

---

平成13年度

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

---

廃用性骨萎縮のメカニズムと治療法の開発

研 究 報 告 書

主任研究者 池 田 恭 治

平成13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14年3月

主任研究者 池田 恭治

# 平成13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<br>老年病研究部 部長          | 池田 恭治 |
| 2. 分担研究報告書.....                    | 10    |
| 1. 骨細胞が発現する遺伝子群の同定と機能解析.....       | 11    |
| 国立長寿医療研究センター<br>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.....          | 22    |
| 神奈川歯科大学<br>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..... | 26    |
| 産業医科大学<br>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

マウス脛骨から調製した骨細胞が豊富な分画から骨芽細胞が豊富な分画を差し引いたサブトラクションライブラリーを作製し、47 個 16 種類の遺伝子(うち 8 個 6 種が新規)を同定した。新規遺伝子のアミノ酸配列を決定し、その相同遺伝子とそれぞれに対する類似遺伝子(いずれも新規)を同定した。また、伸展刺激開始後 6 時間のヒト骨細胞に特異的に発現する既知のタンパクを他のライブラリーとの *in silico* の解析から見出し、脱リン酸化酵素の役割を明らかにした。iNOS を遺伝的に欠損するマウスを用いて、再荷重時の骨形成促進には、iNOS 由来の NO が必須であることを明らかにした。

キーワード:力学的負荷、骨細胞、遺伝子、骨粗鬆症、寝たきり

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  
整形外科教室  
教授

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)に着目し、骨細胞が特異的に発現する遺伝子群を同定し、それらが果たす機能を明らかにすることによって、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を開発することを目的に行った。また、NOS ノックアウトマウスを用いて、NO が mechanotransduction に果たす役割を *in vivo* で明らかにした。

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。本研究では、骨にもっとも

B. 研究方法

1. 骨細胞が発現する遺伝子群の探索

以下の5つの方法で骨細胞に特異的に発現する遺伝子群の探索を行った。

(1) DNA チップによる方法

8週齢の ICR マウスから摘出した脛骨から回収した細胞をI型コラーゲンをコートしたプレートに

播き、5ヶ月目に回収した細胞より total RNA を調製した。この細胞および total RNA のサンプル名を LOCY (long-term cultured osteocyte like cell) とした。対照には、2週齢の ICR マウス♂の脛骨から採取した細胞を、I 型コラーゲンをコートしたプレート上で1週間培養し、アルカリフォスファターゼ陽性であることを確認後、回収した細胞より total RNA を調製した。この細胞および total RNA のサンプル名を POB (primary osteoblast) とした。これらのサンプルから調製したターゲット DNA を用いて 12489 クローンのもつたマウス DNA チップ解析を行った。

ヒト大腿骨頭由来の骨片を 0.75mg/mL コラゲナーゼで5回処理 (37°C 振とう、20 分×5 回) した後、5mM EDTA 処理 (37°C 振とう、15 分) したものをコラーゲン I 型コートプレートに播いた。約1週間後に骨片より outgrowth してきた細胞の形状を観察し、それが繊維芽細胞様ならば骨片を回収し、0.05%トリプシン処理 (37°C 振とう、15 分) したものを再度新しいコラーゲン I 型コートプレートに播いた。この操作は星形の形態を示す骨細胞が outgrowth してくるまで繰り返した。ヒト骨芽細胞 NHOst は三光純薬より購入したものを使用した。サンプル名は、outgrowth してきた骨細胞様細胞を IOCIII, 三光純薬より購入した骨芽細胞を NHOst とする。これらのサンプルを用いて 12626 クローンのもつたヒト DNA チップ解析を行った。

## (2) サブトラクションによる方法

8週齢の ICR マウス♂から摘出した脛骨を材料とし、それらの結合組織を除去後、1mm 角以下の骨片にした。この骨片を 0.75mg/mL コラゲナーゼで5回処理 (37°C 振とう、20 分×5 回) した。コラゲナーゼ処理1回目を行った後に残った骨片を破碎し調整した total RNA を (leg1.5) とした。一方、コラゲナーゼ処理 1 回目のコラゲナーゼ液から回収した細胞をコラーゲン I 型コートプレートに播き、1-2週間後回収した細胞から調整した total RNA を (leg1) とした。同様に、コラゲナーゼ処理2, 3回目

または4, 5回目のコラゲナーゼ液から回収した細胞を培養後、回収調製した total RNA をそれぞれ (leg2,3), (leg4,5) とした。(leg1.5) をテスター (骨細胞が豊富な分画) とし、(leg1) と (leg2,3) と (leg4,5) を等量混ぜたサンプル (leg1-5) をドライバー (骨芽細胞が豊富な分画) として、テスターからドライバーを差し引いたサブトラクションライブラリーを CLONTECH PCR-Select cDNA Subtraction Kit を用いて作製した。このライブラリーから、テスターにおいて高発現しているクローンをディファレンシャルスクリーニングによりピックアップ後、ノーザンブロットングで確認した。骨細胞における特異的発現は、8週齢マウス ICR♂の脛骨凍結切片を用いた in situ ハイブリダイゼーションによって検討した。新規遺伝子についてはデータベースをもとに設計したプライマーを用いて PCR を行い、ヌクレオチド配列の決定を行った。

## (3) DNA マイクロアレイによる方法

8週齢の C57BL/6 マウスを尾部懸垂により後肢を脱荷重状態にし、その実験開始時点 (0 時間)、または 6 時間後に摘出した脛骨より mRNA を調製した。また、8週齢の C57BL/6 マウスを2週間尾部懸垂した後、尾部懸垂から解除し (再荷重)、その実験開始時点 (0 時間)、6 時間後、および 24 時間後に摘出した脛骨より mRNA を調製した。各群 n=5 とした。群名はそれぞれ尾部懸垂について TS 0hr、TS 6hr および再荷重について RL 0hr、RL 6hr、RL 24hr とした。これらを DNA マイクロアレイ解析を行った。比較はそれぞれ2群間で行い、TS 0hr と TS 6hr、RL 0hr と RL 6hr、RL 0hr と RL 24hr とで行った。DNA マイクロアレイにおいて、そのシグナル差が2倍を超えるものを選択した。

