

# ヒト黄色靭帯骨化組織における Indian hedgehog (Ihh), Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) の発現

有賀 健太 (大阪大学医学部整形外科), 中瀬 尚長 (大阪大学医学部整形外科),  
孟 文翔 (大阪大学医学部整形外科), 吉川 秀樹 (大阪大学医学部整形外科),  
米延 策雄 (大阪大学医学部整形外科),  
奥田 真也 (大阪労災病院整形外科)

## 【研究要旨】

内軟骨性骨形成過程における軟骨細胞の増殖・分化に対する重要な制御因子である Ihh, PTHrP の発現を, ヒト黄色靭帯骨化組織において免疫組織学的に検討した。組織像では, 非骨化部から骨化部にかけて増殖層から軟骨細胞様細胞・肥大軟骨細胞様細胞へと分化する内軟骨性骨形成に類似した像が認められた。Ihh はその前肥大期と考えられる細胞群において発現が認められた。一方, PTHrP と ptc の発現は一部増殖軟骨層から前肥大層・肥大層にかけて比較的広範に認められた。この事より, 靭帯骨化過程においても骨端線軟骨における内軟骨性骨形成と同様に Ihh, PTHrP による軟骨細胞様細胞の増殖・分化制御機構が存在する可能性が示唆された。

## A. 研究目的

黄色靭帯骨化症例の骨化部と非骨化部の境界領域の靭帯組織において, 内軟骨性骨化における軟骨細胞の増殖および分化に重要な役割を持つ PTHrP, Ihh およびそのレセプター ptc の発現の有無と発現様式を明らかにすることである。本研究は脊柱靭帯骨化症の発症予防あるいは進行防止策へ繋がる基礎的情報を提供しうると考えられる。

## B. 研究方法

椎弓切除術による除圧を要した黄色靭帯骨化症例 2 例より切除された骨化部靭帯組織を, 4%パラホルムアルデヒドで24時間固定・20%EDTAによる脱灰後, 矢状断パラフィン包埋切片を作成した。Indian hedgehog (Ihh), Parathyroid Hormone related peptide (PTHrP), patched (ptc) に対するヤギポリクローナル抗体を用いてストレプトアビジン法にて免疫染色を施行した。免疫染色所見は骨化移行部組織像により, 便宜的に増殖層, 前肥大層, 肥大層に分けて検討した。

## C. 研究結果

組織学的には骨化移行部の靭帯では, 比較的細胞密度の高い増殖軟骨細胞様細胞 (増殖層) から, 肥大軟骨細胞様細胞 (肥大層) への分化を経て骨化する内軟骨性骨化パターンの像を示していた。Ihh の局在は主に軟骨細胞様細胞が肥大化し始める領域 (前肥大層) において発現していた。(図) Ptc の発

現は前肥大層から肥大層側の増殖層にかけて認められた。PTHrP の発現は増殖層から肥大層の一部にかけ比較的広範に発現していた。

## D. 考察

靭帯骨化部では, 組織学的に骨端線軟骨のような完全な肥大軟骨細胞は認めないが, 細胞質の肥大化を伴い軟骨マトリックスを産生する軟骨細胞様細胞が前骨化部に存在している。Ihh と PTHrP は主にその遺伝子欠損動物による検討から, 骨端線軟骨における内軟骨性骨形成において, 軟骨細胞の増殖促進と肥大軟骨細胞への分化抑制の機能を有していると考えられている。さらに Ihh は PTHrP の発現を誘導し, PTHrP は Ihh の発現を抑制するという negative feedback loop を形成して長管骨の成長を制御して

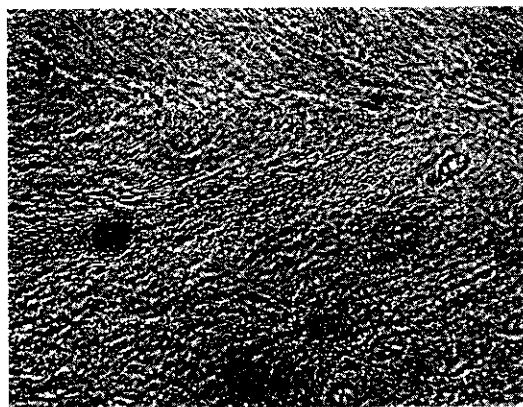


図. 抗Ihh抗体による前肥大軟骨細胞様細胞の免疫染色像

いる。本検討においてこれらの両因子は、靭帯骨化という異所性骨形成の場においても骨端線軟骨と類似した発現様式を示した。このことより *Ihh* および PTHrP が、靭帯骨化における軟骨細胞様細胞の増殖および骨化へと向かう分化の制御に関与している可能性が示唆された。

#### E. 結論

黄色靭帯骨化部組織において、内軟骨性骨形成における軟骨細胞の分化・増殖の制御に重要な役割を持つ *Ihh*、PTHrP の発現を免疫組織学的に検討した。*Ihh* は前肥大層において、PTHrP は増殖層から肥大層の一部にかけて比較的広範に、*ptc* は増殖層から前肥大層にかけて発現していた。

# 肥大軟骨細胞由来の成長因子CTGF/Hcs24の骨芽細胞の増殖と分化に与える影響

滝川 正春 (岡山大学歯学部・口腔生化学, 中央研究施設), 西田 崇 (岡山大学歯学部・中央研究施設), 中西 徹 (岡山大学歯学部・口腔生化学), 浅野 将宏 (岡山大学歯学部・口腔生化学), 志茂 剛 (岡山大学歯学部・口腔生化学)

## 【研究要旨】

肥大軟骨細胞由来の成長因子CTGF/Hcs24が、軟骨細胞だけでなく、血管内皮細胞の遊走及び分化を促進することから、この因子が内軟骨性骨化を促進する因子 ecogenin (endochondral ossification genetic factor) と呼ぶべき因子であることを示唆してきたが、軟骨が骨に置換する際には骨芽細胞の関与が不可欠なため、骨芽細胞に対するCTGF/Hcs24の作用を解析した。骨芽細胞様細胞株、MC3T3-E1細胞とSaOS-2細胞を組換えCTGF/Hcs24蛋白質質(rCTGF/Hcs24)で刺激すると、コラーゲン合成及びALP活性の促進効果が認められた。又、rCTGF/Hcs24はMC3T3-E1細胞の石灰化を促進し、その効果はBMP-2と同程度であった。これらの結果は、肥大軟骨細胞から産生されたCTGF/Hcs24が骨形成過程にも重要な因子であることを示唆している。

## A. 研究目的

我々は、内軟骨性骨形成過程全般を促進する因子を単離することを目的に、軟骨細胞系の細胞と骨芽細胞系の細胞との間で differential display-PCR法を行い、hcs24を見出した<sup>1)</sup>。また、この遺伝子が結合組織成長因子(CTGF)をコードしており、成長発育期に、肥大軟骨細胞層に最も強く発現していることを in situ ハイブリダイゼーション法で明らかにした<sup>1, 2)</sup>。また、この肥大軟骨細胞由来の成長因子CTGF/Hcs24の組換え体タンパク質(rCTGF/Hcs24)を作製し、in vitroの細胞培養系で機能解析を行ったところ、成長軟骨細胞の増殖と分化を促進すること<sup>2, 3)</sup>、血管内皮細胞の増殖、遊走および接着を促進すること<sup>2, 4)</sup>、さらに、in vivoで血管新生作用があることを明らかにした<sup>2, 5)</sup>。これらの知見は、この成長因子が内軟骨性骨形成過程で幅広く(軟骨細胞の増殖・分化、骨側からの血管侵入)重要な役割を果たす因子であることを示唆している<sup>2, 6)</sup>。

後縦靭帯骨化症(OPLL)は脊柱管内の後縦靭帯組織が異所性に骨化することにより、脊髄を圧迫し、種々の脊髄症状を呈する疾患である。本疾患の骨化が内軟骨性骨化を介して起こることを考えると<sup>7)</sup>、内軟骨性骨形成過程の最終段階である軟骨から骨への置換にCTGF/Hcs24がどのような役割を果たしているのかを解析することは、本疾患の発症メカニズムを理解するのに非常に重要である。そこで、本研究では、内軟骨性骨形成過程の最終段階である骨

芽細胞の増殖と分化及びその前段階による軟骨細胞の石灰化に与えるCTGF/Hcs24の影響をin vitroの培養系を用いて解析することを目的とした。

## B. 研究方法

ヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞株SaOS-2およびマウス骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1は10%ウシ胎仔血清(FBS)を含むalpha変法Eagle培地(aMEM)中で、37°C、5%CO<sub>2</sub>気相下にて培養した。組換えCTGF/Hcs24タンパク質(rCTGF/Hcs24)はctgf/hcs24cDNAをHeLa細胞に遺伝子導入し、その培養上清からヘパリンアフィニティーカラム及び抗CTGF抗体アフィニティーカラムで精製した。SaOS-2細胞に対するCTGF/Hcs24の結合は結合試験及び架橋実験で判定した。SaOS-2細胞におけるCTGF/Hcs24の遺伝子発現はノーザンブロット法により行った。SaOS-2細胞及びMC3T3-E1細胞のアルカリホスファターゼ(ALPase)活性に与えるCTGF/Hcs24の影響はBesseyらの方法に準じて行った。MC3T3-E1細胞および成長軟骨細胞の石灰化に与えるCTGF/Hcs24の影響はアリザリンレッド染色によって判定した。

## C. 研究成果

1. SaOS-2細胞に対する<sup>125</sup>I-rCTGF/Hcs24の結合  
SaOS-2細胞がCTGF/Hcs24の特異的受容体を持っているかどうかを調べるために、Iodogen法でヨード標識したrCTGF/Hcs24を用いて結合試験及

