

## 表 2 Subtraction

約 1300 clone 中

gene name	clone 数	Northern	in situ
mouse complement factor H	4種(15個)	leg1.5 > leg(1~5)	
homo sapiens mRNA for Sec24 protein (Sec24A isoform), partial length=5967	2種(2個)		
homo sapiens type I collagen alpha1 chain	2種(6個)	leg1.5 > leg(1~5)	N.D.
homo sapiens type I collagen alpha2 chain	4種(6個)		
Rattus norvegicus eukaryotic initiation factor 5 (eIF-5) (Eif5)	1	N.D.	
mouse glucocorticoid-regulated inflammatory prostaglandin G/H synthase (Cox-2)	1		
mouse osteopontin	2種(5個)		
homo sapiens UMP-CMP kinase	1		
mouse mRNA for Krox-20 protein containing zinc fingers, length=2862	1		
mouse beta-globin major gene(length=6532bp)	1		
他EST	6種(8個)		
	47		

N.D.=not detected

### 表3 脱荷重による遺伝子発現変化

脱荷重により発現が減少するもの (脱荷重0hr>脱荷重6hr)

発現量差 (倍)	Gene Name	GenBank Id
1.7	immunoglobulin heavy chain 3 (serum IgG2b)	A1158823
1.5	immunoglobulin kappa chain variable 20 (V20 family)	AW496194
1.5	thyroid hormone receptor alpha	AA612414
1.5	aplysia ras-related homolog N (RhoN)	W74896
1.5	signal transducer and activator of transcription 1	AA726873
1.5	T-cell specific GTPase	A1060720

他EST 1

脱荷重により発現が増加するもの (脱荷重0hr<脱荷重6hr)

発現量差 (倍)	Gene Name	GenBank Id
1.8	metallothionein 2	W36474
1.5	homeo box C4	A1047090
1.5	exostoses (multiple) 2	A1466760
1.5	ESTs, Weakly similar to HYPOTHETICAL 20.3 KD PROTEIN IN GCD14-POS18 INTERGENIC REGION [Saccharomyces cerevisiae]	A1325578
1.5	ESTs, highly similar to CBDD1, homolog of the Drosophila melanogaster CBDD1 protein [H.sapiens]	AA437623
1.5	orosomucoid 2	AA245687
1.5	protein phosphatase 3, catalytic subunit, gamma isoform	AA175592
1.5	chitinase 3-like 3	AA673731

他EST 9

表4 再荷重による遺伝子発現変化

再荷重により発現が増加するもの (再荷重0hr<再荷重6hr)	Gene Name	GenBank Id
1.5	pregnancy specific glycoprotein pseudogene 1	AI225368

他EST 7

再荷重により発現が減少するもの (再荷重0hr>再荷重6hr)	Gene Name	GenBank Id
3.1	Mus musculus mRNA for myosin heavy chain 2B, partial	AA656712
3	troponin T3, skeletal, fast	AA770924
2.9	creatine kinase, muscle	AI552711
2.9	ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, fast twitch 1	AA717019
2.8	troponin C, fast skeletal	AA771566
2.4	myoglobin	AA821997
2.3	troponin I, skeletal, fast 2	AA821941
2	Mus musculus mRNA for myosin heavy chain 2A, partial	AA869609
1.9	myosin heavy chain, cardiac muscle, adult	AA671135
1.6	histone H2A.Z	AA606684
1.6	enolase 3, beta muscle	AA681602
1.5	ryanodine receptor 1, skeletal muscle	AA619831
1.5	aplysia ras-related homolog N (RhoN)	W74896
1.5	ESTs, Highly similar to CREATINE KINASE, SARCOMERIC MITOCHONDRIAL PRECURSOR [Rattus norvegicus]	AI325608
1.5	clathrin adaptor protein mu3A	AA608117
1.5	lipoprotein lipase	AA739040
1.5	tropomyosin 2, beta	W18330
1.5	desmin	W15812

他EST 2

表5 再荷重による遺伝子発現変化

再荷重により発現が増加するもの (再荷重0hr<再荷重24hr)