## 2. 力学的負荷に対する骨反応に果たす iNOS の役割

Jackson Laboratory から iNOS 遺伝子欠損マウスを購入し、産業医科大学動物研究センタ

ーにて飼育、交配、繁殖した。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。

マウスを4群に分け、グループ1は、1週間の非荷重（尾部懸垂）を行った。グループ2は、1週間、正常荷重を行った。グループ3は、1週間の非荷重（尾部懸垂）の後、2週間の再荷重を行った。グループ4は、3週間、正常荷重を行った。それぞれのグループにおいて、iNOS 遺伝子欠損マウス (-/-) と野生型マウス (+/+) を比較した。

上記の4グループとは全く別に、再荷重時に iNOS (+/+) マウスに NOS inhibitor である aminoguanidine 20 mg/day を投与する実験（投与する群としない群、それぞれ5匹ずつ）と、iNOS (-/-) に NO donor である nitroglycerin (2% nitroglycerin tape を貼付) を投与する実験（投与する群としない群、それぞれ5匹ずつ）を行い、組織形態計測と骨髄細胞培養を行った。

屠殺の6日前と2日前に6 mg/kg calcein を腹腔内投与し、骨梁表面に蛍光二重標識した。右側の脛骨を採取し、10%ホルマリンで固定、methylnmethacrylate resin (MMA) で包埋し、Villanueva 染色を行った。前額面を5 mm の厚さで薄切した。左脛骨は、5%パラフォルムアルデヒドで固定した後、酒石酸抵抗性酸ホスフォターゼ (TRAP) 染色を行った。脛骨近位二次海綿骨で骨形態計測を行い、海綿骨量 (BV/TV)、骨石灰化速度 (MAR)、骨形成率 (BFR/BS) を調べ、TRAP 染色標本で、破骨細胞数 (Oc. N/BS) と破骨細胞骨接触面 (Oc. S/BS) を調べた。

再荷重後12時間、1、2、3、7、14日に、ウサギ抗 iNOS polyclonal 抗体（和光純薬、大阪）を用いて、iNOS の免疫染色を行った。それらの隣接切片にて、アルカリホスフォターゼ (ALP) 染色を行った。

尾部懸垂後の骨髄における骨芽細胞への分化過程に対する iNOS の影響を知るために、脛骨から骨髄細胞を採取し、15%FCS、10 mmol/l dexamethazone、50 g/ml ascorbic acid、10 mmol/l sodium  $\beta$ -glycerophosphate の存在下の  $\alpha$ -MEM で細胞培養した。培養開始後21日目に、培養 dish に接着した細胞集団を alizarin red で染色し、mineralized nodule の形成面積を NIH image を用いて測定した。

## C. 研究結果と考察

### 1. 骨細胞が発現する遺伝子群の探索

#### (1) DNA チップ解析

LOCY は、培養1-2ヶ月目までは増殖が観察されたが、以降は増殖が停止し、3-5ヶ月目から約80%が骨細胞に特徴的な小突起を有する星型の形状を呈した。この細胞はアルカリホスファターゼ陰性であった。骨芽細胞マーカーであるアルカリホスファターゼは POB においてのみ発現がみられ、I型コラーゲン  $\alpha$ 1鎖は POB が LOCY の2.4倍の発現を示し、I型コラーゲン  $\alpha$ 2鎖およびオステオポンチンの遺伝子発現は両細胞において同等の値を示した。オステオカルシンは LOCY においてのみ発現がみられた。軟骨細胞マーカーであるII型コラーゲン  $\alpha$ 1鎖は POB、LOCY ともに発現がみられなかった。POB における発現量が相対値で50未満かつ LOCY における発現が POB の4倍を越えたものは12489クローン中138クローンであった。この138クローンの内、13クローンをノーザンブロットイングで発現を検討したところ、POB に比して脛骨での発現が高いクローンが OTS-8、グレムリン、RDC1 遺伝子の3個。脛骨に比して POB での発現が高いクローンが5個、検出限界以下のクローンが5個であった。また、前記138クローンの内、14クローンを in situ ハイブリダイゼーションにより骨組織での発現を検討したところ、RDC1 は骨細胞と骨芽細胞に、melanoma antigen は骨膜（骨芽細胞）に、ルミカン は骨膜と骨

内膜(骨芽細胞)において発現がみられた。その他の 11 クローンは検出限界以下であった。ノーザンブロッティングの結果より、LOCY には *in vivo* の骨細胞マーカーである DMP1 遺伝子の発現が認められなかった。そのため、*in vitro* での長期培養により得られた LOCY について骨細胞としての同定は形態に頼るだけとなり、有効な細胞特異的マーカー単離の可能性は低いと判断し、このスクリーニングを中止した。

ヒト DNA チップの結果、*in vivo* での骨細胞マーカーである DMP1 は NHost, IOCI ともに発現がみられなかった。骨芽細胞マーカーであるアルカリフォスファターゼは NHost においてのみ発現がみられ、I 型コラーゲン  $\alpha 1$  鎖、I 型コラーゲン  $\alpha 2$  鎖は両細胞において同等の発現を示し、オステオカルシンは両細胞に発現がみられなかった。オステオポンチンは IOCI においてのみわずかに発現がみられた。軟骨細胞マーカーである II 型コラーゲン  $\alpha 1$  鎖は両細胞ともに発現がみられなかった。NHost における発現量が相対値で 50 未満かつ IOCI における発現が NHost の 4 倍を越えたものは 12626 クローン中 98 クローンであった。DNA チップにおける DMP1 および各種骨芽細胞細胞マーカーの発現の結果より、IOCI や NHost は *in vivo* の骨細胞および骨芽細胞細胞の遺伝子発現を反映しておらず、IOCI と NHost を用いたスクリーニング続行による骨細胞特異的マーカー単離の可能性は低いと判断し、このスクリーニングを中止した。

