

- 12) Liu Y, Himes BT, Moul J, et al. (1997) Application of recombinant adenovirus for in vivo gene delivery to spinal cord. **Brain Res** **768** : 19-29.
- 13) Liu Y, Kim D, Himes BT et al. (1999) Transplants of fibroblasts genetically modified to express BDNF promote regeneration of adult rat rubrospinal axons and recovery of forelimb function. **J Neurosci** **19** : 4370-4387.
- 14) Lou J, Lawrence G, Xu F, et al. (1998) In vivo Bcl-2 oncogene neuronal expression in the rat spinal cord. **Spine** **23** : 517-523.
- 15) Miura T, Tanaka S, Seichi A, et al. (2000) Partial functional recovery of paraplegic rat by adenovirus-mediated gene delivery of constitutive active MEK1. **Exp Neurol** **166** : 115-126.
- 16) Miyake S, Makimura M, Kanagae Y, et al. (1996) Efficient generation of recombinant adenovirus using DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. **Proc Natl Acad Sci USA** **93** : 1320-1324.
- 17) Ramon-Cueto (2000) Olfactory ensheathing glia transplantation into the injured spinal cord. **Prog Brain Res** **128** : 265-272.
- 18) Ramon Y Cajal (1928) *Degeneration and regeneration of the nervous system*. translated by May RM, Oxford Univ. press, London.
- 19) Schwab ME and Bartholdi D (1996) Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. **Physiol Rev** **76** : 319-370.
- 20) Xu XM, Guenard V, Kleitman N (1995) A combination of BDNF and NT-3 promotes supraspinal axonal regeneration into Schwann cell grafts in adult rat thoracic spinal cord. **Exp Neurol** **134** : 261-272
- 21) Xu XM, Guenard V, Kleitman N (1995) Axonal regeneration into Schwann cell-seeded guidance channels grafted into transected adult rat spinal cord. **J Comp Neurol** **351** : 145-160.

# 急性脊髄損傷後に発現増加する BMPs は神経幹細胞のアストロサイトへの分化を運命付ける

瀬戸口啓夫 (鹿児島大学整形外科・同難治性ウイルス性疾患研究センター分子病理部門・熊本大学発生医学研究センター胚形成部門転写制御分野),  
米 和徳 (鹿児島大学整形外科), 松永 俊二 (鹿児島大学整形外科),  
柳沢 亮 (熊本大学発生医学研究センター胚形成部門転写制御分野),  
滝沢 琢己 (熊本大学発生医学研究センター胚形成部門転写制御分野・群馬大学小児科),  
落合 和 (熊本大学発生医学研究センター胚形成部門転写制御分野),  
出雲 周二 (鹿児島大学難治性ウイルス性疾患研究センター分子病理部門),  
中島 欽一 (熊本大学発生医学研究センター胚形成部門転写制御分野),  
田賀 哲也 (熊本大学発生医学研究センター胚形成部門転写制御分野), 小宮 節郎 (鹿児島大学整形外科)

## 【研究要旨】

成体の中枢神経は損傷後の再生能力は極めて乏しいことが知られているがその原因として gliosis 形成による再生阻害が指摘されている。以前我々はアダルトラットの脊髄損傷後に BMP7 の発現が増加すること、ならびに BMPs がマウス胎仔由来神経幹細胞の neuron 分化を抑制し astrocyte 分化を誘導する事を報告した。今回は BMP2 及び BMP7 に着目して脊髄損傷後の発現を解析し、成体マウス脊髄由来神経幹細胞に対する作用を調べた。定量的 RT-PCR 法にて BMPs mRNA は脊髄損傷後に発現増大を示した。また BMPs は成体マウス脊髄由来神経幹細胞の neuron 分化を抑制し astrocyte への分化誘導作用を示した。移植した神経幹細胞や脊髄に内在する神経幹細胞は脊髄損傷後に増殖するが neuron へは分化せず astrocyte へ分化する。今回の結果より脊髄損傷後に発現増加する BMPs の gliosis 形成への関与が推察される。

## A. 研究目的

成体の中枢神経は末梢神経とは異なり損傷後の再生能力は極めて乏しいことが知られている。その原因として①神経細胞の生存や再生に必要な神経栄養因子の不足, ②成熟に伴う成長能力の喪失, ③Nogo 等の再生阻害蛋白質, ④glial scar による物理的再生阻害等が報告されている<sup>1)</sup>。これら阻害因子を克服して中枢神経系を再生するために神経幹細胞を利用した再生医療が注目を浴びている。しかし動物実験において脳や脊髄の損傷後に神経幹細胞を移植してもそのほとんどはグリア細胞へと分化してしまいその治療効果は未だ充分とは言えない。我々は急性脊髄損傷後に脊髄内で骨形成因子 BMP7 の発現が増加することを報告してきた<sup>2)</sup>。一方で我々は *in vitro* の実験で BMP が胎児由来の神経幹細胞に対し neuron 分化抑制作用ならびにアストロサイト分化誘導作用を持つことを報告した<sup>3,4)</sup>。これら二つの知見より脊髄損傷後に形成される gliosis に BMP のシグナルの関与していることが示唆された。そこでまず我々はアダルトマウスの脊髄に内在する神経幹細胞を単離し、BMPs の及ぼす影響について調べた。

## B. 研究方法

【方法】①脊髄損傷モデルの作製: 14 週齢の雄 Wistar rat を用い、麻酔下に椎弓切除を行った後、胸髄部に 120g の圧迫損傷を 2 分間加え脊髄完全麻痺モデルを作成した。これらの損傷モデルの脊髄を全身麻酔下に損傷後 3 時間, 6 時間, 12 時間, 24 時間, 2 日後, 3 日後, 4 日後, 5 日後, 6 日後, 7 日後に摘出した (損傷群)。また対照として何ら損傷を加えなかったラットの脊髄を同様に摘出した (対照群)。  
② *In situ* hybridization: 脊髄損傷モデルをパラホルムアルデヒドにて還流固定後に脊髄を摘出固定。その後損傷部より中枢部についてパラフィン切片を作製し *In situ* hybridization を行い、NBT-BCIP を用いアルカリホスファターゼ発色を行った。観察は損傷中心より 7.5 mm まで行った。  
③定量的 RT-PCR: Primer Express を用いて適切な primer をデザインし、TaqMan Rt-PCR を行った。  
④神経幹細胞の単離: アダルトマウスの脊髄を摘出。Trypsin 処理後ホモジナイズし bFGF/EGF 入り N2 medium にて培養。neurosphere を trypsin 処理後オルニチン/ファイブロネクチンコート チャンバー スライドにまきなおし、BMP2, BMP7 を 40 ng/ml

