 由来の NO が必須である。

F. 研究発表

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

G. 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