## (2) サブトラクション法によるスクリーニング

1300 クローンをディファレンシャルスクリーニングにかけ、テスターにおいて高発現している 47 個 16 種類の遺伝子を単離した。内 39 個 10 種が既知遺伝子、8 個 6 種が EST であった。これらの内、complement factor H および機能未知の EST クロンの 2 クローンにおいてノーザンブロッティングによりテスター > ドライバーという発現量差が確認されたが、ともに *in situ* ハイブリダイゼーションで

は検出限界以下であった。この EST クローンについて、ヌクレオチド配列の決定を行ったところ、365a.a. の新規蛋白をコードしていることが予測された。ホモロジー検索の結果、そのヒト相同遺伝子と一次構造にホモロジーの高いマウスの遺伝子がそれぞれ検出された。これらはいずれも 6 カ所の疎水領域があり、膜蛋白である可能性が示された。ノーザンブロッティングの結果、leg bone と un-pregnant uterus において特に発現していることが確認された。また、ST2, MC3T3-E1, KUSA-A1 などの間葉系または骨芽細胞様の細胞株においては発現が確認されなかった。興味深いことに石灰化条件下(アスコルビン酸および  $\beta$  グリセロフォスフェート存在下で 52 日間培養)の MC3T3-E1 において発現の顕著な増加が確認された。この新規遺伝子は骨芽細胞の石灰化能促進因子である可能性、または骨芽細胞系の後期分化の指標になる可能性が考えられた。

## (3) 尾部懸垂マウスにおける DNA マイクロアレイ解析

脱荷重により発現が減少する遺伝子、または再荷重により発現が増加する遺伝子は認められなかった。また、再荷重 0 時間(RL0hr)と比較して、再荷重 24 時間(RL24hr)または 48 時間(RL48hr)では、幾つかの筋肉特異的因子が低い発現を示したが、これらは調製組織中に混在した結合組織由来のものである可能性が考えられた。今回の結果より、組織(特に骨は結合組織や血液を完全に除去することの困難さも手伝って)を材料に用いた DNA マイクロアレイによる発現量検討は微量の遺伝子発現変化をとらえるには適さず、検体調製には工夫が必要と考えられた。

## 2. 力学的負荷に対する骨反応に果たす iNOS の役割

実験期間中に、各遺伝子のマウス群間で、体重および大腿骨長軸の長さには有意な差は認

めなかった。NO 補充と NO 阻害実験においても群間に有意差を認めなかった。

海綿骨量 (BV/TV) は、非荷重後 1 週で、iNOS (+/+), (+/-)、(-/-) とともに同程度、正常荷重群に比べて有意に減少した。Calcein による二重標識面、骨石灰化速度 (MAR)、骨形成率 (BFR/BS) は、非荷重後 1 週で、正常荷重群に比べて有意に減少した。破骨細胞骨接触面 (Oc.S/BS) は、正常荷重群に比べて、いずれの遺伝子型においても増加した。

非荷重後の再荷重で、BV/TV は、iNOS (+/+) では、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 (-/-) の中間値まで増加した。BFR/BS は、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。Oc. N/BS および Oc. S/BS 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。

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。

iNOS (-/-) の再荷重時にみられた骨量、骨形成、mineralized nodule の形成の低下は、NO donor である nitroglycerin 投与により回復した。逆に、iNOS (+/+) の再荷重時にみられた骨量、骨形成、mineralized nodule の形成の回復は、NOS inhibitor である aminoguanidine 投与により抑制された。

野生型マウスにおいて、骨芽細胞は、非荷重により扁平化し、再荷重で立方形になった。非荷重状態では、免疫染色で、骨芽細胞や骨

細胞に iNOS 蛋白は検出できなかった。再荷重後 12 時間で、立方形になった骨芽細胞に、iNOS 蛋白の発現を認め、同時に ALP 染色で強い陽性を示した。iNOS 蛋白は、再荷重時の骨細胞にも検出された。ALP 陽性細胞は、再荷重後 12 時間の骨梁表面と皮質骨内面に存在していた。再荷重 1 日以降の切片では、iNOS および ALP の染色性は低下してきた。

#### D. 結論

骨細胞を豊富に含む分画から、DNA チップやサブトラクション法を用いて新規遺伝子産物を複数同定した。今後、これらの機能を細胞培養およびマウス遺伝学などの方法により明らかにしていく予定である。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

Shibata T, Shira-ishi A, Sato T, Masaki T, Sasaki A, Masuda Y, Higashi S, Uchida Y, Saito M, Ito M, Ogata E, Watanabe K, Ikeda K  
Vitamin D hormone inhibits osteoclastogenesis *in vivo* by decreasing the pool of osteoclast precursors in bone marrow. **J Bone Miner Res** 2002 in press

Sasaki A, Ikeda K, Watanabe K. A RING finger protein Praja 1 regulates Dlx5-dependent transcription through its ubiquitin ligase activity for the Dlx/Msx-interacting MAGE/Necdin family protein, Dlxin-1. **J Biol Chem** 2002 in press

Uchiyama Y, Higuchi Y, Takeda S, Masaki T, Shira-ishi A, Sato K, Kubodera N, Ikeda K, Ogata E A vitamin D analog ED-71 is a more potent inhibitor of bone resorption than

alfacalcidol in an estrogen-deficient rat model of osteoporosis. **Bone** 2002 *in press*

Watanuki M, Sakai A, Sakata T, Tsurukami H, Miwa M, Uchida Y, Watanabe K, Ikeda K, Nakamura T Role of inducible nitric oxide synthetase in the skeletal adaptation to acute increase in mechanical loading.. **J Bone Miner Res** 2002

Masuda Y, Sasaki A, Ikeda K, Watanabe K Dlxin-1, a novel protein that binds Dlx5 and regulates its transcriptional function. **J Biol Chem** 276:5331-5338, 2001

Sasaki A, Masuda Y, Ikeda K, Watanabe K Filamin associates with Smads and regulates TGF- $\beta$  signaling. **J Biol Chem** 276:17871-17877, 2001

Sato T, Shibata T, Ikeda K, Watanabe K Generation of bone-resorbing osteoclasts from B220-positive cells: its role in accelerated osteoclastogenesis due to estrogen deficiency. **J Bone Miner Res** 16:2215-2221, 2001

## 2. 学会発表

新鞍陽平、菱谷彰徳、佐々木文、池田恭治、渡辺 研 コラーゲン受容体DDR2のシグナル伝達機構 第19回日本骨代謝学会年会 8月8日 11日 名古屋

佐々木文、増田芳子、池田恭治、渡辺 研 Dlx5の転写機能はRING finger 蛋白 prajalによって制御される 第19回日本骨代謝学会年会 8月8日 11日 名古屋

菱谷彰徳、石倉信之、伊東昌子、佐々木文、柴田 猛、池田恭治、油谷浩幸、渡辺 研 高齢マウスにおける低形成性骨粗鬆症とDNAマイクロアレイ法による遺伝子発現プロファイル 第19回日本骨代謝学会年会 8月8日 11日 名古屋

渡辺 研、内山也寸志、杉田敦子、武田 聰、菱谷彰徳、安居輝人、菊谷 仁、池田恭治 エストロゲン欠乏骨粗鬆症におけるT細胞およびCD40を介したT-Bシグナリングの関与 第19回日本骨代謝学会年会 8月8日 11日 名古屋

Watanabe K, Uchiyama Y, Sugita A, Takeda S, Hishiya A, Ikeda K. Role of T cells and T to B signaling through CD40 in the pathogenesis of estrogen deficient osteoporosis. The 23rd annual meeting, American Society for Bone & Mineral Research. 10月12日 10月16日 Phoenix, Arizona, USA.

Hishiya A, Mizuno K, Niikura Y, Sasaki A, Ikeda K, Watanabe K. DDR2, a collagen receptor, interacts with Jab-1 and activates MMP1 promoter through AP-1. The 23rd annual meeting, American Society for Bone & Mineral Research. 10月12日 10月16日 Phoenix, Arizona, USA.

Sasaki A, Ikeda K, Watanabe K. The transcription function of Dlx5 is regulated by a RING-finger protein praja-1 through ubiquitin-dependent degradation of Dlxin-1, a Dlx/Msx-interacting protein. The 23rd annual meeting, American Society for Bone & Mineral Research. 10月12日 10月16日 Phoenix, Arizona, USA.

日比陽子、荒木聖美、池田恭治、本山 昇 マウス筋芽細胞C2C12の分化および脱分化におけるフォークヘッド型転写因子AFXの機能解析 日本分子生物学会第24回年会 12月9日 12日 横浜

菱谷彰徳、新鞍陽平、佐々木文、池田恭治、渡辺 研 コラーゲン受容体のシグナル伝達機構 日本分子生物学会第24回年会 12月9

日 12日 横浜

分担研究者

高垣 裕子

1. 論文発表

1. 高垣裕子:骨形成の力学的要因—骨芽細胞の分化・局在に伴う応答のバリエーションと細胞間共同作用—. 日本骨形態計測学界雑誌 in press.
2. Naruse, K., Miyauchi, A., Itoman, M. and Mikuni-Takagaki, Y: Distinct anabolic response of osteoblast to low-intensity pulsed ultrasound. *J. Bone Miner. Res.*, in press.
3. Mikuni-Takagaki, Y., Naruse, K., Azuma Y. and Miyauchi, A.: The role of calcium channels in osteocyte function. *Musculoskel Neuron Interact*, 2:255-258, 2002.
4. Satoyoshi, M., Kawata, A., Koizumi, T., Inoue, K., Itoharu, S., Teranaka, T. and Mikuni-Takagaki, Y.: Matrix metalloproteinase-2 in dentin matrix mineralization. *J. Endodontics*, 27:462-466, 2001.
5. 高垣裕子(分担)骨細胞の形成と機能 in 新分子骨代謝学と骨粗鬆症 pp.145-157, メディカルレビュー社 2001

2. 学会発表

1. 成瀬康治, 宮部基, 大貫裕子, 宮内章光, 糸満盛憲, 高垣裕子:低出力超音波パルスによる骨形成-分化段階と共に変化する骨髄細胞の応答. 第19回日本骨代謝学会, 2001.
2. Y. Mikuni-Takagaki, K. Naruse, A. Miyauchi, Y. Onuki, T. Izumi, and M. Itoman: Bone marrow derived osteogenic cells, but not mature osteoblasts/osteocytes, are the

target cells for the anabolic response to therapeutic low-intensity, pulsed ultrasound, American Society for Bone and Mineral Research 23<sup>rd</sup> Annual Meeting, 2001.

3. 高垣裕子:骨形成の力学的要因 第21回日本骨形態計測学会, 2001.
4. Y. Mikuni-Takagaki: The role of calcium channels in osteocyte function. The 31<sup>st</sup> International Sun Valley hard tissue workshop. 2001.
5. A. Miyauchi, K. K. Naruse, M. Itoman, M. Goto, K. Notoya, K. Okabe, Y. Takagi, K. Jinnai, Y. Yoshimoto, T. Sugimoto, K. Chihara, T. Fujita, Y. Mikuni-Takagaki, PTH Potentiates Volume Sensitive Calcium Influx in Mechanically Stretched Human Osteocytes. American Society for Bone and Mineral Research 23<sup>rd</sup> Annual Meeting, 2001.
6. 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

1. A. Sakai, T. Nakamura, et al. Disruption of the p53 gene results in preserved trabecular bone mass and bone formation after mechanical unloading. *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol.17, No. 1, 119-127, 2002年発行
2. M. Watanuki, A. Sakai, K. Watanabe, K. Ikeda, T. Nakamura, et al. Role of inducible nitric oxide synthase in skeletal adaptation to acute increases in mechanical loading. *Journal of Bone and Mineral*

Research, 2002 in press.