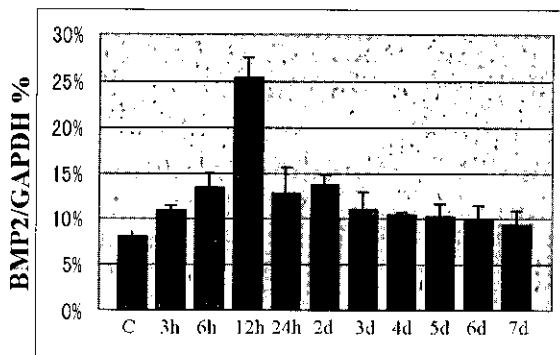


Fig. 1a Increase in the expression of BMP2 mRNA after spinal cord injury

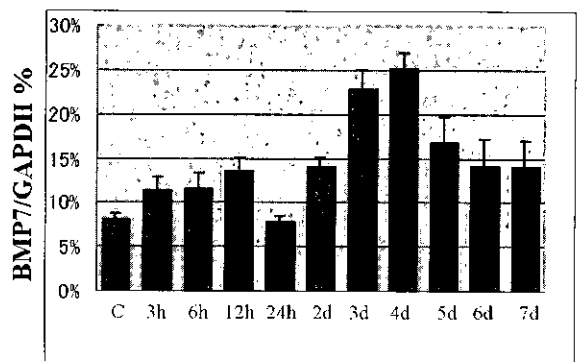


Fig. 1b Increase in the expression of BMP7 mRNA after spinal cord injury

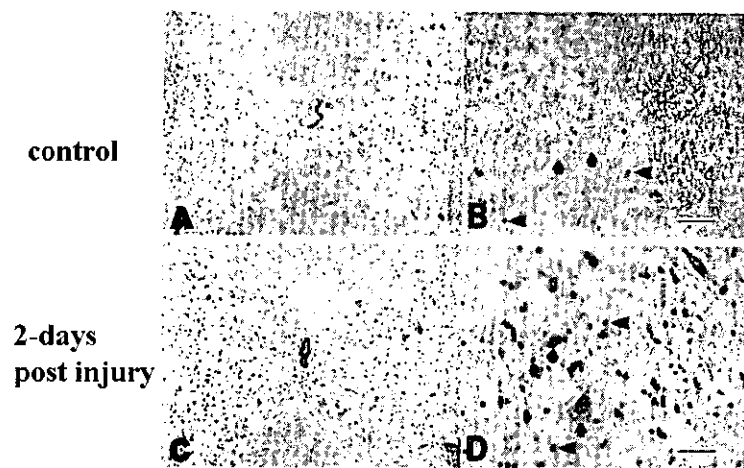


Fig. 2 Upregulation of BMP7 expression after spinal cord injury

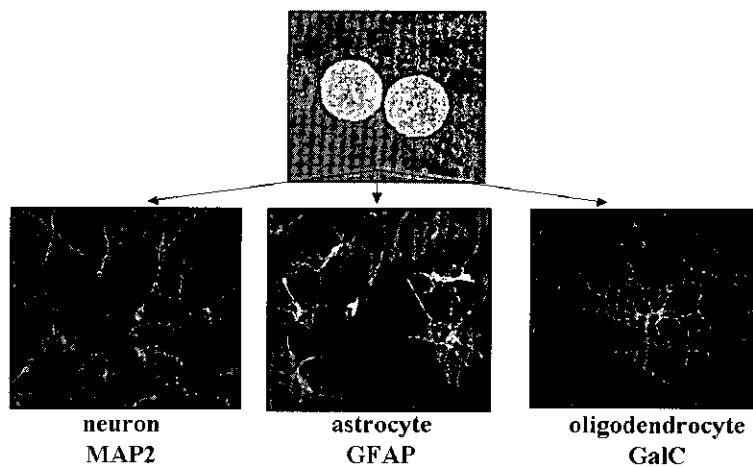


Fig. 3 Adult spinal cord-derived neural precursor cells have ability to differentiate into neuron, astrocyte, and oligodendrocyte

添加し、2日後に免疫染色を行った。

### C. 研究結果

アダルトラットの急性脊髄損傷モデルにおいては

損傷後12時間をピークとするBMP2 mRNAの発現増加を認めた (Fig. 1a)。BMP7 mRNAは損傷後4日をピークとする発現増加を認めた (Fig. 1b)。In situ hybridization において対照群でも

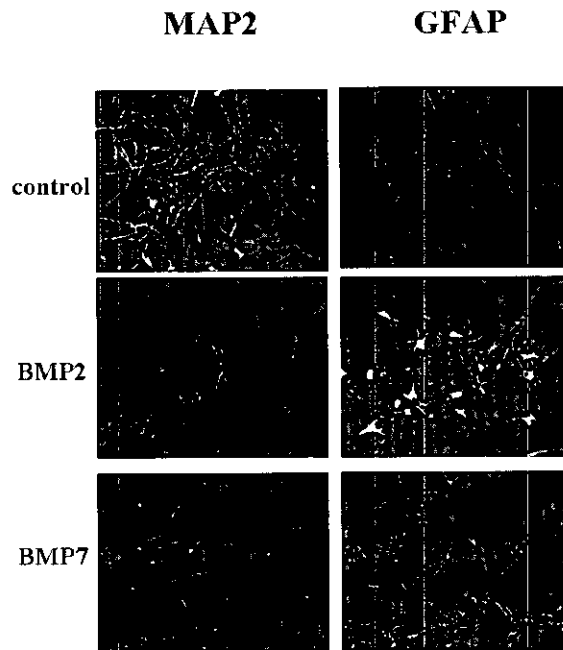


Fig. 4a BMPs alter adult precursor cell fate from neurogenesis to astrocytogenesis

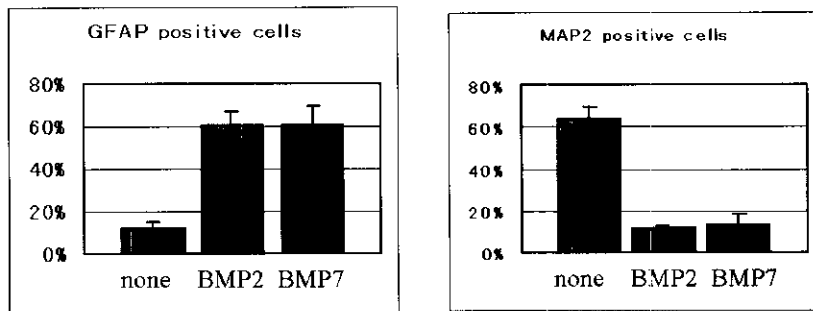


Fig. 4b BMPs alter adult precursor cell fate from neurogenesis to astrocytogenesis

oligodendrocyteでmRNA発現を認めたが、急性脊髄損傷後2日でBMP7 mRNA発現細胞が増加していた。さらにoligodendrocyteに加えてmotor neuronでも発現を認めるようになった(Fig. 2)。アダルトマウスの脊髄より単離した神経幹細胞と思われる細胞を分化誘導したところMAP2 positiveのneuron, GFAP positiveのastrocyte, Galc positiveのoligodendrocyteへと3種類の細胞へと分化しうる多分化能を持っていた(Fig. 3)。これら神経幹細胞は培養系でコントロール群では大部分の細胞がMAP2 positiveのneuronに分化するのにに対しBMP2を添加して2日培養するとneuronの分化が抑制されGFAPポジティブのastrocyteが分化誘導された。BMP7についても同様の結果が得られた(Fig. 4a, b)。

#### D. 考察

成体の脊髄中にも神経幹細胞は存在し脊髄損傷後に分裂増殖するがその大部分がastrocyteに分化することが報告されている<sup>5)</sup>。また成体中枢神経系に神経幹細胞を移植しても同様にastrocyteに優位に分化することが知られている<sup>6)</sup>。我々は脊髄損傷後にBMPsの発現が増加することを示した。またBMPがアダルトマウス由来の神経幹細胞のneuron分化を抑制しastrocyte分化を誘導することを示した。これらの結果より脊髄損傷後に生じるgliosisの形成にBMPsのシグナルが関与していることが示唆された。

#### E. 結論

BMPsのシグナルを制御し神経幹細胞のastrocyteへの分化を抑制することは中枢神経の機

能再生に有用であることが示唆された。

[参考文献]

- 1) Brittis, P. A. & Flanagan, J. G. Nogo domains and a Nogo receptor : implications for axon regeneration. *Neuron* 30, 11-4. (2001).
- 2) Setoguchi, T. et al. Traumatic injury-induced BMP7 expression in the adult rat spinal cord. *Brain Res* 921, 219-25. (2001).
- 3) Nakashima, K. et al. Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science* 284, 479-82. (1999).
- 4) Nakashima, K. et al. BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5868-73. (2001).
- 5) Johansson, C. B. et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96, 25-34. (1999).
- 6) Suhonen, J. O., Peterson, D. A., Ray, J. & Gage, F. H. Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* 383, 624-7. (1996).

F. 研究発表

1. 論文発表

Setoguchi T, Yone K, Matsuoka E,  
Takenouchi H, Nakashima K, Sakou T,  
Komiya S, Izumo S.

Traumatic injury-induced BMP7 expression in the adult rat spinal cord. *Brain Res*. 2001 Dec 7 ; 921(1-2) : 219-25.

2. 学会発表

4<sup>th</sup> Combined Meeting of The Orthopaedic Research Societies of The U.S.A., Canada, Europe, and Japan June 1-3, 2001  
ROHDES  
EXPRESSION OF BMP7 mRNA AFTER SPINAL CORD INJURY

第 16 回 日本整形外科学会基礎学術集会  
H13.10.18-19  
急性脊髄損傷後の BMP7, BMP2 mRNA 発現の  
変化

瀬戸口啓夫, 米 和徳, 永野 聡, 本部卓志,  
中島欽一, 出雲周二, 小宮節郎

第 74 回日本生化学大会 H13.10/25-28  
急性脊髄損傷による BMP2 および BMP7  
mRNA の発現量増加

瀬戸口啓夫, 米 和徳, 中原真二, 中島欽一,  
田賀哲也, 出雲周二, 小宮節郎

2001 CSRS Annual Meeting

November 29-31 2001

Increase in the BMPs mRNA Following  
Spinal Cord Injury and BMPs Change the  
Neural Precursor Cell Fate from  
Neurogenesis to Astrocytogenesis

Takao Setoguchi, MD, Kazunori Yone, MD,  
PhD, Kyoji Hayashi, MD, PhD, Shuji Izumo,  
MD, PhD, Kinichi Nakashima, PhD, Tetsuya  
Taga, PhD, Setsuro Komiya, MD, PhD  
(Kagoshima, Japan)