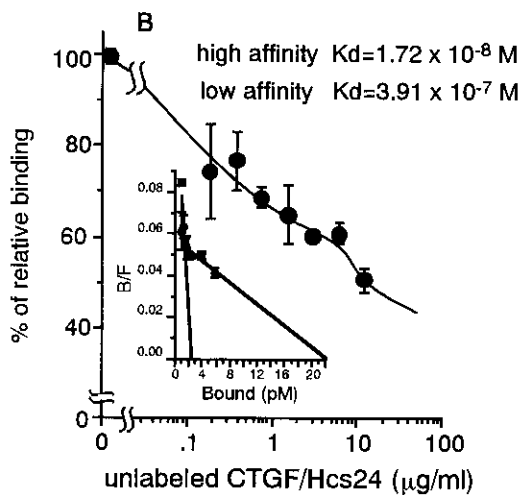
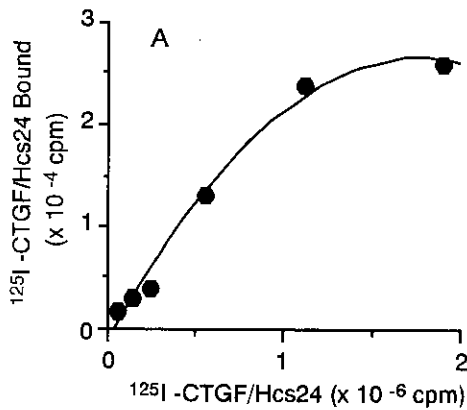


図1 SaOS-2細胞に対する<sup>125</sup>I-rCTGF/Hcs24の結合  
 A SaOS-2細胞をコンフルエントに達するまで培養後、図に示す放射活性の<sup>125</sup>I-rCTGF/Hcs24を添加し、4℃で2時間インキュベートした。0.1% BSA-PBSで5回洗浄後、細胞を可溶化し、細胞に特異的に結合した放射活性を測定した。各値は2穴の平均値を示す。  
 B SaOS-2細胞をコンフルエントに達するまで培養後、<sup>125</sup>I-rCTGF/Hcs24とグラフに示す濃度の非標識rCTGF/Hcs24を共存添加し、細胞に結合した放射活性を測定した。縦軸は非標識rCTGF/Hcs24を加えていない時の値を100%とした時の相対値を示す。各値は2穴の平均値と標準偏差を示す。グラフ内はこの結果をもとにスキッチャード解析をした結果を示す。

び架橋実験を行った。図1Aは、濃度依存的なSaOS-2細胞に対する<sup>125</sup>I-rCTGF/Hcs24の結合を示したものである。細胞に対する特異的結合は、およそ $1.5 \times 10^{-8}$  Mの濃度で飽和状態に達した。さらに、非標識rCTGF/Hcs24の添加により、SaOS-2細胞に対する<sup>125</sup>I-rCTGF/Hcs24の結合は濃度依存的

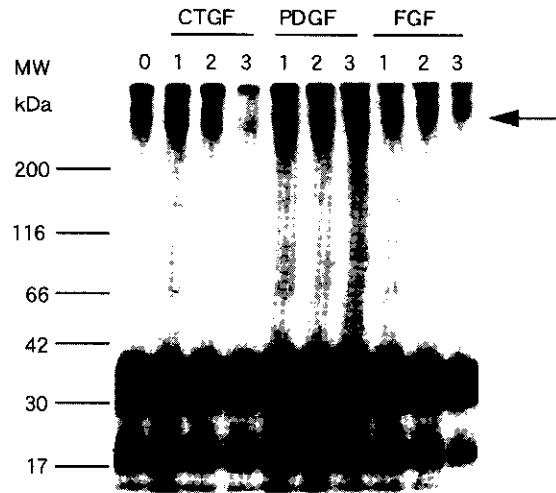
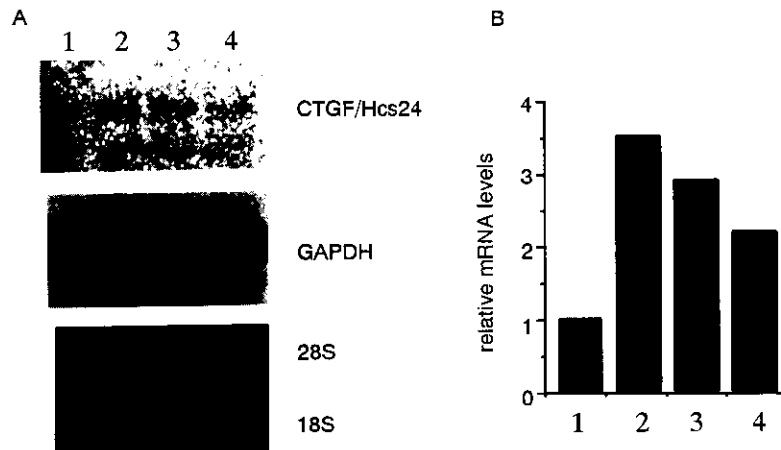


図2 SaOS-2細胞における<sup>125</sup>I-rCTGF/Hcs24受容体複合体の架橋実験  
 SaOS-2細胞をコンフルエントに達するまで培養後、<sup>125</sup>I-rCTGF/Hcs24と標識していないrCTGF/Hcs24あるいはPDGF-BB、bFGFの存在下で架橋実験を行った。細胞を回収、可溶化し、還元条件下で4-20%グラジエントポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、オートラジオグラフィを行った。矢印は<sup>125</sup>I-rCTGF/Hcs24受容体複合体を示す。0:競合物質(-), 1:10ng/ml, 2:100ng/ml, 3:1μg/mlは、非標識rCTGF/Hcs24あるいはPDGF-BB、bFGFの濃度を示す。

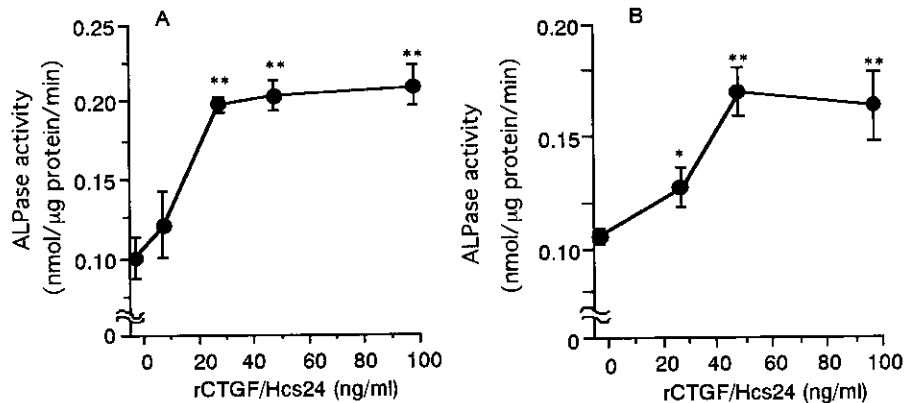
に減少し、10 μg/mlの非標識rCTGF/Hcs24添加で非標識リガンドを添加していない<sup>125</sup>I-rCTGF/Hcs24添加のみの群と比較して50%の阻害効果を認めた(図1B)。この結果をもとにスキッチャード解析を行うと、傾きの異なる2本の直線が得られ、親和性の異なる2つの受容体の存在が示唆された。計算の結果、高親和性の受容体のKd値は17.2 nMであり、低親和性受容体のKd値は391 nMとなった。図2は、架橋実験の結果を示している。その結果、280 kDa、38 kDaそして18 kDaの3種類のバンドが認められた。280 kDaのバンドは、1 μg/mlの非標識rCTGF添加により完全に消失したが、同じ濃度のPDGF-BBやbFGFでは消失しなかった。38 kDaおよび18 kDaのバンドはおそらくCTGF/Hcs24とその分解産物と推定された。

## 2. SaOS-2細胞における各成長因子刺激によるCTGF/Hcs24 mRNAの発現誘導

SaOS-2細胞を10 ng/mlのTGF-β, 50 ng/mlのBMP-2あるいは50 ng/mlのIGF-1で24時間刺激すると、CTGF/Hcs24 mRNAの発現レベルが無刺



**図3** SaOS-2細胞における各成長因子刺激によるCTGF/Hcs24mRNAの発現誘導  
 SaOS-2細胞をコンフルエントに達するまで培養後、培養上清を0.5% FBSを含むαMEMに交換し、同時に10 ng/mlのTGF-β, 50 ng/mlのBMP-2あるいは50 ng/mlのIGF-1を添加した。24時間後にtotal RNAを回収し、10 μgのtotal RNAを用いてNorthern blotを行った。Aの上段:CTGF/Hcs24, Aの中段:GAPDH, Aの下段:エチジウムブロマイドで染色したのホルムアルデヒド変性1%アガロース電気泳動の結果を示す。Bは各バンドを定量した結果を示す。  
 1. PBS, 2. TGF-β, 3. BMP-2, 4. IGF-1



**図4** SaOS-2細胞およびMC3T3-E1細胞におけるALPase活性に与えるrCTGF/Hcs24の影響

A SaOS-2細胞をコンフルエントに達するまで培養後、培養上清を0.5% FBSを含むαMEM培地に交換し、同時にrCTGF/Hcs24をグラフに示す各濃度添加し、2日間培養した。ALPase活性の測定はBesseyらの方法に準じて行い、各値は3穴の平均値と標準偏差を示し、縦軸は1 μgの総タンパク質あたりのパラニトロフェニルリン酸2ナトリウムの分解量を示す。

B MC3T3-E1細胞の結果を示す。(対照との有意差: \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ )

激群と比較してそれぞれ3.5倍, 3.0倍, 2.0倍に上昇した(図3)。

### 3. SaOS-2細胞及びMC3T3-E1細胞の増殖活性に与えるrCTGF/Hcs24の影響

SaOS-2細胞及びMC3T3-E1細胞をrCTGF/Hcs24存在下あるいは非存在下で培養し、

細胞数を測定すると、時間依存的に増殖活性が認められ、培養1日目からrCTGF/Hcs24非存在下と比較して有意に増加した。また、rCTGF/Hcs24の濃度に対しても10 ng/mlから有意な増殖活性が見られ、50 ng/mlで最大値に達した(データ省略)。

### 4. SaOS-2細胞及びMC3T3-E1細胞のALPase活

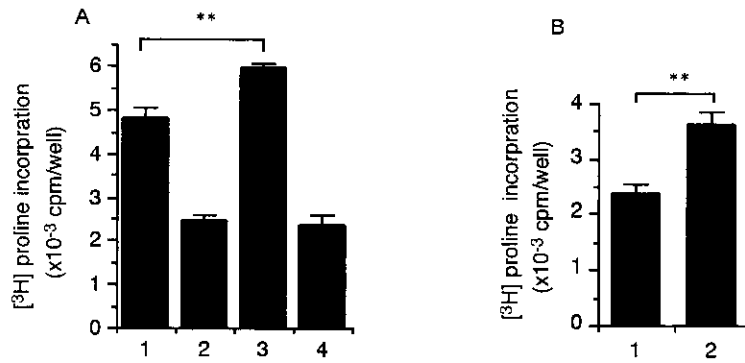


図5 MC3T3-E1細胞におけるタンパク質合成,特にコラーゲン合成に与えるrCTGF/Hcs24の影響

A MC3T3-E1細胞をコンフルエントに達するまで培養後,血清飢餓状態で24時間培養した。rCTGF/Hcs24を50 ng/ml添加し,12時間培養後,370 kBq/mlの $[^3\text{H}]$ プロリンで12時間ラベルし,コラーゲナーゼで消化後,酸不溶性画分の放射活性を測定した。

1. コラーゲナーゼ未消化の対照群, 2. コラーゲナーゼ消化した対照群, 3. コラーゲナーゼ未消化のrCTGF/Hcs24添加群, 4. コラーゲナーゼ消化したrCTGF/Hcs24添加群

B 対照群およびrCTGF/Hcs24添加群のコラーゲン合成量を示す。

1. 対照群, 2. rCTGF/Hcs24群 (対照との有意差:  $**p < 0.01$ )

#### 性に与えるrCTGF/Hcs24の影響

SaOS-2細胞及びMC3T3-E1細胞をコンフルエントに達するまで培養し,rCTGF/Hcs24を凶に示す濃度で添加し,ALPase活性を測定すると,どちらの細胞とも濃度依存的にALPase活性の上昇が認められ,SaOS-2細胞は30 ng/mlで,MC3T3-E1細胞は50 ng/mlで最大値に達した(図4)。

#### 5. MC3T3-E1細胞のコラーゲン合成に与えるrCTGF/Hcs24の影響

MC3T3-E1細胞を50 ng/mlのrCTGF/Hcs24で刺激し,全タンパク質中の $[^3\text{H}]$ プロリンの取り込み量とコラーゲナーゼによって消化されなかった $[^3\text{H}]$ プロリンの取り込み量を測定すると,全タンパク質中の $[^3\text{H}]$ プロリンの取り込み量はrCTGF/Hcs24刺激によって増加したが,コラーゲナーゼによって消化されなかった $[^3\text{H}]$ プロリンの取り込み量には変化はなかった。すなわち,rCTGF/Hcs24はコラーゲン合成能を増加させることが判明した(図5)。

#### 6. MC3T3-E1細胞及びウサギ成長軟骨細胞の石灰化に与えるrCTGF/Hcs24の影響

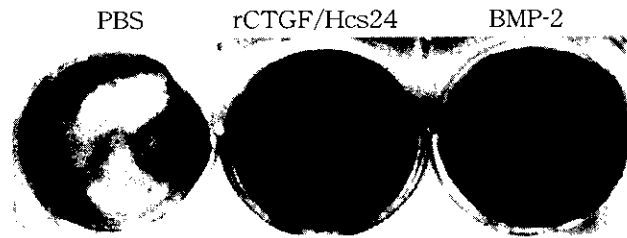
MC3T3-E1細胞の培養系に50  $\mu\text{g/ml}$ のアスコルビン酸,10 mMの $\beta$ -グリセロリン酸及びrCTGF/Hcs24あるいはBMP-2を50 ng/ml添加して20日間培養した。細胞を95%エタノールで固定

後,1%のアリザリンレッドで染色すると,rCTGF/Hcs24添加群はBMP-2添加群と同程度の染色性を示した(図6)。また,ウサギ成長軟骨細胞に対しても同様にアリザリンレッドの染色性で石灰化能を測定すると,rCTGF/Hcs24添加群は無添加群と比較して有意に染色性が亢進した(図6)。

#### D. 考察

内軟骨性骨形成過程において,未分化間葉系細胞から分化した成長軟骨細胞が増殖,成熟し,軟骨基質を産生した後に肥大化し,基質は石灰化して,最終的にこの石灰化基質に血管が侵入して軟骨は骨に置換する。これまで,我々は,CTGF/Hcs24が軟骨細胞の増殖と分化を促進すると共に<sup>2,3)</sup>,血管内皮細胞に対しても増殖と遊走を促進し<sup>2,4)</sup>,なおかつ強力な血管誘導因子であることを報告した<sup>2,5)</sup>。これらの結果から,この因子が内軟骨性骨形成過程を幅広く促進する因子(ecogenin; endochondral ossification genetic factor)と言うべき因子であることを示唆した<sup>2,6)</sup>。さらに,今回の結果は,骨芽細胞に対しても,軟骨細胞同様<sup>8)</sup>,CTGF/Hcs24の特異的な結合部位を持ち,CTGF/Hcs24が骨芽細胞の増殖と分化を促進すると共に,BMP-2とほぼ同程度の石灰化促進作用を有することを示した<sup>9)</sup>。当初,我々は,軟骨細胞系の細胞と骨芽細胞系の細胞との間でdifferential display-PCR法を行い,軟骨細胞に多く発現し,骨芽細胞にほとんど発現していない機

MC3T3-E1細胞



ウサギ成長軟骨細胞

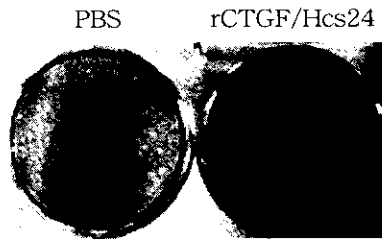


図6 MC3T3-E1細胞及びウサギ成長軟骨細胞の石灰化に与える  
rCTGF/Hcs24及びBMP-2の影響

MC3T3-E1細胞及びウサギ成長軟骨細胞培養系に50 $\mu$ g/mlのアスコルビン酸及び10mMの $\beta$ -グリセリン酸を添加して20日間培養した。細胞を播種すると同時にrCTGF/Hcs24あるいはBMP-2を50ng/ml添加した。培養上清の交換は週2回の割合で行い、その都度、rCTGF/Hcs24あるいはBMP-2を添加した。細胞を95%エタノールで固定後、1%のアリザリンレッドで染色した。

能分子としてCTGF/Hcs24を単離、同定してきた。確かに、今回の結果においても骨芽細胞系の細胞ではCTGF/Hcs24の発現はほとんど認められなかったことから、骨芽細胞に対してはパラクリン因子として機能している可能性が考えられる。すなわち、CTGF/Hcs24は成長軟骨細胞の増殖と分化、肥大化を促進させながら、自らは基質の石灰化に伴って基質中に蓄えられ、破骨細胞などによって軟骨基質の吸収が起こると、基質からCTGF/Hcs24が遊離され石灰化軟骨に侵入しつつある血管内皮細胞やそれに随伴する骨芽細胞に作用して、最終的には、軟骨から骨への置換を促進している可能性が考えられる<sup>10)</sup>。なお、TGF- $\beta$ 、BMP-2、IGF-1の成長因子で刺激すると、CTGF/Hcs24mRNAの発現上昇が認められたことから、CTGF/Hcs24は骨のリモデリングに関与している可能性も考えられる。

### E. 結論

肥大軟骨細胞で産生されるCTGF/Hcs24は成長軟骨細胞や血管内皮細胞に作用するだけでなく、骨芽細胞の増殖と分化にも作用し、内軟骨性骨形成過程の最終段階である軟骨から骨への置換に対しても積極的に作用する多機能因子であることが判明し

た。

### 〔参考文献〕

- 1) Nakanishi T., Kimura Y., Tamura T., Ichikawa H., Yamaai Y., Sugimoto T., Takigawa M. (1997) Cloning of a mRNA preferentially expressed in chondrocytes by differential display-PCR from a human chondrocytic cell line that is identical with connective tissue growth factor (CTGF) mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234 : 206-210.
- 2) Takigawa M. (2000) Physiological roles of connective tissue growth factor (CTGF/Hcs24) : promotion of endochondral ossification, angiogenesis and tissue remodeling. In : *Tissue Engineering for Therapeutic Use* (eds Ikada Y and Shimizu Y) Vol. 4 : pp1-13, Elsevier Amsterdam
- 3) Nakanishi T., Nishida T., Shimo T., Kobayashi K., Kubo T., Tamatani T., Tezuka K., Takigawa M. (2000) Effects of CTGF/Hcs24, a hypertrophic chondrocyte-specific gene, on the proliferation and differentiation of