発現量差 (倍)	Gene Name	GenBank Id
1.7	ESTs, Highly similar to GUANINE NUCLEOTIDE-BINDING PROTEIN G(K), ALPHA SUBUNIT [Rattus norvegicus]	AA438152
1.5	procollagen, type XIV, alpha 1	AA002997

他EST 5

再荷重により発現が減少するもの (再荷重0hr>再荷重24hr)

発現量差 (倍)	Gene Name	GenBank Id
1.7	chondroitin sulfate proteoglycan 2	AA755868
1.6	myoglobin	AA821997
1.6	Mus musculus mRNA for myosin heavy chain 2B, partial	AA656712
1.6	ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, fast twitch 1	AA717019
1.6	CD79a antigen	AI876995
1.6	creatine kinase, muscle	AI552711
[1.5]	ESTs, Weakly similar to FCEB_MOUSE HIGH AFFINITY IMMUNOGLOBULIN EPSILON RECEPTOR BETA-SUBUNIT [M.musculus]	AI552228
[1.5]	ESTs, Moderately similar to PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE CATALYTIC SUBUNIT, BETA ISOFORM [Homo sapiens]	AA709957
[1.5]	aplysia_ras-related homolog N (RhoN)	W74896
1.5	histocompatibility 2, O region beta locus	AA154371
1.5	troponin C, fast skeletal	AA771566
1.5	forkhead box D1	AI893923
1.5	transglutaminase 3, E polypeptide	AI325332
1.5	troponin T3, skeletal, fast	AA770924
1.5	H2.0-like homeo box gene	AI121405
1.5	early growth response 1	AA674784

他EST 2

厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)  
分担研究報告書

骨細胞における遺伝子発現と機能解析

分担研究者 高垣 裕子(神奈川歯科大学 講師)

研究要旨

昨年度の結果が示す通り、特異的な遺伝子の解析には primary の細胞の場合純度が課題となる。我々は、調整法の改良とは別に、特異的な応答により発現される遺伝子に限れば細胞の純度にかかわらず解析可能である点に着目した。そこで、ヒト骨組織、骨芽細胞を含む EST ライブラリー (大阪大学細胞工学センターBodyMap プロジェクトその他より公開された EST) を in silico で比較解析したのについて、特異的と示唆された遺伝子のタンパクを伸展骨細胞において同定した。その結果、脱リン酸化酵素に関連して興味ある結果が得られた。

キーワード: 骨形成、力学的刺激、骨細胞、分化、メカノセンサー

A. 研究目的

骨細胞 (オステオサイト) は細胞同志多数の骨細管と呼ばれる管構造を通じて骨内ネットワークすなわち情報伝達システムを構築している。骨細胞はさらに破骨細胞とも接触可能であり、また骨髄間質細胞、骨芽細胞を経由して毛細血管の周皮細胞とも間接的に繋がっている。骨細胞は、1) 構造・環境特性に由来するシアストレスの増幅、2) 骨細胞自身の伸展刺激受容体 (複合体) —Caイオン流入をもたらし、cAMP産生を誘導する。又、PTHにより応答が増幅される—の特異性により、力学的環境のセンサーとして骨全体に化学物質の情報を発信することが、これまでの自他の研究から明らかにされた。

骨細胞は、間葉系幹細胞由来の骨芽細胞が骨形成に際して自ら分泌した基質 (マトリッ

クス) 中に囲まれていく過程で分化し細胞突起を発達させた細胞で、徐々に増殖能を失う。この新たに骨細胞へと分化した (コミットした) 細胞から見ると、骨形成面、即ち血流からの物質の補給が可能な骨表面は、一日に約 1 μm ずつ離れて行く。したがって骨細胞は、それと同じスピードで突起と骨細管を伸長させながら骨表面 (骨芽細胞) との接触を保つ。分化したばかりの骨細胞は未石灰化骨基質である類骨を挟んで複数の骨芽細胞と細胞突起により接触しており、更に深部へと移行するにつれ、その距離は長くなる。従って骨形成の際には、分化のレベルの異なる骨 (芽) 細胞が連続的に存在する訳で、対応して機能が分担される。我々は、伸展刺激に対する応答能の最も高い幼若骨細胞 (成熟骨芽細胞よりも分化した、突起の出現し始めの細胞) を単