### III

## 骨 形 成 因 子

# 脊柱靱帯骨化症の成因における etidronate の影響と estrogen の関与

香取 勸 (東邦大学整形外科), 和田 明人 (東邦大学整形外科),  
武者 芳朗 (東邦大学整形外科), 岡島 行一 (東邦大学整形外科),  
岡田 弥生 (東邦大学免疫学)

## 【研究要旨】

我々は現在までに、OPLL 患者において、血清 estrogen の増加、estrogen 親和性の高い receptor の存在、免疫能の低下、estrogen 刺激による TGF- $\beta$ 、basic FGF 産生の増加などを明らかにしてきた。そこで我々は、etidronate が OPLL 患者由来の靱帯細胞にいかに関与を及ぼすか検討した。結果、etidronate 単体での刺激は TGF- $\beta$  および basic FGF 産生に影響をおよぼさなかったが、estrogen との同時刺激において OPLL 患者由来培養細胞では、TGF- $\beta$  および basic FGF 産生の若干の抑制効果がみられた。また、持続的高 estrogen 状態におかれた正常細胞に対する etidronate の影響が OPLL 患者由来細胞と異なる結果となったことから、etidronate の骨化抑制作用は、estrogen receptor の親和性に影響されることが考えられた。

## A. 研究目的

後縦靱帯骨化症 (以下 OPLL) を中心とした脊柱靱帯骨化症の成因としてこれまでに遺伝的素因、局所因子、全身性因子の関与が報告されている。我々は、免疫学教室の協力を得て、脊柱靱帯骨化症の成因について検討してきた。現在までに、OPLL 患者において、血清 estrogen の増加、estrogen 親和性の高い receptor の存在、リンパ球増殖能の低下、単核球反応性の低下、estrogen 刺激による TGF- $\beta$ 、basic FGF の増加などを明らかにした。

一方、etidronate はリン酸カルシウム結晶の形成を抑制すること、低容量で破骨細胞の活動抑制による骨吸収抑制作用が見られること、幼若ラットにおいて大量投与で高度の石灰化障害を来すこと、OPLL モデルラットにおいて脊柱靱帯での一連の石灰化、骨化過程の抑制が組織学的に証明されている。今回我々は、OPLL 患者由来の靱帯細胞が産生する TGF- $\beta$ 、basic FGF に対し、etidronate が単体でいかに影響を及ぼすか、また、estrogen による growth factor 産生増加に対し etidronate がいかに関与するか、検討を行った。

## B. 研究方法

### 1) etidronate 単体刺激での growth factor 産生変化の検討

対象は頸椎手術を行った混合あるいは連続型 OPLL 患者 5 例、男性 3 例、女性 2 例、平均年齢は 59.6 歳、コントロールとして非 OPLL 患者 6 例、男性 4 例、女性 2 例、平均年齢は 55.7 歳であった。

患者の同意のもと、頸椎手術時に黄色靱帯組織を

採取し、RPMI-1640 (Sigma Co. LTD) 培養液中で細切後、10% Fetal Bovine Serum (FBS, Summit Biotechnology Inc.) 添加 RPMI-1640 中に浮遊させ、培養を開始した。約 14 日後に増殖がみられた細胞を、Trypsin-EDTA 処理 (0.05% Trypsin, 0.53 mM EDTA, GIBCO Co. LTD) によって回収し、継代培養した。以下の検討には 3 代継代培養後の細胞を用いた。培養靱帯細胞を  $5 \times 10^5$  個/ml に調整し、24-well plate の well に 1 ml ずつ分注し 7 日間培養した。etidronate (住友製薬社製) は培養液で溶解し、 $10^{-8}$ M ~  $10^{-5}$ M の間の濃度で作成した。各濃度で etidronate 刺激後、6、12、18、24 時間後と 3、5、7 日後の培養上清を採取、ELISA 法 (Amersham 社製、TGF- $\beta$  1 human, ELISA system, R&D system 社製 Quantikine, human FGF basic ELISA kit) により TGF- $\beta$ 、basic FGF を測定した。測定はすべて二重測定で行い、Student の T 検定で p 値 0.01 未満を有意差ありとした。

### 2) estrogen による growth factor 産生増加に対する etidronate の影響の検討

次に、estrogen に対する etidronate の影響をみるために、混合あるいは連続型 OPLL 患者 5 例、男性 2 例女性 3 例、平均年齢 66.6 歳、コントロールとして、非 OPLL 患者 6 例を対象とし、患者の同意のもとに頸椎手術時に黄色靱帯組織を採取した。コントロール群の内訳は男性 2 例女性 3 例、平均年齢は 65.5 歳であった。

OPLL 群は 1) と同様に培養し、非 OPLL 群では、OPLL 患者の特徴である、高 estrogen 状態を実験的に再現するために、コントロール群の他に、培養液

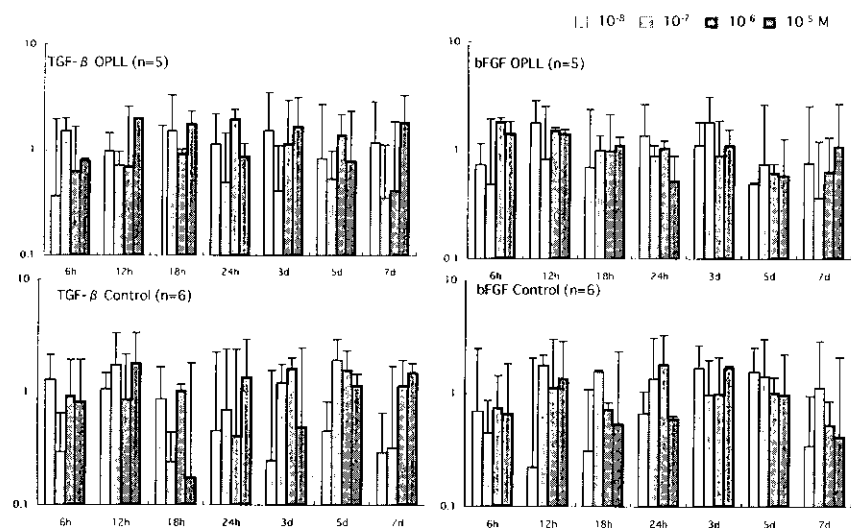


Fig. 1 etidronate 添加培養 Growth Factor 産生比

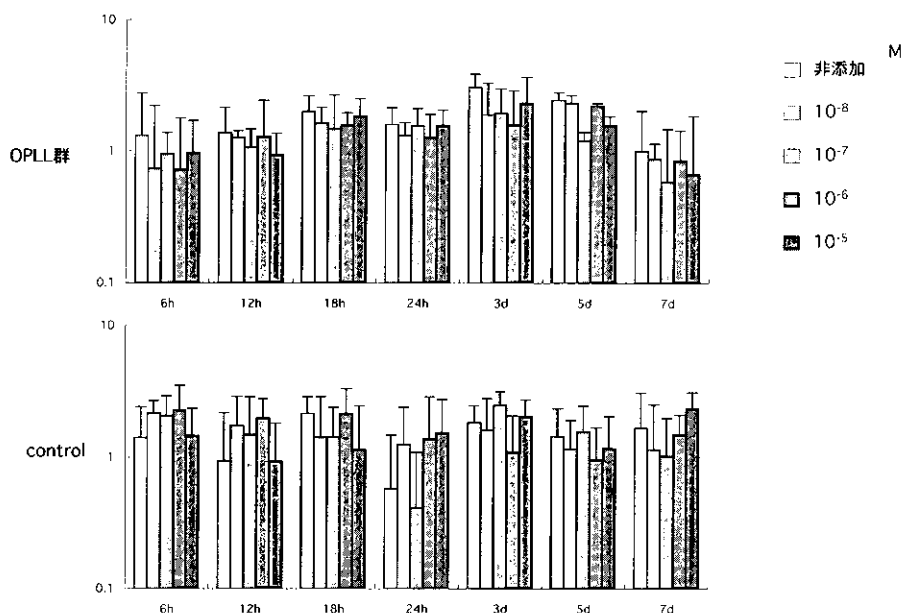


Fig. 2 estrogen 刺激による TGF-β 産生比上昇に対する etidronate の影響

中に 17 β estradiol を溶解した高 estrogen 群を作成した。三継代後、さらに 17 β estradiol を  $7.3 \times 10^{-8} \text{M}$  濃度で添加する estrogen 刺激と、上記の etidronate 刺激を 3 群に同時に行い、その後 6, 12, 18, 24 時間後と、3, 5, 7 日後の培養上清を採取、ELISA 法により TGF-β, basicFGF を測定した。測定はすべて二重測定で行った。今回は各培養時間に estrogen 添加で得られた値を、未添加で得られた値で除した値を、各 growth factor 産生比とした。