- chondrocytes in culture. *Endocrinology* 141 : 264-273.
- 4) Shimo T., Nakanishi T., Kimura Y., Nishida T., Ishizeki K., Matsumura T., Takigawa M. (1998) Inhibition of endogenous expression of connective tissue growth factor by its antisense oligonucleotide and antisense RNA suppresses proliferation and migration of vascular endothelial cells. *J. Biochem.* 124 : 130-140.
  - 5) Shimo T., Nakanishi T., Nishida T., Asano M., Kanyama M., Kuboki T., Tamatani T., Tezuka K., Takemura M., Matsumura T., Takigawa M. (1999) Connective tissue growth factor induces the proliferation, migration, and tube formation of vascular endothelial cells *in vitro*, and angiogenesis *in vivo*. *J. Biochem.* 126 : 137-145.
  - 6) 滝川正春, 中西 徹, 志茂 剛 (1998) 内軟骨性骨形成に最も重要な新規成長因CTGF. *細胞工学* 17 : 357-362.
  - 7) Okada K., Oka S., Tohge K., Ono K., Hosoya T. (1991) Thoracic myelopathy caused ossification of the ligamentum flavum : clinicopathologic study and surgical treatment. *Spine* 16, 280-287.
  - 8) Nishida T., Nakanishi T., Shimo T., Asano M., Hattori T., Tamatani T., Tezuka K., Takigawa M. (1998) Demonstration of receptors specific for connective tissue growth factor on a human chondrocytic cell line (HCS-2/8). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247 : 905-909.
  - 9) Nishida T., Nakanishi T., Asano M., Shimo T., Takigawa M. (2000) Effects of CTGF/Hcs24, a hypertrophic chondrocyte-specific gene product, on the proliferation and differentiation of osteoblastic cells *in vitro*. *J. Cell. Physiol.* 184 : 197-206.
  - 10) 中西 徹, 滝川正春 (1999) 結合組織成長因子 CTGF/Hcs24 の生理機能—内軟骨性骨化における役割—. *生化学* 71 : 429-432.
  - K., Doi T., Nishida K., Kawai A., Nakanishi T., Takigawa M., Inoue H. : Expression of connective tissue growth factor in cartilaginous tumors. *Cancer*, 89, 1466-1473, 2000.
  2. Kubota S., Hattori T., Shimo T., Nakanishi T., Takigawa M. : Novel intracellular effects of human connective tissue growth factor expressed in Cos-7 cells. *FEBS Letters*, 474, 58-62, 2000.
  3. Kubota S., Kondo S., Eguchi T., Hattori T., Nakanishi T., Pomerantz R.J., Takigawa M. : Identification of an RNA element that confers post-transcriptional repression of connective tissue growth factor/hypertrophic chondrocyte specific 24 (ctgf/hcs24) gene : similarities to retroviral RNA-protein interactions. *Oncogene*, 19, 4773-4786, 2000.
  4. Kondo S., Kubota S., Eguchi T., Hattori T., Nakanishi T., Sugawara T., Takigawa M. : Characterization of a mouse ctgf 3' -UTR segment that mediates repressive regulation of gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 278, 119-124, 2000.
  5. Nakanishi T., Yamaai Y., Asano M., Nawachi K., Suzuki M., Sugimoto T., Takigawa M. : Overexpressions of connective tissue growth factor/hypertrophic chondrocyte specific gene product 24 (CTGF/Hcs24) decreases bone density in adult mice and induces dwarfism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press. 2001.
  6. Kubota S., Eguchi T., Shimo T., Nishida T., Hattori T., Kondo S., Nakanishi T., Takigawa M. : Novel mode of processing and secretion of connective tissue growth factor/ecogenin (CTGF/Hcs24) in chondrocytic HCS-2/8 cells. *Bone*, in press. 2001.

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Shakunaga T., Ozaki T., Ohara N., Asaumi

### 2. 学会発表

1. 久保田聡, 服部高子, 志茂 剛, 中西 徹, 滝川正春 : 結合組織成長因子 / 肥大軟骨細胞



- 特異的遺伝子産物 (CTGF/Hcs24) 発現による細胞周期変調効果. 第32回日本結合組織学会, 2000.5.24-25, 東京
2. 久保田聡, 近藤誠二, 江口傑徳, 服部高子, 中西 徹, 滝川正春: 軟骨由来の成長因子 CTGF/Hcs24 遺伝子に同定された新たな転写後制御エレメント, CAESAR. 第18回日本骨代謝学会, 2000.7.19-22, 広島
  3. 吉道 玄, 中西 徹, 服部高子, 西田 崇, 山本照子, 滝川正春: 軟骨由来成長因子 CTGF/HCS24 による軟骨分化マーカーII型コラーゲンおよびX型コラーゲンの発現促進に対する MAP キナーゼ経路阻害剤の効果. 第18回日本骨代謝学会, 2000.7.19-22, 広島
  4. 西田 崇, 中西 徹, 志茂 剛, 吉道 玄, 滝川正春: 肥大軟骨由来の成長因子 CTGF/Hcs24 による細胞外基質構成タンパク質および細胞外基質分解酵素発現の制御. 第18回日本骨代謝学会, 2000.7.19-22, 広島
  5. 中西 徹: 結合組織の増殖因子. 第73回日本組織培養学会シンポジウム「細胞治療の基礎と応用」. 2000.9.7-8, 岡山
  6. 山合友一朗, 中西 徹, 浅野将宏, 縄稚久美子, 服部高子, 杉本朋貞, 滝川正春: 軟骨由来成長因子 CTGF と転写制御因子 Cbfa1 の発生過程での遺伝子発現のパターン解析. 歯科基礎医学会, 2000.9.30-10.1, 大阪
  7. 久保田聡, 近藤誠二, 江口傑徳, 服部高子, 中西 徹, 滝川正春: 軟骨由来の成長因子 CTGF/Hcs24 遺伝子の転写後制御エレメント, CAESAR の構造機能連関. 第73回日本生化学会大会, 2000.10.11-14, 横浜
  8. 西田 崇, 中西 徹, 柴原 基, 吉道 玄, 滝川正春: 軟骨由来成長因子 CTGF/Hcs24 の関節軟骨における作用. 第73回日本生化学会大会, 2000.10.11-14, 横浜
  9. 吉道 玄, 中西 徹, 坪井佳子, 山本照子, 滝川正春: 結合組織成長因子 CTGF/Hcs24 の軟骨分化促進作用におけるシグナル伝達経路の解析. 第59回日本矯正歯科学会, 2000.10.25-27, 大阪
  10. 久保田聡, 近藤誠二, 江口傑徳, 服部高子, 中西 徹, 滝川正春: 軟骨由来成長因子 CTGF/Hcs24 遺伝子の転写後調節エレメント CAESAR: 変異体分析によって得られた新たな知見. 第23回日本分子生物学会年会, 2000.12.13-16, 神戸
  11. 江口傑徳, 久保田聡, 近藤誠二, 服部高子, 中西 徹, 窪木拓男, 矢谷博文, 滝川正春: ヒト軟骨細胞様培養細胞株 HCS-2/8 における結合組織成長因子 ctgf/ecogenin 遺伝子発現制御機構. 第23回日本分子生物学会年会, 2000.12.13-16, 神戸
  12. 近藤誠二, 久保田聡, 江口傑徳, 服部高子, 中西 徹, 菅原利夫, 滝川正春: Characterization of a mouse ctgf 3' -UTR segment that mediate repressive regulation of gene expression. 第23回日本分子生物学会年会, 2000.12.13-16, 神戸
  13. 西田 崇, 中西 徹, 柴原 基, 久保田聡, 吉道 玄, 滝川正春: 肥大軟骨細胞由来成長因子 CTGF/Hcs24 の関節軟骨細胞に対する作用. 第14回日本軟骨代謝学会, 2001, 3.9-10, 岐阜
  14. 吉道 玄, 中西 徹, 西田 崇, 服部高子, 滝川正春: 軟骨由来の成長因子 CTGF/Hcs24 の軟骨細胞増殖分化促進作用におけるシグナル伝達機構の解析. 第14回日本軟骨代謝学会, 2001, 3.9-10, 岐阜
  15. 江口傑徳, 久保田聡, 近藤誠二, 服部高子, 中西 徹, 窪木拓男, 矢谷博文, 滝川正春: ヒト軟骨細胞様培養細胞株 HCS-2/8 における結合組織成長因子 ctgf/ecogenin のプロモーター活性決定因子. 第14回日本軟骨代謝学会, 2001, 3.9-10, 岐阜
  16. 中西 徹: 軟骨由来成長因子 CTGF/Hcs24 の内軟骨性骨形成における役割. 第14回日本軟骨代謝学会, 2001, 3.9-10, 岐阜
  17. 椋代義樹, 久保田聡, 中西 徹, 滝川正春: ニワトリ軟骨由来の CTGF/Hcs24 cDNA のクローニングと解析. 第14回日本軟骨代謝学会, 2001, 3.9-10, 岐阜

# 骨の力学的刺激に対する応答のシグナリング

高垣 裕子 (神奈川県歯科大学 口腔生化学教室), 川瀬 俊夫 (神奈川県歯科大学 歯科生体工学教室)

KEYWORDS=骨細胞, 骨芽細胞, リガメント細胞, 力学的刺激, 石灰化, 分化

## 【研究要旨】

これまでの我々の研究から, 骨形成の能力のある細胞, 例えば骨芽細胞, 骨細胞, 歯根膜リガメント細胞などを比較すると, 力学的刺激 (伸展刺激) に対する応答の特性には, 細胞により違いがあることが明らかになった。その場合いずれの細胞系でも, 分化のステージにつれて応答のパターンは変化する。今回, 非侵襲的な刺激を与えて骨折治癒を促進する骨折治療器を用い, 超音波パルス照射 (US) の作用機序を検討した。20分の照射後, 24時間まで培養した細胞の mRNA の発現レベルを生長因子, 骨基質タンパク等について検討した結果, 骨髄由来の (前駆) 骨芽細胞, 骨から調製した骨芽細胞の一部のみが顕著な骨形成作用を示した。応答する細胞は伸展刺激とは異なることが明らかになった。