離培養し、伸展刺激負荷後の細胞内における mRNA レベルの変化を経時的に比較した結果、タンパクにより主に5つのパターンを示すことを見出している (Kawata and Takagaki, 1998)。1) c-fos型：一過性に初期 (immediate-early) に上昇する一峰型、2) COX 2型：1) に加えて12時間後に再上昇する二峰型、3) IGF-I・オステオカルシン型：初期の上昇の後一旦下降し、24時間後に再上昇する二峰型、4) iNOS型：なだらかに上昇してゆっくり下降し、24時間でほぼ元に戻る一峰型、5) COX 1型：無変化型の5つのタイプである。初期の細胞応答に関しては *in vivo* での解析も十分可能であり、発現しているタンパクが例えば流入したCaイオンで直接的に活性化されるNOSの応答のような、タンパクレベルでの応答が、mRNAレベルの変化と共に既に多数知られている。培養骨細胞による上述のようなmRNAレベルの解析が重要となり得るのは、むしろ遅延型の応答の情報伝達機構解明においてであると我々は考えた。なぜならば、短時間の負荷の後に、新たな刺激や情報の流入を全く止めて経過を観察するのは、動物実験では困難だからである。我々は、刺激開始後約6時間で、IGF-IやCOX 2のmRNAレベルが一旦基礎値よりも下降するのに興味を持ち、ヒト大腿骨由来の骨細胞においてこの時点で特異的に発現されている遺伝子を検索する目的で解析を行った。

骨の伸展刺激に対する応答の全体像を把握することを本研究の最終的な目標とする。

## B. 研究方法

北里大学整形外科において、大腿骨頸部骨折治療のため手術を受けた女性患者より、同意を得て、除去部分の処分される骨片を頂戴した。骨細胞の培養は、既に報告した方法で行った。

概略以下のとおりである。骨片より骨髄を除去後、鋏で出来るだけ小さな砂粒状の細片にする。0.2mg/mlのシグマDNaseを含む細胞分散用コラゲナーゼ溶液 (1mg/ml) 25ml中、37度で振盪する。30分後取り出してピペティング操作をくりかえして骨片を洗浄し、静置培養する。事前にMatrigelを薄くコートし手早く乾燥させた100mmの培養皿をもちいる。約1週間後外生した細胞が繊維芽細胞の形態を示すときは、骨片を集めて0.25%トリプシンで20分ほど振盪し、再びピペティング操作をくりかえして骨片を洗浄して新しい培養皿に移す。数週間後外生した細胞が突起をたくさん出現させていればサンプルとして回収する。必要に応じて新しい培養皿に移す操作を繰り返すが、この実験に関しては2回目の移動後のOCII分画を使用した。サブコンフルエントの状態での細胞密度は、骨芽細胞が到達する密度より1桁以上低い。回収した細胞は、Flexercell負荷装置とFlex I 培養皿を利用し、約0.4% (4,000 E) 前後の伸展刺激を3時間負荷した。11秒間に1/3Hzで4回伸展・解除した後49秒間静置するサイクルを180回繰り返した後、更に3時間静置培養して材料とした。無刺激のコントロールサンプルは、Flex I 皿に静置培養、培地交換後24時間経過した時点で回収して用いた。

*in silico* の解析により得られた情報に基づき、特異的発現の示唆されたタンパクの抗体を入手し、タンパクレベルでの発現を免疫学的に調べた。すなわち細胞タンパクを、培養細胞層をタンパク分解酵素阻害剤及びフォスファターゼ阻害剤、detergent の入った lysis buffer に溶解させて調製、タンパク量を測定した後に免疫沈降法ならびに Western blot 法により刺激の有無で発現量に変化があるかどうかを調べた。

## C. 研究結果

伸展骨細胞に特異的な遺伝子について、例えば骨組織のライブラリーに現れる上位 20 の遺伝子は、他の検索ライブラリーの半分以上に見出される非特異的遺伝子であった。一般的に、高頻度発現遺伝子は非特異的遺伝子（フィブロネクチン、コラーゲン、アクチン、SPARC など）が殆どである。