### C. 研究結果

1) etidronate 単体刺激での growth factor 産生変

#### 化の検討

各培養時間に etidronate 添加で得られた値を、未添加で得られた値で除した値を各 growth factor の産生比とし、グラフに示した。各培養時間、培養濃度において、TGF-β, basicFGF とともに、OPLL 群とコントロール群に有意な差は認められなかった。(Fig. 1)

2) estrogen による growth factor 産生増加に対する etidronate の影響の検討

etidronate 未添加での TGF-β の産生は、estrogen 刺激を行った際に、教室の馬目らが報告したとおり、3 ~ 5 日後をピークとする産生比増加を



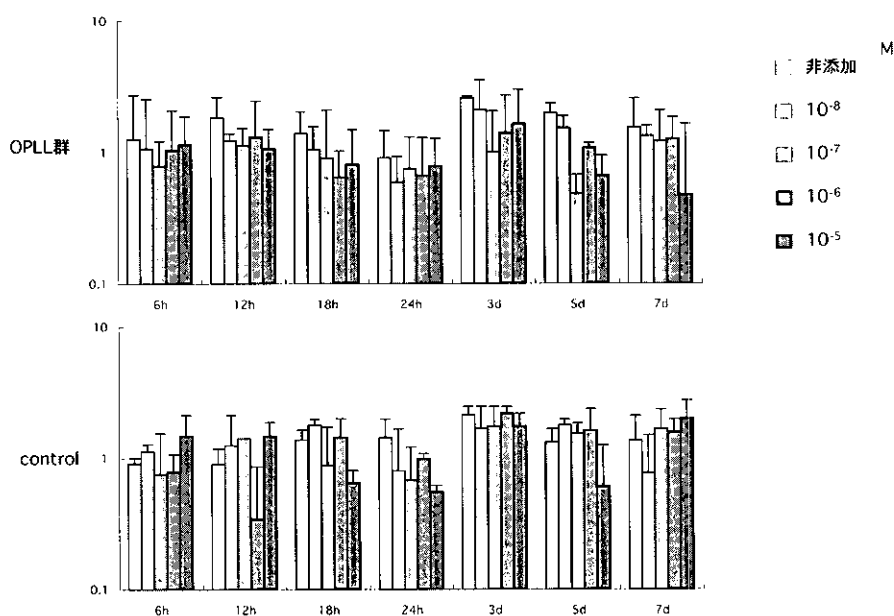


Fig. 3 estrogen 刺激による bFGF 産生比上昇に対する etidronate の影響

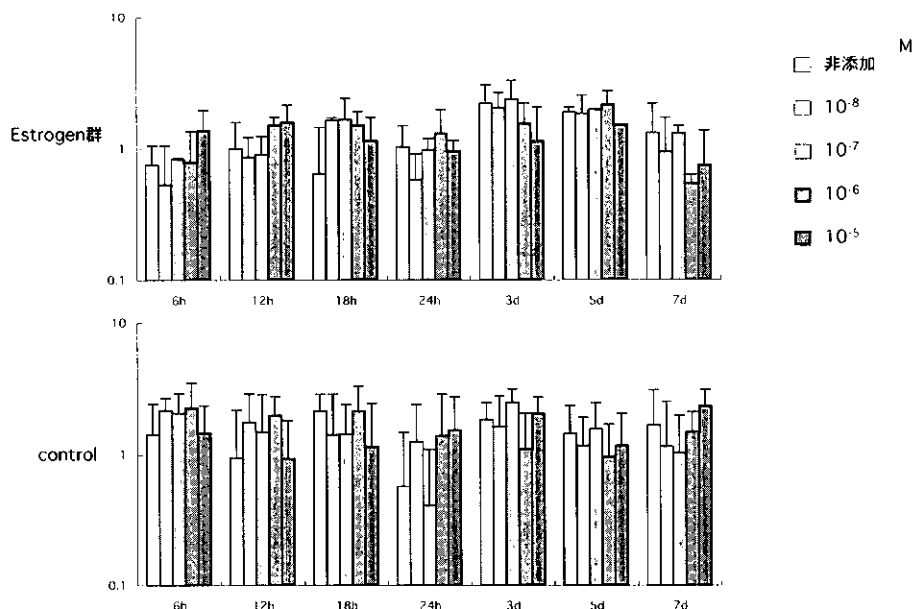


Fig. 4 持続的高 Estrogen 下培養細胞に対する etidronate の影響 (TGF-β)

認めた。また他に 12～18 時間にも一度ピークがあり、二峰性のピークを示した。一方、etidronate 刺激を行ったものではコントロール群に比し OPLL 群で産生が抑制される傾向があったが、各培養時間、各濃度間において有意差を認めなかった。(Fig. 2)

一方、basicFGF 産生比も etidronate 非添加では 12～18 時間および、3～5 日後を頂点とする、二峰性の産生比の増加を認めた。OPLL 群では etidronate 刺激により若干の抑制を認めたと、コン

トロール群に比して有意差はなかった。(Fig. 3)

次に非 OPLL 患者由来細胞に、17β estradiol を負荷した高 estrogen 群に対する etidronate の作用をみると、TGF-β の産生は、コントロール群と同様、各濃度、各培養時間に有意な差は認められなかった。(Fig. 4)

また、basicFGF も、コントロール群と同様に、高 estrogen 群の産生動態には変化は認められなかった。(Fig. 5)

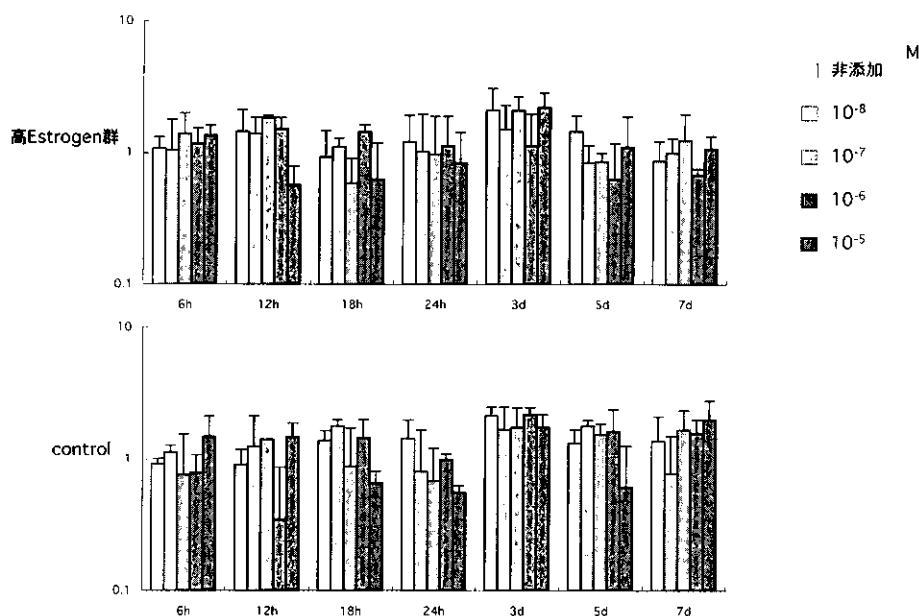


Fig. 5 持続的高 Estrogen 下培養細胞に対する etidronate の影響 (bFGF)

#### D. 考察

etidronate の異所性骨化抑制作用の機序については、リン酸カルシウム結晶の形成を抑制し、その凝集を遅延させるという化学的作用による骨化抑制にくわえ、Khokher らは *in vitro* のヒト骨芽細胞において、アルカリフォスファターゼ活性や、細胞増殖が抑制されたと報告し、近年では Fleisch が軟骨細胞および骨構成細胞の成長や分化を抑制する、いわゆる cellular effect という見解を示した。etidronate の cellular effect の一つとして estrogen による receptor を介した骨化作用を抑制するのではないかと考え、実験を行った。

etidronate 単体刺激では TGF- $\beta$ , basicFGF 産生に変化は認められなかったが、estrogen 刺激によって引き起こされる growth factor の産生能上昇に対して、etidronate 添加により抑制傾向を認めた。また、高 estrogen 状態に置かれた正常培養細胞は OPLL 患者由来培養細胞と同様に etidronate 刺激の影響が発現すると推測していたが、今回の結果では有意な差はなかった。

以上の結果は、estrogen による骨化促進機序に etidronate が何らかの影響を与えることを示唆しているが、今回、高 estrogen 群で有意差を認めなかった原因として、高 estrogen 状態のままの継代が十分でなかった、また負荷濃度が適正ではなかった、負荷時間が十分でなかった、receptor の親和性が高まっていなかったなどの可能性が考えられた。

#### E. 結論

OPLL 患者由来の培養靭帯細胞を用いて、estrogen および etidronate が靭帯骨化に及ぼす影響を検討した。etidronate 刺激のみでは TGF- $\beta$ , basicFGF 産生に変化は認められなかった。OPLL 患者由来の培養細胞では、estrogen 刺激による TGF- $\beta$ , basicFGF の産生増加は etidronate によって抑制される傾向が認められた。対照群患者の細胞を、持続的高 estrogen 状態で培養し etidronate 刺激を行っても、TGF- $\beta$ , basicFGF の産生に変化は認められなかった。etidronate の骨化抑制作用には、estrogen 受容体の何らかの関与が示唆された。

#### [参考文献]

- 1) 茂手木三男, 武者芳朗, 森須正孝ほか: 脊柱靭帯骨化の成因—食品摂取傾向と性ホルモン—. 整形外科 44: 1017-1026, 1993
- 2) 武者芳朗, 森須正孝, 和田明人ほか: 脊柱靭帯骨化の成因—血清性ホルモンを中心に—. 脊椎脊髄 6: 787-794, 1993
- 3) 和田明人: 脊柱靭帯骨化症の培養靭帯細胞におけるエストロゲン親和性. 日整会誌 69: 440-449, 1995
- 4) 馬目晃匡: 脊柱靭帯骨化の成因に関する免疫学的検討—骨化発生に関するエストロゲンの役割について—. 脊椎外科学会誌 7: 348-355, 1996
- 5) 根本敏成, 三浦幸雄, 今給黎篤弘ほか: 股関節形成術後の異所性骨化における EHDP の臨床効

果の検討. 関東整災誌28 : 368-373, 1997

- 6) Fleish HA et al : Disphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and in vivo. Science 165 : 1262-1264, 1969
- 7) Gasser AB et al : The influence of two disphosphonate on calcium metabolism in the rat. Clin Sci43 : 31-45, 1972
- 8) 塩田悦二ほか:Disphosphonateによる骨, 軟骨石灰化障害及び骨吸収障害に関する実験的研究. 整外と災外30 : 175-179, 1981
- 9) 山本謙吾, 河合 清, 三浦幸雄 : Zucker fatty rat の実験的OPLLに対するEHDPの効果. 整形災害外科40 : 803-813, 1997
- 10) Fleish HA : Bisphosphonates : Mechanisms of Action. Endocrine Reviews 19 : 80-100, 1998
- 11) Gregory G et al : Bisphosphonates Directly Regulate Cell Proliferation, Differentiation, and Gene Expression in Human Osteoblasts
- 12) Khokher MA et al : Diphosphonates Inhibit Human Osteoblast Secretion and Proliferation

#### F. 研究発表

未

#### G. 知的所有権の取得状況

無

# RB 遺伝子と p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の発現による骨肉腫細胞株 Saos-2 での E2F-1 の発現変化

大川 恵三 (弘前大学医学部生化学第二), 神 裕道 (弘前大学医学部整形外科),  
佐藤 衛 (弘前大学医学部生化学第二), 土田 成紀 (弘前大学医学部生化学第二)

## 【研究要旨】

cyclin-dependent kinases (CDK) はがん抑制遺伝子産物 RB をリン酸化することにより、転写因子 E2F-1 を RB から遊離させ、E2F-1 は細胞増殖に働く多くの遺伝子の発現を促進する。CDK を阻害する p21<sup>Cip1</sup> は、RB のリン酸化を抑制することにより E2F-1 の活性化を抑え、細胞増殖を抑制する。これまで、我々は RB と p53 遺伝子に変異をもつヒト骨肉腫細胞株 Saos-2 に、RB 遺伝子を発現させると、細胞増殖は停止し、I 型コラーゲンの発現が増加するのに対し、p21<sup>Cip1</sup> の発現では細胞増殖は停止するが、I 型コラーゲンは低下することを明らかにした。RB と p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子による細胞増殖の抑制機構を解明するため、RB と p21<sup>Cip1</sup> による E2F-1 の発現と活性変化を検討した。RB の発現により、E2F-1 のタンパク量と転写活性は低下したのに対し、p21<sup>Cip1</sup> の発現では E2F-1 タンパク量と活性は上昇した。野性型の RB 遺伝子を持つ骨肉腫細胞株 U2-OS では、p21<sup>Cip1</sup> の発現により E2F-1 タンパク量と活性は低下した。これらの結果から、p21<sup>Cip1</sup> による E2F-1 の転写活性の制御は RB の有無により異なり、p21<sup>Cip1</sup> は RB を介さない経路で E2F-1 タンパク量を上昇させると考えられた。

## A. 研究目的

骨形成に中心的役割を果たす骨芽細胞は、軟骨細胞や筋細胞などとともに未分化間葉系幹細胞から分化し、多くの段階を経て骨細胞に変化する<sup>1,2)</sup>。近年、骨芽細胞への分化を誘導する転写因子として core binding factor  $\alpha$  1 (CBFA1) が同定されたが<sup>3,4)</sup>、その他の転写因子の役割は明らかではない。

一般に、細胞の分化には分化に関連した遺伝子の発現のみならず、細胞増殖の抑制を必要とする<sup>5)</sup>。細胞増殖は主に細胞周期の G1 から S 期のレベルで制御され、サイクリン D に依存する cyclin-dependent kinase (CDK) 4 及びサイクリン E とサイクリン A に依存する CDK2 の 2 種類のキナーゼが、がん抑制遺伝子産物 RB をリン酸化することにより、転写因子 E2F-1 を RB から遊離させ、活性化する<sup>6)</sup>。遊離の E2F-1 は、S 期に働く多くの遺伝子の発現を促進する。一方、CDK 活性はいろいろな CDK inhibitors (CDI) により抑制的な制御を受けている<sup>7)</sup>。CDI の 1 つ、p21<sup>Cip1</sup> はがん抑制遺伝子産物 p53 により発現誘導され、CDK4 と CDK2 の活性を阻害し、RB のリン酸化の抑制を介して、E2F-1 の活性化を抑え、細胞増殖を停止させる<sup>8)</sup>。

これまで我々は、テトラサイクリン (TC) により発現を調節できる遺伝子発現ベクターを用いて、RB と p53 遺伝子に変異をもつ骨肉腫細胞株 Saos-2 に RB 遺伝子を発現させると、細胞増殖が G1 期で停止し、細胞形態が変化し、I 型コラーゲンやアルカリ

性フォスファターゼの発現が増加するなど分化が誘導されることを明らかにした<sup>9)</sup>。一方、p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子を発現させると、細胞増殖は G1 期と G2/M 期で停止し、I 型コラーゲンの発現は低下し、オステオポンチンの発現が増加するなど、RB 遺伝子を発現させた場合とは異なる挙動を示した<sup>10)</sup>。

従って、p21<sup>Cip1</sup> は RB を介さずにこれらの変化をおこすことが示唆されるが、p21<sup>Cip1</sup> が E2F-1 の活性に影響を与えるかは明らかでない。本研究では、RB と p21<sup>Cip1</sup> 遺伝子の間で Saos-2 細胞での E2F-1 の発現変化と E2F-1 により発現制御を受ける B-Myb 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 遺伝子やチミジル酸合成酵素 (TS) 遺伝子の発現変化を比較し、p21<sup>Cip1</sup> が E2F-1 のタンパク量とその活性を増加させ、RB の作用と異なることを明らかにした<sup>11)</sup>。

## B. 研究方法

### 1. RB と p21 発現プラスミドの作製

RB あるいは p21cDNA を TC で発現調節できるベクターにネオマイシン耐性遺伝子とともに挿入し、発現プラスミドを作製した。

### 2. 細胞培養と発現プラスミドのヒト骨肉腫細胞株への導入

RB 遺伝子が不活化しているヒト骨肉腫細胞株 Saos-2 と、RB と p53 遺伝子は野性型で、p16 遺伝子を欠損する U2-OS 細胞株の 2 種類の細胞株に発現プラスミドを導入した。テトラサイ

クリントランスアクティベーター(tTA)遺伝子とハイグロマイシンB耐性遺伝子を含むプラスミドを導入した細胞をハイグロマイシンで選別後、RBなどの発現プラスミドをリポフェクトアミンを用いて導入した。これらの細胞をハイグロマイシンとネオマイシンで選別し、クローンを得た。これらのクローンをハイグロマイシン、ネオマイシンとTCを含む培地で培養して維持し、RBなどの遺伝子の発現は、培地からTCを除いて行った。

### 3. ウェスタンブロット

細胞を0.1% NP-40を含む緩衝液で破碎後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりタンパク質を分離し、タンパク質をニトロセルロース膜にトランスファーし、それぞれの抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

