

図 13 NFR26ヶ月齢 T.B.染色

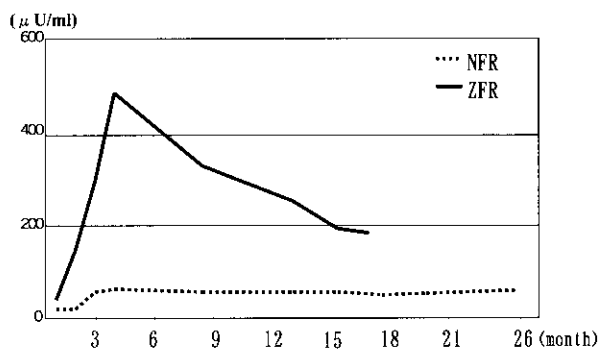


表 1 血中インスリン濃度の経月齢的变化

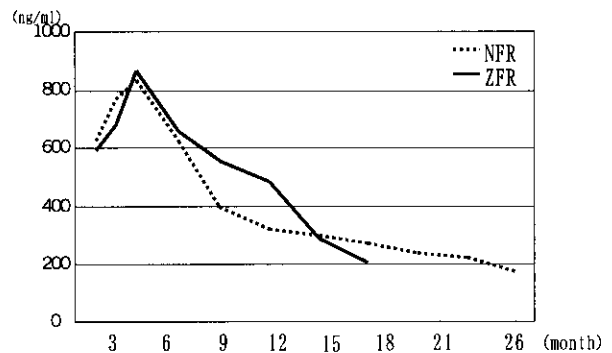


表 2 血中IGF-1濃度の経月齢的变化

- 高インスリン血症
- 高レプチン血症
- 高脂血症
- 空腹時血糖.....正常ないし軽度上昇
- 血糖負荷試験.....軽度の耐糖能低下
- 成長ホルモン軽度上昇
- 過食・肥満
- 不妊

表 3 ZFRの臨床像

- 血糖降下作用
- 蛋白合成作用
- 脂質代謝作用
- 細胞増殖作用
- 骨形成促進作用

表 4 インスリンの生理作用

上昇し、NFR の約 8 倍となり、以後成長につれて徐々に降下していたが、NFRには経月齢的に明らかな変動は認めなかった (表 1)。

血中 IGF-1 値は、ZFR, NFR ともに、生後 4 ヶ月頃までは高値を示すが、以後、徐々に減少傾向を認め、有意差は認めなかった (表 2)。

#### D. 考察

Zucker Fatty Rat は、3 ヶ月齢頃より成人発症型糖尿病に非常に類似した臨床症状を呈するモデルラットである (表 3)。インスリンの生理作用は、血糖降下などの代謝作用のほかに細胞増殖作用や骨形成促進作用があると考えられている (表 4)<sup>2)</sup>。また、インスリンは IGF-1 レセプターのリガンドでもある

ため、高インスリン血症が、IGF-1 本来の強い細胞増殖作用を惹起し、椎間板における軟骨や紡錘形細胞の増殖を促進していると考えられた<sup>3)</sup>。

インスリンのシグナル伝達機構には、代謝作用を調節する PI3 キナーゼ経路と増殖作用を調節する MAP キナーゼ経路の大きく 2 つに区分されている (表 5)<sup>4)</sup>。4 ヶ月齢以降の ZFR では、NFR と比べて高濃度の血中インスリンが、インスリン receptor を介し IRS-1, IRS-2, Shc からその下流の MAP キナーゼの活性を増強し、強い増殖作用発現に至ると考えられた。

軟骨細胞様細胞増殖部に発現を認めた CTGF は肥大軟骨細胞から産生され、前成熟期にある軟骨細胞の成熟や成熟軟骨細胞の肥大化を促進し、骨側の

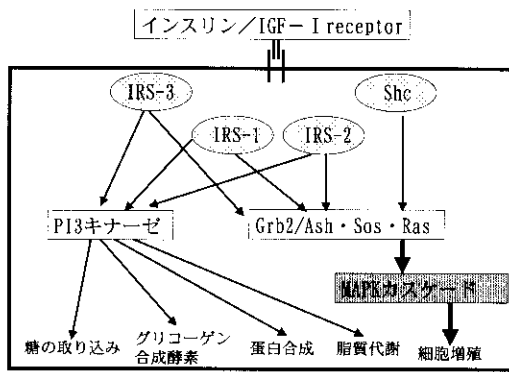


表5 インスリンのシグナル伝達機構

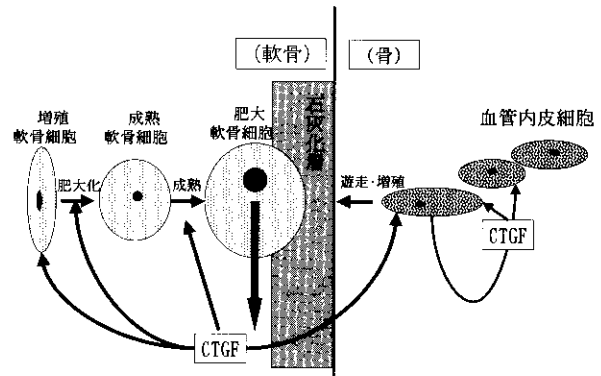


表6 内軟骨性骨化におけるCTGFの役割

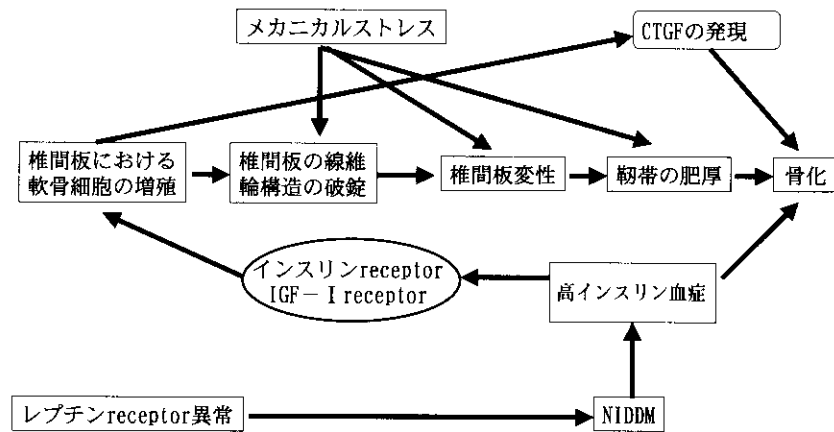


表7 韧带骨化の成因

血管内皮細胞にも働きかけ、石灰化軟骨への血管侵入を促進する内軟骨性骨化をオートクライン、パラクライン的に多段階に促進する因子であると考えられている(表6)<sup>5)</sup>。ZFRでの椎間板の軟骨細胞様細胞増殖部にCTGFの発現を認めたことより、今後、骨化への進展が予想される。しかし、今回の継代では、明らかな韧带骨化を認めることが出来なかった。今回の実験系における韧带骨化の成因としては、レプチンのレセプター異常による過食・肥満の結果、NIDDM、高インスリン血症を呈し、IGF-1・インスリンレセプターを介したインスリンの細胞増殖作用によって肥大軟骨細胞が分化誘導され、CTGFを発現することにより、内軟骨性骨化が促進され、これがインスリン自身の骨形成促進作用とともに韧带骨化に発展していくと考えられた。また、背側よりも腹側の方に早期に変性が認められるのは腹側の方に強いメカニカルストレスが加わるためと考えられた(表7)。

### E. 結論

Zucker Fatty Rat における韧带骨化の前段階と考えられる椎間板での軟骨細胞様細胞の増殖にはインスリン、IGF-1receptor を介した高濃度インスリンの細胞増殖作用が考えられた。

CTGFが発現することより、椎間板の軟骨様細胞の増殖は、韧带骨化の前段階の可能性があるとが示唆された。

### F. 研究発表

なし

### G. 知的所有権の取得状況

特になし

### [参考文献]

- 1) 田中 恵: Zucker Fatty Rat に関する実験的脊柱韧带骨化に関する研究. 東京医大雑誌:52 (1): 19-32, 1994.

- 2) Yano H, et al. : Effects of insulin on in vitro bone formation in fetal rat parietal bone. *Endocrine Journal*.41 (3) : 293-300, 1994.
- 3) Takuwa Y, et al. : Calcium metabolism in paravertebral ligamentous ossification. *Acta Endocrinol* 109 : 428-432, 1985.
- 4) 戸辺一之 : インスリン情報伝達異常と糖尿病. *糖尿病の最前線*. (門脇孝編) 37, 1996.
- 5) 滝川正春ら : 内軟骨性骨形成に最も重要な新規調節因子CTGF. *細胞工学*, 17, 357-362, 1998.