2. 学会発表

1) A. Sakai, T. Nakamura, et al. Trabecular bone mass and bone formation are preserved after mechanical unloading in p53 knockout mice. 1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the European Calcified Tissue Society, Madrid, Spain, 2001年6月

2) 酒井昭典、中村利孝、ほか 非荷重による骨量減少は、p53 を介した骨髄細胞のアポトーシスの亢進による 第19回日本骨代謝学会、名古屋国際会議場、2001年8月

3) S. Uchida, A. Sakai, T. Nakamura, et al. Localized expression of hypoxia inducible factor family and differential expression of VEGF splice isoforms in neovascularization and bone formation during regenerating bone and bone marrow after drill-hole injury. 23rd annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Phoenix, Arizona, USA, 2001年10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

# 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)  
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

マウス脛骨から調製したアルカリフォスファターゼ陽性細胞を長期培養することにより増殖が停止し、骨細胞に特徴的な小突起を有する星型の形状を呈したアルカリフォスファターゼ陰性細胞を単離する方法を開発した。この細胞をマウス初代骨芽細胞と DNA チップで比較し、発現量差が 4 倍を越えた 138 クローンと同定した。ヒト大腿骨頭から調製した骨細胞様細胞をヒト骨芽細胞と DNA チップで比較し、発現量差が 4 倍を越えた 98 クローンと同定した。また、マウス脛骨から調製した骨細胞が豊富な分画から骨芽細胞が豊富な分画を差し引いたサブトラクションライブラリーを作製し、47 個 16 種類の遺伝子(うち 8 個 6 種が新規)を同定した。新規遺伝子のアミノ酸配列を決定し、その相同遺伝子とそれぞれに対する類似遺伝子(いずれも新規)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ほぼ不明である。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。最近、DMP1 が骨細胞特異的に発現することが報告されたが、この因子は *in vitro* において骨細胞での発現がみられず、逆に骨芽細胞株において発現がみられるなど、*in vivo* とは異なる発現を示すため、骨細胞特異的のマーカールとして不十分

なものであるといえる。本研究では骨細胞の特異的発現マーカーの探索を目的として、DNA チップおよびサブトラクション法によるスクリーニングを行った。また、メカニカルストレスの骨への影響を検討することを目的として、マウス尾部懸垂モデルを用いて脱荷重および再荷重時における遺伝子発現のプロファイリングを行った。

B. 研究方法

(1) 8週齢の ICR マウス♂20~30 匹から摘出した脛骨を材料とし、それらの結合組織を除去後、1mm 角以下の骨片にする。この骨片を 0.75mg/mL コラゲナーゼで4回処理(37°C 振とう、20分×4回)し、このコラゲナーゼ処理 2~4 回目のコラゲナーゼ液から回収した細胞を I 型コラーゲンをコートしたプレートに播き、約1ヶ月間は2回/

週の培地交換を、2ヶ月目から5ヶ月目にかけては2回/月の培地交換を行い、5ヶ月目に回収した細胞より total RNA を調製した。この細胞および total RNA のサンプル名を LOCY (long-term cultured osteocyte like cell) とした。一方、2週齢の ICR マウス♂20~30匹から摘出した脛骨を材料とし、それらの結合組織を除去後、10%FCS 含有培地中で 1mm 角以下の骨片に裁断したときに培地中にでた細胞を回収後、I 型コラーゲンをコートしたプレートに播き1週間培養し、アルカリフォスファターゼ陽性であることを確認後、回収した細胞より total RNA を調製した。この細胞および total RNA のサンプル名を POB (primary osteoblast) とした。これらのサンプルから調製したターゲット DNA を用いて 12489 クロンののったマウス DNA チップ解析を行った。その結果、LOCY における特異的発現がみられかつ発現量が高いものをピックアップした。それらについて、骨髄をフラッシュアウトしたマウス脛骨における発現を POB のそれとノーザンブロットで比較検討した。LOCY のかわりに脛骨を用いたのは、LOCY のサンプル量確保の困難さおよび in vivo での発現を確認する必要性を考慮したためである。また、骨細胞における特異的発現を、8週齢♂ICR マウスの脛骨凍結切片を用いた in situ ハイブリダイゼーションによって検討した。

(2) ヒト大腿骨頭を材料とし、それらの結合組織を除去後、1mm 角以下の骨片にする。この骨片を 0.75mg/mL コラゲナーゼで5回処理 (37°C 振とう、20分×5回) した後に 5mM EDTA 処理 (37°C 振とう、15分) したものをコラーゲン I 型コートプレートに播いた。約1週間後に骨片より outgrowth してきた細胞の形状を観察し、それが繊維芽細胞様ならば骨片を回収し、0.05%トリプシン処理 (37°C 振とう、15分) したものを再度新しいコラーゲン I 型コートプレートに播く。この操作は星形の形態を示す骨細胞が outgrowth してくるまで繰り返した。ヒト骨芽

細胞 NHOst は三光純薬より購入したものをを使用した。サンプル名は、outgrowth してきた骨細胞様細胞を IOCH, 三光純薬より購入した骨芽細胞を NHOst とする。これらのサンプルを用いて 12626 クロンののったヒト DNA チップ解析を行った。

(3) 8週齢の ICR マウス♂20~30匹から摘出した脛骨を材料とし、それらの結合組織を除去後、1mm 角以下の骨片にした。この骨片を 0.75mg/mL コラゲナーゼで5回処理 (37°C 振とう、20分×5回) した。コラゲナーゼ処理1回目を行った後に残った骨片を破碎し調整した total RNA を (leg1.5) とした。一方、コラゲナーゼ処理1回目のコラゲナーゼ液から回収した細胞をコラーゲン I 型コートプレートに播き、1~2週間後回収した細胞から調整した total RNA を (leg1) とした。同様に、コラゲナーゼ処理2, 3回目または4, 5回目のコラゲナーゼ液から回収した細胞を培養後、回収調製した total RNA をそれぞれ (leg2,3), (leg4,5) とした。(leg1.5) をテスター (骨細胞が豊富な分画) とし、(leg1) と (leg2,3) と (leg4,5) を等量混ぜたサンプル (leg1-5) をドライバー (骨芽細胞が豊富な分画) として、テスターからドライバーを差し引いたサブトラクションライブラリーを CLONTECH PCR-Select cDNA Subtraction Kit を用いて作製した。このライブラリーから、テスターにおいて高発現しているクロンをディファレンシャルスクリーニングによりピックアップ後、ノーザンブロットで確認した。骨細胞における特異的発現は、8週齢マウス ICR ♀の脛骨凍結切片を用いた in situ ハイブリダイゼーションによって検討した。新規遺伝子についてはデータベースをもとに設計したプライマーを用いて PCR をを行い、ヌクレオチド配列の決定を行った。

(4) 8週齢の C57BL/6 マウスを尾部懸垂により後肢を脱荷重状態にし、その実験開始時点 (0時間)、または6時間後に摘出した脛骨より mRNA を調製

した。また、8週齢の C57BL/6 マウスを2週間尾部懸垂した後、尾部懸垂から解除し(再荷重)、その実験開始時点(0時間)、6時間後、および24時間後に摘出した脛骨より mRNA を調製した。各群 n=5 とした。群名はそれぞれ尾部懸垂について TS 0hr、TS 6hr および再荷重について RL 0hr、RL 6hr、RL 24hr とした。これらを DNA マイクロアレイ解析を行った。比較はそれぞれ2群間で行い、TS 0hr と TS 6hr、RL 0hr と RL 6hr、RL 0hr と RL 24hr とで行った。DNA マイクロアレイにおいて、そのシグナル差が2倍を超えるものを有効とみなした。

### C. 研究結果および考察

(1) LOCY は、培養1〜2ヶ月目までは増殖が観察されたが、以降は増殖が停止し、3〜5ヶ月目から約80%が骨細胞に特徴的な小突起を有する星型の形状を呈した(図1)。この細胞はアルカリフォスファターゼ陰性であった。骨芽細胞マーカーであるアルカリフォスファターゼは POB においてのみ発現がみられ、I型コラーゲン $\alpha$ 1鎖は POB が LOCY の2.4倍の発現を示し、I型コラーゲン $\alpha$ 2鎖およびオステオポンチンの遺伝子発現は両細胞において同等の値を示した。オステオカルシンは LOCY においてのみ発現がみられた。軟骨細胞マーカーであるII型コラーゲン $\alpha$ 1鎖は POB、LOCY ともに発現がみられなかった。POB における発現量が相対値で50未満かつ LOCY における発現が POB の4倍を越えたものは12489クローン中138クローンであった。この138クローンの内、13クローンをノーザンブロッティングで発現を検討したところ、POB に比して脛骨での発現が高いクローンは OTS-8、グレムリン、RDC1 遺伝子の3個。脛骨に比して POB での発現が高いクローンは5個、検出限界以下のクローンは5個であった(表1)。また、前記138クローンの内、14クローンを *in situ* ハイブリダイゼーションにより骨組織での発現を検討したところ、RDC1 は骨細胞と骨芽細胞に、melanoma antigen は骨膜(骨芽細胞)に、ルミカン

は骨膜と骨内膜(骨芽細胞)において発現がみられた。その他の11クローンは検出限界以下であった(表1)。ノーザンブロッティングの結果より、LOCY には *in vivo* での骨細胞マーカーである DMP1 遺伝子の発現が認められなかった。そのため、*in vitro* での長期培養により得られた LOCY について骨細胞としての同定は形態に頼るだけとなり、有効な細胞特異的マーカー単離の可能性は低いと判断し、このスクリーニングを中止した。

(2) ヒト DNA チップの結果、*in vivo* での骨細胞マーカーである DMP1 は NHost、IOCIII ともに発現がみられなかった。骨芽細胞マーカーであるアルカリフォスファターゼは NHost においてのみ発現がみられ、I型コラーゲン $\alpha$ 1鎖、I型コラーゲン $\alpha$ 2鎖は両細胞において同等の発現を示し、オステオカルシンは両細胞に発現がみられなかった。オステオポンチンは IOCIII においてのみわずかに発現がみられた。軟骨細胞マーカーであるII型コラーゲン $\alpha$ 1鎖は両細胞ともに発現がみられなかった。NHost における発現量が相対値で50未満かつ IOCIII における発現が NHost の4倍を越えたものは12626クローン中98クローンであった。DNA チップにおける DMP1 および各種骨芽細胞細胞マーカーの発現の結果より、IOCIII や NHost は *in vivo* の骨細胞および骨芽細胞細胞の遺伝子発現を反映しておらず、IOCIII と NHost を用いたスクリーニング続行による骨細胞特異的マーカー単離の可能性は低いと判断し、このスクリーニングを中止した。

(3) 1300クローンをディファレンシャルスクリーニングにかけ、テスターにおいて高発現している47個16種類の遺伝子を単離した。内39個10種が既知遺伝子、8個6種が EST であった(表2)。これらの内、complement factor H および機能未知の EST クローンの2クローンにおいてノーザンブロッティングによりテスター>ドライバーという発現量