### 4. ノーザンブロット

細胞から抽出したトータルRNAを電気泳動で分離後、ニトロセルロース膜にトランスファーし、<sup>32</sup>PでラベルしたcDNAプローブを用いてノーザンブロットを行った。

### 5. 細胞周期の解析

細胞を70%エタノールで固定し、RNaseで処理後、propidium iodideで染色し、FACScan (Becton-Dickinson社製)で細胞周期を解析した。

## C. 研究結果とD. 考察

### 1. RBによるE2F-1の発現低下とE2F-1応答遺伝子の発現低下

RBcDNAを導入したSaos-2細胞株のクローンでは、培地からTCを除去後24時間と48時間で、RBの発現に伴い、細胞周期はG1期で停止し、E2F-1のタンパク量とmRNA量は著しく低下した。さらに、E2Fで発現が制御される遺伝子、B-Myb遺伝子、DHFR遺伝子、TS遺伝子の発現をノーザンブロットで調べた結果、これらの遺伝子の発現も低下した。これらの結果から、RBはE2F-1のタンパクレベルとその活性を低下させることが明らかとなった。

### 2. p21<sup>Cip1</sup>によるE2F-1タンパク量の上昇とE2F-1応答遺伝子の発現増加

p21<sup>Cip1</sup> cDNAを導入したSaos-2細胞株のクローンでは、p21<sup>Cip1</sup>の発現に伴い、細胞周期はG1期とG2/M期で停止したが、E2F-1タンパク量は増加し、B-Myb mRNA量とDHFR mRNA

量も増加した。しかし、E2F-1 mRNAの上昇は少なかった。

### 3. 野性型のRB遺伝子を持つ細胞株でのp21<sup>Cip1</sup>によるE2F-1の発現変化とE2F-1応答遺伝子の発現変化

p21<sup>Cip1</sup>は、RBが存在する場合、E2F-1の発現に異なる影響を与える可能性を考え、野性型のRB遺伝子を持つヒト骨肉腫細胞株U2-OSに、p21<sup>Cip1</sup>の発現プラスミドを導入して得たクローンで、E2F-1の発現変化を調べた。

TC除去後48時間で、p21<sup>Cip1</sup>の発現に伴い、細胞周期はG1期とG2/M期で停止し、E2F-1のタンパク量とmRNA量は著しく低下した。抗RB抗体によるウェスタンブロットの結果から、p21<sup>Cip1</sup>の発現により内因性のRBタンパク量は著しく低下し、かつリン酸化されていないRBタンパク質が主となることが示唆された。p21<sup>Cip1</sup>によるE2F-1のタンパク量の低下に一致してB-Myb mRNA、DHFR mRNAとTS mRNAレベルも低下した。

これらの結果から、p21<sup>Cip1</sup>によるE2F-1の制御はRBの有無により異なり、RBが存在しない場合、p21<sup>Cip1</sup>はE2F-1の活性を上昇させることが注目された。E2F-1はp21<sup>Cip1</sup>遺伝子の転写を促すことが知られているが<sup>12)</sup>、p21<sup>Cip1</sup>がどのような機序でE2F-1のタンパク量と活性を上昇させるのかは明らかでない。

p21<sup>Cip1</sup>はCDK2やCDK4を阻害することによりRBを介してE2F-1活性を抑制するほか、RBを介さずにE2F-1を抑制することが報告されている<sup>13)</sup>。今回の我々の結果は、RB遺伝子を欠くSaos-2細胞ではp21<sup>Cip1</sup>の発現によりE2F-1タンパク量が増加し、E2F-1の転写活性も上昇することから新しい知見と考えられた。この細胞では、p21<sup>Cip1</sup>の発現により細胞増殖はG1期とG2/M期で停止することから、E2F-1の増加は細胞増殖を反映したものとは考え難い。p21<sup>Cip1</sup>はCDKを阻害するほか、細胞周期に依存せずに、proliferating-cell nuclear antigen (PCNA)の活性を抑えて細胞増殖を抑制することが知られている<sup>14)</sup>。Saos-2細胞でのp21<sup>Cip1</sup>による細胞増殖の抑制には、E2F-1ではなくPCNAなどの関与が示唆される。

p21<sup>Cip1</sup>は増殖に係わる遺伝子の発現を抑制するほか、フィブロネクチンなど細胞外マトリックスを構成するタンパク質をコードする遺伝子の発現を促進することが知られている<sup>15)</sup>。オステオポンチンは

細胞外マトリックスを構成するタンパク質の1つであり, p21<sup>Cip1</sup> 発現細胞でオステオポンチンの発現が明らかにされている<sup>10)</sup>。

## E. 結論

RB 遺伝子と p53 遺伝子が不活化しているヒト骨肉腫細胞株 Saos-2 に, TC により発現調節できる遺伝子発現ベクターを用いて RBcDNA と p21<sup>Cip1</sup> cDNA を導入した。RB の発現に伴い, E2F-1 のタンパク量と転写活性は低下した。一方, p21<sup>Cip1</sup> の発現により E2F-1 のタンパク量と活性は上昇した。野性型の RB 遺伝子を持つ骨肉腫細胞株 U2-OS では, p21<sup>Cip1</sup> の発現により E2F-1 のタンパク量と活性は低下した。これらの結果から, p21<sup>Cip1</sup> による E2F-1 の転写活性制御は RB の有無により異なることが示唆された。

### [参考文献]

1. Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R : Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* 80 : 371-378, 1995.
2. Aubin JE, Liu F : The osteoblast lineage. In *Principles of Bone Biology* (JP Bilezikian, LG Raisz, GA Rodan Eds.) pp. 51-67, 1996, Academic Press, San Diego.
3. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T : Targeted disruption of *cbfa 1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89 : 755-764, 1997.
4. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G : *Osf/Cbfa1* : a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89 : 747-754, 1997.
5. Casaccia-Bonofil P, Tikoo R, Kiyokawa H, Friedrich V Jr, Chao MV, Koff A : Oligodendrocyte precursor differentiation is perturbed in the absence of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *Genes Dev.* 11 : 2335-2346, 1997.
6. Nevins JR, Leone G, DeGregori J, Jakoi L : Role of the Rb/E2F pathway in cell growth control. *J. Cell. Physiol.* 173 : 233-236, 1997.
7. Sherr C, Roberts JM : Positive and negative regulation by CDK inhibitors. *Genes Dev.* 13 : 1501-1512, 1999.
8. Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P : Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82 : 675-684, 1995.
9. Ookawa K, Tsuchida S, Adachi J, Yokota J : Differentiation induced by RB expression and apoptosis induced by p53 expression in an osteosarcoma cell line. *Oncogene* 14 : 1389-1396, 1997.
10. 神 裕道, 原田征行, 植山和正, 大川恵三, 早狩 誠, 横田 淳, 土田成紀 : RB 遺伝子と p21WAF1/CIP1 遺伝子の発現による骨肉腫細胞株での分化の誘導 : 骨芽細胞の分化における同遺伝子の役割. 厚生省特定疾患骨・関節系疾患調査研究班, 平成 10 年度研究報告書 pp.17-21, 1999.
11. Ookawa K, Tsuchida S, Kohno T, Yokota J : Alterations in expression of E2F-1 and E2F-responsive genes by RB, p.53 and p21Sdi1/WAF1/CIP1 expression. *FEBS Lett.* 500 : 25-30, 2001.
12. Gartel AL, Najmabadi F, Goufman E, Tyner AL : A role for E2F1 in Ras activation of p21WAF1/CIP1 transcription. *Oncogene* 19 : 961-964, 2000.
13. Dimri GP, Nakanishi M, Desprez PY, Smith, JR, Campisi J : Inhibition of E2F activity by the cyclin-dependent protein kinase inhibitor p21 in cells expressing or lacking a functional retinoblastoma protein. *Mol. Cell. Biol.* 16 : 2987-2997, 1996.
14. Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B : The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369 : 574-578, 1994.
15. Chang BD, Watanabe K, Broude EV, Fang J, Poole JC, Kalinichenko TV, Roninson IB : Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression : implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 4291-4296, 2000.

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Takumi Y, Matsubara A, Tsuchida S, Ottersen OP, Shinkawa H, Usami S : Various glutathione S-transferase isoforms in the rat cochlea. *Neuroreport* 12(7), 1513-1516, 2001.

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.* 92(6), 649-658, 2001.

Umemoto M, Yokoyama Y, Sato S, Tsuchida S, Al-Mulla F, Saito Y : Carbonyl reductase as a significant predictor of survival and lymph node metastasis in epithelial ovarian cancer. *Br. J. Cancer* 85(7), 1032-1036, 2001.

Ookawa K, Tsuchida S, Kohno T, Yokota J : Alterations in expression of E2F-1 and E2F-responsive genes by RB, p53 and p21Sdi1/WAF1/Cip1 expression. *FEBS Lett.* 500(1/2), 25-30, 2001.

Satoh K, Hayakari M, Ookawa K, Satou M, Aizawa S, Tanaka M, Hatayama I, Tsuchida S, Uchida K : Lipid peroxidation end products-responded induction of a preneoplastic marker enzyme glutathione S-transferase P-form (GST-P) in rat liver on administration via the portal vein. *Mutation Res.* 483(1), 65-72, 2001.

Satoh K, Itoh K, Yamamoto M, Tanaka M, Hayakari M, Ookawa K, Yamazaki T, Sato T, Tsuchida S, Hatayama I : Nrf2 transactivator-independent GSTP1-1 expression in 'GSTP1-1 positive' single cells inducible in female mouse liver by DEN : a preneoplastic character of possible initiated cells. *Carcinogenesis* 23(3), 457-462, 2002.

Imaizumi T, Aratani S, Nakajima T, Carlson

M, Matsumiya T, Tanji K, Ookawa K, Yoshida H, Tsuchida S, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, Satoh K : Retinoic acid-inducible gene-I is induced in endothelial cells by LPS and regulates expression of COX-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292(1), 274-279, 2002.

## G. 知的所有権の取得状況

なし

# 骨の力学的刺激に対する応答のシグナリング

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

KEYWORDS=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は、骨形成の能力のある細胞、例えば骨髄由来未分化細胞、骨芽細胞、骨細胞、株化骨芽細胞などを比較すると、力学的刺激に対する応答が、刺激の種類により、細胞により、分化段階により明らかに異なることを示す。今回、歯周組織より培養した細胞について検討したところ、骨芽細胞と歯周リガメント細胞（歯根膜細胞）では伸展刺激による骨形成促進作用に顕著な違いがあった。リガメント細胞は伸展刺激に対して増殖応答を示すことはなく、24%の周期的伸展という過酷な条件下で6%、18%よりも分化が促進されることが明らかになった。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。

## A. 研究目的

歯周リガメント（歯根膜）細胞及び骨芽細胞が、分化に伴って力学的刺激に対する応答を変化させる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

検体は神奈川歯科大学附属病院に来院した患者より、歯科矯正治療ないし歯槽骨整形の目的で抜去された第一小臼歯ないし歯槽骨骨片を得た。研究目的の説明ならびに同意取得は、大学の基準に基づいて行われた。既に報告した方法にて外生法で調整したヒト骨芽細胞とヒト歯周リガメント細胞を用い、細胞分化が細胞に及ぼす影響を検討した。それぞれを約5代目まで培養し回収、 $2 \times 10^4$  M/cm<sup>2</sup> でコラーゲンコートされたFlex I皿に播種し、10nMデキサメサゾン (Dex) を含んだ培養液で1週間ないし2週間培養した。細胞は、指定された伸展率で24時間の間、10秒間ずつ伸展、解除を繰り返して伸展刺激した。細胞を回収後、ALP（アルカリフォスファターゼ）アッセイ、DNA測定全RNA抽出等、用途に応じて処理した。mRNAの発現は、全RNAを用いてRT-PCR法により骨タンパク mRNA レベルを測定した。

## C. 研究結果

### 1) 骨芽細胞と歯周リガメント細胞の ALP 活性における応答の違い

伸展刺激の強さを変えて、それぞれの細胞の応答を増殖 [図1] と ALP 活性 [図2] について

比較した。血清除去培地に移して伸展した場合の増殖は、図1に示すとおりヒト骨芽細胞では、伸展しない場合に比して1.3(6%)、1.3(18%)、1.2倍(24%)、それぞれ有意に増加していた。ヒト歯周リガメント細胞の場合は増殖応答はなく、24%ではむしろ有意に増殖が抑制された( $\times 0.76$ )。一方同時に細胞表面のALP活性を測定すると、リガメント細胞では当初のDNA当りの活性が骨芽細胞の約半分であったが、伸展により24時間で顕著に増加し、その強さは伸展の強いほど高かった[図2]。24%では1.76倍増加し、本来の骨芽細胞の値に近かった。骨芽細胞における増加は緩やかで、6%で1.13倍、最大値を示す18%でも1.16倍と、有意ではあるが僅差であった。更に24%ではむしろ抑制され、本来の値の $\times 0.9$ であった。

### 2) 分化に伴う応答の変化

骨芽細胞とリガメント細胞における伸展刺激応答を、それぞれについてALP活性の異なる出発材料と比較すると、骨芽細胞では成熟(ALP活性の上昇)に伴ってALP活性増大応答が出現するが、増殖は初期の細胞でも促進された。一方リガメント細胞では、増殖は初期にのみ促進され得るが、ALP活性増大の応答は初期でも成熟期でも明らかであった[図3]。

### 3) 両細胞の典型的な骨の遺伝子群における伸展刺激の影響

両者においてALP活性が増強された18%の条件で、経時的な変化を観察する目的で、12時間伸展、12時間無刺激の継続的な伸展スケ



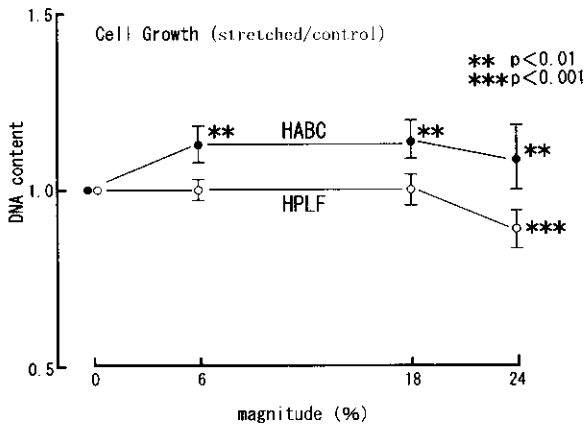


図1 伸展刺激の増殖に対する影響

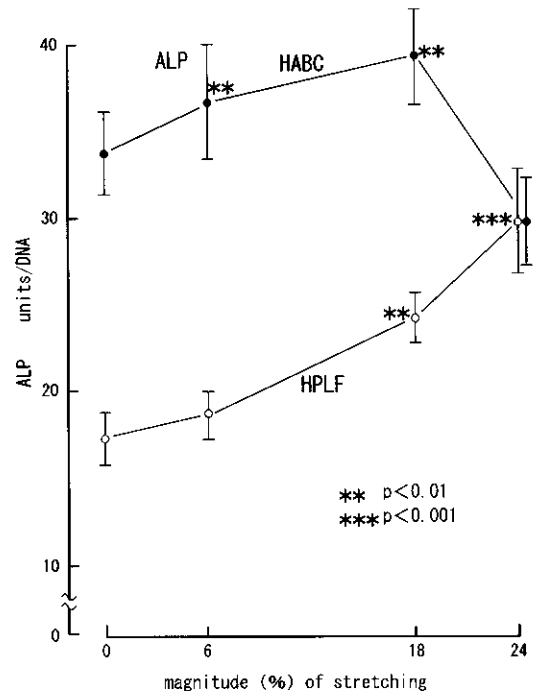


図2 伸展刺激のALP活性に対する影響

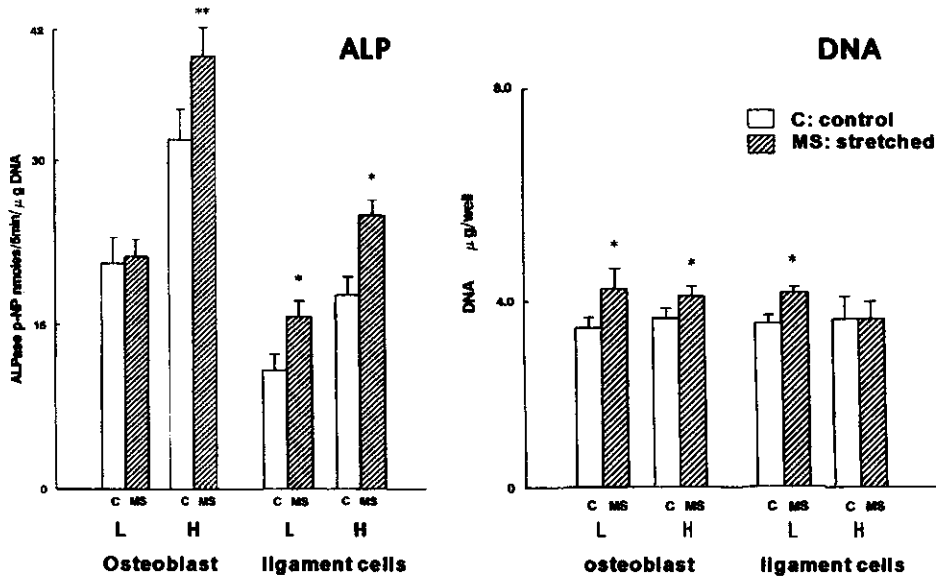


図3 分化段階による伸展刺激応答の変化

ジュールで培養を行った。c-fos, cox-2などのいわゆる immediate-early の伸展直後の応答や BMP の変化はどちらの細胞も同様であった。それ以外のオステオカルシン、オステオポンチン等骨基質タンパクやALPなどのmRNAは、照射開始後3日間でいずれも上昇したが、ALPの増加はリガメント細胞でのみ顕著、オステオポンチンの増加は逆に骨芽細胞で顕著であった [投稿中]。

#### D. 考察

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。骨形成系細胞はいずれも伸展刺激の標的細胞であるが、それぞれの刺激受容の閾値及び結果として起こる骨形成作用は異なり、更にそれぞれが細胞の分化に依存して特有の応答をもたらす。

## E. 結論

同一の lineage の細胞でも、わずかな分化段階の差に伴って力学的刺激に対して全く異なった応答を示す。

## F. 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—, 日本骨形態計測学会雑誌 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, 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. 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.

## G. 知的所有権の所得状況

4. 特許取得 なし
5. 実用新案登録 なし
6. その他 なし

# 骨格成長と骨折治癒過程におけるCTGF/Hcs24の遺伝子発現

滝川 正春 (岡山大学大学院医歯学総合研究科, 口腔生化・分子歯科学),  
中西 徹 (岡山大学大学院医歯学総合研究科, 口腔生化・分子歯科学),  
西田 崇 (岡山大学大学院医歯学総合研究科, 口腔生化・分子歯科学),  
縄稚久美子 (岡山大学大学院医歯学総合研究科, 口腔生化・分子歯科学),  
中田 英二 (岡山大学大学院医歯学総合研究科, 整形外科)

## 【研究要旨】

肥大軟骨細胞由来の成長因子CTGF/Hcs24のマウス胎生期における発現は二相性で、胎生7日の初期に高く、胎生10日で一旦低下した後、胎生15日—17日で再び増強することが明らかとなった。また、後者の発現は肥大軟骨細胞肥大軟骨細胞の出現と関連していた。マウス骨折モデルを用いた骨折治癒過程におけるCTGF/Hcs24のmRNAの発現は骨折8—14日後の再生組織の肥大軟骨細胞と増殖軟骨細胞に強く、骨折2—8日後の骨折部近辺の増殖しつつある骨膜細胞と、骨折8日後の仮骨の周辺の繊維組織中の細胞に見られた。また、CTGF/Hcs24タンパクは骨折8—14日後の再生軟骨の肥大軟骨細胞と増殖軟骨細胞に局在していることが判明した。また、骨折8—14日後の増殖しつつあり、また、分化しつつある細胞に多くみられ、骨を形成する細胞へと分化すると減少した。マウスでは多くの内軟骨性骨化が始まるのは胎生13日であることから、後期の遺伝子発現は内軟骨性骨化と関連するものと考えられるが、初期の遺伝子発現の亢進は幼若細胞の分化と関連するものと考えられる。

## A. 研究目的

我々は、ヒト軟骨細胞様細胞株HCS-2/8から肥大軟骨細胞に高発現する遺伝子 hcs24 をクローニングしたが、その遺伝子産物は結合組織成長因子 (CTGF) をコードする遺伝子であることが判明した<sup>1,2)</sup>。CTGF/Hcs24はCCNファミリーという、一群の4つの特徴的なドメイン構造を有するシステインに富むタンパク質の一つで最近注目を浴びている新しい成長因子である<sup>2)</sup>。筆者らはこの遺伝子産物CTGF/Hcs24の組み換え体タンパク質を調整し、内軟骨性骨化に関与する、軟骨細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞の三種の細胞の増殖と分化をin vitroで促進し、また、in vivoでは血管新生を促進することも明らかにした<sup>3-6)</sup>。さらに、昨年度は、このCTGF/Hcs24が成長軟骨細胞や骨芽細胞の石灰化を促進することを明らかにし、OPLLとの関連を示唆した。

本研究では、CTGF/Hcs24の生理的、病理的役割を解明するため、骨格成長過程と骨折治癒過程におけるCTGF/Hcs24の遺伝子発現について検討した。

## B. 研究方法

### 1. 実験動物

骨格成長におけるCTGF/Hcs24の役割を調

べるには、胎生10, 15, 17日齢および生後1日齢のC57BL/6マウスを用いた。また、転写因子cbfa1ノックアウトマウスおよびこれと正常C57BL/6マウスと交配したものを使用した。

マウス肋骨骨折モデルの作製は、5週齢雄ICRマウスの右第八肋骨をはさみで肋骨の軸に垂直に骨折を起こした。対照にはSham operationを施した。

### 2. ノーザンブロット

マウス胎生期のpre-blotハイブリダイゼーション膜を使用した。プローブにはマウスctgfの非コード領域を用い、通法にしたがってハイブリダイズした。

### 3. In situ hybridization

プローブとしては、ジゴキシゲニン標識をしたアンチセンスプローブを用い、whole mount In situ ハイブリダイゼーションと組織切片を用いたIn situ hybridizationを行った。

### 4. 免疫染色

c-末側の20アミノ酸からなるペプチド断片をウサギに免疫して調製した抗体を用いて通法に従って行った。

## C. 研究成果

### 1. 骨格成長におけるCTGF/Hcs24の発現と

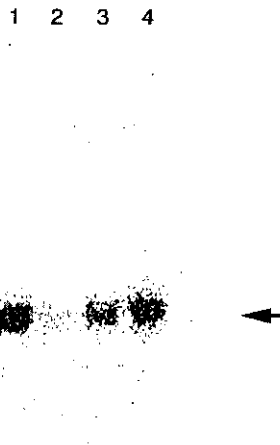


Figure 1 Expression of CTGF/Hcs24 during the development of the mouse embryo was analyzed by using an MTN blot membrane. Each lane contained about 2 mg of mRNA. Seven day (lane 1), 11-day (lane 2), 15-day (lane 3) 17-day (lane 4) were examined. The arrow indicates hybridized m RNA of mouse CTGF/Hcs24.

Table 1 Gene expression of CTGF and collagen type X during late development of hard tissues both in normal and *Cbfa1* targeted mutant mice

name of genes	organs	age							
		E13		E15		E17		PO	
		wt	<i>cbfa1</i> -/-	wt	<i>cbfa1</i> -/-	wt	<i>cbfa1</i> -/-	wt	<i>cbfa1</i> -/-
<i>c</i>	femur	±~	-	+	-	+	-	+	-
	phalanges	±~	-	+	-	+	-	+	-
<i>t</i>	radius	±~	-	+	-	+	-	+	-
<i>g</i>	ribs	-	-	+	-	+	-	+	-
<i>f</i>	vertebrae	-	-	+	-	+	-	+	-
	temporal b.	-	-	±	-	+	-	+	-
	hyoid b.	±~	-	+	-	+	-	+	-
<i>α</i>	femur	-	-	±	-	++	±~	++	±~
	phalanges	-	-	+	-	++	-	++	-
<i>I</i>	radius	-	-	±	-	++	±~	++	+
(X)	ribs	-	-	±	-	+	-	+	-
	vertebrae	-	-	±	-	+	-	++	-
	temporal b.	-	-	±	-	+	-	+	-
	hyoid b.	-	-	±	-	++	-	++	-

#### cbfa1による制御

マウス胎生期の pre-blot ハイブリダイゼーション膜を使用したノーザンブロットの結果、CTGF/Hcs24の発現は胎生7日の初期に高く、胎生10日で一旦低下した後、胎生15日—17日で再び増強することが明らかとなった (Figure 1)。

マウスでは多くの内軟骨性骨化が始まるのは胎生13日であるが、CTGF/Hcs24はこの時期に指の基節骨、尾椎を含む椎骨のX型コラーゲ

ンを発現している細胞、すなわち、肥大軟骨に発現し始め、肢骨、肋骨をはじめとする内軟骨性の肥大軟骨の存在する肥大化層へと特異的に発現する部位が増加していった (Table 1)。一方、骨膜や増殖軟骨での発現はどのステージでも見られなかった。また、血管の内皮に関しては、真皮等の通常の部位では確認されず、骨髄の内皮細胞では発現が見られた。さらに、*cbfa1* 遺伝子をノックアウトしたマウスの15日胚ではどの部位でもCTGF/Hcs24の遺伝子発現は