# 内軟骨骨化のモデルとしてのNHOS骨肉腫細胞株移植マウス —内軟骨骨化に働く因子の解析—

楠美 智巳 (弘前大学医学部病理学第二), 佐藤 衛 (弘前大学医学部生化学第二),  
田中 正則 (弘前大学医学部病理学第二), 土田 成紀 (弘前大学医学部生化学第二),  
工藤 一 (弘前大学医学部病理学第二)

## 【研究要旨】

マウスに自然発生した軟部組織腫瘍から樹立した NHOS 細胞株は同系マウスに移植すると骨化をひき起こすことから、骨化の機序を検討した。NHOS細胞をマウス大腿に移植し、移植後1週と3週の腫瘍組織重量はそれぞれ  $1.7 \pm 0.5$  g と  $9.2 \pm 1.8$  g であった。移植後1週の組織ではアルシアンブルー染色陽性の軟骨性の基質が観察されたが、3週の組織では von Kossa 染色陽性の石灰化した骨基質が大部分を占めた。移植後1週の組織ではⅡ型コラーゲンや骨形成因子-6などの発現を認めたが、3週ではⅡ型コラーゲンの発現は低下し、オステオポンチンやオステオカルシンなど骨基質の発現が増加した。これらの結果から、NHOS細胞をマウスに移植した場合の石灰化は内軟骨骨化と類似した経過を取り、この過程を解析するモデルとなる可能性が示唆された。

## A. 研究目的

脊椎後縦靭帯骨化症 (OPLL) は後縦靭帯に進行性の異所性骨化をきたす疾患であり、脊柱靭帯細胞が軟骨細胞に分化し<sup>1)</sup>、さらに内軟骨骨化の過程を経て靭帯骨化に至る機序が想定されている<sup>2)</sup>。軟骨細胞の分化は軟骨幹細胞や前駆軟骨細胞から増殖軟骨細胞、肥大性軟骨細胞などを経て石灰化軟骨細胞へと進行すると考えられ<sup>3)</sup>、これらの分化に骨形成因子 (bone morphogenetic protein, BMP) が重要な役割を演じている<sup>4)</sup>。BMPはBMP-2, 4, 6, 7など数種類のアイソフォームからなり、これらは transforming growth factor (TGF) - $\beta$  スーパーファミリーに属し、異所性に骨、軟骨を誘導するほか、細胞の増殖や分化、アポトーシスの調節などに働くことが明らかにされている<sup>5)</sup>。BMPのシグナルは、細胞膜上のセリン/スレオニンキナーゼ活性を有する受容体 (BMPR) により細胞内に伝えられ<sup>6)</sup>、細胞質の Smad がリン酸化される。リン酸化された Smad は核へ移行し、他の転写因子と協調して標的遺伝子の発現をひき起こす<sup>7)</sup>。一方、BMPは細胞のストレス応答や分化の誘導に働く c-Jun N-terminal kinase (JNK) や p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) のシグナル伝達系を活性化する<sup>8, 9)</sup>。JNKとp38MAPKのそれぞれにより活性化される c-Jun と ATF-2 は Smad と協調して働く転写因子として同定されている<sup>10, 9)</sup>。従って、BMPは Smad 系と JNK/p38MAPK 系の2つの情報伝達経路を活性化し、軟骨細胞の分化を促す。

軟骨細胞の分化を促す因子は、これまで培養細胞やノックアウトマウスなどを用いて調べられてきた<sup>11)</sup>。in vitro の培養には胚芽結合組織から分離した未分化細胞などが用いられ、継代可能な細胞株はほとんど知られていない<sup>12)</sup>。

最近、我々は Balb/c マウスに自然発生した軟部組織の腫瘍から細胞株 (Nishi-Hirosaki osteosarcoma, NHOS) を樹立し、同系マウスへの移植により骨化をひき起こすことを明らかにした<sup>13)</sup>。この細胞株の骨化の機序を明らかにするため、移植後の経過を組織学的に詳細に検討するとともに、骨芽細胞や軟骨細胞の分化度を示すマーカーやこれらの骨化に係わる因子の発現を調べた。

## B. 研究方法

NHOS細胞株の培養は10%ウシ胎児血清を含む RPMI-1640 培地で行った。生細胞数の計測はトリプシン処理後、細胞を回収し、トリパンブルー染色により行った。マウスへの移植は、 $4.0 \times 10^6$  個の NHOS細胞を6週から10週齢の Balb/c マウスの大腿部の筋肉内に注入して行い、移植後1~3週の腫瘍を材料として病理組織学的検索やアルシアンブルー染色、von Kossa 染色などの組織化学を行った。in situ ハイブリダイゼーション (ISH) は4%パラホルムアルデヒドで固定した移植腫瘍を材料として Hara らの方法<sup>14)</sup> に従って行った。I型コラーゲンのプロ- $\alpha$ 1鎖 (COL1A1)、アルカリ性フォスファターゼ (ALP)、オステオポンチン (OPN)、オ

表 1. RT-PCR による培養細胞と移植後 1 週と移植後 3 週の腫瘍組織での骨芽細胞と軟骨細胞の分化マーカーと骨化に係わる因子の発現

	培養細胞	移植後 1 週の腫瘍組織	移植後 3 週の腫瘍組織
A. 分化マーカー			
COL1A1	(+)	(+)	(+)
ALP	(+)	(+)	(+)
COL2A1	(-)	(+)	(-)
B. 骨化に係わる因子			
Cbfa1	(+)	(+)	(+)
BMP-2	(+)	(+)	(+)
BMP-4	(+)	(+)	(+)
BMP-6	(-)	(+)	(+)
BMP-7	(-)	(+)	(+)
BMPRI A	(+)	(+)	(+)
BMPRI B	(+)	(+)	(-)
BMPRII	(+)	(+)	(+)
PTH/PTHrPR	(+)	(+)	(+)

(+) は発現, (-) は発現せず.

ステオカルシン (OC) などの cDNA からそれぞれのアンチセンス RNA とセンス RNA を合成し, ジゴキゲニンで標識し ISH のプローブとして使用した。

RT-PCR は培養細胞あるいは移植腫瘍から調製した RNA を逆転写酵素により cDNA を合成した後, 適当なプライマーと Taq ポリメラーゼを添加して PCR を行った<sup>13)</sup>。

## C. 研究結果

### 1. 移植腫瘍での骨化

NHOS 細胞をマウス大腿の筋肉に移植したところ, 5 日後に移植部位は腫瘍を形成し, 1 週後と 3 週後の腫瘍重量はそれぞれ,  $1.7 \pm 0.5$  g と  $9.2 \pm 1.8$  g となった。組織学的に, 腫瘍組織は紡錘形の細胞と多角形の細胞からなり, 移植後 1 週では, 一様に淡青色に染まる部分と好塩基性の網目状の構造が散見された。淡青色の部分はアルシアンブルー染色で陽性を示し, 軟骨細胞由来の基質と考えられた。移植後 2 週以降, 軟骨性の基質は減少し, 好塩基性の網目状の構造が大部分を占めるようになった。これらの網目構造は von Kossa 染色で陽性を示し, 石灰化した骨基質と考えられた。軟骨性の基質を取り囲む細胞は形態の上で骨基質周囲の細胞と差異を認めなかった。

移植後 3 週の腫瘍組織での COL1A1, OPN, OC など骨基質のタンパク質をコードする遺伝子の発現を, アンチセンス RNA プローブを用

いた ISH により検討した。COL1A1 と ALP mRNA は腫瘍組織全体に発現を認めたが, OPN mRNA は骨基質を取り囲む腫瘍細胞に強く発現し, OC は骨基質周囲だけで発現し, 骨化していない部位では発現を認めなかった。センス RNA をプローブとした場合, これらの染色を認めず, その特異性を確認した。

### 2. 骨化に係わる遺伝子の発現

骨芽細胞と軟骨細胞の分化マーカーと骨化に係わる因子の発現を培養 NHOS 細胞, 移植後 1 週と 3 週の腫瘍組織からそれぞれ RNA を調製し, RT-PCR により検討した。COL1A1 と ALP mRNA は培養細胞, 移植後 1 週と 3 週のいずれの時期でも発現を認めたが, II 型コラーゲンの  $\alpha 1$  鎖 (COL2A1) は移植後 1 週で強く発現し, 培養細胞と移植後 3 週ではほとんど発現を認めなかった (表 1)。

骨化に係わる因子として, Cbfa1, BMP-2, 4, 6, 7 とこれらの受容体 BMPRIA, BMPRI B と BMPRII, および副甲状腺ホルモン (PTH) / 副甲状腺ホルモン関連ペプチド (PTHrP) の受容体 (PTH/PTHrPR) の発現を調べた。これら多くは培養細胞と移植腫瘍のいずれでも発現していたが (表 1), BMP-6 と 7 は培養細胞では発現せず, 移植後 1 週と 3 週の腫瘍組織で発現した。BMPRI B の発現は移植後 3 週の腫瘍組織で陰性化した。

#### D. 考察

NHOS 細胞は細胞培養の増殖期には紡錘形の形態を示したが、増殖の停止した定常期には多角形を示した。細胞培養を30日間継続しても石灰化は観察されなかった<sup>13)</sup>。しかし、NHOS細胞を同系のマウス大腿の筋肉内に移植すると腫瘍組織を形成し、移植後1週にはアルシアンブルー陽性の軟骨基質を認め、2週後には石灰化した骨基質が観察され、3週後にはこれが腫瘍組織全体に広がった。培養細胞ではCOL2A1やBMP-6、BMP-7の発現を認めず、COL2A1は移植後1週の腫瘍組織では認めたが、3週では認めなかった。これらの結果から、NHOS細胞をマウス大腿に移植した場合の石灰化は内軟骨骨化と類似した経過を取ることが注目された。培養細胞の段階では紡錘形から多角形への細胞形態の変化が観察されたが、軟骨細胞の初期分化マーカーCOL2A1は観察されなかったことから、前駆軟骨細胞の段階に留まっている可能性が示唆された。移植後1週の腫瘍組織の細胞は、COL2A1やBMP-6の発現の結果などから<sup>12, 15)</sup>増殖軟骨細胞に分化し、移植3週目の細胞はさらに石灰化軟骨細胞あるいは骨芽細胞に分化していると考えられた。細胞培養系で前駆軟骨細胞から石灰化軟骨細胞に分化するマウス細胞株が知られている<sup>12)</sup>。一方、NHOS細胞株は、マウスへの移植により、増殖軟骨細胞やそれ以降の細胞に分化すると考えられ、宿主由来の因子が分化誘導に関与し、腫瘍組織でBMP-6とBMP-7の発現を促す可能性が示唆される。

前述のように、BMPはSmad系とJNK/p38MAPK系の2つの経路を介して軟骨細胞の分化を促す。一方、PTHやPTHrPによる分化の抑制にp38MAPK活性の抑制が関与することが明らかになっている<sup>16)</sup>。従って、軟骨細胞の分化にJNK/p38MAPK系も重要な役割を演じていると考えられ、今後、これらの経路の阻害剤を用いて、その役割が具体的に解明されることが期待される。

内軟骨骨化の過程は、軟骨細胞の分化と骨芽細胞による骨化が厳密な調節を受けながら進行するが、その初期に、前駆軟骨細胞と前駆骨芽細胞の2種類の前駆細胞が存在し、それらからそれぞれの細胞へ分化していくのか、単一の前駆細胞が存在し、まず軟骨細胞に分化した後、さらに骨芽細胞に分化していくのかは明らかでない<sup>17)</sup>。本細胞株での結果からは、後者の可能性が示唆されるが、移植後3週の細胞が骨芽細胞の性質を有しているかどうか、検討する必要がある。また、これらの細胞がNHOS細胞に由

来し、宿主の骨芽細胞由来ではないことの確認も必要である。

OPLLのモデル動物の1つと考えられるttwマウス(あるいはtwyマウス)ではその原因遺伝子としてnucleotide pyrophosphatase (Npp) 遺伝子の変異が報告された<sup>18)</sup>。nucleotide pyrophosphataseは石灰化を抑制するピロリン酸の産生を促すことから、Npp 遺伝子の変異はピロリン酸の産生を抑制し、石灰化を促進する可能性が示唆されている。また、最近、関節軟骨の石灰化をひき起こすマウスの原因遺伝子としてピロリン酸の輸送に働く遺伝子が同定された<sup>19)</sup>。従って、OPLLに観察される骨化には、軟骨細胞の分化に働く因子だけでなく、石灰化に働く因子など多くの因子の関与が示唆される。NHOS細胞を移植したマウスモデルは、内軟骨骨化の過程の解明や骨化に係わる因子を個体レベルで解析する上で有用と考えられる。

#### E. 結論

マウス骨肉腫細胞株NHOSをマウス大腿の筋肉に移植すると腫瘍組織を形成し、移植後1週には軟骨基質を、3週には石灰化した骨基質を認めた。移植後1週の細胞はCOL2A1やBMP-6などの発現から増殖軟骨細胞の段階に分化していると考えられ、その石灰化は内軟骨骨化と類似した経過をとることが示唆された。

#### [参考文献]

- 1) Kon T, Yamazaki M, Tagawa M, Goto S, Terakado A, Moriya H, 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.
- 2) Okada K, Oka S, Tohge K, Ono K, Yonenobu K, Hosoya T : Thoracic myelopathy caused by ossification of the ligamentum flavum. Clinicopathologic study and surgical treatment. *Spine* 16 : 280-287, 1991.
- 3) 宿南知佐, 開 祐司 : 軟骨形成とサイトカイン. *実験医学* 18 : 2161-2166, 2000.
- 4) Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitscock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA : Novel regulators of bone formation. Molecular clones and activities. *Science* 242 :

- 1528-1534, 1988.
- 5) Hogan BL : Bone morphogenetic proteins : multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* 10 : 1580-1594, 1996.
  - 6) Koenig BB, Cook JS, Wolsing DH, Ting J, Tiesman JP, Correa PE, Olson CA, Pecquet AL, Ventura F, Grant RA, Chen G-X, Wrana JL, Massague J, Rosenbaum JS : Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH3T3 cells. *Mol. Cell Biol.* 14 : 5961-5974, 1994.
  - 7) Kretschmar M, Doody J, Timokhina I, Massague J : A mechanism of repression of TGF  $\beta$  /Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev.* 13 : 804-816, 1999.
  - 8) Brown JD, DiChiara MR, Anderson KR, Gimbrone MA, Topper JN : MEKK-1, a component of the stress (stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase) pathway, can selectively activate Smad 2-mediated transcriptional activation in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 274 : 8797-8805, 1999.
  - 9) Sano Y, Harada J, Tashiro S, Gotoh-Mandeville R, Maekawa T, Ishii S : ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor- $\beta$  signaling. *J. Biol. Chem.* 274 : 8949-8957, 1999.
  - 10) Zhang Y, Feng XH, Derynck R : Smad 3 and Smad 4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF- $\beta$  -induced transcription. *Nature* 394 : 909-913, 1998.
  - 11) Chung U, Schipani E, McMahon AP, Kronenberg HM : Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. *J. Clin. Invest.* 107 : 295-304, 2001.
  - 12) Shukunami C, Shigeno C, Atsumi T, Ishizeki K, Suzuki F, Hiraki Y : Chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic cell line ATDC5 in vitro. *J. Cell Biol.* 133 : 457-468, 1996.
  - 13) Kusumi T, Nishi T, Tanaka M, Tsuchida S, Kudo H : A murine osteosarcoma cell line with a potential to develop ossification by transplantation. *Jpn. J. Cancer Res.* in press, 2001.
  - 14) Hara A, Ikeda T, Nomura S, Yagita H, Okumura K, Yamauchi Y : In vivo implantation of human osteosarcoma cells in nude mice induces bones with human-derived osteoblasts and mouse-derived osteocytes. *Lab. Invest.* 75 : 707-717, 1996.
  - 15) Akiyama H, Shukunami C, Nakamura T, Hiraki Y : Differential expressions of BMP family genes during chondrogenic differentiation of mouse ATDC5 cells. *Cell Struct. Funct.* 25 : 195-204, 2000.
  - 16) Zhen X, Wei L, Wu Q, Zhang Y, Chen Q : Mitogen-activated protein kinase p38 mediates regulation of chondrocyte differentiation by parathyroid hormone. *J. Biol. Chem.* 276 : 4879-4885, 2001.
  - 17) Karsenty G : Chondrogenesis just ain't what it used to be. *J. Clin. Invest.* 107 : 405-407, 2001.
  - 18) Okawa A, Nakamura I, Goto S, Moriya H, Nakamura Y, Ikegawa S : Mutation in Npps in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nature Genet.* 19 : 271-273, 1998.
  - 19) Ho AM, Johnson MD, Kingsley DM : Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis. *Science* 289 : 265-270, 2000.

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kumano T, Kimura J, Hayakari M, Yamazaki T, Sawamura D, Tsuchida S : Polymorphism of the glutathione transferase subunit 3 in Sprague-Dawley rats involves a reactive cysteine residue. *Biochem. J.* 305 : 405-412, 2000.
2. Kakizaki I, Ookawa K, Ishikawa T, Hayakari M, Aoyagi T, Tsuchida S : Induction of apoptosis and cell cycle arrest in mouse colon 26 cells by benastatin A. *Jpn. J. Cancer Res.* 91 : 1161-1168, 2000.
3. Ookawa K, Jin H, Yokota J, Tsuchida S : Phenotypic alterations of osteosarcoma cell lines by introduction of tumor suppressor genes using a tetracycline-

- inducible system. In *New Directions for Cellular and Organ Transplantation*. M. Sasaki et al. eds. pp. 15-22, Elsevier, 2000.
4. Hayakari M, Kimura J, Kumano T, Takahata T, Suzuki S, Satoh K, Tsuchida S : Metabolism of glucocorticoid hormone by macrophage migration inhibitory factor. In *New Directions for Cellular and Organ Transplantation*. M. Sasaki et al. eds. pp. 31-35, Elsevier, 2000.
  5. Tsuchida S, Sato M, Yamazaki T, Kimura J, Ookawa K, Hayakari M, Satoh K : Glutathione transferase as markers for allograft rejection in liver and kidney transplantation. In *Progress in Transplantation*. A. Munakata ed., pp. 9-17, Elsevier, 2000.
  6. 土田成紀, 佐藤 衛 : グルタチオンS-トランスフェラ - ゼによる薬物・異物代謝. *BIO Clinica* 15 : 436-441, 2000.
  7. 土田成紀 : グルタチオントランスフェラ - ゼの発現制御とストレス応答における役割. *生化学* 73 : 89-92, 2001.



# 後縦靭帯骨化症患者由来の靭帯細胞においてCTGF/Hcs24により 発現調節される遺伝子の解析

赤石 孝一 (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), 丹野 雅彦 (弘前大学整形外科),  
山本 祐司 (弘前大学整形外科), 原田 征行 (弘前大学整形外科)

## 【研究要旨】

OPLL患者の靭帯骨化移行部での免疫組織学的検討を行い, CTGF/Hcs24免疫染色により軟骨細胞, 特に石灰化軟骨に存在する肥大軟骨細胞と思われる細胞が陽性であることを見出した。しかしながら対照とした非OPLL患者の頸椎後縦靭帯では, 陰性であった。そこで, 本研究では, OPLLの発症, 進展においてCTGF/Hcs24の果たす役割を解明するため, recombinant human CTGF/Hcs24 (rhCTGF)をOPLL患者の脊柱靭帯由来培養細胞に添加することにより誘導される遺伝子の解析を, DD-RT-PCR法を用いて行った。rhCTGFの添加でバンド濃度が減少したゲルより配列決定でき, BRCA1と相同性を持っていた。更に, Estrogen単独添加よりも, rhCTGFとEstrogenとの併用で添加したものの方が, RT-PCR法においてALP mRNAの発現が有意に高いことが証明された。EstrogenがCTGF/Hcs24との相互作用によって骨化進展の過程を増強させる可能性が示唆された。

## A. 研究目的

後縦靭帯骨化症 (ossification of the posterior longitudinal ligament, 以下OPLL)は脊柱管内の後縦靭帯が異所性に骨化し, 脊髄を圧迫することで重篤な脊髄麻痺を起こす疾患である。発症には遺伝学的因子及び環境因子等が複雑に関与していると考えられているが, 詳細は不明である。本疾患における靭帯骨化は組織学的検討から主に内軟骨性骨形成過程を介していると考えられている<sup>1) 2)</sup>。内軟骨性骨形成過程とは, 軟骨細胞の増殖と分化および骨側からの血管侵入を伴う過程である。

最近, 肥大軟骨細胞に遺伝子hcs24が高発現しており, その産物である結合組織成長因子CTGFが正常な内軟骨性骨形成全般を促進する因子として機能していることが明らかとなってきた<sup>3~7)</sup>。更に, 肥大軟骨細胞で産生されたCTGF/Hcs24が血管に随伴する骨芽細胞にも働いて骨形成を促進し, 結果として軟骨の骨への転化を促すことも報告されている<sup>8)</sup>。

我々はOPLL患者の骨化靭帯の組織学的検討を行った結果, 骨化靭帯は靭帯から骨組織へ連続的に移行しており, その移行部には線維性軟骨や石灰化軟骨が観察された。サフラニンO染色およびType II collagenの免疫染色で靭帯骨化移行部の細胞外マトリックスや軟骨細胞周囲が染色され, 靭帯骨化移行部は軟骨組織であることが確認された。更に, 靭

帯骨化移行部での免疫組織学的検討を行い, CTGF/Hcs24免疫染色により軟骨細胞, 特に石灰化軟骨に存在する肥大軟骨細胞と思われる細胞が陽性であることを見出した(図1)。しかしながら対照とした非OPLL患者の頸椎後縦靭帯では, 陰性であった。このことは, CTGF/Hcs24がOPLLの発症, 進展に関与していることを示唆する。

そこで, 本研究では, OPLLの発症, 進展においてCTGF/Hcs24の果たす役割を解明するため, recombinant human CTGF/Hcs24 (rhCTGF)をOPLL患者の脊柱靭帯由来培養細胞に添加することにより誘導される遺伝子の解析を, differential display reverse transcription polymerase chain reaction (DD-RT-PCR)法を用いて行った。

## B. 研究方法

本研究を行うにあたって, 対象者にインフォームドコンセントを行い, 事前に弘前大学医学部倫理委員会の承認を得た。

1) OPLL患者由来の細胞培養およびrhCTGF添加によるDD-RT-PCR

OPLL患者1例(64歳男性)より無菌的に手術時に摘出した骨化近傍部の骨化していない後縦靭帯を用いた。この組織を細切し, phosphate buffered saline (PBS)にて洗浄した。5% CO<sub>2</sub>/95% Air, 37°Cの条件下で, 組織培養用の直径100mmのDish

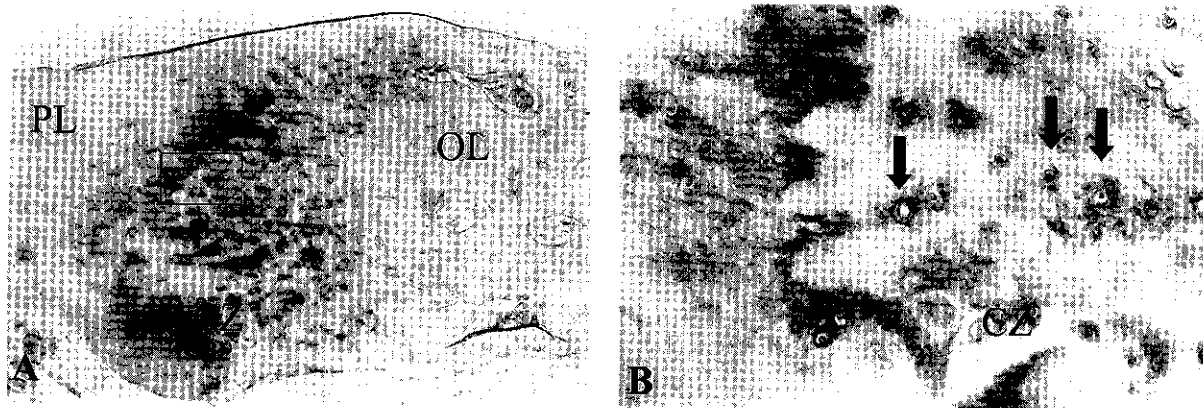


図1. OPLLの靭帯骨化移行部でのCTGFの局在

A : × 40

B : × 200

PL : 後縦靭帯 CZ : 石灰化層 OL : 骨化層

を用いて 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS ; JRH Biosciences, Lenexa, KS, U.S.A.) 含有 Dulbecco' s Modified Eagle Medium (DMEM; Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) 培地中にその組織片 (explant) を静置し, explant 外に遊走して来た細胞を継代培養した。継代には, 0.1 % の trypsin を使用した。また, 培養液は 3 日ごとに交換を行った。継代 5 代目に confluent に達した後, 1 % FBS 含有 DMEM 培地に変更し 24 時間後に 30ng/ml の rhCTGF を添加し, 24 時間後に RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を使用し RNA を抽出した。対照として同一の細胞にて rhCTGF を添加しないものを用いた。誘導される遺伝子発現を Anchor Primer を次の 3 つ (Anchor Primer 1: 5'-GCGCAAGCTTTTTTTTTTTGG-3', Anchor Primer 2: 5'-GCGCAAGCTTTTTTTTTTTTCG-3', Anchor Primer 3: 5'-GCGCAAGCTTTTTTTTTTTTCG-3') と, 任意 Primer を次の 3 つ (Arbitrary Primer 1: 5'-CGGGAAGCTTATCGACTCCAAG-3', Arbitrary Primer 2: 5'-CGGGAAGCTTTAGCTAGCATGG-3', Arbitrary Primer 3: 5'-CGGGAAGCTTGCTAAGACTAGC-3') を組み合わせて合計 9 通りで, Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて DD-RT-PCR 法を行った。PCR 産物をポリアクリルアミドゲル上で電気泳動し, SYBER Green I (Molecular Probes inc., Eugene, OR, U.S.A.) にて染色した。特異的に発現しているバンド部分のゲルを抽出し, Ultrafree-DA (Millipore, Tokyo, Japan) を用いて DNA を精製した。精製した DNA の塩基配列を Genetic Analyzer (Applied

Biosystems, Foster, CA, U.S.A.) を用いて決定し, データベース (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) においてホモロジー検索 (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) をした。

## 2) BRCA1 mRNA の発現量の変化

5 例の男性 OPLL 患者 (年齢 46 ~ 69 歳, 平均 55.8 歳) より無菌的に手術時摘出した骨化近傍部の骨化していない後縦靭帯由来の細胞を, 前述と同様の方法で細胞培養を行った。それぞれの Dish において継代 5 代目に confluent に達した後, 1 % FBS 含有 DMEM 培地に変更し 24 時間後に 30ng/ml の rhCTGF を添加し, 24 時間後に RNA を抽出した。対照として同一の細胞にて rhCTGF を添加しないものを用いた。human cDNA ライブラリー (Accession14680) を用いて Primer BRCA1 (Forward: 5'-GTTGGTCTGACTGACAAGGAATTGG-3', Reverse: 5'-TGGGCATTTAGAAGGGGATGAC-3') を作成し, mRNA 量を定量化するために指数関数的に増加しているサイクル数で RT-PCR 法を行った。PCR 産物をアガロースゲル (0.25 %) 上で電気泳動を行い, SYBER Green I で染色した。染色後, UV トランスイルミネーターで蛍光を発したゲルをデジタルカメラで画像をとり QuantiScan (BIOSOFT, Cambridge, UK) で解析した。添加した群としない群とでそれぞれ比較検討した。内部標準として glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) を用いた。統計解析には, paired t-test を用いた。

## 3) Estrogen receptor- $\alpha$ mRNA の発現

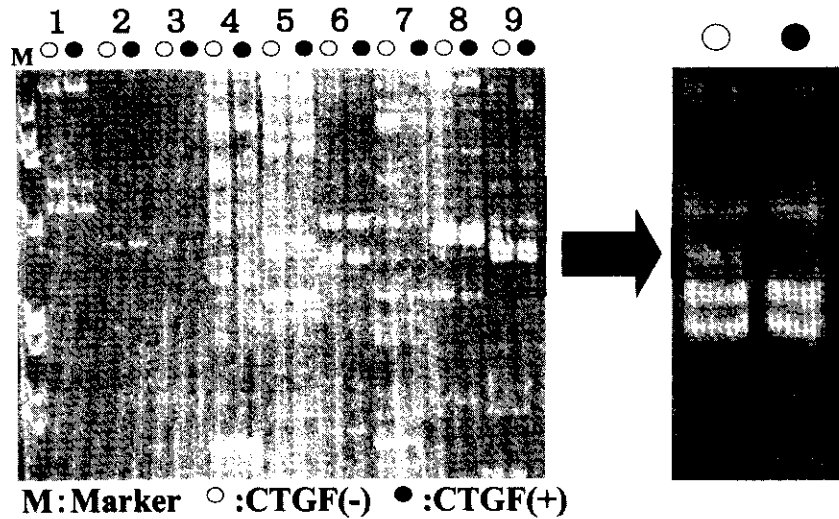


図2. DD-RT-PCR法

2) で述べた5例のOPLL患者の培養細胞を用いた。それぞれのDishにおいて継代5代目にconfluentに達した後、1%FBS含有DMEM培地に変更し24時間後にRNAを抽出した。Estrogen receptor- $\alpha$  (以下ER- $\alpha$ ) mRNAの存在を確認するために、Primer ER- $\alpha$  (Forward: 5'-GTACCAATGACAAGGGAAGTATGGC-3', Reverse: 5'-AGACGAGACCAATCATCAGGATCT-3')を用いてRT-PCR法を行った。PCR産物をアガロースゲル上で電気泳動を行い、SYBER Green Iで染色した。染色後、UVトランスイルミネーターで蛍光を発したゲルをデジタルカメラで画像をとり、QuantiScanで解析した。

4) rhCTGFならびに17 $\beta$ -estradiolの添加

新たに3例の男性OPLL患者(年齢54~66歳、平均年齢60.0歳)から手術時に摘出した骨化近傍部の骨化していない後縦靭帯由来の細胞を使用した。継代5代目にconfluentに達した後、rhCTGFならびに17 $\beta$ -estradiol (以下E2)を添加した。用いた条件は4つで、培養細胞がconfluentに達した後、1%FBS含有DMEM培地に変更し24時間後に、a)何も添加せずに72時間培養、b) rhCTGFのみを添加し72時間培養、c) 24時間後にE2のみ $10^{-5}$ Mの濃度で添加し48時間培養、d) rhCTGFを添加し24時間後に更にE2を $10^{-5}$ Mの濃度で添加し48時間培養である。ALP mRNAの発現誘導をPrimer ALP (Forward: 5'-ATCGCCTACCAGCTCATGCAT-3', Reverse: 5'-GTTCAGCTCGTACTGCATGTC-3')を作成し、RT-PCR法を用いて測定した。PCR産物をアガロースゲル上で電気泳動を行い、SYBER Green Iで染色した。染色後、UVトランスイルミネーターで蛍

光を発したゲルをデジタルカメラで画像をとり、QuantiScanで解析した。

### C. 研究結果

1) rhCTGFを添加して24時間培養したOPLL細胞と添加しなかった細胞からtotal RNAを抽出し、DD-RT-PCR法にて解析したところ、バンドの濃度が増加したものが複数見出された(図2)。それらのバンドをゲルから抽出し、DNA配列の決定を試みたところ、添加によりバンド濃度が減少した(Anchor Primer 3: 5'-GCGCAAGCTTTTTTTTTTTTCG-3'とArbitrary Primer 3: 5'-CGGGAAGCTTGCTAAGACTAGC-3'の組み合わせ)1つのバンドが配列決定できた。その配列をデータベースと相同性の比較を行い、homo sapiens BRCA1 (breast-ovarian cancer susceptibility gene)の一部であることが明らかとなった。

2) 5例のOPLL患者から抽出したRNAに対して、BRCA1のPrimerを作製し、RT-PCR法を行い、半定量的にBRCA1/G3PDHを測定したところ、rhCTGFを添加しない群で $0.596 \pm 0.053$ 、添加した群で $0.334 \pm 0.027$ であった。rhCTGFを添加した群で、有意なBRCA1 mRNAの発現量の減少( $p < 0.01$ )が証明された(図3, 4)。

3) 5例のOPLL患者から抽出されたRNAに対して、ER- $\alpha$ のPrimerを作製し、RT-PCR法を行ったところ、5例全例にER- $\alpha$  mRNAの発現が認められ、OPLL患者にER- $\alpha$  mRNAが存在することが証明された(図5)。

4) 無添加群ならびにrhCTGF単独で添加した群

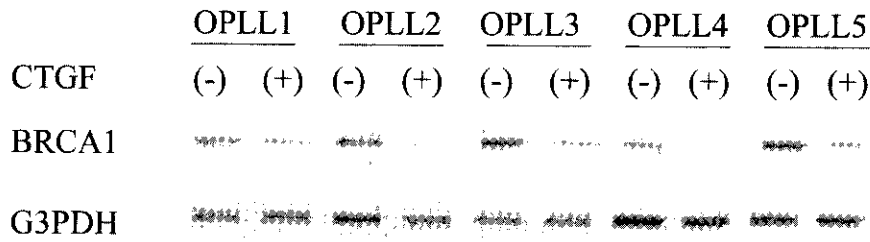


図3. OPLL患者5例の脊柱靱帯細胞におけるBRCA1 mRNAの発現

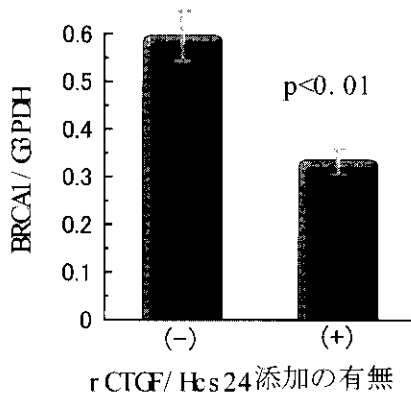


図4. rhCTGF/Hcs24 添加 24 時間による BRCA1 mRNAの発現

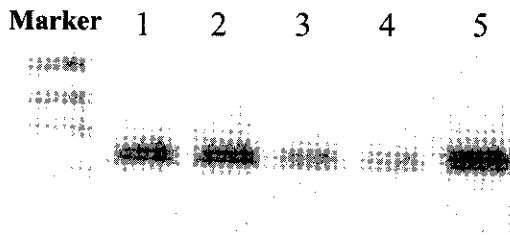


図5. RT-PCR法による Estrogen receptor-α mRNAの発現

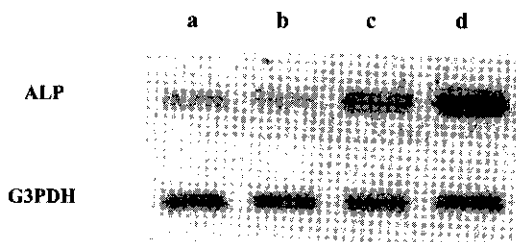


図6. OPLL患者の頸椎後縦靱帯由来の培養細胞におけるALP mRNAの発現

- a: rhCTGF/Hcs24, E2ともに添加せず
- b: rhCTGF/Hcs24のみ添加
- c: E2のみ添加
- d: rhCTGF/Hcs24, E2の両方を添加

よりも, E2単独で添加した群がALP mRNAの発現が高いことが証明された。更に rhCTGF を添加し, 24時間後に更にE2を  $10^{-5}$  Mの濃度で添加して培養した群が, 最も高いことが証明された (図6)。

#### D. 考察

Estrogenの骨形成促進作用については, In vivoで卵巣摘出動物のみならず正常動物でも高用量のEstrogenが骨量を増加させることが報告されている<sup>9)</sup>。In vitroでも様々な骨芽細胞培養系でEstrogenがALP活性を上昇させ, Type I collagenの発現を誘導することが知られている<sup>10, 11)</sup>。また骨組織においては, 破骨細胞, 骨芽細胞にER-αの発現が確認され, EstrogenがER-αを介してALP活性を上昇させることも報告されている<sup>12)</sup>。しかしながら繊維芽細胞では, EstrogenがALP活性を上昇させるという報告はない。本研究では, Estrogenの単独添加により, OPLL患者の頸椎後縦靱帯由来靱帯細胞では, RT-PCR法にてALP mRNAの増加が認められた。未発表データではあるが, 非OPLL患者の頸椎後縦靱帯由来培養細胞に対してEstrogenの添加実験を行ったが, RT-PCR法にてALP mRNAの増加は認められなかった。このことは, OPLL患者の培養細胞は靱帯組織由来の繊維芽細胞様細胞であるが, 元来の繊維芽細胞とは異なる性質を有したOsteoprogenitor cellへの形質転換を示唆する。Estrogenは, 脂溶性低分子であるステロイドホルモンであり, 細胞膜を通過し, 細胞内に存在する核内receptorであるER-αと結合する。ER-αはアミノ基末端からカルボキシル基末端にかけてA~E領域に分けられ, E領域はactivate function-2を有しLigand binding domainでもある。Estrogenはactivate function-2と結合することにより, 2量体となり, 更にDNA上のEstrogen応答配列と結合し標的遺伝子の転写を調節する<sup>13~16)</sup>。

BRCA1遺伝子は17q21.1に位置し, 乳ガンの抑制遺伝子として知られており, 遺伝性乳ガンの30~

40%がBRCA1遺伝子の異常があると報告されている<sup>17)</sup>。また、in vitroでの乳腺上皮細胞において、BRCA1はER- $\alpha$ のActivation function-2に作用し、EstrogenのER- $\alpha$ への結合を阻害し、ER- $\alpha$ のLigand 依存的な転写活性を抑制する事が報告されている<sup>14)</sup>。本研究では、OPLL患者の頸椎後縦靭帯由来培養細胞において、rhCTGFの添加によりBRCA1 mRNAの発現の減少が認められた。更にEstrogenとrhCTGFの併用は、Estrogen単独に比べ、ALP mRNAの増加をより顕著にした。このことは、rhCTGFによるBRCA1の減少が、ALP mRNAを増加させるというEstrogenの作用を助長させた可能性が示唆される。

また本研究では、OPLL患者の頸椎後縦靭帯由来培養細胞のみならず、非OPLL患者の頸椎後縦靭帯由来培養細胞に対して同様にrhCTGFの添加実験を行った。その結果、後者の細胞でもBRCA1 mRNAの発現が抑制された。更に、同様にER- $\alpha$  mRNAの存在も確認した。そこで、OPLL患者の異所性骨化メカニズムで、非OPLL患者とは異なる二つの点が明かとなった。一つは、主に肥大軟骨細胞に存在するCTGF/Hcs24の有無である。組織学的検討でOPLL患者由来の骨化近傍部の靭帯部分に、肥大軟骨細胞と思われる細胞がCTGF/Hcs24免疫染色陽性であった。一方対照である非OPLL患者では、CTGF/Hcs24免疫染色は陰性であった。更にもう一つの異なる点は、Estrogenに対する反応性である。OPLL患者の培養靭帯細胞ではEstrogenの添加でALP mRNAの増加が認められたのに対し、対象である非OPLL患者ではALP mRNAの増加が認められなかった。OPLLにおける異所性骨化は、組織学的検討から主に内軟骨性骨化に基づくものであることが示唆されている。しかしながら、何らかの原因により靭帯内に出現したCTGF/Hcs24が、本来の機能である内軟骨性骨形成過程を促進するとともに、既にOsteoprogenitor cellへの形質転換をしたと考えられる細胞へのEstrogenの反応性を増加させると考えられる。

## E. 結論

EstrogenがCTGF/Hcs24との相互作用によって骨化進展の過程を増強することから、異所性骨化の機構の少なくともその一部はEstrogenの骨芽細胞を介する骨形成促進作用に基づくものであることが示唆された。

## 謝辞

recombinant human CTGF/Hcs24を供与していただいた、岡山大学歯学部口腔生化学教室、滝川正春教授に深謝いたします。

## 〔参考文献〕

- 1) Ono K, Ota H, Hamada H. Ossified posterior longitudinal ligament : a clinicopathological study. Spine 1977 ; 2 : 126-38.
- 2) Okada K, Oka S, Tohge K. Thoracic myelopathy caused by ossification of the ligamentum flavum : clinicopathologic study and surgical treatment. Spine 1991 ; 16 : 280-7.
- 3) Takigawa M, Tajima K, Pan HO, Enomoto M, Kinoshita A, Suzuki F, Takano Y, et al. Establishment of a clonal human chondrosarcoma cell line with cartilage phenotypes. Cancer Res 1989 ; 49 : 3996-4002.
- 4) Zhu JD, Pan HO, Suzuki F, Takigawa M. Proto-oncogene expression in a human chondrosarcoma cell line : HCS-2/8. J Cancer Res 1994 ; 85 : 364-71.
- 5) Nakanishi T, Kimura Y, Tamura T, Ichikawa H, Yamaai Y, Sugimoto T, Takigawa M. Cloning of 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 1997 ; 234 : 206-10.
- 6) Hattori T, Fujisawa T, Sasaki K, Yutani Y, Nakanishi T, Takahashi K, Takigawa M. Isolation and characterization of a rheumatoid arthritis-specific antigen (RA-A47) from a human chondrocytic cell line (HCS-2/8). Biochem Biophys Res Commun 1998 ; 245 : 679-83.
- 7) Nakanishi T, Nishida T, Shimo T, Kobayashi K, Kubo T, Tamatani T, Tezuka K. Effects of a hypertrophic chondrocyte-specific gene product Hcs24/CTGF on the proliferation and differentiation of chondrocytes in culture. Endocrinology 2000 ; 141 : 264-73.
- 8) Nishida T, Nakanishi T, Asano M, Shimo T, Takigawa M. Effects of CTGF/Hcs24, a hypertrophic chondrocyte-specific gene

- product, on the proliferation and differentiation of osteoblastic cells In vitro. *J Cell Physiol* 2000 ; 184 : 197-206.
- 9) Samuels A, Perry MJ, Tobias JH. High-dose estrogen induces de novo medullary bone formation in female mice. *J Bone Miner Res* 1999 ; 14 : 178-91.
  - 10) Robinson JA, Waters KM, Turner RT, Spelsberg TC. Direct action of naturally occurring estrogen metabolites on human osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 2000 ; 15 : 499-506.
  - 11) Gray TK, Flynn TC, Gray KM, Nabell LM. 17  $\beta$ -estradiol acts directly on the clonal osteoblast cell line UMR106. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 6267-71.
  - 12) Braidman I, Baris C, Wool L, Selby P, Adams J, Freemont A, Hoyland J. Preliminary evidence for impaired estrogen receptor-alpha protein expression in osteoblasts and osteocytes from men with idiopathic osteoporosis. *Bone* 2000 ; 26 : 423-7.
  - 13) Fan S, Wang J, Yuan R, Ma Y, Meng Q, Erdos MR, Pestell RG, et al. BRCA1 Inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells. *Science* 1999 ; 284 : 1354-6.
  - 14) Tasset D, Tora L, Fromental C, Scheer E, Chambon P. Distinct classes of transcriptional activating domains function by different mechanisms. *Cell* 1990 ; 62 : 1177-87.
  - 15) Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 1995 ; 270 : 1491-4.
  - 16) Umesonon K, Murakami K, Thompson C, Evans R. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 1991 ; 65 : 1255-66.
  - 17) Emi M, Matsushima M, Katagiri T, Yoshimoto M, Kasumi F, Yokota T, Miki Y et al. Multiplex mutation screening of the BRCA1 gene in 1000 Japanese breast cancers. *Jpn J Cancer Res* 1998 ; 89 : 12-6.

# Histone deacetylase inhibitorによるosteopontin発現の検討

南 晋司 (和歌山県立医科大学 整形外科教室), 坂田 亮介 (和歌山県立医科大学 整形外科教室),  
松崎 交作 (和歌山県立医科大学 整形外科教室), 玉置 哲也 (和歌山県立医科大学 整形外科教室)

KEYWORD=histone deacetylase inhibitor, trichostatinA, osteopontin, OPLL

## 【研究要旨】

[目的]マウス未分化間葉系細胞を用いヒストン蛋白脱アセチル化酵素阻害剤による骨分化への誘導能を検討することを目的とした。[方法]マウス未分化間葉系細胞C3H10T1/2にhistone deacetylase inhibitorであるtrichostatinA (TSA)を50 ng/ml添加し投与後経時的にosteopontinのmRNA発現を検討した。さらにどのような転写因子がosteopontinのmRNA発現に影響を与えているかを検討するためにosteopontinのpromoter領域を用いluciferase assayによる解析をおこなった。[結果]TSA投与によりosteopontinのmRNAは経時的に発現の上昇を認めた。また、luciferase assayにおいてもTSAを添加した群の方が活性の上昇を認めた。[結論]ヒストン蛋白のアセチル化による骨分化マーカーであるosteopontinのmRNAの亢進を認めた。これらの発現はluciferase assayの結果から転写レベルにおいて発現の調節がおこなわれているものと考えられた。結果的にはヒストン蛋白のアセチル化が骨分化への誘導に影響を与えている可能性を示唆するものであった。

## 【はじめに】

ビタミンAと骨増殖との関連についてはin vitroにおいてもその活性化型物質であるレチノイン酸が骨分化を調節すると以前より報告され、レチノイン酸と靭帯骨化症発症との関連が示摘されている<sup>1)</sup>。また最近、レチノイン酸のレセプターであるretinoic acid receptor (RAR)やretinoid X receptor (RXR)がヒストン蛋白のアセチル化により転写レベルでその発現が調節されている可能性が報告されている<sup>2)</sup>。また、我々もレチノイン酸とTSAの強調作用によりosteopontinの発現が上昇することを報告した。従って、ヒストン蛋白をアセチル化する酵素であるhistone deacetylase inhibitorを用いることにより骨分化過程においてRARやRXRなどの転写因子がどのように作用しているかは骨化のメカニズムを考えるうえで非常に重要であると考えられる。またSatoらはosteopontinの発現において転写因子であるcbfa1やetsなどの転写因子がその発現に関与していると報告しており<sup>3)</sup>、TSAを添加することによりこれら転写因子とosteopontinの発現の関連性を調べることは骨化進展におけるメカニズムを解析する上で重要なことであるとされる。今回我々は骨分化能をもつ未分化間葉系細胞を用いヒストン蛋白のアセチル化によりosteopontinの発現を経時的に観察し、また

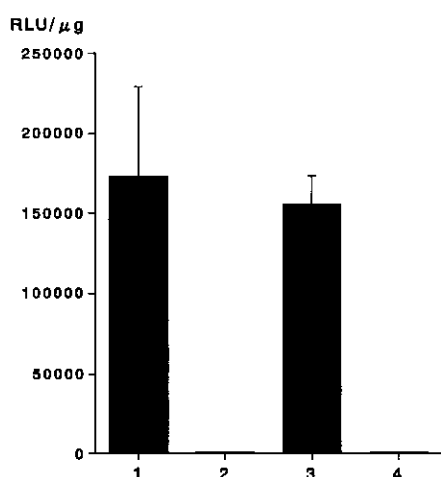
luciferase assayにより転写レベルでの解析をおこなった。

## 【方法と対象】

未分化間葉系細胞C3H10T1/2を $2.5 \times 10^5$ 個/10cm dish播種し24時間後にhistone deacetylase inhibitorであるtrichostatinA (TSA)を50 ng/ml添加した。投与後3, 6, 12, 24, 48, 72時間後にosteopontinのmRNA発現をNorthern blotting法にて解析した。またC3H10T1/2を $8 \times 10^4$ 個/6cm dish播種し24時間後、mouse osteopontin promoterを組み込んだluciferase reporter plasmid (mOP-luc)をリン酸カルシウム法にて遺伝子導入をおこなった。さらに24時間後TSAを添加し48時間後に細胞を採取し解析をおこなった。またNorthern blotting法においてinternal controlとしては28Sを用いた。

## 【結果】

osteopontinのmRNAの発現はTSA投与により経時的に上昇を認めた。luciferase assayによる解析ではTSA投与によりosteopontinのpromoter活性の上昇を認めた(図1)。



	RLU/μg	TSA/control
1. mOP-luc-910 TSA	173036	262
2. mOP-luc-910 control	659	
3. mOP-luc-254 TSA	155318	272
4. mOP-luc-254 control	570	

図1. Luciferase assayの結果  
TSA投与によるOsteopontin promoter活性

#### 【考察・結論】

レチノイン酸 (RA) による骨分化や脊柱靭帯骨化との関連が以前より報告されている。この RA のレセプターである RXR  $\beta$  は第6染色体短腕に存在し脊柱靭帯骨化症の候補遺伝子であるコラーゲン 11  $\alpha$  2 遺伝子の調節にも関与している可能性があり注目をされている<sup>4)</sup>。近年、この RA のレセプターである RAR や RXR の発現は RA や TSA によりその発現の亢進が認められること、vitaminD やステロイドなどにより誘導される転写因子と複合体を形成すること、さらにヒストン蛋白のアセチル化作用をもつ転写因子 p300 がこれら複合体に結合しさまざまな遺伝子発現に関与しているという報告がなされている。従ってこれらの転写因子がどのように遺伝子発現を調節しているかについては興味のあるところである。今回の実験において histone deacetylase inhibitor である TSA を用いヒストン蛋白をアセチル化させることにより osteopontin の m-RNA の発現が経時的に亢進することを明らかとした。また luciferase assay においても TSA 投与により osteopontin の promoter 活性の上昇が認められたことより osteopontin の発現は転写レベルにおいて調節されることが考えられた。

TSA を用いたこれらの発現において転写因子がどのように調節しているのかはまだ明らかとはされておらず、今後はさらにヒストン蛋白のアセチル化において osteopontin promoter の deletion mutant を用い、どのような転写因子に調節されているのかを解析し、骨分化や靭帯骨化症発症と関連について検討加える必要があるものと考えている。

#### 【参考文献】

- 1) 荒井三千雄: 整形外科疾患とビタミンA 日整会誌 65: s15, 1991
- 2) Minucci S, Horn V, Bhattacharyya N, Russanova V, Ogryzko V.V, Gabriele L, Howard B.H, Ozato K: A histone acetylase inhibitor potentiates retinoid receptor action in embryonal carcinoma cells Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 94, 11295-11300, 1997
- 3) Sato M, Morii E, Komori T, Kawahara H, Sugimoto, Terai K, Shimizu H, Yasui T, Ogihara H, Yasui N, Ochi T, Kitamura Y, Ito Y, Nomura S: Transcriptional regulation of osteopontin gene in vivo by PEBP2a/CBFA1 and ETS1 in skeletal tissues Oncogene: 17, 1517-1525, 1998
- 4) 古賀公明, 他: 脊椎後縦靭帯骨化症の遺伝子解析, 脊椎後縦靭帯骨化症調査研究班平成8年度研究報告書: 8-10, 1997



# Zucker Fatty Ratのアキレス腱異所性石灰化と骨形成関連因子

今給黎篤弘 (東京医科大学整形外科), 中谷 知薫 (東京医科大学整形外科),  
町田 英明 (東京医科大学整形外科), 山本 謙吾 (東京医科大学整形外科),  
渡辺 健 (東京医科大学整形外科), 西野 誠一 (東京医科大学整形外科)

## 【研究要旨】

Zucker Fatty Rat (ZFR) は、脊柱靭帯骨化症モデルラットであると共にインスリン非依存性糖尿病モデルラットとしてもよく知られている。今回、ZFRのアキレス腱に高頻度に石灰化が観察されることに注目し、アキレス腱の石灰化とインスリンに関する骨形成関連因子との関係を免疫組織学的に解析し検討した。ZFRのアキレス腱には軟骨様細胞が出現し、増殖・肥大化を示し内軟骨性骨化の一過程と考えられた。その軟骨様細胞にIGF-I, IRS-1, CTGFの発現を認めたことから、その増殖・肥大化にはIGF-Iにより産生を促進されたCTGFが関与していると考えられ、骨化過程はCTGF及びIRS-1を介したIGF-I, インスリンにより促進されたと考えられた。またZFRはNFRに比し、高インスリン血症を呈しIGF-I, IRS-1, CTGFの発現量が多いことから、ZFRに内軟骨性骨化傾向がより強いと考えられた。

## A. 研究目的

脊柱靭帯骨化 (OPLL) の発生機序は依然として不明な点が多いが耐糖能異常を有する症例にその発生頻度が高いことが知られている。当教室では以前より脊柱靭帯骨化症自然発生モデルとして ZFR を使用し研究を行い、高頻度にアキレス腱の異所性石灰化を発生し、その石灰化にBMP2・BMP4が関与することを報告した。またZFRはインスリン非依存性糖尿病 (NIDDM) モデルラットとしてもよく知られており、今回我々は局所的骨化素因の解明の一助としてアキレス腱異所性石灰化とインスリン、Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) 等の関連を免疫組織学的に検討した。

## B. 研究方法

実験動物は、生後1ヶ月齢から12ヶ月齢までのZFR30匹及び対象群としてNon Fatty Rat (以下NFR) 30匹である。以下の項目につき比較検討した。

### 1. 空腹時血糖値, インスリン値, 血清IGF-I値測定

ジエチルエーテルにて吸入麻酔後開胸し、左心室より採血した。採血後は4% paraformaldehydeにて還流固定とした。

### 2. 軟X線撮影

還流固定後、後肢を切断し更に24時間4% paraformaldehydeにて固定し、軟X線撮影した。撮影はSoftex社typeESMを用い、Fuji X-ray filmを使用した。撮影は20KVp, 2.0mA, 30秒の一定条件下に行った。

### 3. HE染色・ph4.1 Toluidine blue染色

軟X線撮影後、10%EDTAにて96時間脱灰しパラフィン包埋した。4 $\mu$ mの連続矢状断切片を作製し、HE染色及びph4.1 Toluidine blue染色を施行した。

### 4. 免疫染色

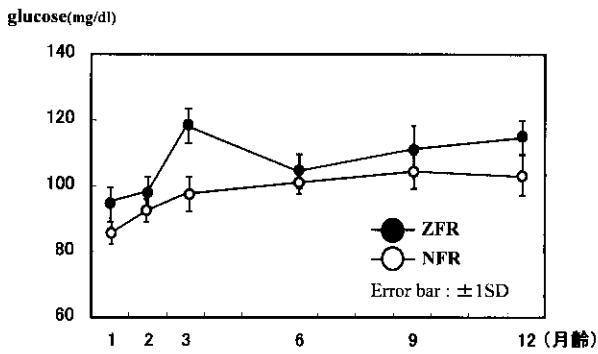
ヒストファインSAB-POキット(ニチレイ社)を用いてABC法にて行った。1次抗体は、抗IGF-I抗体(santa Cruz社), 抗CTGF抗体(R&D SYSTEMS社), 抗IRS-1抗体(Santa Cruz社)を使用した。また骨形成因子として注目されるIGF-IとCTGF, 骨芽細胞や軟骨細胞においてインスリンとIGF-Iの情報伝達に重要な役割を担うIRS-1については画像解析ソフト(三谷商事株式会社 Win ROOF)を用い陽性細胞面積率を計測した。

### (倫理面への配慮)

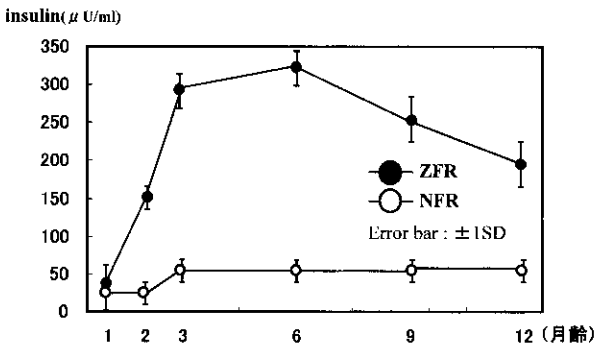
東京医科大学動物実験倫理委員会の規定に基づき実験を施行した。

## C. 研究結果

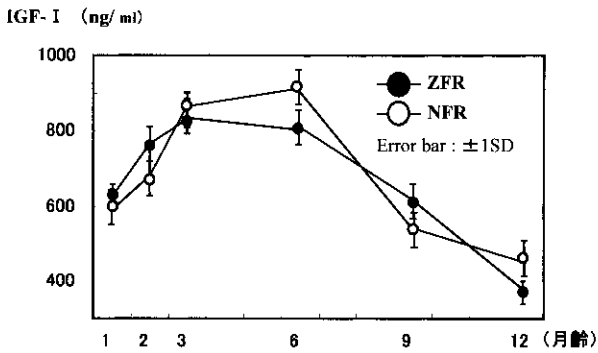
- 空腹時血糖値は、ZFRのほうがどの月齢においてもやや高かった(図1A)。ZFRのインスリン値は1ヶ月齢ではNFRと差は無いが、6ヶ月齢ではNFRの約6倍と高い値を示し、その後加齢とともに減少した(図1B)。血清IGF-I値は、平均値に明らかな差を認めなかった(図1C)。
- 軟X線撮影では、ZFRではアキレス腱の踵骨付着部より近位腹側に1ヶ月齢から石灰化陰影が



A 空腹時血糖値



B インスリン値



C 血中IGF-I値

図1

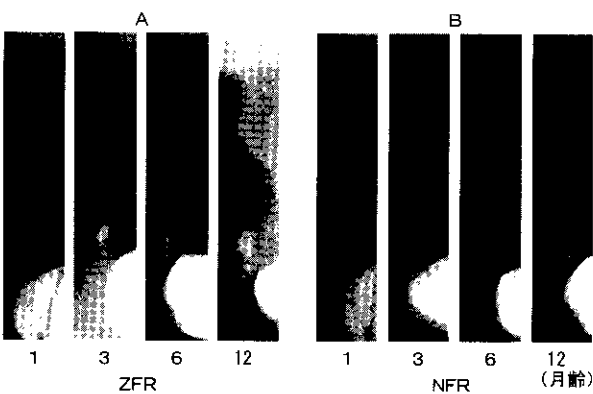


図2 アキレス腱軟X線撮影像

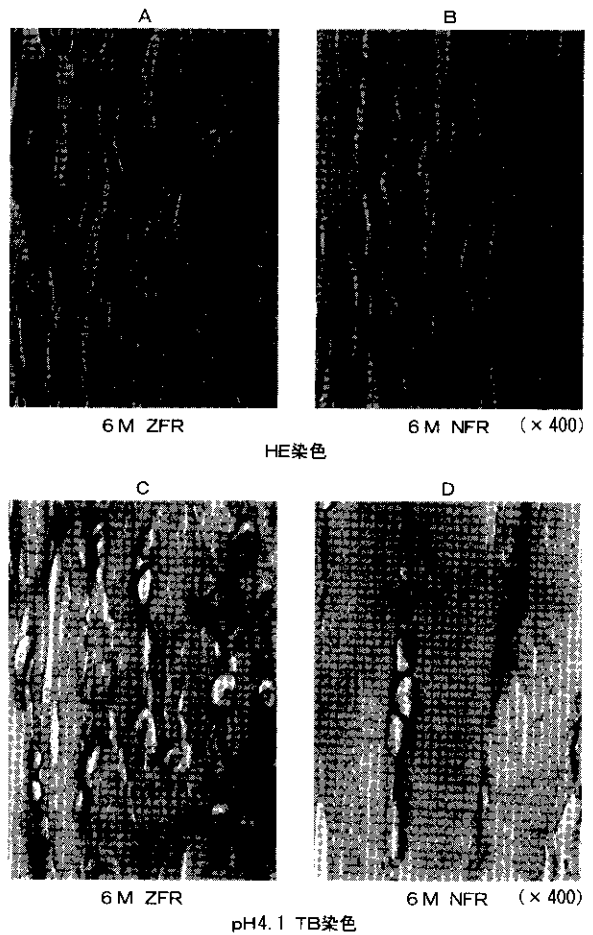
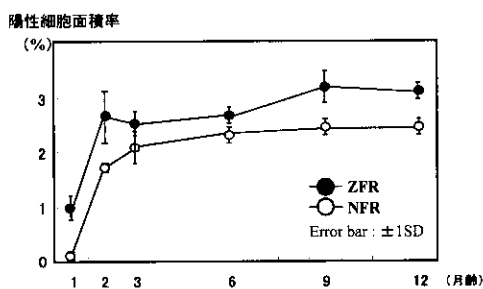
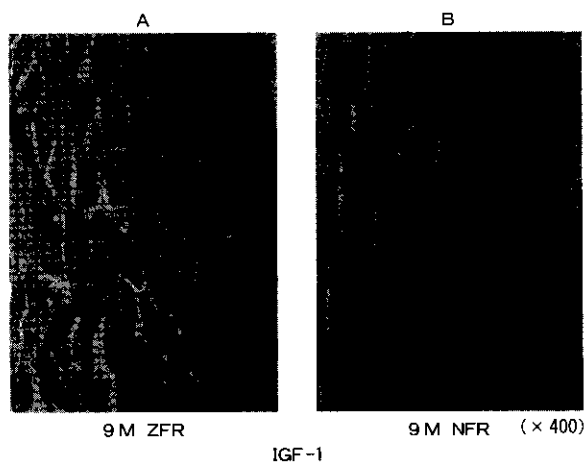


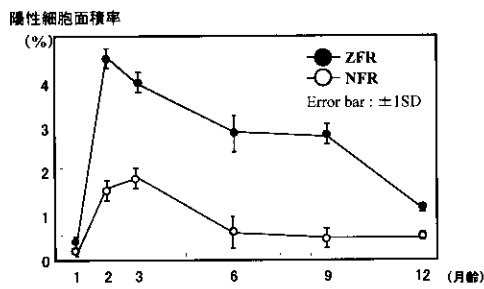
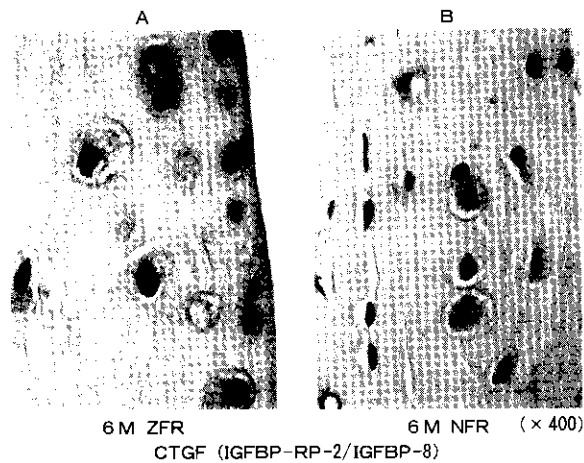
図3

- 出現するものが多く、経月齢的に増大傾向を示した。NFRでは、6ヶ月齢以降にてわずかに小石灰化陰影を認めるのみであった(図2A, B)。
3. HE染色では、アキレス腱踵骨付着部近位腹側に軟骨様細胞が出現し、その細胞はZFRにより多く認められ加齢により増殖・肥大化した(図3A, B)。pH4.1 Toluidine blue染色では、HE染色にて認められた軟骨様細胞が染色された(図3C, D)。
  4. 抗IGF-I抗体による免疫染色では、軟骨様細胞の細胞質内に染色性を認めた(図4A, B)。画像解析では、IGF-I陽性細胞の面積率は、ZFRの方が高く、9ヶ月齢でピークを示した(図4C)。CTGFは、肥大化した軟骨様細胞に発現を認め(図5A, B)、画像解析で陽性細胞の面積率はZFRの方が高く、3ヶ月齢でピークを示した(図5C)。IRS-1は軟骨様細胞に発現したが、ZFRの方がより高い染色性を示した(図6A, B)。その画像解析では陽性細胞の面積率は、



C 画像解析 (IGF-1)

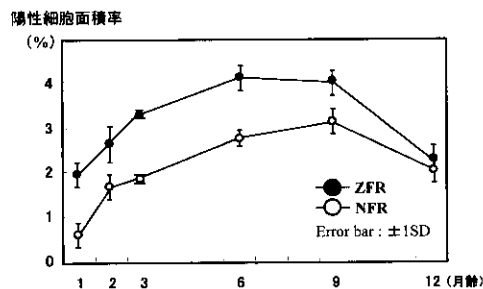
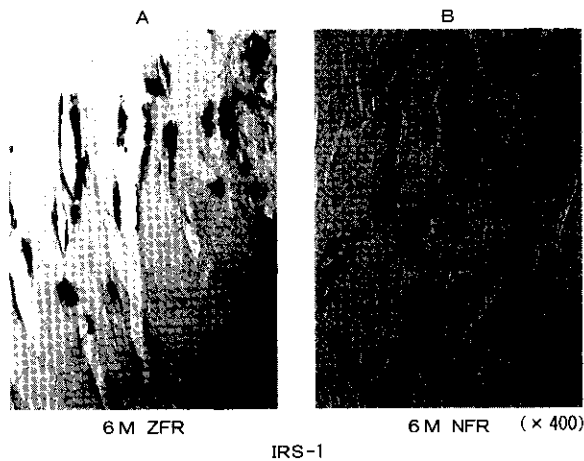
図 4



C 画像解析 (CTGF)

図 5

ZFRの方が高く、6から9ヶ月齢でピークを示した(図6C)。



C 画像解析 (IRS-1)

図 6

#### D. 考察

以前よりOPLLの発現、進展と糖代謝異常の関係が指摘されており、インスリン自身に骨形成促進作用があることが報告されている。IGF-I、インスリンは共に類似した代謝作用と同化作用を持つが、これは受容体が構造的に類似しており、低親和性ながらIGF-Iがインスリン受容体と、またインスリンがIGF-I受容体と結合することにより説明され、高濃度なインスリンが骨化促進作用を発現する可能性を示している。受容体に結合した後は、共通の基質をリン酸化することによってさらに下流のシグナルを活性化する。この基質がIRSで骨芽細胞や軟骨細胞ではIRS-1を、破骨細胞ではIRS-2を介した情報伝達がメインストリームであることが報告されている。また、CTGFは内軟骨性骨化においてその骨化過程全般を促進する重要な因子として知られており、IGF-IやTransforming Growth Factor  $\beta$ により産生が促進される。昨年度、我々は本報告書で石灰化アキレス腱に軟骨様細胞・BMP2・BMP4・オステオポンチンの発現を確認し、この石灰化様式が内

軟骨性骨化の一過程に類似することを報告した。今回の実験でもアキレス腱石灰化部位に正常の腱組織には認められない加齢に伴い増殖・肥大化する軟骨様細胞の出現を認め、その細胞に内軟骨性骨化過程で最も重要とされる CTGF の発現を認めたことより、アキレス腱の石灰化は内軟骨性骨化の一過程であると考えた。またアキレス腱に出現した軟骨様細胞に IGF-I, IRS-1, CTGF の発現を認めたことから、その増殖・肥大化は IGF-I により産生を促進された CTGF と IRS-1 を介した IGF-I, インスリンにより促進されたと考えられた。また ZFR は NFR に比し、高インスリン血症を呈し IGF-I, IRS-1, CTGF の、発現量が多いことから ZFR はより内軟骨性骨化傾向が強いと考えられた。

#### E. 結論

アキレス腱異所性石灰化は、内軟骨性骨化の一過程と考えられ、その過程は CTGF と IRS-1 を介した IGF-I, インスリンにより促進されたと考えられた。

#### [参考文献]

- 1) Zucker, L.M. et al : Fatty a new mutation in the rat. J. Hered 52 : 275-278, 1961
- 2) 三浦幸雄ら : Zucker Fatty rat における石灰化アキレス腱基質の生化学的変化の検討. 脊柱靭帯骨化症調査研究班平成 2 年度研究報告書 : 120-123, 1991
- 3) 米田知二ら : Zucker Fatty rat における石灰化アキレス腱基質の生化学的分析. 脊柱靭帯骨化症調査研究班平成 7 年度研究報告書 : 133-135, 1996
- 4) 今給黎篤弘ら : Zucker Fatty rat の異所性石灰化アキレス腱における石灰化関連因子の遺伝子発現及び病理学的検討. 脊柱靭帯骨化症に関する調査研究班平成 11 年度研究報告書 : 27-30, 2000
- 5) 袖崎 晋ら : 骨におけるインスリン様成長因子 (IGFs) と IGF 結合蛋白の意義. 実験医学 14(10) : 78-83, 1996
- 6) 川口 浩 : インスリン受容体基質 - 1 (IRS-1) ノックアウトマウスの解析. CLINICIAN: 95-98, 2000
- 7) 高橋伸一郎ら : インスリン様成長因子の細胞内シグナル伝達. ホルモンと臨床 46(2) : 13-27, 1998
- 8) 山中良孝ら : IGFBP の細胞生物学. ホルモンと臨床 46(2) : 29-38, 1998

- 9) 滝川正春ら : 内軟骨性骨形成に最も重要な新規成長因子 CTGF. 細胞工学 17 : 357-362, 1998