骨組織 EST のみに見られ、発現頻度は低いが特異的と考えられる既知の遺伝子として、タンパク発現の差まで確認できた中に calcineurin B、その結合タンパクである FKBP-12 があった。まだ差を確認していないが PTP4A、PKCI-1、FKBP-associated proeinFAP48 などの関連タンパクもあった。我々は、これらが関与する情報伝達経路は、骨細胞に特異的な伸展刺激による Ca 流入の下流において、PKA および CaMK が引き起こした転写活性やタンパクの発現をリサイクル（収束）させるプロセスであると考えている。時間差をもって発現されるパターンが、calcineurin B で確認された。伸展骨細胞で FK506 が示すアナボリックな相乗効果が、リン酸化酵素の活性化状態を持続させると考えれば大変よく説明できる。それぞれのフォスファターゼの基質と酵素反応の確認は、次年度に継続される。

#### D. 結論

運動による骨形成の促進には、伸展刺激に応答した骨細胞への Ca イオンの流入と、それに引き続く情報伝達が重要である。しかし、流入したイオンが排出されなければならないにもかかわらず、遅延して起こるべき一連の応答は全く不明だったといえる。週に 2 回の運動が生体において骨形成促進効果を示すメカニズムも明らかでない。本研究により、Ca イオンの流入後、cAMP などに応答して発現した

遺伝子やリン酸化されたタンパクがどのようにして持続的にアナボリックな効果をもたらすのかを知るための手がかりが、伸展刺激に応答した骨細胞に遅延して発現される特異的遺伝子から得られた。

#### E. 研究発表

##### 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., Itohara, 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. 高垣裕子: 多様なメカニカルストレスに対する骨系細胞の種々の応答. 第42回 関東整形災害外科学会. 2002
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Y. Mikuni-Takagaki: The role of calcium channels in osteocyte function. The 31<sup>st</sup> International Sun Valley hard tissue

workshop. 2001.

6. 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.
7. 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

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



厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)  
分担研究報告書

荷重刺激に対する骨形成反応における iNOS の役割

分担研究者 中村 利孝(産業医科大学整形外科学教室 教授)

研究要旨

マウスの尾部を懸垂し、後肢を非荷重にすると、急激な海綿骨量減少が生じる。その後、再荷重すると、いったん減少した骨量が回復する。この骨量の回復には、inducible nitric oxide synthase (iNOS) 由来の NO が必須であるか否かを明らかにする目的で、昨年度より本研究をおこなってきた。

海綿骨量や骨形成率は、非荷重後 1 週で、iNOS 遺伝子欠損マウス (+/+), 野生型マウス (-/-) とともに同程度、正常荷重群に比べて有意に減少した。再荷重で、iNOS (+/+) は、正常荷重群レベルまで増加したのに対し、(-/-) は低下したままであった。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、骨組織に iNOS 蛋白は検出できなかったが、再荷重後 12 時間では、立方形になった骨芽細胞に、iNOS 蛋白の発現を認め、同時にアルカリフォスファターゼ染色で強い陽性を示した。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。

この 2 年間の研究結果から、1) 非荷重による骨量減少、骨形成低下は、iNOS に依存しない、2) 尾部懸垂後の再荷重時の骨形成促進には、iNOS 由来の NO が必須である、ことを組織および細胞レベルで明らかにした。骨芽細胞において、iNOS 由来の NO は、非荷重後の再荷重による急激な荷重増加に伴う骨代謝回転調節と骨形成促進に適応する上で、重要な役割を担っている。

キーワード: 尾部懸垂モデル、荷重、非荷重、NO

## A. 研究目的

適度の力学的負荷は、骨量と骨構造の維持に不可欠な要素である。宇宙飛行や長期臥床など

の重力刺激の軽減した状態では、急激な骨量減少が生じることが知られている (Lancet 355: 1607-1611, 2000、J Bone Miner Res 5: 843-850, 1990)。しかし、力学的負荷の増減が骨に及ぼす影響に関する分子メカニズムについては不明な点が多い。