差が確認されたが、ともに *in situ* ハイブリダイゼーションでは検出限界以下であった。この EST クローンについて、ヌクレオチド配列の決定を行ったところ、365a.a. の新規蛋白をコードしていることが予測された。ホモロジー検索の結果、そのヒト相同遺伝子と一次構造にホモロジーの高いマウスの遺伝子がそれぞれ検出された。これらはいずれも6カ所の疎水領域があり、膜蛋白である可能性が示された。ノーザンブロッティングの結果、leg bone と un-pregnant uterus において特に発現していることが確認された。また、ST2, MC3T3-E1, KUSA-A1 などの間葉系または骨芽細胞様の細胞株においては発現が確認されなかった。興味深いことに石灰化条件下(アスコルビン酸およびβグリセロフォスフェート存在下で52日間培養)の MC3T3-E1 において発現の顕著な増加が確認された。この新規遺伝子は骨芽細胞の石灰化能促進因子である可能性、または骨芽細胞系の後期分化の指標になる可能性が考えられた。

(4) 脱荷重により発現が減少する遺伝子、または再荷重により発現が増加する遺伝子は認められなかった。また、再荷重 0 時間(RL0hr)と比較して、再荷重 24 時間(RL24hr)または 48 時間(RL48hr)では、幾つかの筋肉特異的因子が低い発現を示したが、これらは調製組織中に混在した結合組織由来のものである可能性が考えられた。今回の結果より、組織(特に骨は結合組織や血液を完全に除去することの困難さも手伝って)を材料に用いた DNA マイクロアレイによる発現量検討は微量の遺伝子発現変化をとらえるには適さず、検体調製には工夫が必要と考えられた。(表3ー

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

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

Vitamin D hormone inhibits osteoclastogenesis *in vivo* by decreasing the pool of osteoclast precursors in bone marrow. **J Bone Miner Res** 2002 in press

Sasaki A, Ikeda K, Watanabe K. A RING finger protein Praja 1 regulates Dlx5-dependent transcription through its ubiquitin ligase activity for the Dlx/Msx-interacting MAGE/Necdin family protein, Dlxin-1. **J Biol Chem** 2002 in press

Uchiyama Y, Higuchi Y, Takeda S, Masaki T, Shira-ishi A, Sato K, Kubodera N, Ikeda K, Ogata E A vitamin D analog ED-71 is a more potent inhibitor of bone resorption than alfacalcidol in an estrogen-deficient rat model of osteoporosis. **Bone** 2002 *in press*

Watanuki M, Sakai A, Sakata T, Tsurukami H, Miwa M, Uchida Y, Watanabe K, Ikeda K, Nakamura T Role of inducible nitric oxide synthetase in the skeletal adaptation to acute increase in mechanical loading. **J Bone Miner Res** 2002

Masuda Y, Sasaki A, Ikeda K, Watanabe K Dlxin-1, a novel protein that binds Dlx5 and regulates its transcriptional function. **J Biol Chem** 276:5331-5338, 2001

Sasaki A, Masuda Y, Ikeda K, Watanabe K Filamin associates with Smads and regulates TGF-β signaling. **J Biol Chem** 276:17871-17877, 2001

Sato T, Shibata T, Ikeda K, Watanabe K Generation of bone-resorbing osteoclasts from B220-positive cells: its role in accelerated osteoclastogenesis due to estrogen deficiency. **J Bone Miner Res** 16:2215-2221, 2001

### 2. 学会発表

新鞍陽平、菱谷彰徳、佐々木文、池田恭治、

渡辺 研 コラーゲン受容体DDR2のシグナル伝達機構 第19回日本骨代謝学会年会 8月8日 11日 名古屋

佐々木文、増田芳子、池田恭治、渡辺 研 Dlx5の転写機能はRING finger 蛋白 prajalによって制御される 第19回日本骨代謝学会年会 8月8日 11日 名古屋

菱谷彰徳、石倉信之、伊東昌子、佐々木文、柴田 猛、池田恭治、油谷浩幸、渡辺 研 老齢マウスにおける低形成性骨粗鬆症とDNAマイクロアレイ法による遺伝子発現プロファイル 第19回日本骨代謝学会年会 8月8日 11日 名古屋

渡辺 研、内山也寸志、杉田敦子、武田 聰、菱谷彰徳、安居輝人、菊谷 仁、池田恭治 エストロゲン欠乏骨粗鬆症におけるT細胞およびCD40を介したT-Bシグナリングの関与 第19回日本骨代謝学会年会 8月8日 11日 名古屋

Watanabe K, Uchiyama Y, Sugita A, Takeda S, Hishiya A, Ikeda K. Role of T cells and T to B signaling through CD40 in the pathogenesis of estrogen deficient osteoporosis. The 23rd annual meeting, American Society for Bone & Mineral Research. 10月12日 10月16日 Phoenix, Arizona, USA.

Hishiya A, Mizuno K, Niikura Y, Sasaki A, Ikeda K, Watanabe K. DDR2, a collagen receptor, interacts with Jab-1 and activates MMP1 promoter through AP-1. The 23rd annual meeting, American Society for Bone & Mineral Research. 10月12日 10月16日 Phoenix, Arizona, USA.

Sasaki A, Ikeda K, Watanabe K. The transcription function of Dlx5 is regulated by a RING-finger protein praja-1 through

ubiquitin-dependent degradation of Dlxin-1, a Dlx/Msx-interacting protein. The 23rd annual meeting, American Society for Bone & Mineral Research. 10月12日 10月16日 Phoenix, Arizona, USA.

日比陽子、荒木聖美、池田恭治、本山 昇 マウス筋芽細胞 C2C12の分化および脱分化におけるフォークヘッド型転写因子AFXの機能解析 日本分子生物学会第24回年会 12月9日 12日 横浜

菱谷彰徳、新鞍陽平、佐々木文、池田恭治、渡辺 研 コラーゲン受容体のシグナル伝達機構 日本分子生物学会第24回年会 12月9日 12日 横浜

## F. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

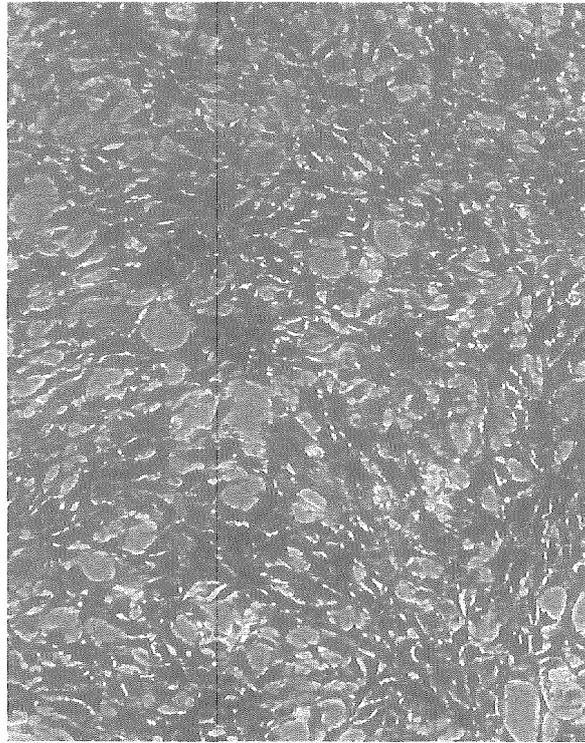
### 2. 実用案登録

なし

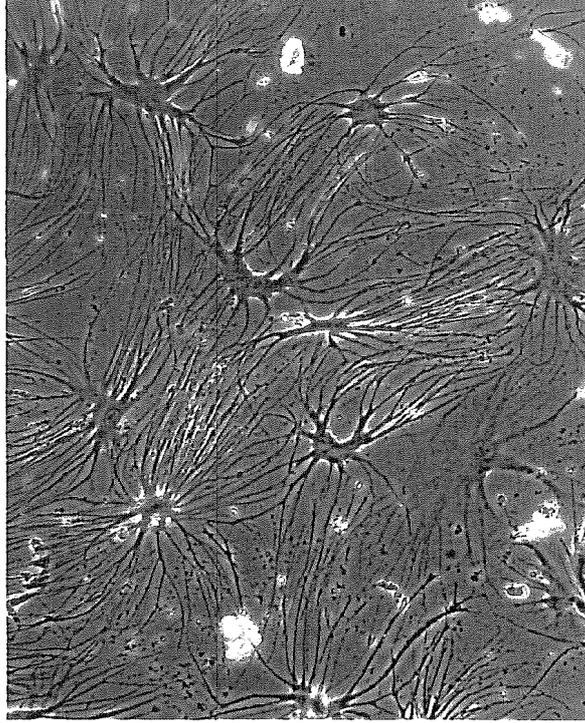
### 3. その他

なし

図 1



**POB(mouse osteoblast)**  
Mouse ICR (2wks old) 7-day culture (ALP staining)



**LOCY(mouse long-term cultured osteocyte like cells)**  
Mouse ICR (9wks old) 5-months culture

# 表1 マウス骨細胞様細胞>マウス骨芽細胞様細胞

サンプル：骨細胞様細胞LOCY（長期培養したマウス脛骨由来初代骨芽細胞）vs 骨芽細胞様細胞POB（マウス脛骨を刻んだ液由来の細胞ALP活性陽性）  
 DNAチップサイズ：12489クローム  
 発現量が4倍を超えたもの（LOCY > POB） & 骨芽細胞様細胞の発現量が<50のもの：138クローム

| Gene Name  | GenBank ID | LOCY > POB  |      | マウス脛骨tibia<br>(骨髄除去後)<br>vs POB   |      | in situ       |
|--|------------|-------------|------|-----------------------------------|------|---------------|
|  |            | 発現量差<br>(倍) | 発現量  | Northern<br>(4ug/lane)            |      |               |
| monocyte chemoattractant protein-2 (MCP-2)         | AB02341    | 280         | 3292 | ?                                 | N.D. | N.D.          |
| NOV  | Y09257     | 226         | 2589 |                                   |      | N.D.          |
| IGF binding protein 6                              | X81584     | 162         | 1671 | tibia < POB                       |      | N.D.          |
| matrix metalloprotease 3                           | X66402     | 113         | 3489 | N.D.                              |      |               |
| melanoma antigen                                   | D10049     | 65          | 4719 |                                   |      | 骨膜<br>(骨芽細胞?) |
| plasminogen activator                              | J03520     | 62          | 1034 | N.D.                              |      | N.D.          |
| ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 | AW122933   | 54          | 634  |                                   |      |               |
| microsomal epoxide hydrase 1 (Eph1)                | U89491     | 48          | 534  | tibia < POB                       |      |               |
| DAN  | D50263     | 44          | 177  | tibia < = POB                     |      |               |
| aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1      | M74570     | 33          | 433  | N.D. (bone marrowに多い)             |      | N.D.          |
| fibulin 1  | X70854     | 31          | 357  | tibia < POB                       |      |               |
| c-fos induced growth factor                        | X99572     | 31          | 388  |                                   |      | N.D.          |
| OTS-8  | M73748     | 30          | 399  | tibia > POB                       |      | N.D.          |
|  |            |             |      | tibia < = POB<br>(bone marrowに多い) |      | N.D.          |
| EST  | A1604345   | 22          | 559  |                                   |      |               |
| EST  | AW125849   | 17          | 203  | N.D.                              |      | N.D.          |
| lumican  | AF01362    | 17          | 2524 | N.D.                              |      | 骨芽細胞          |
| gremlin  |            |             |      | tibia > POB<br>(bone marrowに多い)   |      | N.D.          |
| RDC1 orphan chemokine receptor                     | AF04580    | 17          | 165  |                                   |      |               |
| nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1    | AF00023    | 16          | 188  | tibia > >                         |      | 骨細胞、骨芽細胞      |
|  | X16995     | 16          | 332  |                                   |      | N.D.          |

N.D. = not detected = not detected