### A. 研究目的

異なった種類の力学的刺激による石灰化促進のメカニズムを明らかにするのを本研究の目的とする。

### B. 研究方法

ラットの頭蓋冠と脛骨より調製した細胞, 脛骨骨髄由来の細胞とウシ歯根膜細胞を用いて, US が細胞に及ぼす影響を検討した。頭蓋冠及び脛骨から採取した骨芽細胞・骨細胞と MC3T3-E1 細胞・ST2 細胞, ウシ歯根膜細胞, ラット脛骨から採取した骨髄細胞, 及び骨髄細胞をデキサメサゾン (Dex) を含んだ培養液で 1 日, 1 週間, 2 週間培養した細胞, に US を照射し, 全 RNA を抽出して RT-PCR 法により骨タンパク mRNA の発現を観察した。

### C. 研究結果

1) ST2 細胞において, US 照射により, 例えば同じ生長因子でも, IGF-I のようにレベルの上昇する mRNA と TGF- $\beta$  のように変動しないものが見出された。2) 典型的な初期応答遺伝子である c-fos, cox-2 以外にも, オステオカルシン, 骨シアロプロテイン等の骨基質タンパク mRNA が, 照射開始後 1 時間以内に一過性の発現レベルの上昇を示した。3) これらの応答は, タンパク合成阻害剤サイクロヘキサマイドの影響を受けなかった。4) 2) 以外に, 12—24 時間以降に顕著な mRNA レベルの上昇を示す骨タンパク質があり, 24 時間目での mRNA レベルの上昇は, タンパク合成阻害剤サイクロヘキサマイドあるいは Cox2 の選択的阻害剤 NS398 によ

り抑えられた。従って, 1) US 照射は ST2 細胞において IGF-I などの増殖因子や骨基質タンパクの mRNA の発現を誘導し, 細胞を骨形成へ向かわせる。2) US 照射開始後の一過性の mRNA レベルの上昇と 12 時間以降の上昇は, タンパク合成を介さない一次的な初期応答と, 新たなタンパク合成を要する二次的なアナボリックな応答であると考えられた。更に, 臨床的知見を念頭に初代培養細胞の応答を検討するため, ラット長骨骨髄より採取した細胞及びウシ歯根膜細胞を定法に従ってデキサメタゾンないし vit. C により分化させ, 低出力超音波パルスの標的細胞を明らかにすると同時に ST2 細胞との比較を行った。その結果標的細胞としての形質はきわめて狭いウィンドウを持って変化して行くことが明らかとなった。骨形成系細胞では, 一般的な初期応答遺伝子である c-fos, cox-2 のみが応答する相や, 増殖因子も応答する相, あるいは骨基質タンパクも応答する相などがあり, 更に分化が進むと伸展刺激には応答するが US 照射には殆ど応答しない相 (骨細胞) も見出された。また, 頭蓋冠より採取した骨芽細胞の一群では, US 照射直後 c-fos, cox2 や, Osteocalcin (OCN), Bone sialo-protein (BSP), Insulin like growth factor-I (IGF-I) の増加を認めたが, 同じ操作で採取した骨芽細胞でも, OCN, BSP, IGF-I に変化が認められないものもあった。株化骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 は後者と同様であった。骨髄細胞の US に対する反応は c-fos, cox2, IGF-I の増加であったが, Dex 添加 1 日目の骨髄細胞で US 照射後の c-fos, cox2 の発現が最も強く増強

された。IGF-IはDex添加前, 添加1日目でUSによる増加が認められたが, 添加1週, 2週目では変化は認められなかった。OCNはDex添加により骨髄由来細胞に発現するようになるが, USによる変化は認められなかった。

#### D. 考察

骨髄細胞のUS照射に対する反応はプロスタノイドや成長因子などのパラクリンメディエーターを介して骨形成系細胞を骨形成に向かわせる反応であると考えられた。Dexを添加した骨髄細胞のUSに対する応答はDexの作用時間により異なるが, 細胞の分化度に対する影響以外にも, Cox2をはじめとした個別のタンパクに対するDexによる負(正)の調節が加味された結果と考えられた。ウシ歯根膜細胞の結果からは, リガメント細胞の刺激受容の閾値が骨形成系細胞より遥かに高いことが知られた。

#### E. 結論

骨形成系細胞に対してUSは, 1) 非侵襲的に機械的刺激として働き骨形成作用を示し, 2) 細胞の分化に依存した特有の応答をもたらすが, 主な標的細胞は比較的未分化な群であり, 最も広範な臨床的効果はパラクリンのメディエーターの産生によるのではないかと考えられる。骨細胞による伸展刺激に対する応答と対照的である。得られた結果は臨床的な知見を支持するばかりでなく, ステロイドによる続発性骨粗鬆症への応用の可能性も示唆している。

#### F. 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 matrix mineralization. *J. Endodontics*, 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. K. 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.
  3. 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.
  4. 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.
  5. Y. 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. Twenty-Second Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2000.
  6. 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. Twenty-Second Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2000.

7. 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.
8. 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.

# 後縦靭帯骨化症の骨化の発生・進展におけるメカニカルストレスの影響

丹野 雅彦 (弘前大学・整形外科), 古川 賢一 (弘前大学・薬理学),  
植山 和正 (弘前大学・整形外科), 元村 成 (弘前大学・薬理学),  
原田 征行 (弘前大学・整形外科)

## 【研究要旨】

後縦靭帯骨化症 (OPLL) における骨化進展の一因として、靭帯にかかる局所の機械的刺激が指摘されているが、その機序は未だ不明である。今回我々は培養脊柱靭帯細胞に周期的伸展刺激を加えることにより、OPLL 由来脊柱靭帯細胞 (OPLL 細胞) に対する機械的刺激の効果を骨形成という視点から検討した。その結果、伸展刺激が OPLL 細胞の骨芽細胞系への分化を誘導し、また、BMP-2 の autocrine/paracrine 機構を促進する可能性が示唆された。また、伸展刺激による骨芽細胞分化の機序として、細胞膜表面の  $Ca^{2+}$  チャネルを介した  $Ca^{2+}$  の細胞内流入がそのシグナル伝達に重要と考えられた。

## A. 研究目的

これまでの研究により OPLL 細胞は正常の靭帯細胞と比べ alkaline phosphatase (ALP) 活性が高い<sup>1)</sup>、BMP などの各種成長因子に対する反応性が異なる<sup>2, 3)</sup> など、細胞自体が骨形成細胞に形質転換を起こしている可能性が指摘されている。また、局所的な機械的刺激 (メカニカルストレス) が OPLL の骨化進展を促進する可能性が多く臨床研究により示されている<sup>4-6)</sup>。そこで我々は、このような形質転換が予想される OPLL 細胞では、メカニカルストレスに対し正常とは異なる細胞応答、すなわち骨形成を促す方向に反応するという仮説を立てた。その検証を目的とし、今回我々は OPLL 細胞に周期的伸展刺激を加え、その効果を遺伝子レベルおよび蛋白機能の面より正常靭帯 (non-OPLL) 細胞と比較し、メカニカルストレスが OPLL の骨化誘導にどのように関わっているかを検討した。

## B. 研究方法

### 1. 靭帯細胞

細胞は術中摘出した OPLL 患者および non-OPLL 患者 (頸椎椎間板ヘルニア, 頸椎症性脊髄症, 頸部脊柱間狭窄症) の脊柱靭帯組織 (後縦靭帯, 黄色靭帯, 棘間靭帯) (Table I) より 10% FBS 添加 DMEM 中で細胞を explant 法にて単離培養したものを用いた。

### 2. 培養細胞における mineralization

OPLL 細胞と non-OPLL 細胞の性質の差を確認するため、継代 5 代目を 35 mm ゼラチンコートディッシュに播きコンフルエントの後、培養

液にアスコルビン酸 (50  $\mu$ g/ml),  $\beta$ -glycerophosphate (5 mM) を加え、4 週目と 8 週目で alizarin red 染色を行い培養細胞の mineralization を評価した。

### 3. 周期的伸展刺激

継代 5 代目をゼラチンコートしたシリコンチャンバーに播種しコンフルエントの後、培地の血清濃度を 1% に下げ、24 時間経過したもの

Table I Tissue samples Used In This Study, Showing Clinical Diagnosis, Patient's Gender and Age, Tissue Derived.

Code	OPLL			Non-OPLL			
	Diagnosis	Gender/Age	Tissue	Code	Diagnosis	Gender/Age	Tissue
O-1	OPLL	M/45	PLL	N-1	CDH	M/46	PLL
O-2	OPLL	M/46	PLL	N-2	CDH	M/60	PLL
O-3	OPLL	M/57	PLL	N-3	CDH	M/60	PLL
O-4	OPLL	M/63	PLL	N-4	CDH	F/46	PLL
O-5	OPLL	M/50	LF	N-5	CDH	F/49	PLL
O-6	OPLL	M/53	LF	N-6	CDH	M/59	LF
O-7	OPLL	F/58	LF	N-7	CSM	M/44	PLL
O-8	OPLL	F/50	LF	N-8	CSM	M/59	PLL
O-9	OPLL	F/64	LF	N-9	CSM	M/58	LF
O-10	OPLL	M/60	ISL	N-10	CSM	F/58	ISL

OPLL, ossification of the posterior longitudinal ligament; CDH, cervical disc herniation; CSM, cervical spondylotic myelopathy; PLL, posterior longitudinal ligament; LF, ligamentum flavum; ISL, interspinous ligament; M, male; F, female.

を実験に用いた。伸展刺激は、伸展装置（スカラテック社）に上記のチャンバーを装着し、コンピューター制御で一軸方向に周期的（1Hz, 20%長）に加えた。

4. RT-PCR法による骨形成関連遺伝子の発現定量  
 伸展刺激の負荷時間を0, 3, 6, 9時間の間で変化させた後、細胞からtotal RNAを抽出し、骨形成関連遺伝子として、骨芽細胞の早期の分化マーカーであるALP, osteopontinを、またOPLLの発症や異所性骨化に深く関与しているとされる bone morphogenetic protein (BMP)-2 とその受容体 (BMPR-IB ならびに BMPR-II)の mRNA 発現量を RT-PCR法を用い検討した。PCR productは泳動後、SYBR Green-I で染色したものを TIFF file 形式で保存し QuantiScan software を用い定量した。結果はすべて内部標準 (G3PDH) で normalization した。

5. ALP活性と Ca<sup>2+</sup> channel blockerの効果  
 24時間刺激後、細胞のALP活性を測定した。その際、stretch-activated Ca<sup>2+</sup> channel (SAC)の blockerである Gd<sup>3+</sup>と電位依存性L型 Ca<sup>2+</sup> channel (VDC)の blockerである diltiazem および nifedipine を前処理したものでその効果を検討した。

6. Western blot法による培養上清中のBMP発現  
 0 - 24 時間伸展刺激後の細胞上清を Centricon YM-10 (Millipore) を用い20倍濃縮し、同量 (4mg/ml) のサンプルを 10% SDS-PAGEにて電気泳動し、染色後抗ヒトヤギポリクローナルBMP2/4抗体を用い、その発現をみた。

### C. 研究結果

#### 1. in vitro mineralization

OPLLの細胞培養では早いもので4週目頃からミネラルの沈着がみられ、8週以降ではそれがほぼdish全体に認められるようになったが、non-OPLLではミネラル化がみられなかった(図1)。OPLL細胞の10例中6例でこのような反応が認められたことから、これらの細胞がよりosteogenicな性質を持つものと考え、以後の実験に用いた。

2. 伸展刺激による骨形成関連遺伝子の発現亢進  
 伸展刺激を加えても non-OPLLではほとんど変化がみられないのに対し、OPLLでは刺激

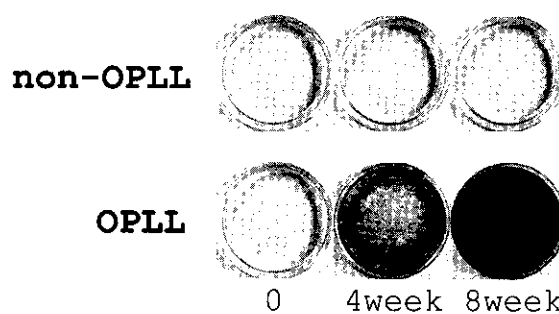


図1 培養細胞における mineralization alizarin red 染色

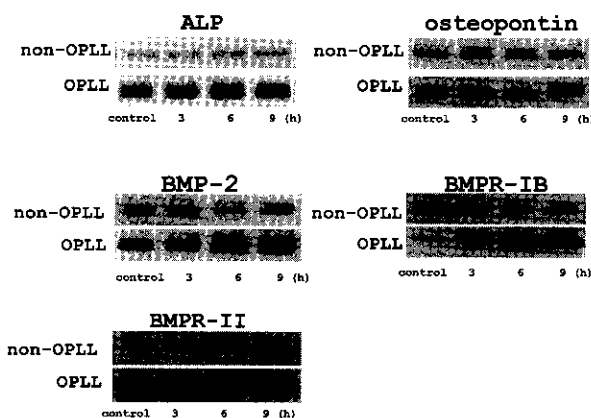


図2A 伸展刺激の骨形成関連遺伝子発現に対する影響 control: stretch(-)

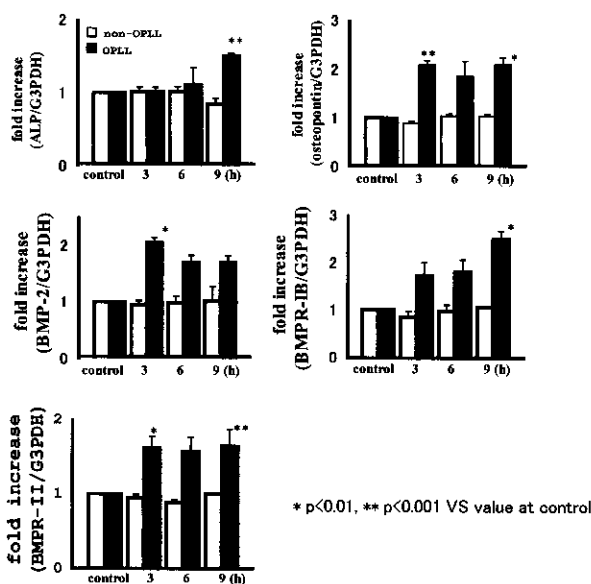


図2B fold increase(N=6)

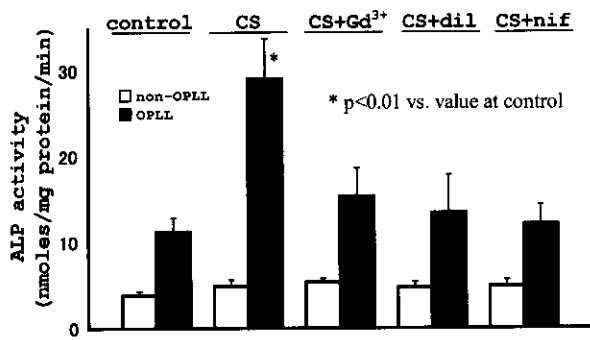


図3 伸展刺激のALP活性に対する影響(N=4)  
control : stretch(-). CS : stretch(+), Gd<sup>3+</sup> : gadrinium, dil : diltiazem, nif : nifedipine

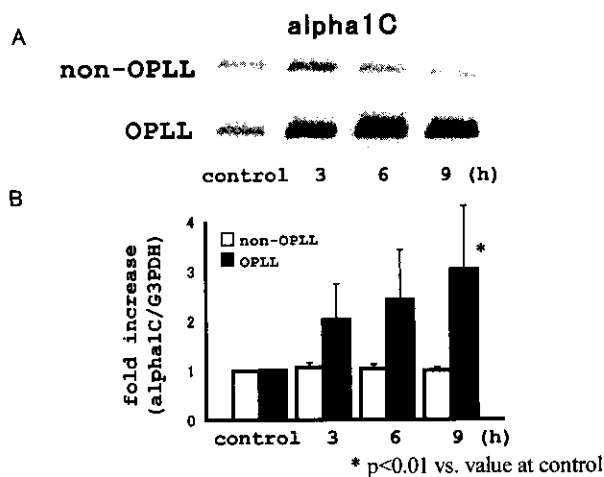


図4 A. 伸展刺激の alpha1c subunit 遺伝子発現に対する影響  
B. fold increase(N=5)  
\* p<0.01 vs. value at control

を加えなかった細胞 (control) に比べALPは9時間で約1.5倍, osteopontinは3時間で約2.1倍増加した。BMP2およびBMPR-IB, BMPR-IIのmRNA発現も同様にOPLL細胞でそれぞれ3時間で1.7倍, 9時間で2.5倍, 9時間で1.6倍と発現が増大した (図2A, B)。

### 3. 伸展刺激による骨芽細胞分化誘導に対するCa<sup>2+</sup> channel blockerの効果

PCRの結果同様ALP活性もOPLL細胞でのみ伸展刺激により活性が亢進する傾向にあった。これはGd<sup>3+</sup> (50 μM), diltiazem (10 μM) および nifedipine (1 μM) の前処理によりcontrolのレベルまで抑制された (図3)。

### 4. VDCのalpha1c subunit mRNA発現

靱帯細胞は非興奮性の細胞と考えられるため, 実際にCa<sup>2+</sup> channelが発現しているのか,

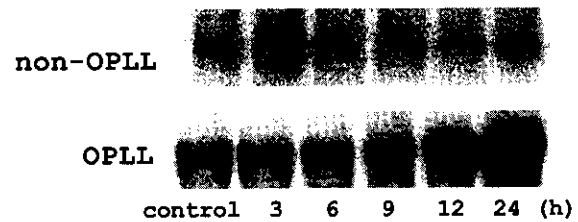


図5 伸展刺激のBMP分泌に対する影響  
control : stretch(-)

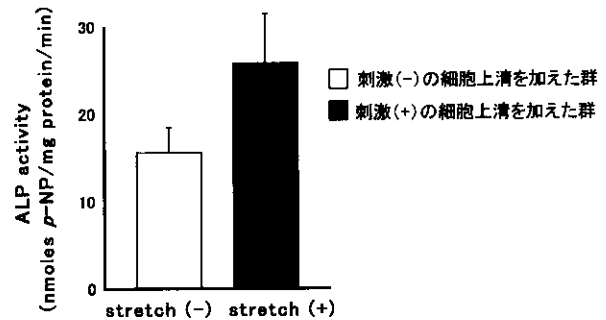


図6 伸展刺激後OPLL細胞上清の他のOPLL細胞に対する効果(N=4)

またそれが伸展刺激の影響を受けるのかを, VDCのalpha1c subunit mRNA発現をPCRにより確認した。結果, OPLL細胞においてその発現が伸展刺激により増大する傾向にあることがわかった (図4A, B)。

### 5. 伸展刺激によるBMP分泌効果

伸展刺激後, 培養上清中のBMP2/4の発現をみたところ, non-OPLLではその発現量に変化がみられなかったのに対し, OPLLでは刺激時間に応じてその発現が増大する傾向にあった (図5)。

### 6. 伸展刺激後の培養上清の他のOPLL細胞に対する効果

24時間伸展刺激後のOPLLの細胞上清で他のOPLL細胞を培養し, 48時間後にALP活性を測定した結果, 有意差がみられなかったもののstretch (-)の上清に比べ, stretch (+)の上清で培養した細胞のALP活性が高くなる傾向にあった (図6)。

## D. 考察

最近の研究により, メカニカルストレスが様々な細胞において生化学的なシグナルに置換され, 周囲の微小環境に適応するように遺伝子発現やタンパク合成を引き起こすこと分かっている<sup>7, 8)</sup>。本研究に

においても、周期的伸展刺激が OPLL 細胞において ALP, osteopontin の mRNA 発現だけでなく、ALP 活性も増大させることが明らかとなり、また、OPLL の発症に深く関与すると考えられている BMP2 とその受容体 mRNA, そして細胞上清中への分泌も増大させることが示された。伸展刺激自体が OPLL 細胞の骨芽細胞分化を誘導しているのか、それとも BMP の分泌を介した反応なのか、もしくは個々の反応の相乗効果なのかは明らかではないが、刺激後の細胞上清で培養した OPLL 細胞で ALP 活性が高くなる傾向があったことから、少なくとも伸展刺激による BMP を含めた何らかの成長因子の分泌作用があるものと考えられる。いずれにしても、こういった事象が OPLL における靭帯骨化を促進させているものと推定される。これは non-OPLL 細胞において、同様の反応がみられなかったことから裏付けられる。それでは OPLL の中でもどういった細胞がメカニカルストレスに反応するのか？ 今回は示していないが、実際は全く伸展刺激に反応しない OPLL 細胞も存在し、特に mineralization が起こらない群においてその傾向が顕著であった。このことは米盛ら<sup>9)</sup>が述べているように、靭帯を採取した時期、すなわち靭帯骨化が進行中であるか、もしくはすでに停止してしまっている状態なのかといった靭帯細胞自体の osteogenic potential の程度の差に影響されているものと考えられる。

メカニカルストレスのシグナル伝達機構のひとつとして、stretch-activated Ca<sup>2+</sup> channel (SAC) が様々な細胞で同定されている<sup>10, 11)</sup>。その活性は Gd<sup>3+</sup> で抑制されるとされるが、Gd<sup>3+</sup> は SAC に特異的ではなく、電位依存性 Ca<sup>2+</sup> channel (VDC) も阻害すること<sup>12)</sup>や VDC の cardiac isoform である  $\alpha_1c$  subunit が骨芽細胞におけるその活性に関与する<sup>13, 14)</sup>といった報告があり、SAC が VDC family に属しているという可能性が示されている。また、VDC (L型) は内軟骨性骨化の過程にも重要な役割を持つと報告<sup>15)</sup>もある。本研究において、OPLL 細胞の  $\alpha_1c$  subunit の発現が伸展刺激により亢進し、さらに同刺激による細胞の ALP 活性の増大が SAC の blocker である Gd<sup>3+</sup> や VDC の blocker である diltiazem や nifedipine によりほぼ抑えられた。このことは OPLL 細胞におけるメカニカルストレス受容機構の一つとして、SAC もしくは VDC (L型) を介した細胞内への Ca<sup>2+</sup> の流入がそのシグナル伝達に重要である可能性を示唆するものと考えられる。靭帯細胞自体は非興奮性の細胞と推定

されるため、こういったかたちで電位依存性の channel が OPLL の靭帯骨化に関与しているという事実は、非常に興味深い知見と考えられる。

今回、BMP が伸展刺激により upregulate される機構について明らかにできなかったが、必ずしも ALP が upregulate される機序とは異なることも考えられ、この点も含め、今後さらなる詳細解明のための研究が必要と考えられる。

## E. 結論

本研究により、周期的伸展刺激が OPLL 細胞の骨芽細胞系への分化を誘導し、また、BMP-2 の autocrine/paracrine 機構を促進する可能性が示唆された。その機序の一つとして、SAC もしくは VDC を介した細胞内への Ca<sup>2+</sup> の流入が重要と考えられた。

### [参考文献]

- 1) Ishida Y and Kawai S : Characterization of cultured cells derived from ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Bone*. 14, 85-91, 1993.
- 2) Kon T, Yamazaki M, Tagawa M, Goto S, Terakado A, Moriya H and Fujimura S : Bone morphogenetic protein-2 stimulates differentiation of cultured spinal ligament cells from patients with ossification of the posterior longitudinal ligament. *Calcif. Tissue Int.* 60, 291-296, 1997.
- 3) Goto K, Yamazaki M, Tagawa M, Goto S, Kon T, Moriya H and Fujimura S : Involvement of insulin-like growth factor I in development of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Calcif. Tissue Int.* 62, 158-165, 1998.
- 4) Matsunaga S, Sakou T, Taketomi E, Yamaguchi M and Okano T : The natural course of myelopathy caused by ossification of the posterior longitudinal ligament in the cervical spine. *Clin. Orthop.* 305, 168-177, 1994.
- 5) Nakamura H : A radiographic study of the progression of ossification of the cervical posterior longitudinal ligament: the correlation between the ossification of the posterior longitudinal ligament and that of the anterior longitudinal ligament. *Nippon Seikeigeka*



- Gakkai Zasshi. 68, 725-36, 1994.
- 6) Takatsu T, Ishida Y, Suzuki K and Inoue H : Radiological study of cervical ossification of the posterior longitudinal ligament. *J. Spinal Disord.* 12, 271-273, 1999.
  - 7) Chicurel ME, Singer RH, Meyer CJ and Ingber DE : Integrin binding and mechanical tension induce movement of mRNA and ribosomes to focal adhesions. *Nature.* 392, 730-733, 1998.
  - 8) Dodds RA, Ali N, Pead MJ and Lanyon LE : Early loading-related changes in the activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase and alkaline phosphatase in osteocytes and periosteal osteoblasts in rat fibulae in vivo. *J. Bone Miner. Res.* 8, 261-267, 1993.
  - 9) Yonemori K, Imamura T, Ishidou Y, Okano T, Matsunaga S, Yoshida H, Kato M, Sampath TK, Miyazono K, ten Dijke and P, Sakou T : Bone morphogenetic protein receptors and activin receptors are highly expressed in ossified ligament tissues of patients with ossification of the posterior longitudinal ligament. *Am. J. Pathol.* 150, 1335-1347, 1997.
  - 10) Lee J, Ishihara A, Oxford G, Johnson B and Jacobson K : Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature.* 400, 382-386, 1999.
  - 11) Duncan RL and Hruska KA : Chronic, intermittent loading alters mechanosensitive channel characteristics in osteoblast-like cells. *Am. J. Physiol.* 267, F909-F916, 1994.
  - 12) Biagi BA and Enyeart JJ : Gadolinium blocks low- and high-threshold calcium currents in pituitary cells. *Am. J. Physiol.* 259, C515-520, 1990.
  - 13) Duncan RL, Kizer N, Barry EL, Friedman PA and Hruska KA : Antisense oligodeoxynucleotide inhibition of a swelling-activated cation channel in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1864-1869, 1996.
  - 14) Miyauchi A, Notoya K, Mikuni-Takagaki Y, Takagi Y, Goto M, Miki Y, Takano-Yamamoto T, Jinnai K, Takahashi K and Kumegawa M, et al. : Parathyroid hormone-activated volume-sensitive calcium influx pathways in mechanically loaded osteocytes. *J. Biol. Chem.* 275, 3335-3342, 2000.
  - 15) Zimmermann B, Lange K, Mertens P and Bernimooulin JP : Inhibition of chondrogenesis and endochondral mineralization in vitro by different calcium channel blockers. *Eur. J. cell Biol.* 63, 14-121, 1994.

# Zucker Fatty Rat の脊柱靱帯骨化における免疫組織学的検討

今給黎篤弘 (東京医科大学整形外科), 町田 英明 (東京医科大学整形外科),  
中谷 知薫 (東京医科大学整形外科), 山本 謙吾 (東京医科大学整形外科),  
正岡 利紀 (東京医科大学整形外科), 渡辺 健 (東京医科大学整形外科)

## 【研究要旨】

脊柱靱帯骨化モデルラットの Zucker Fatty Rat はレプチンのレセプター異常により過食, 肥満に起因する NIDDM により, 4ヶ月齢頃より高インシュリン血症を呈する。6ヶ月齢頃より椎間板での insulin like growth factor-1 (IGF-1) レセプターの発現の増加, 軟骨細胞様細胞の増殖と変性が始まり, 増殖した軟骨細胞様細胞には connective tissue growth factor (CTGF) の発現も認め, 靱帯骨化の前段階と考えられる椎間板の変性に, インスリン, IGF-1, CTGF の関与が示唆された。

### A. 研究目的

脊柱靱帯骨化は耐糖能異常の患者にその発生頻度が多いことが知られ, さらにインスリン, IGF-1 による細胞増殖作用や骨形成促進作用が関与していると考えられている。本研究の目的は, 脊柱靱帯骨化モデルラットである ZFR<sup>1)</sup> を用いて, インスリン, IGF-1 と内軟骨性骨化促進因子である CTGF の靱帯骨化における役割を解明する事である。

### B. 研究対象と方法

対象は 1~17ヶ月齢の ZFR25匹, 1~29ヶ月齢の Non Fatty Rat (以下 NFR) 30匹, 計55匹を使用した (図1)。チエチルエーテルにて麻酔後, 4%パラホルムアルデヒドにて還流固定施行し, 脊椎を摘出した。4%パラホルムアルデヒドにて24時間固

定後, 20%EDTAで1週間脱灰し, パラフィン包埋施行後, 4 $\mu$ mの組織標本を作製した。染色はヘマトキシリン・エオジン染色 (以下 H.E. 染色), pH4.1 トルイジンブルー染色 (以下 T.B. 染色), 免疫染色を施行した。

#### (倫理面への配慮)

東京医科大学動物実験倫理委員会の規定に基づき実験を施行した。

### C. 研究結果

3ヶ月齢の H.E. 染色, T.B. 染色では ZFR, NFR ともに椎間板, 脊柱靱帯に明らかな細胞増殖等の所見は認めず, 線維輪構造は保たれている (図2, 3)。

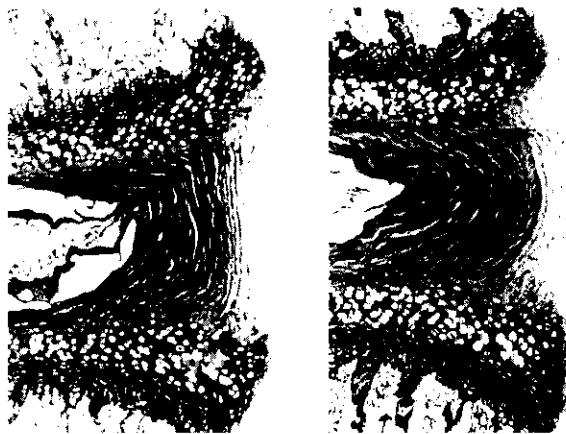
4ヶ月齢の NFR の H.E. 染色では明らかな変化は認めないが, ZFR では腹側椎間板線維輪部に紡錘形細胞と, 円形の軟骨細胞様細胞の増殖を認め, 線維輪構造の破綻と椎間板の膨隆を認める (図4)。ZFR



図1 ZFRとNFR (12ヶ月齢)



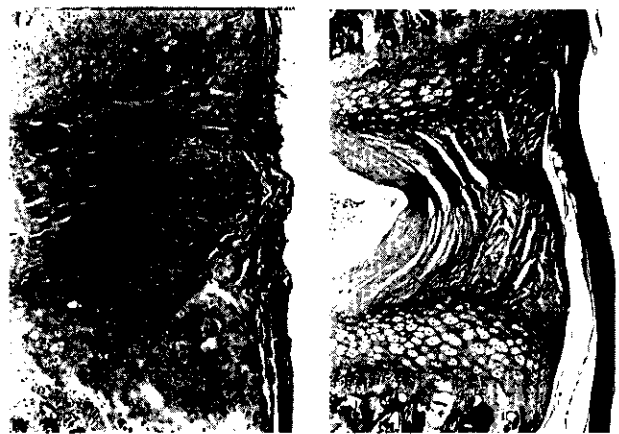
図2 3ヶ月齢 H.E.染色 (Th2/3腹側)  
ZFR  $\times$  100      NFR  $\times$  100



ZFR × 100

NFR × 100

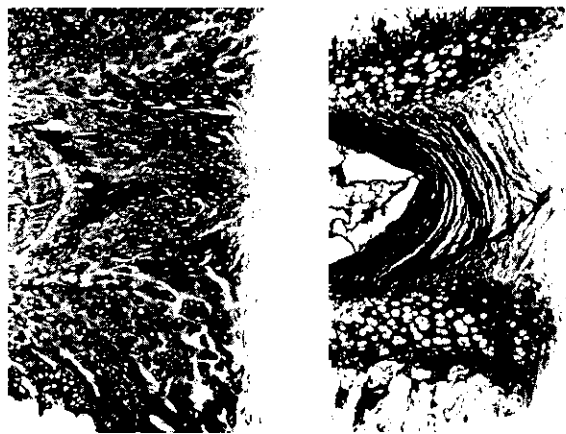
図3 3ヶ月齢 T.B. 染色 (Th2/3 腹側)



ZFR × 100

NFR × 100

図4 4ヶ月齢 H.E. 染色 (Th2/3 腹側)



ZFR × 100

NFR × 100

図5 4ヶ月齢 T.B. 染色 (Th2/3 腹側)



× 100

× 400

図6 ZFR 4ヶ月齢 CTGF 免疫染色 (Th2/3 腹側)



H.E. × 40

T.B. × 40

図7 ZFR12ヶ月齢 (Th2/3 腹側)



H.E. × 200

T.B. × 200

図8 ZFR12ヶ月齢 (Th2 前縦靱帯附着部)

の T.B. 染色では線維輪内に軟骨基質の増大と軟骨細胞様細胞の増殖を認める (図5)。4ヶ月齢のZFRのCTGFによる免疫染色では、増殖した軟骨細胞様細胞に発現を認めた (図6)。

12ヶ月齢のZFRのH.E., T.B.染色では、椎間板、前縦靱帯の肥厚、線維輪構造の破綻を認め (図7)、前縦靱帯附着部では腹側椎間板の線維輪から前縦靱帯附着部まで及ぶ軟骨細胞様細胞と紡錘形細胞の増

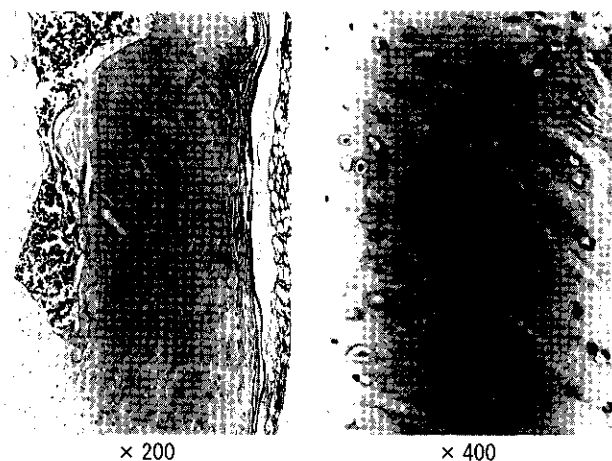


図9 ZFR12ヶ月齢 CTGF免疫染色  
(Th2/3前縦靱帯附着部)

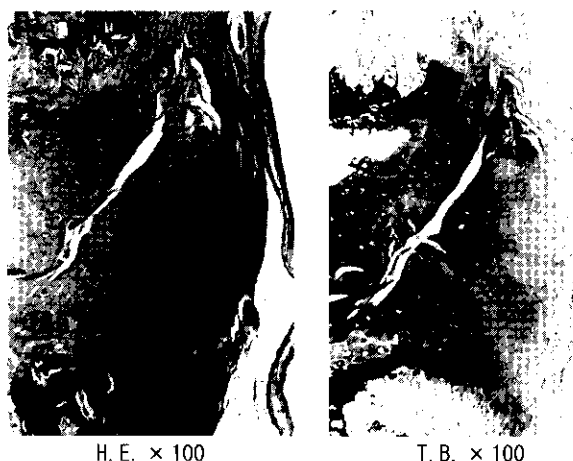


図10 ZFR12ヶ月齢 (Th2/3背側)  
H.E. × 100 T.B. × 100

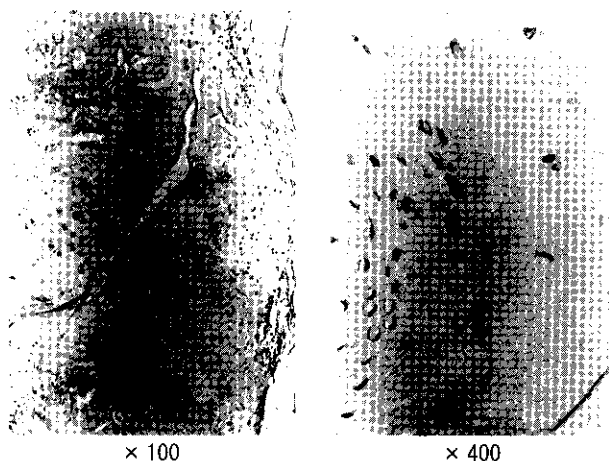


図11 ZFR12ヶ月齢 CTGF免疫染色 (Th2/3背側)

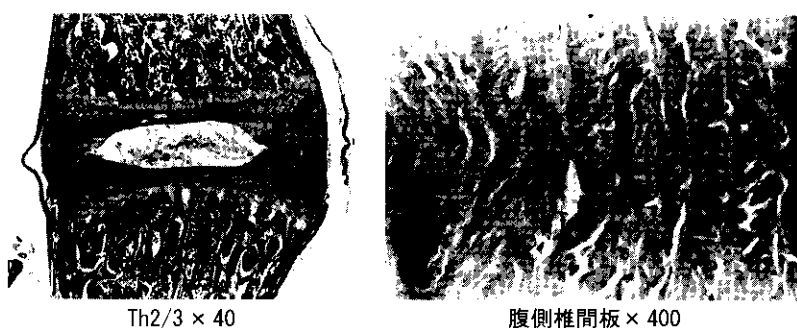


図12 NFR26ヶ月齢 H.E.染色  
Th2/3 × 40 腹側椎間板 × 400

殖を認め(図8), 軟骨様細胞には免疫染色でCTGFの発現を認めた(図9)。しかし, 背側椎間板には明らかな細胞増殖や膨隆などの変化は認めなかった。

17ヶ月齢のZFRのH.E.染色, T.B.染色では, 腹側同様に背側の椎間に軟骨細胞様細胞と紡錘形細胞の増殖や, 後縦靱帯の肥厚も同様に認め(図10), 軟骨

細胞にはCTGFの発現を認めた(図11)。

26ヶ月齢のNFRのH.E.染色では椎間板部の細胞増殖は認めず, 線維輪構造も保たれていた(図12)。T.B.染色では軟骨細胞の増殖や, 軟骨基質の増大等は認めなかった(図13)。

ZFRの血中インスリン値は, 4ヶ月齢をピークに