マウスやラットの尾部懸垂モデルは、後肢における力学的負荷軽減モデルとして有用である。いままでに、このモデル動物を用いて、非荷重状態は、骨髄細胞における骨芽細胞前駆細胞の分化と増殖を抑制するという報告や、insuline-like growth factor (IGF)、transforming growth factor- $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ 2)、オステオカルシン、オステオポンチンの mRNA の発現量を低下させるという報告がある (J Bone Miner Res 10: 415-423, 1995)。また、逆に、非荷重後の再荷重は、再荷重後 20 分で骨膜細胞の c-fos mRNA を増加させ、それに続いて、2 時間後に cyclooxygenase-2 (COX2) mRNA を増加させると報告されている (Bone 22: 89S-93S, 1998)。マウスの尾部を懸垂し、後肢を非荷重にすると、急激な骨量減少が生じる。その後、再荷重すると、いったん減少した骨量が回復する。1 週間の非荷重後に、2 週間再荷重をすると、ほぼ元のレベルまで回復する。

非荷重後の再荷重における骨量の回復には、inducible nitric oxide synthase (iNOS) 由来の nitric oxide (NO) が必須であるか否かを明らかにする目的で、昨年度より研究をおこなってきた。昨年度の研究により、非荷重後 1 週で、iNOS 遺伝子野生型 (+/+), ヘテロ型 (+/-), 欠損型 (-/-) マウスにおいて、海綿骨量と骨形成は同程度に有意に減少すること、再荷重で、iNOS (+/+) では、正常荷重群レベルまで回復するのに対し、(-/-) では、低下したままであることを明らかにした。

本年度の研究の目的は、尾部懸垂による後肢非荷重モデルマウスの脛骨から骨髄細胞を採取し、細胞培養し、骨髄細胞から骨芽細胞への分化過程に NO が必須であるか否かを *ex vivo* の系で明らかにすることである。また、免疫染色により、実際どの細胞に iNOS 蛋白の発現がみられるのかを確認する。この 2 年間の研究成果により、非荷重後の再荷重時における、骨量と骨形成の増加には、iNOS 由来の NO が必須であるか否かを組織と細胞レベルで明らかすることができる。

## B. 研究方法

### ・動物

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。尾部懸垂した状態でも、ケージ内をある程度自由に移動でき、摂食、飲水は自由に可能である。正常荷

重群も同じデザインのケージで飼育した。食餌は、標準的な CE-2 (Clea Japan Inc.、東京) であり、1.25%カルシウムと 1.06%リン、2.0 IU/g ビタミン D3 を含有している。8 週齢の雄性を実験に用いた。摂餌量はすべての実験群間でマッチさせた。なお、実験のプロトコールは、産業医科大学動物実験倫理委員会において承認されている。

#### ・実験群のデザイン

マウスを 4 群に分けた。グループ 1 は、1 週間の非荷重(尾部懸垂)を行った群である。グループ 2 は、1 週間、正常荷重を行った群である。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群である。グループ 4 は、3 週間、正常荷重を行った群である。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。海綿骨量の変化に関しては、ヘテロ型マウス (+/-) も用いた。各遺伝子における各グループあたりのマウス数は、組織形態計測用に 6 匹、骨髄細胞培養実験用に 4 匹の計 10 匹であり、iNOS (+/+) 40 匹、(+/-) 40 匹、(-/-) 40 匹の合計 120 匹である。

#### ・NO 補充と NO 阻害実験

上記の 4 グループとは全く別に実験を組んだ。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。

#### ・組織形態計測

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。エーテルで麻酔し、頸椎脱臼にて屠殺した。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ホターゼ (TRAP) 染色を行った。

脛骨近位二次海綿骨で骨形態計測を行った。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、アルカリホスホターゼ (ALP) 染色を行った。

#### ・骨髄細胞培養

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

骨から骨髓細胞を採取した。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。

#### ・統計

それぞれの時点で、同一遺伝子マウスにおける、非荷重/再荷重群と正常荷重群との間の検定は、Student's t-test と Mann-Whitney's U-test で、 $p < 0.05$  を有意とした。異なった時点にける検定には、Tukey-Kramer post-hoc test after one-way ANOVA と Mann-Whitney's U-test で、 $p < 0.05$  を有意とした。

### C. 研究結果

#### ・体重

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。

#### ・組織形態計測

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

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。

#### ・NO 補充と NO 阻害実験

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。

#### ・免疫染色

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. 考察

尾部懸垂による非荷重では、iNOS 遺伝子に関係なく、骨量減少、骨形成低下、骨吸収亢進が認められた。一方で、再荷重に対する骨形成ないし骨吸収反応は、iNOS (-/-) で欠如し、nitroglycerin の投与で回復、iNOS (+/+) においても aminoguanidine 投与により抑制されたことから、iNOS 遺伝子由来の NO は、非荷重後の再荷重における骨反応に必須であることが、組織形態計測および ex vivo の骨髓細胞培養の結果から明らかとなった。また、免疫染色により、再荷重後12時間という早期に、骨梁表面と皮質骨内面の骨芽細胞において、

ALP とともに iNOS 蛋白が発現していることを確認した。

我々は、最近、骨髓基質細胞数と CFU-f のコロニー数は、1週間の尾部懸垂マウスと正常荷重マウスの両群間で、差がないことを明らかにした(J Bone Miner Res 14: 1596-1604, 1999)。その一方で、2週間の再荷重は、全骨髓細胞数、接着細胞数、mineralized nodule の形成の全てを増加させた。これらの結果から、非荷重の骨形成系細胞に与える影響は、非荷重後の再荷重が骨形成系細胞に与える影響とは明らかに異なることがわかった。今回の結果は、尾部懸垂において、iNOS は骨形成の減少や骨吸収の増加に影響を与えないことを示した。破骨細胞の形成は、骨形成系細胞により制御されているので、非荷重時の骨吸収の増加と再荷重時の骨吸収の低下は、ともに骨芽細胞分化の二次的なものである可能性がある。

力学的負荷が骨形成を刺激する上での NO の役割については、ラットで Chow ら (J Bone Miner Res 13: 1039-1044, 1998) が報告している。尾骨を急激に圧迫することにより、尾骨の石灰化面と海綿骨量が増加したことから、NO donor である S-nitroso-N-acetyl-D, L-penicillamine あるいは S-nitroso-glutathione を投与することで、さらにこれらのパラメーターが増加したことを報告している。一方で、NO inhibitor である L-N<sup>G</sup>-monomethyl-arginine を力学刺激の15分

前に投与しておくこと、骨形成の増加が抑制されたと報告している (Am J Physiol 270: E995-E960, 1996)。

過去の文献で、成熟ラットにおいて、eNOS が骨細胞と立方形の骨芽細胞に検出されたが、iNOS の発現はどの骨細胞や骨芽細胞にも認めなかったという報告がある (J Bone Miner Res 12: 1108-1115, 1997, Bone 23: 1-6, 1998)。我々は、非荷重後の再荷重時に、iNOS 蛋白を骨細胞や骨芽細胞に認めた。iNOS の発現は、サイトカイン刺激下や新生児の骨細胞では検出されている (J Bone Miner Res 12: 1108-1115, 1997)。iNOS 遺伝子欠損マウスの骨代謝回転は、eNOS 遺伝子欠損マウスのそれとは明らかに異なっている。eNOS 遺伝子欠損マウスでは、野生型と比べて、有意な海綿骨量減少を示すが、iNOS 遺伝子欠損マウスの骨量や骨形成は、野生型のそれらと差はない。eNOS 蛋白は恒常的に発現しているが、iNOS 蛋白は、非常に限られた環境で発現し、正常荷重時には認められないのかもしれない。

## E. 結論

- 1) 非荷重による骨量減少、骨形成低下、骨吸収増加は、iNOS に依存しない。
- 2) 尾部懸垂後の再荷重時の骨形成促進には、iNOS 由来の NO が必須である。骨芽細胞において、iNOS 由来の NO は、非荷重後の再荷重による急激な荷重増加に伴う骨代謝回転調節と骨形成促進に適応する上で、重要な役割を担っ

ている。

## F. 研究発表

### 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

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし