

Figure 2 Histological features of fracture healing in mouse ribs. Photomicrographs show the healing process on days 2 (A), 8 (B), 14 (C) and 20 (D) after the fracture. Sections were stained with safranin O. Specific regions are indicated as follows : ms, muscle ; po, periosteum ; h, hematoma ; hc, zone of hypertrophic chondrocytes ; pc, zone of proliferating chondrocytes ; Tb, trabecular bone. Bar = 200 μ m.

みられなかった (Table 1)。

2. 骨折治癒過程における CTGF/Hcs24 の発現

In situ ハイブリダイゼーションの結果、CTGF/Hcs24 mRNA は骨折 8 ないし 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発現していることが判明した (Figures 2 & 3)。また、骨折 2 ないし 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発現していることがわかった (Figures 2 & 3)。また、免疫染色の

結果、CTGF/Hcs24 タンパクは骨折 8 ないし 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 (Figures 2 & 4)。また、骨折 8 ないし 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 (Figures 2 & 4)。また、繊維性組織、仮骨中の血管内皮細胞、骨折部周辺の骨膜細胞に認められた (Figures 2 & 4)。

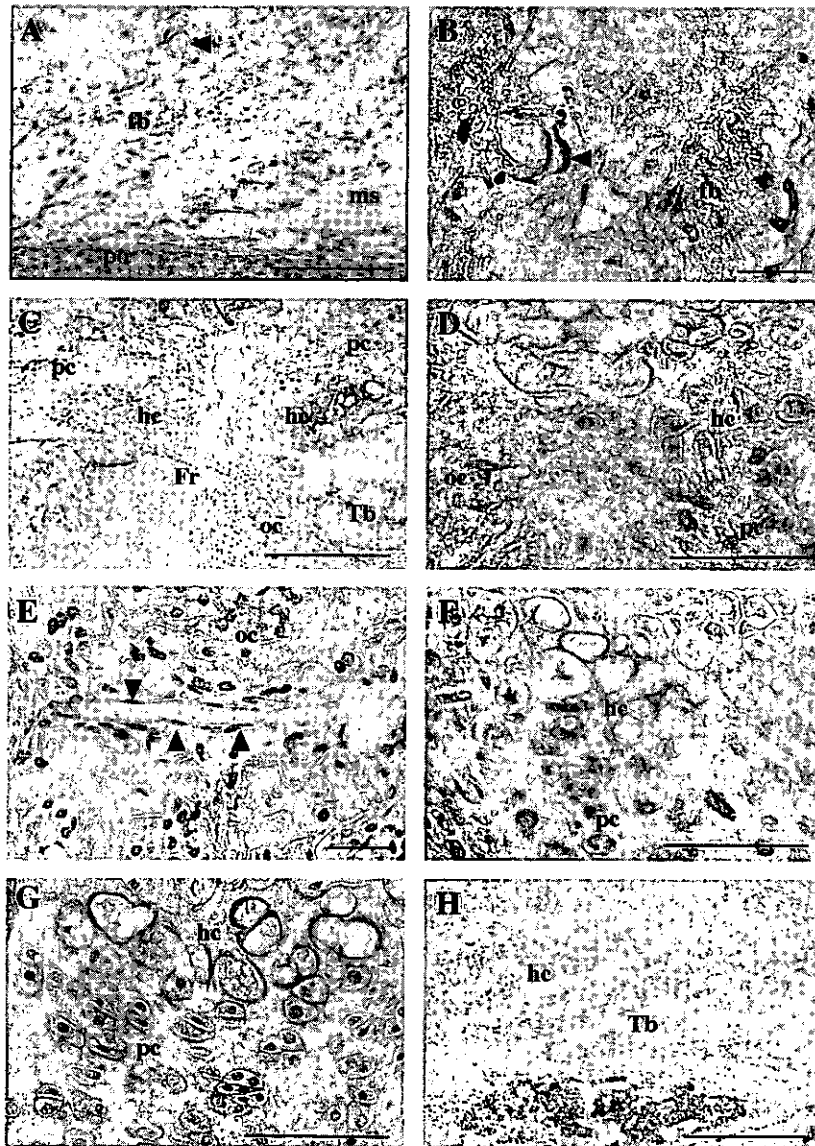


Figure 3 The expression of CTGF/Hcs24 mRNA in fractured mouse ribs. Photomicrographs show the expression of CTGF/Hcs24 mRNA on days 2 (A, B), 8 (C), 14 (D, F), and 20 (E) after the fracture. Sections do not continue on from those in Figure 1. Sections were hybridized with CTGF/Hcs24 antisense probes (A-E) or sense probes (F). (A) No signal was detected in periosteal cells far from the fracture site on day 2. (B) Moderate signal was detected in periosteal cells in the vicinity of the fracture site on day 2. (C) Strong signal was detected in hypertrophic chondrocytes and moderate signal in proliferating chondrocytes and weak signal in vascular endothelial cells in the callus on day 8. (D) Strong signal in hypertrophic chondrocytes and moderate signal in active osteoblasts in the regions of intramembranous ossification on day 14. (E) Weak signal was detected in hypertrophic chondrocytes and proliferating chondrocytes on day 20. (F) Sense probes detected no signal in any of the cells at the fracture site. Specific regions are indicated as follows: po, periosteal cells ; hc, zone of hypertrophic chondrocytes ; pc, zone of proliferating chondrocytes ; Tb, trabecular bone ; ec, vascular endothelial cells in the callus ; ob, active osteoblasts. Bar = 50mm.

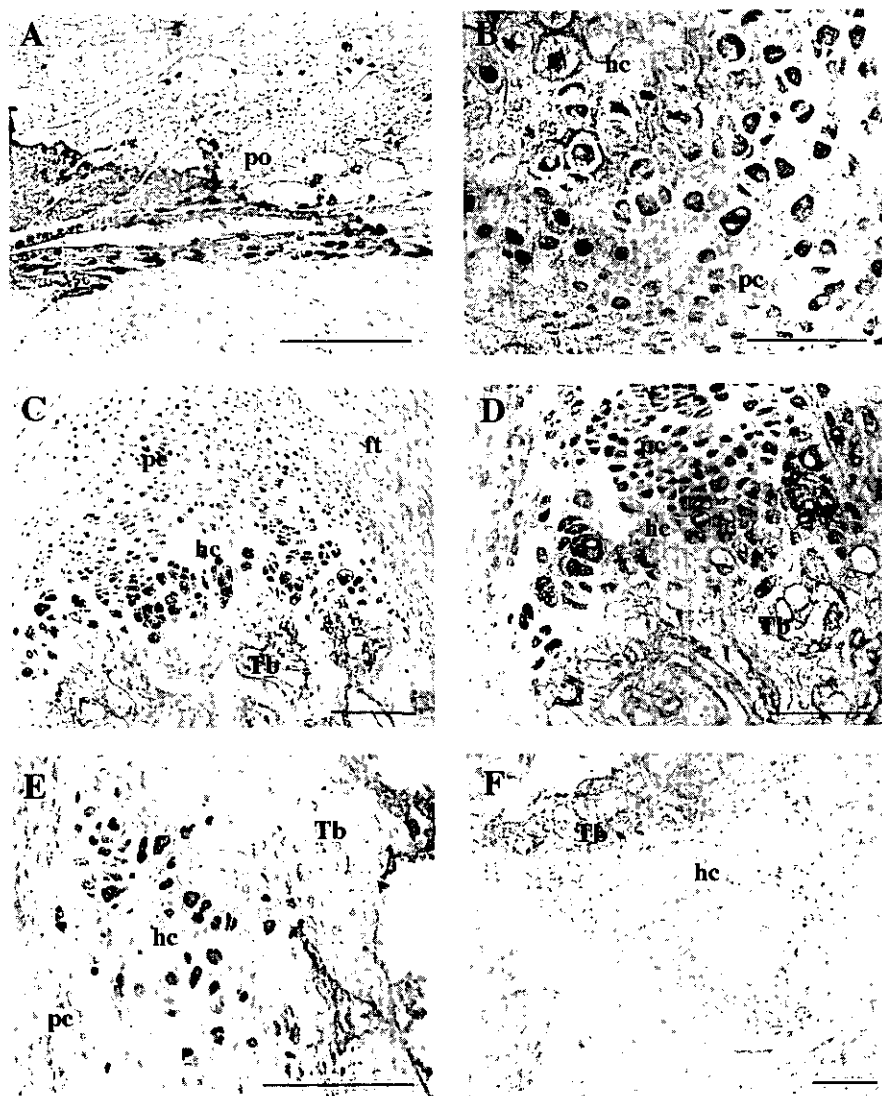


Figure 4 The localization of CTGF/Hcs24 in fractured mouse ribs. Photomicrographs show the localization of CTGF/Hcs24 on days 2 (A, B), 8 (C), 14 (D), 20 (E), and the negative control on 14 day (F) after the fracture. Sections were stained with anti-CTGF/Hcs24 antibodies (E) and nonimmune rabbit IgG (F). Sections do not continue on from those in Figure 1. (A) No signal was detected in periosteal cells in the area far from the fracture site on day 2. (B) Weak signal was detected in periosteal cells near the fracture site on day 2. (C) Strong signal was detected in hypertrophic chondrocytes in the regions of regenerating cartilage and moderate signal in proliferating chondrocytes and vascular endothelial cells in the callus on day 8. (D) Strong signal was detected in hypertrophic chondrocytes and moderate signal in proliferating chondrocytes on day 14. (E) Weak signal was detected in proliferating chondrocytes and moderate signal in hypertrophic chondrocytes on day 20. (F) No signal was detected. Specific regions are indicated as follows : po, periosteal cells ; hc, zone of hypertrophic chondrocytes ; pc, zone of proliferating chondrocytes ; Tb, trabecular bone ; ec, vascular endothelial cells in the callus. Bar = 50 mm.

D. 考察

1. 骨格成長における CTGF/Hcs24 の発現と *cbfa1* による制御について

これまで、*in vitro* の実験において、CTGF/Hcs24 が肥大軟骨細胞から産生されて、

軟骨細胞の増殖と分化を促進し、骨への転化をも促進することが予想されていたが今回の実験結果より、この遺伝子産物がマウス発生過程において、実際に肥大化層の形成や軟骨から骨への転化の直前に発現することが証明された。す

なわち、この骨化会誌のマーカーともいふべき CTGF/Hcs24 は、発生過程における骨や軟骨の形成に極めて重要な働きを行っていることが推察される。さらに、今回 Cbfa1 遺伝子をノックアウトしたマウスでは CTGF/Hcs24 の発現の低下が認められたが、最近、Cbfa1 が軟骨細胞分化においても必至な因子であることが明らかになっており、今回の結果は、軟骨細胞の分化過程において、Cbfa1 により CTGF/Hcs24 が発現誘導を受ける可能性を示している。

一方、マウス胎生期の 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から明らかとなったが、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。

2. 骨折治癒過程における CTGF/Hcs24 の発現について

今回の結果から、CTGF/Hcs24 は骨折治癒過程においても肥大軟骨細胞から産生され肥大軟骨細胞層を中心として軟骨細胞層全体に存在することが明らかとなり、CTGF/Hcs24 は軟骨細胞にとってオートクリン・パラクリン因子であることが明らかとなった。

また、骨折後初期において、増殖しつつある骨膜細胞や血管内皮細胞にも発現していることから、組織再生の際には肥大軟骨細胞だけでなく種々の細胞が発現・産生する因子であることが示唆された。事実、皮膚の創傷治癒過程でも発現がみられることが報告されており、普段全く発現のみられない組織に置いても、病的に急激な組織改築が行われる際には発現し組織修復に重要な役割を果たしている因子であることが示唆される²⁾。そして、肥大軟骨細胞層は生理的な急激な組織改築の代表として考えることができるであろう。

また、骨折治癒過程は一種の発生過程の縮図とも考えられ、マウス胎生 7 日目の CTGF/Hcs24 の高い発現は骨折治癒過程の幼若な細胞における高発現と対応する可能性も考えられる。

[参考文献]

- 1) Nakanishi, T., Kimura, Y., Tamura, T., Ichikawa, H., Yamaai, Y., Sugimoto, T., and Takigawa, M. : Cloning of a mRNA preferentially expressed in chondrocytes in differential display PCR from a human chondrocytic cell line that is identical with connective tissue growth factor (CTGF) mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 234, 206-210, 1997.
- 2) Takigawa, M. : Physiological roles of connective tissue growth factor (CTGF/Hcs24) : promotion of endochondral ossification, angiogenesis and tissue remodeling ; In *Tissue Engineering for Therapeutic Use* (ed, Shimizu, Y.). Vol. 4, Elsevier, Amsterdam, 1-13, 2000.
- 3) Shimo, T., Nakanishi, T., Kimura, Y., Nishida, T., Ishizeki, K., Matsumura, T. and Takigawa, M. : Inhibition of endogenous expression of connective tissue growth factor by its antisense oligonucleotide and antisense RNA suppresses proliferation and migration of vascular endothelial cells. *J. Biochem.*, 124, 130-140, 1998.
- 4) Shimo, T., Nakanishi, T., Nishida, T., Asano, M., Kanyama, M., Kuboki, T., Tamatani, T., Tezuka, K., Takemura, M., Matsumura, T. and Takigawa, M. : Connective tissue growth factor induces the proliferation, migration and tube formation of vascular endothelial cells in vitro and angiogenesis in vivo. *J. Biochem.*, 126(1), 137-145, 1999.
- 5) Nishida, T., Nakanishi, T., Asano, M., Shimo, T. and 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.*, 184, 197-206, 2000.
- 6) Nakanishi, T., Nishida, T., Shimo, T., Kobayashi, K., Kubo, T., Tamatani, T., Tezuka, K. and Takigawa, M. : Effects of CTGF/Hcs24, a product of a hypertrophic chondrocyte-specific gene, on the proliferation and differentiation of chondrocytes in culture. *Endocrinology*, 141(1), 264-273, 2000.

[発表論文]

1. Nakanishi, T., Yamaai, Y., Asano, M., Nawachi, K., Suzuki, M., Sugimoto, T. and Takigawa, M. : Overexpressions of connective tissue growth factor/hypertrophic chondrocyte specific gene product 24 (CTGF/Hcs24) decreases bone density in adult mice and induces dwarfism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 281, 678-681, 2001.
2. Eguchi, T., Kubota, S., Kondo, S., Shimo, T., Hattori, T., Nakanishi, T., Kuboki, T., Yatani, H. and Takigawa, M. : Regulatory mechanism of human connective tissue growth factor (ctgf/hcs24) gene expression in a human chondrocytic cell line, Hcs-2/8. *J. Biochem.*, 130 (1), 79-87, 2001.
3. Kubota, S., Eguchi, T., Shimo, T., Nishida, T., Hattori, T., Kondo, S., Nakanishi, T. and Takigawa, M. : Novel mode of processing and secretion of connective tissue growth factor/ecogenin (CTGF/Hcs24) in chondrocytic HCS-2/8 cells. *Bone*, 29(2), 155-161, 2001.
4. Shimo, T., Nakanishi, T., Nishida, T., Asano, M., Sasaki, A., Kanyama, M., Kuboki, T., Matsumura, T. and Takigawa, M. : Involvement of CTGF, a hypertrophic chondrocyte-specific gene product, in tumor angiogenesis. *Oncology*, 61, 315-322, 2001.
5. Shimo, T., Kubota, S., Kondo, S., Nakanishi, T., Sasaki, A., Mese, H., Matsumura, T. and Takigawa, M. : Connectivetissue growth factor as a major angiogenic agent that is induced by hypoxia in a human breast cancer cell line. *Cancer Lett.*, 174, 57-64, 2001.
6. Yosimichi, G., Nakanishi, T., Nishida, T., Hattori, T., Takano-Yamamoto, T. and Takigawa, M. : CTGF/Hcs24 induces chondrocyte differentiation through p44/42 MAPK/extracellular-signal regulated kinase (ERK). *Eur. J. Biochem.* 268, 1-9, 2001.
7. Yamashiro, Y., Fukunaga, T., Kobashi, N., Kamioka, H., Nakanishi, T., Takigawa, M. and Takano-Yamamoto, T. : Mechanical stimulation induces CTGF expression in rat osteocytes. *J. Dent. Res.*, 80(2), 2001.

[学会発表]

1. 久保田聡, 江口傑徳, 志茂 剛, 服部高子, 近藤誠二, 中西 徹, 滝川正春: 結合組織成長因子 CTGF/Hcs24 の軟骨細胞様細胞株 Hcs-2/8 での発現と動態制御. 第 33 回日本結合組織学会, 2001.6.7-8, 東京
2. 縄稚久美子, 中西 徹, 吉道 玄, 中田英二, 服部高子, 小守壽文, 滝川正春: CTGF/Hcs24 軟骨強制発現トランスジェニックマウスの解析. 第 19 回日本骨代謝学会, 2001.8.8-11, 名古屋
3. 西田 崇, 中西 徹, 久保田聡, 吉道 玄, 近藤誠二, 滝川正春: In vitro 及び In vivo における肥大軟骨細胞由来の成長因子 CTGF/Hcs24 の関節軟骨細胞に対する作用. 第 19 回日本骨代謝学会, 2001.8.8-11, 名古屋
4. 吉道 玄, 中西 徹, 西田 崇, 服部高子, 山本照子, 滝川正春: 軟骨由来の成長因子 (Connective tissue growth factor, CTGF/Hcs24) の軟骨細胞増殖, 分化促進作用における情報伝達機構の解析. 第 19 回日本骨代謝学会, 2001.8.8-11, 名古屋
5. 江口傑徳, 久保田聡, 近藤誠二, 志茂 剛, 中西 徹, 窪木拓男, 矢谷博文, 滝川正春: ヒト軟骨肉腫由来軟骨様細胞株 Hcs-2/8 における結合組織成長因子 CTGF/Hcs24 遺伝子のプロモーター活性決定因子. 第 19 回日本骨代謝学会, 2001.8.8-11, 名古屋
6. 久保田聡, 江口傑徳, 志茂 剛, 西田 崇, 服部高子, 近藤誠二, 中西徹, 滝川正春: 軟骨由来成長因子 CTGF/Hcs24 のヒト軟骨細胞株 Hcs-2/8 におけるプロセッシングと分泌の様態. 第 19 回日本骨代謝学会, 2001.8.8-11, 名古屋
7. 近藤誠二, 久保田聡, 志茂 剛, 西田 崇, 吉道 玄, 江口傑徳, 菅原利夫, 滝川正春: 低酸素によるヒト乳癌細胞における結合組織成長因子 CTGF 及びマトメリクスメタロプロテアーゼ (MMP) 活性の協調的発現誘導. 第 43 回歯科基礎医学会, 2001.9.19-21, 大宮
8. 江口傑徳, 久保田聡, 近藤誠二, 志茂 剛, 中西 徹, 窪木拓男, 矢谷博文, 滝川正春: ヒト軟骨様細胞株 HCS-2/8 における CTGF/Hcs24 遺伝子のプロモーター活性決定因子. 第 43 回歯科基礎医学会, 2001.9.19-21, 大宮
10. 久保田聡, 近藤誠二, 江口傑徳, 服部高子, 中西 徹, 滝川正春: 軟骨由来成長因子 CTGF/Hcs24 遺伝子の転写後制御エレメント

- CAESARの構造と機能. 第43回歯科基礎医学会, 2001.9.19-21, 大宮
11. 山合友一郎, 中西 徹, 縄稚久美子, 吉道 玄, 浅野将宏, 杉本朋貞, 滝川正春: 軟骨由来成長因子 CTGF トランスジェニックマウスの硬組織形成と遺伝子発現の解析. 第43回歯科基礎医学会, 2001.9.19-21, 大宮
 12. 近藤誠二, 久保田聡, 志茂 剛, 西田 崇, 吉道 玄, 江口傑徳, 菅原利夫, 滝川正春: 低酸素によるヒト乳癌細胞における結合組織成長因子 CTGF 及びマトリクスメタロプロテアーゼの発現誘導. 第60回日本癌学会総会, 2001.9.26-28, 横浜
 13. 久保田聡, 近藤誠二, 椋代義樹, 江口傑徳, 服部高子, 中西 徹, 滝川正春: 多機能成長因子 CTGF/Hcs24 遺伝子の転写後制御エレメント, CAESARの作用機序. 第74回日本生化学会大会, 2001.10.25-28, 京都
 14. 江口傑徳, 久保田聡, 志茂 剛, 近藤誠二, 中西 徹, 矢谷博文, 滝川正春: 軟骨様細胞株 HCS-2/8 における多機能成長因子 CTGF/Hcs24 の転写から分泌まで. 第74回日本生化学会大会, 2001.10.25-28, 京都
 15. 西田 崇, 中西 徹, 久保田聡, 吉道 玄, 近藤誠二, 滝川正春: 軟骨細胞においてヘパラン硫酸は軟骨細胞由来成長因子 CTGF/Hcs24 の作用を制御する. 第74回日本生化学会大会, 2001.10.25-28, 京都
 16. 近藤誠二, 久保田聡, 志茂 剛, 西田 崇, 吉道 玄, 江口傑徳, 菅原利夫, 滝川正春: 低酸素による結合組織成長因子 (CTGF) 及びマトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) 活性の協調的発現誘導. 第9回日本血管細胞生物学会, 2001.11.5-6, 福岡
 17. 川木晴美, 久保田聡, 湊 雅直, 森谷徳文, 服部高子, 大山和美, 中西 徹, 滝川正春: 結合組織成長因子 (CTGF) の構造・機能解析のための ELISA システムの開発. 第22回岡山歯学会学術集会, 2001.11.18, 岡山
 18. 江口傑徳, 久保田聡, 森谷徳文, 椋代義樹, 窪木拓男, 矢谷博文, 滝川正春: 結合組織成長因子 CTGF の軟骨細胞特異的転写調節因子の探索. 第9回日本分子生物学会年会, 2001.12.9-12, 横浜
 19. 森谷徳文, 久保田聡, 江口傑徳, 近藤誠二, 椋代義樹, 菅原利夫, 滝川正春: 軟骨由来成長因子 CTGF/Hcs24 の遺伝子発現抑制機構. 第9回日本分子生物学会年会, 2001.9-12, 横浜
 20. 西田 崇, 久保田聡, 中西 徹, 吉道 玄, 滝川正春: 軟骨細胞においてヘパラン硫酸は肥大軟骨細胞由来の成長因子 CTGF/Hcs24 の作用を制御する. 第15回日本軟骨代謝学会, 2002.3.8-9, 前橋
 21. 中西 徹, 縄稚久美子, 山合友一郎, 吉道 玄, 服部高子, 小守壽文, 滝川正春: CTGF/Hcs24 を軟骨組織で強制発現した transgenic mouse の解析. 第15回日本軟骨代謝学会, 2002.3.8-9, 前橋
 22. 湊 雅直, 久保田聡, 川木晴美, 西田 崇, 中西 徹, 滝川正春: 軟骨由来成長因子 CTGF/Hcs24/ecogenin の構成モジュール特異的抗体の解析とその応用. 第15回日本軟骨代謝学会, 2002.3.8-9, 前橋

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。またゲルシフト法により転写因子との結合能を検討した。[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。また deletion mutant を作成し検討を加えたところ転写因子である AP1 認識部位配列のところで活性の低下を認めた。ゲルシフト法では転写因子である c-fos においてスーパーシフトを認めた。[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, この発現は luciferase assay, ゲルシフト法の結果から AP1 認識部位配列において発現の調節がおこなわれている可能性が考えられた。

【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¹⁾。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²⁾。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³⁾, 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認められる。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 2.5×10^5 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 8×10^4 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。また細胞より核タンパク質を抽出しゲルシフト法により転写因子との結合能を検討した。

【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。また deletion mutant を作成し検討を加えたところ転写因子である AP1 認識部位配列のところで活性の低下を認めた (図 1)。ゲルシ

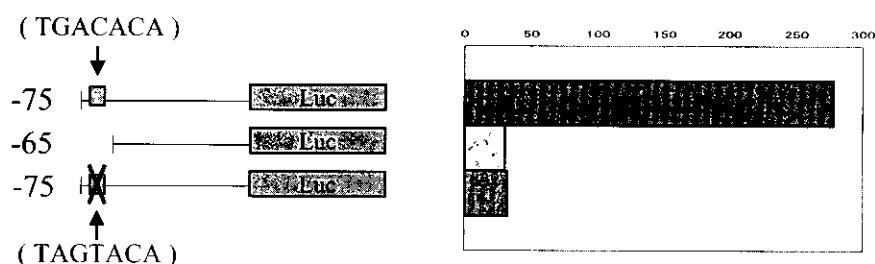


図1 osteopontin promoter の deletion mutant および AP1 結合部位変異を用いた Luciferase assay AP1 結合部位の deletion mutant により osteopontin promoter 活性の低下を認めた

フト法では転写因子である c-fos においてスーパーシフトを認めた。

【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 β 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 α 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⁴⁾。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。

また deletion mutant を作成し検討を加えたところ転写因子である AP1 認識部位配列のところでは活性の低下を認め、ゲルシフト法では転写因子である c-fos においてスーパーシフトを認めた。このことよりヒストン蛋白アセチル化における osteopontin の m-RNA の発現には転写因子である AP1 が関与している可能性が考えられた。これまでの報告としては転写因子である c-fos のトランスジェニックマウスは骨の過形成を生じ、また c-fos のノックアウトマウスは骨の形成不全を生じると報告されている。これ

らの結果をあわせて考えると、AP1 を構成している c-fos が骨化の過程において転写レベルで重要な働きをしていると考えることができる。今後の研究方針としては内軟骨骨化を示す組織モデル (マウス骨折モデル、骨端部組織) よりオステオポンチン、c-fos の遺伝子の時間的発現について、またその局在について解析をおこない、これら遺伝子の相互作用機序を解明する必要があると考えている。また c-fos やオステオポンチンの遺伝子多型について脊柱靭帯骨化症患者の血液サンプルより DNA を抽出し調べる必要があると考えている。

【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

ヒト黄色靭帯の細胞外マトリックス構築におけるプロテオグリカンとエラスチンの相互関係

板橋 泰斗 (弘前大学整形外科・弘前大学医学部第一生化学), 高垣 啓一 (弘前大学医学部第一生化学),
湯川 昌広 (弘前大学整形外科), 植山 和正 (弘前大学整形外科),
原田 征行 (青森県立中央病院), 藤 哲 (弘前大学整形外科),
遠藤 正彦 (弘前大学医学部第一生化学)

【研究要旨】

ヒト黄色靭帯には、基質成分としてプロテオグリカン (PG), 線維成分としてコラーゲンやエラスチンが豊富に存在し、これらの分子が細胞外マトリックスを形成している。これらの中で、PGとエラスチンの相互作用が明確でないため、両者の結合性を測定した。

手術時に採取されたヒト黄色靭帯から ion-exchange chromatography, hydrophobic chromatography によって 1 種の大型 PG と 3 種の小型 PGs (decorin, decorin-subtype, biglycan) を分離精製した。また、同組織からアルカリ処理により、 α -elastin を分離した。表面プラズモン共鳴バイオセンサを使用し、センサーに固定化されたエラスチンに対する精製された PGs の結合性を測定した。その結果、エラスチンに対して 3 種の小型 PGs のすべてに結合性が認められたが大型 PG には認められなかった。小型 PGs の結合部位はコアタンパク側であり、3 種の小型 PGs の中で biglycan が結合性が高かった。また、骨化靭帯患者から α -elastin を抽出し各々の α -elastin に対する小型 PGs との結合性を調べたところ、健常靭帯の α -elastin との結合性に比較し、骨化靭帯からの α -elastin に対する結合性が低かった。両者における elastin のアミノ酸組成には差異がなく、elastin の架橋結合構造のうち、Neodesmosine が骨化靭帯エラスチンにおいて含量が低かった。このことから、骨化靭帯の細胞外マトリックスは、エラスチンと PG の相互作用において健常者と異なる点が見出された。

【Introduction】

ヒト黄色靭帯は、脊柱に沿って存在する一連の靭帯である。この靭帯において、内軟骨内骨化が加齢に伴って生じ、神経症状が発生する¹⁾。黄色靭帯の細胞外マトリックス (ECM) における基質成分であるプロテオグリカン (PG) は Ca と結合することから、骨化過程に重要な役割を果たしていると考えられる²⁾。これまでの研究で、我々はヒト黄色靭帯における PG の構造解析を行い、以下のことを発見した。

加齢に伴いデルマトン硫酸がコンドロイチン 6 硫酸に変化していること、コンドロイチナーゼ ABC 消化後の糖鎖の組成分析により、加齢や骨化した靭帯では Δ Di-4S の代わりに Δ Di-6S が増加していることを発見した³⁾。更に PG は主にデコリン、デコリンサブタイプ、バイグリカンであることを発見した⁴⁾。

一方、黄色靭帯の ECM には、基質成分と共に線維成分としてエラスチンやコラーゲンが豊富に存在する。これらは PGs と相互に結合して ECM を構築している。近年、small PG であるデコリンのコアタンパクが type I, II, III, VI, XIV collagen に結合する

ことが報告された⁵⁻⁹⁾。棟方らは、ヘパリンやコンドロイチン硫酸 E が collagen に結合することを報告した¹⁰⁾。また、高垣らはコンドロイチン硫酸 E のドメイン構造が type V collagen に結合することを報告した¹¹⁾。このように、デコリン、バイグリカンのような PG はコラーゲン線維の制御、安定化、凝集に関係すると考えられているが、PG と弾性線維の相互関係は明確にされていない。

エラスチンは弾性線維のコア部分であり、架橋結合構造である desmosine (DES), Isodesmosine (ISDES), Neodesmosine (NEO) などの数種のアミノ酸により、不溶性の高密度ネットワークを形成している^{12,13)}。電子顕微鏡による研究では、elastogenesis においてグリコサミノグリカン糖鎖が microfibril に関与する可能性が報告された^{14,15)}。最近では、免役沈降反応や固相結合分析によって、牛胎児項靭帯の decorin と biglycan が tropoelastin に相互関係があることが示唆されている¹⁶⁾。しかし、その結合性、また疾患との関わりについては明らかになっていない。

この論文において、ヒト黄色靭帯の ECM における

PGs とエラスチンの結合性を表面プラズモン共鳴バイオセンサーによって証明する。更に、健常靭帯及び骨化靭帯における両者の結合性の違いがあることを証明し、どの様に靭帯骨化の関係するかを考察する。

【Materials and Methods】

Chemicals

DEAE-Sephacel, Sepharose CL-4B, and Octyl-Sepharose CL-4B, and electrophoresis calibration kit were purchased from Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Uppsala, Sweden). A research grade sensor chip CM5, amine coupling kit containing *N*-hydroxysuccinimide (NHS), *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC), 1M ethanolamine hydrochloride adjusted to pH 8.5 with NaOH and HBS-EP buffer, pH 7.4 containing 10mM HEPES, 150mM NaCl, 3.4mM EDTA and 0.005 % surfactant P20 は、Pharmacia Biosensor AB (Uppsala, Sweden) から購入された。Anti-human decorin antibody (PG-40) は Gibco (Grand Island, NY) から購入された。Desmosine and Isodesmosine は Elastin Products Co. (Owensville, MO) から購入された。Actinase E は Kaken Pharmaceutical Co., (Tokyo, Japan) から購入された。Chondroitinase ABC (from *Proteus vulgaris*), Hyaluronic acid (HA, from human umbilical cord, average molecular weight 900k), chondroitin 4-sulfate (Ch4S, from whale cartilage, average molecular weight 34k), chondroitin 6-sulfate (Ch6S, from shark cartilage, average molecular weight 64k), chondroitin sulfate D (ChS-D, from shark cartilage, average molecular weight 54k), chondroitin sulfate E (ChS-E, from squid cartilage, average molecular weight 70k), dermatan sulfate (DS, from pig skin, average molecular weight 32k), and heparan sulfate (HS, from bovine kidney, average molecular weight 28k) は Seikagaku Kogyo Co. (Tokyo, Japan). Heparin (HP, from porcine intestinal mucosa, average molecular weight 19k) は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) から得られた。

ヒト健常黄色靭帯 (Ligamentum flavum, LF) (100g) (130名) 及び骨化黄色靭帯 (OYL) (5g) (6名) は、腰椎脊柱管狭窄症、黄色靭帯骨化症症例に行われた腰椎手術時に摘出された組織から集められた。全ての患者よりインフォームドコンセントを得た。年齢は10代から80代で、組織は実験に供するまで -80°C で保存した。

Preparation of proteoglycans

PGの精製は、Sajera and Hascalの方法に従って前報通り行われた¹⁷⁾。簡潔には以下の通りである。LFがメスで細切され、Physoctron (Niti-on, Funabashi, Japan) を用いて液体窒素下に粉砕され、クロロホルム:メタノール(2:1)で脱脂された。黄色靭帯粉末からのプロテオグリカンの抽出は、protease inhibitors (10mM EDTA, 10mM *N*-ethylmaleimide, 5mM benzamidine-HCl, 1mM phenyl-methanesulfonyl fluoride)を含む10倍量の4M guanidine-HCl in 50mM sodium acetate buffer, pH 5.8 (solution A) で、 4°C で24時間攪拌された。抽出液を回収し、粗プロテオグリカン画分とした。

Separation of proteoglycans

粗プロテオグリカン画分は、塩化セシウムにより1.45g/mlに調整され、超遠心(228,000 $\times g$, 4°C , 72時間)後に1 fractionに500 μl が回収され、各々の fraction のウロン酸含量をカルバゾール反応¹⁸⁾、タンパク質量をBradford法¹⁹⁾による測定により、プロテオグリカンを含む画分を回収した。この溶液を7M urea in 50mM Tris-HCl buffer, pH 7.2 (solution Aと同様のprotease inhibitorsを含む) (solution B) に対し 4°C で72時間透析した。透析後、サンプルはDEAE-Sephacel column (3.3 \times 50.0cm) によるイオン交換が行われた (Fig. 1A)。solution BによるNaClの直線的濃度勾配(0—1.0M)により溶出後、カルバゾール陽性画分を回収し、プロテオグリカン画分としてエタノール沈殿法により回収した。回収されたプロテオグリカン画分は2M guanidine-HCl in 50mM sodium acetate buffer, pH 5.8に溶解され、Octyl-Sepharose CL-4B column (2.4 \times 100cm) にアプライされた。これを2—6M guanidine-HCl/50mM sodium acetate buffer, pH 5.8による直線的濃度勾配により溶出した (Fig. 1B)²⁰⁾。その結果、カルバゾール陽性画分として1つの大型PGと3つの小型PGのピークが見ら

れた。それぞれ蒸留水に対し透析後、凍結乾燥した。

SDS-PAGE, 免疫染色法, N末端アミノ酸配列解析器によるPGの分析

各小型 PG の同定は、湯川らの報告と同様に、SDS-PAGE, Western blotting immunoassay 及び N末端アミノ酸配列分析によって行われた。

SDS-PAGE—ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は Rosenberg らの方法によって行われた²¹⁾。4 °C, 200 V で 4 時間, 5—20 % acrylamide gradient slab gel において SDS-PAGE が行われた。ゲルは Fisher らの方法²²⁾によって Coomassie brilliant blue R-250 で染色された。その結果, ピーク 2, 3 は 70 k—95 k, ピーク 4 は 180 k—200 k にバンドを示し, それぞれを PG-1, PG-2, PG-3 と称した (data not shown)。

Western blotting immunoassay—抗ヒトデコリン抗体を用いた Western blotting immunoassay は Towbin *et al.* の方法に従って行われた²³⁾。抗ヒトデコリン抗体は Roughle らによる方法で²⁴⁾, ヒトデコリンの C 末端ペプチドで免疫されたウサギより得られた。その結果, PG-1 は抗ヒトデコリン抗体に反応を示したが, PG-2 及び PG-3 は反応を示さなかった (data not shown)。これにより, PG-1 はデコリンであり, PG-2 及び PG-3 はそれとは異なるコアタンパクを有することが示唆された。

N 末端アミノ酸配列解析—プロテオグリカンの N 末端アミノ酸配列解析が Applied Biosystems 492 Protein Sequencer を用いて行われた。その結果, PG-1, 2 がヒトデコリンの DEASGIGPEV と, PG-3 がバイグリカンの DEEASGAD と一致した²⁵⁾。これにより, ヒト黄色靭帯には 3 種の小型 PG が存在することが明かとなった。PG-1 は decorin であり, PG-3 は biglycan であった。更に, decorin とはコアタンパクの C 末端側が異なる PG-2 が存在した。湯川らはこの PG の糖鎖, 及びコアタンパクのアミノ酸組成についても解析し, これを decorin-subtype と称した。

Separation and Analysis of α -Elastin

LF 及び OYL より, Lansing らの方法に従い²⁶⁾, 不溶性エラスチンを分離した。簡潔には以下の通りである。LF 及び OYL は 0.1 M NaOH 溶液で, 98 °C, 45 分間インキュベートされた。沈殿物は不溶性エラスチンとして回収された。その沈殿物は 0.25 M シュ

ウ酸溶液とともに, 98 °C, 1 時間インキュベートされ, その可溶性画分を α -elastin として回収した²⁷⁾。 α -elastin は中和され, 脱塩後乾燥された。

α -Elastin は, 6N HCl を用いて 110 °C で 24 時間, 加水分解後, 自動アミノ酸分析器 (automatic amino acid analyzer model JLC-300 ; 日本電子) にて分析された。また, α -elastin の分子量を測定するため, 上述した SDS-PAGE が行われた。

HPLC analysis of crosslinking amino acids from human yellow ligament

架橋アミノ酸は, HPLC (Ultrasphere ODS, Beckman) (4.6 mm \times 25 cm) によって, Watanabe らの方法に準じて測定された²⁸⁾。LF 及び OYL は 1 M NaCl 溶液で 48h, 4 °C に溶解され, その後 3 % phenol を含む 6N HCl, 48h, 110 °C で加水分解された。加水分解産物は蒸留水に溶解され, HPLC により 20 mM SDS を含む 0.1 M phosphate buffer-acetonitrile (5 : 1, v/v), pH 3.9, 流速 1.0 ml/min で溶出された。検出は, UV により, 各架橋形成アミノ酸の吸収極大波長 (DES, λ = 263 nm; ISDES, λ = 278 nm; NEO, λ = 270 nm) で測定された。

Surface plasmon resonance (SPR) による分析

可溶性エラスチンへの PGs の結合性は, BIAcore 2000 instrumentation を使用して決定された²⁸⁾。これは物質間の結合反応により, Surface plasmon resonance の変化が生じ, その変化が resonance units (RU) として視覚的に表される。0.1° の角度変化が 1000 RU とに一致し, 約 1 ng/mm² のセンサー表面の濃度変化に相当する²⁹⁾。 α -Elastin (100 μ g/ml in 10 mM sodium acetate buffer, pH 4.0) は, manual inject により CM-5 sensor chips (sensor 表面にカルボキシメチルデキストランが coat されている) に共有結合された (25 °C, flow rate 10 μ l/min)。固定化レベルは正確な評価のため, 至適固定化量の約 1000 RU とした。PGs は HBS-EP buffer に溶解され (0.13—2.4 μ M), flow rate 10 μ l/min で sensor 表面に流された。Running buffer の response が baseline として決められ, すべての response はこの baseline に比較して表された。Sensor の表面は各々の結合分析終了後に 1.4 M NaCl を含む HBS buffer で再生された。固定化されていないチップ及び BSA で固定化されたチップは非特異的結合を除外するためのコントロー

ルとして使用された。Kinetic constants は、manufacturer's instructions (BIAevaluation software version 3.0) における 1 : 1 model A + B = AB に対応した結合曲線と解離曲線の非線形解析によって計算された。

【Results】

PGs の分離・精製

湯川らの方法に改良を加え、column size を大きくした Octyl-Sepharose CL-4B 疎水性クロマトグラフィーを一度施行することにより、LF から 1 つの大型 PG と 3 つの小型 PG が分離された。SDS-PAGE, 免疫染色, N 末端アミノ酸配列分析により、Peak 1 は大型 PG, Peak 2 は decorin, Peak 3 は decorin-subtype Peak 4 は biglycan であると確認された。

α -Elastin の分離及び分析

SDS-PAGE により、分離された LF 及び OYL の α -elastin が分子サイズ 60k — 85k のバンドを示した。また、アミノ酸組成分析により両者とも過去に報告されている α -elastin の組成と一致した³⁰⁾。

SPR による解析

LF における大型及び小型 PGs と、LF の α -elastin との結合性が、表面プラズモン共鳴バイオセンサー (SPR) を用いて測定された。Sensor chip 表面に α -elastin を固定化し、各 PGs を inject することにより結合分析を行った。固定化された α -elastin 上に結合性を有する物質を含む測定液が流され、結合性があれば RU が上昇し、この測定液が結合性を有さない液に変わると RU は瞬時に低下する。この baseline より RU の上昇分が結合性の強度を示す。このようにして行われた結果、大型 PG と α -elastin との結合性は認められなかった。しかし、小型 PGs である decorin, decorin-subtype, biglycan は、濃度依存的に α -elastin との結合性が認められた。

次に、 α -elastin に対する PGs 分子内の結合部位を確かめるために、PGs を chondroitinase ABC により消化し GAG 糖鎖を除去後コアタンパク側に対する α -elastin との結合性を測定した。その結果、chondroitinase ABC 消化後の large PG と α -elastin との結合性は認められなかったが、3 種の small PGs と α -elastin との結合性が濃度依存的に認められた。すなわち、small PGs のコアタンパク

側と α -elastin との結合が確認された。一方、PGs を pronase により消化後、GAG 糖鎖と α -elastin の結合性を測定したが、結合性は認められなかった。また、HA, Ch4S, Ch6S, DS, ChS-D, ChS-E, HS, Hep (0.25 mM — 10 mM) と α -elastin との結合性も測定したが、結合性は存在しなかった。従って、elastin と GAG 糖鎖には直接的結合性は存在しないものと思われた。

α -elastin に対する 3 種の small PGs の結合性の程度を調べるための kinetics を決定するために、解離定数 (Kd) が測定された。その結果、biglycan (1.0×10^{-6} M) と α -elastin の結合性は、decorin (0.4×10^{-6} M), decorin-subtype (0.1×10^{-6} M) よりも 1/10 — 1/4 倍に低かった。これは、biglycan は 2 本のグリコサミノグリカン糖鎖 (GAG) を持ち、decorin 及び decorin-subtype よりもマイナスチャージが大きいと、センサー表面のカルボキシメチルデキストランとの反発作用により、結合性が低下したと考えられた。Chondroitinase ABC 消化後の各 small PGs core protein と α -elastin との結合性は 3 種とも同様であった。つまり、小型 PG はエラスチンに対し、ほぼ同様の結合性を示すと考えられた。

次に、LF 及び OYL における α -elastin と small PG との結合性の違いについて検討した。Small PGs と OYL の α -elastin との結合性が測定された結果、LF に比較し、OYL の α -elastin との結合性が低下した。OYL の α -elastin に対する小型 PGs の結合性は LF に比較し、decorin は 1/6 倍、decorin-subtype は 1/15 倍、biglycan は 1/6 倍に低下していた (Table 3)。OYL における α -elastin と small PGs との結合性が低下した原因を調べるため、elastic fiber に特有の架橋結合を形成するアミノ酸を測定した。

架橋アミノ酸分析

Reversed phase column (Ultarsphere, ODS) を用いた HPLC を行った結果、架橋形成アミノ酸として 3 つのピークが認められた。それらは、standard の溶出位置から M. Watanabe らによって報告されている Desmosine, Isodesmosine, Neodesmosine と同定された。その中で、Neodesmosine が LF に比較し OYL において有意に低下していた ($P < 0.05$)。このことから、PG の結合性に架橋形成アミノ酸である NEO が関与していることが示唆された。

【考察】

我々は、ヒト黄色靭帯から4種のPG及び α -エラスチンを精製し、小型PGsと α -エラスチンの親和性をSPRによって証明した。親和性が存在したPGsは、デルマタン硫酸糖鎖を持つ小型のPGsで、デコリン、デコリンサブタイプ、バイグリカンであった。その結合部位は、GAG糖鎖側ではなく、コアタンパク側に存在した。

これまでの報告で、GAG糖鎖が弾性線維の形成に関与することが報告されていたが³¹⁾、弾性線維のコア部分であるエラスチンにPGのコアタンパクが結合することによって、弾性線維と相互作用している可能性が示唆された。更に、これらの結合性を解離定数によって解析した。Whole PGsと α -elastinとの結合分析において、decorin and decorin-subtypeに比較し、biglycanの結合性が低かった。これは、GAGsのマイナス荷電がバイグリカンで大きいことから、センサーチップ表面のカルボキシメチルデキストラン硫酸に対し反発力が生じ、バイグリカンの結合が妨げられたと考えられた。コンドロイチナーゼABC消化後のsmall PGsのコアタンパクと α -エラスチンとの結合性は、3種のPGsにおいて、同様であった。つまり、ヒト黄色靭帯における3種の小型PGsは、機能において異なるが^{32,33)}、同じ結合性を有することが示唆された。一方で、chondroitinase ABC消化後の3種のsmall PGsと α -elastinとの結合性がwhole small PGsと比較して低かった。この研究において、センサー表面にカルボキシメチルデキストラン硫酸が存在するためマイナス荷電の影響でPGsと α -エラスチンの結合が阻害されると考えられたが、GAG糖鎖を除去することによって結合性が低下したのは、GAG糖鎖が結合しているPG全体の構造も重要であると考えられた。

我々は、更にLF及びOYLの α -elastinに対するPGsとの結合性を解析した。その結果、OYLの α -elastinに対するsmall PGsの結合性が低下した。この原因を検討するため、LF及びOYLにおける α -elastinのアミノ酸組成を分析したが、両者はほぼ一致していた。そこで、elastic fiberに特有の架橋結合を形成するアミノ酸に着目した。逆相カラムを用いたHPLCで、これらのアミノ酸を測定した結果、DES、ISDES及びNEOと考えられる3種のアミノ酸が認められた。更に、OYLにおけるNEOが、LFに比較し、有意に低下していた。NEOは、ISDESの脱アルキル化によって、又はホルムアルデヒドが関与して生じるとされており¹²⁾、加齢に伴ってほとん

ど変化しないか、NEO/DES + ISDESはわずかに増加すると報告されている。骨化黄色靭帯においてNEOが減少しているのは、NEOの存在するelastic fiberの脆弱な部分からリン酸カルシウムの沈着つまり骨化が開始されNEOが破壊されて減少したか、ISDESの脱アルキル化反応が骨化過程で阻害されNEOが産生されなかったことが考えられる。これらのことから、OYLの α -elastinにおいてsmall PGsの結合性が低下したのは、架橋結合形成アミノ酸の変化により、elastic fiberの3次元高密度ネットワークが粗になることによって、小型PGの結合性が低下したと考えられた。

以前、Takedaらは健常及び骨化靭帯の主なGAGがDSとCSであることを報告した。また、Naritaらはデルマタン硫酸がコンドロイチン硫酸よりもヒドロキシアパタイトとの結合が強いことから、デルマタン硫酸はヒドロキシアパタイトの結晶化すなわち骨化を抑制する可能性があることを報告した³⁵⁾。つまり、DSPGである小型PGsの減少は、骨化を促進させると考えられる。

本研究において、弾性線維の架橋アミノ酸が低下し、エラスチンの3次元高密度ネットワークが粗になり、そのために小型PGが減少することで、弾性線維周囲での骨化が更に増強する可能性が示唆された。

[REFERENCES]

1. Poole, A. R., and Rosenberg, L. C. (1987). "Proteoglycans, chondrocalcin, and the calcification of cartilage matrix in endochondral ossification." In: *Biology of Proteoglycan*, T. N. Wight and R. P. Mecham (eds), pp. 187-210. (Academic Press, New York).
2. Hunter, G. K. (1991). Role of proteoglycan in the provisional calcification of cartilage. *Clin. Orthop.* **262**, 256-280.
3. Okada, A., Harata, S., Takeda, Y., Nakamura, T., Takagaki, K. and Endo, M. (1993). Age-related changes in proteoglycans of human ligamentum flavum. *Spine.* **18**, 2261-2266.
4. Yukawa, M., Takagaki K., Itabashi T., Ueyama, K., Harata S., and Endo M. Structural varieties of small proteoglycans in human spinal ligament. *Connect. Tissue Res.* In press.

5. Scott, J. E. (1988). Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem. J.* **252**, 313-323.
6. Vogel, K. G., Paulsson, M., Heinegard, D. (1984). Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem. J.* **223**, 587-597.
7. Wiberg, C., Hedbom, E., Khairullina, A., Lamande S. R., Oldberg A., Timpl R., Morgelin M., Heinegard D. (2001). Biglycan and decorin bind close to the N-terminal region of the collagen VI triple helix. *J. Biol. Chem.* **276**, 18947-18952.
8. Ehnis, T., Dieterich, W., Bauer, M., Kresse, H., and Schuppan, D. (1997). Localization of a binding site for the proteoglycan decorin on collagen XIV (undulin) *J. Biol. Chem.* **272**, 20414-20419.
9. Schönherr, E., Witsch-Prehm, P., Harrach, B., Robenek, H., Rauterberg, J. and Kresse, H. (1995). Interaction of biglycan with type I collagen. *J. Biol. Chem.* **270**, 2776-2783.
10. Munakata H, Takagaki K, Majima M, and Endo M. (1999). Interaction between collagens and glycosaminoglycans investigated using a surface plasmon resonance biosensor. *Glycobiology.* **9**(10), 1023-1027.
11. Takagaki, K., Munakata, H., Kakizaki, I., Iwafune, M., Itabashi, T., and Endo M. (2001). Domain structure of chondroitin sulfate E octasaccharides binding to type V collagen. *J. Biol. Chem.* In press.
12. Watanabe, M., Sawai, T., Nagura, H., and Suyama, K. (1996). Age-related alteration of cross-linking amino acids elastin in human aorta. *Tohoku J. Exp.* **180**, 115-130.
13. Akagawa, M., and Suyama, K. (2000). Mechanism of formation of elastin crosslinks. *Connect Tissue Res.* **41**(2), 131-141.
14. Baccarani-Contri, M., Vincenzi, D., Cicchetti, F., Mori, G., Pasquali-Ronchetti, I. (1990). Immunocytochemical localization of proteoglycans within normal elastin fibers. *Eur. J. Cell. Biol.* **53**, 305-312.
15. Baccarani-Contri, M., Cicchetti, F., and Pasquali-Ronchetti, I. (1985). Elastin-proteoglycans association revealed by cytochemical methods. *Connect. Tissue Res.* **13**, 237-249.
16. Reinboth, B., Hanssen, E., Cleary, E. G., and Gibson M. A. (2001). Molecular interactions of biglycan and decorin with elastic fiber components : Biglycan forms a ternary complex with tropoelastin and MAGP-1. *J. Biol. Chem.* In press
17. Sajdera, S. W., Hascall, V. C. (1969). Protein-polysaccharide complex from bovine nasal cartilage. A comparison of low and high shear extraction procedures. *J. Biol. Chem.* **244**, 77-87.
18. Bitter, T., and Muir, H. M. (1962). A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.* **4**, 330-334.
19. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
20. Choi, H. U., Johnson, T. L., Pal, S., Tang, L. H., Rosenberg, L. and Neame, P. J. (1989). Characterization of the dermatan sulfate proteoglycans, DS-PGI and DS-PGII, from bovine articular cartilage and skin isolated by octyl-sepharose chromatography. *J. Biol. Chem.* **264**, 2876-2884.
21. Rosenberg, L. C., Choi, H. U., Tang, L. H., Johnson, T. L., Pal, S., Webber, C., Reiner, A., Poole, A. R. (1985). Isolation of dermatan sulfate proteoglycans from mature bovine articular cartilages. *J. Biol. Chem.* **260**, 6304-6313.
22. Fisher, L. W., Termine, J. D., Dejter, S. W., Jr., Whitson, S. W., Yanagishita, M., Kimura, J. H., Hascall, V. C., Kleinman, H. K., Hassell, J. R., Nilsson, B. (1983). Proteoglycans of developing bone. *J. Biol. Chem.* **258**, 6588-6594.
23. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4350-4354.
24. Roughley, P. J., White, R. J., Magny, M. C., Liu, J., Pearce, R. H. and Mort, J. S. (1993).

- Non-proteoglycan forms of biglycan increase with age in human articular cartilage. *Biochem. J.* **295**, 421-426.
25. Fisher, L. W., Hawkins, G. R., Tuross, N. and Termine, J. D. (1987). Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *J. Biol. Chem.* **262**, 9702-9708.
26. Lansing A. L., Rosenthal T. B., Alex, M. and Dempsey, E. W. (1952). The structure and chemical characterization of elastic fibers as revealed by elastase and by electron microscopy. *Anat Rec.* **114**, 555-575.
27. Partridge, S. M., Davis, H. F. and Adair, G. S. (1955). Soluble proteins derived from partial hydrolysis of elastin. *Biochem. J.* **61**, 11-21.
28. Watanabe, M., Sawai, T., Nagura, H. and Suyama K. (1996). Age-related alteration of cross-linking amino acids of elastin in human aorta. *Tohoku J. Exp. Med.* **180**, 115-130.
29. Jhonsson, B., Lofas, S. and Lindquist, G. (1991). Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal. Biochem.* **198**, 268-277.
30. Keith, D. A., Paz, M. A., Gallop, P. M., Glimcher, M. J. (1977). Histologic and biochemical identification and characterization of an elastin in cartilage. *J. Histochem. Biochem.* **25**, 1154-1162.
31. Podrazky, V., Stokrova, S., and Fric, I. (1975). Elastin-proteoglycan interaction. *Connect. Tissue Res.* **4**, 51-54.
32. Danielson, K. G., Baribault, H., Holmes, D. F., Graham, H., Kadler, K. E. and Iozzo, R. V. (1997). Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J. Cell Biol.* **136**, 729-743.
33. Xu, T., Bianco, P., Fisher, L. W., Longenecker, G., Smith, E., Goldstein, S., Bonadio, J., Bosky, A., Heegaard, A. M., Sommer, B., Satomura, K., Dominguez, P., Zhao, C., Kulkarni, A., B., Robey, P. G. and Young, M. F. (1998). Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nat. Genet.* **20**, 78-82.
34. Takeda, Y., Harata, S., Takagaki, K., Narita, H. and Endo, M. (1992). Characterization of glycosaminoglycans in ossified human yellow ligament. *Connect. Tissue.* **24**, 109-114.
35. Narita, H., Takeda, Y., Takagaki, K., Nakamura, T., Harata, S., Endo, M. (1995). Identification of glycosaminoglycans using high-performance liquid chromatography on a hydroxyapatite column. *Anal. Biochem.* **232**, 133-136.

後縦靭帯骨化症患者由来の培養脊柱靭帯細胞が産生するグリコサミノグリカン糖鎖の性状

菊池 明 (弘前大学整形外科), 原田 征行 (弘前大学整形外科),
植山 和正 (弘前大学整形外科), 藤 哲 (弘前大学整形外科),
高垣 啓一 (弘前大学第一生化学), 遠藤 正彦 (弘前大学第一生化学)

【研究要旨】

脊柱靭帯骨化症の発症機序に細胞外マトリックス中のプロテオグリカンの変化が関与する
と考え、培養靭帯細胞を用い、正常靭帯細胞と OPLL 患者由来の脊柱靭帯細胞 (OPLL 細胞) と
が産生するグリコサミノグリカン糖鎖の違いについて検討した。測定の結果両細胞が主に産生
する糖鎖の分子量、酸性度には差を認めなかったが、OPLL 細胞はより酸性度の低い糖鎖も産生
していた。不飽和二糖分析の結果では OPLL 細胞の産生する糖鎖において硫酸化程度の低下を
認めた。糖鎖はアニオンの集合体であり、酸性度の変化は細胞外マトリックス内でのカルシウム
イオンとの反応性に変化を生じる。本研究の結果から OPLL 細胞の産生する糖鎖に認められ
る変化が、細胞外マトリックス内に骨化を生じやすい環境を作り、靭帯骨化発症へと導くこと
が推測された。

A. 研究目的

加齢に伴い黄色靭帯の骨化の頻度は増加することが知られている。これまでに当研究室ではヒト黄色
靭帯の細胞外マトリックス (ECM) の主要構成成分
であるプロテオグリカン (PG) について検討してきた。その結果、加齢変化として PG を構成するグリコ
サミノグリカン (GAG) 糖鎖のコンドロイチン硫酸
の割合が増加し、デルマタン硫酸が減少すること、
またそのコンドロイチン硫酸はそれを構成する N-
アセチルガラクトサミンの 4 位に結合する硫酸基が
減少し、6 位に結合する硫酸基が増加することなど
が明らかとなった¹⁾。したがって、靭帯骨化の発症に
ECM 内の GAG 糖鎖の変化が関与することが示唆さ
れている。

OPLL 患者の脊柱靭帯に由来する細胞は、骨形成
細胞としての性状を有しており、サイトカインやホル
モン、あるいは機械的刺激などにより、骨形成細

胞としての性質を発現することが知られている。本
研究では ECM 内に骨形成が生じる因子としての
GAG 構造変化に注目し、OPLL 細胞の産生する
GAG 糖鎖の正常細胞との相違について検討した。

B. 研究方法

本研究を施行するにあたり、事前に弘前大学倫理
委員会に研究内容を申請し、その承認を得た。

1. 靭帯細胞の培養

本研究では弘前大学医学部附属病院及び同関
連病院で行われた脊椎手術時に、患者より承諾
を得て採集した脊柱靭帯をサンプルとして用い
た。本研究に用いた靭帯細胞の診断名、性別、
年齢、採集部位を Table 1 に示す。

脊椎手術中に採集した靭帯組織より、
outgrowth法を用いて靭帯細胞を単離し、10%

Table 1 Tissue samples used in this study

Non-OPLL				OPLL			
Diagnosis	Gender	Age	Tissue	Diagnosis	Gender	Age	Tissue
CSM	Female	56	PLL	OPLL	Male	50	LF
CSM	Male	39	LF	OPLL, OYL	Male	70	LF
				OPLL	Female	55	ISL

OPLL, ossification of the posterior longitudinal ligament; OYL, ossification of
the ligamentum flavum; CSM, cervical spondylotic myelopathy; LF, ligamentum
flavum; ISL, interspinous ligament; PLL, posterior longitudinal ligament.

FBS添加DMEM培地にて培養した。

2. 培養細胞における mineralization

OPLL 細胞, Non-OPLL 細胞 両者に, confluent に達した段階で培地中に 5mM β GP, 50 μ g/ml アスコルビン酸を添加した。培地は3—4日間隔で交換した。8週間経過後, 培養 dish へのカルシウムの沈着を確認するため, alizarin red 染色を施行した。

3. GAG 糖鎖の伸長

MU-Xyl を培地に添加すると, MU-Xyl をプライマーとして糖鎖が伸長することが報告されている²⁻⁶⁾。本研究では培地中に MU-Xyl を添加して培養後, MU-Xyl に伸長した GAG (以下 MU-GAG) を培地から分離した。

Confluent に達した両細胞の dish に 0.5 mM MU-Xyl を添加した。MU-Xyl は DMSO に溶かし, 培地内の DMSO 濃度が 0.1% になるように培地に添加した。

4. GAG 糖鎖の回収

1 週間培養を継続してから回収した培地 (各 500 ml) を, まず 48 時間透析し (排除限界分子量 10,000), 透析内液を回収した。次にアクチナーゼ消化 (50°C, 72 時間) を行い, 100°C, 5 分間煮沸して反応を停止した。次に遠心 (10,000 rpm, 10 分間) して変性タンパクを沈殿, 除去した。再度透析を行い (排除限界分子量 10,000), 凍結乾燥して MU-Xyl に伸長した MU-GAG を回収した。

5. 高速液体クロマトグラフィー

培地中に産生される MU-GAG 量の経時変化の測定と, 回収した MU-GAG の酸性度の測定は陰イオン交換クロマトグラフィーで行った。陰イオン交換クロマトグラフィーには TSK gel DEAE-5PW column (7.5 \times 75 mm, TOSOH, Japan) を用いた。溶出液は NaCl を用い, 0.25 M から 1 M まで直線勾配をかけた (20 分—60 分)。

MU-GAG の分子量の測定にはゲル濾過クロマトグラフィーを用いた。ゲル濾過クロマトグラフィーには Shodex OHpak SB-803 HQ column (8 \times 300 mm, Shoko, Japan) を用いた。溶出液は 0.2 M NaCl を用い, 流速は

0.5 ml/min で測定した。分子量を測定するために, まず HA, DS, HS の溶出位置を測定し, 分子量と溶出時間との相関関係を求め, 検量線を作成した。次に Non-OPLL 細胞, OPLL 細胞それぞれの産生する MU-GAG の溶出位置を測定し, 検量線から分子量を求めた。

6. 不飽和二糖分析

Non-OPLL 細胞, OPLL 細胞が産生する MU-GAG の糖構成を測定するため, まずコンドロイチナーゼ ABC を用いて MU-GAG を酵素消化した (37°C, Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing CaCl₂)。この酵素消化により不飽和二糖単位になった糖の量を, YMC-Pack Polyamine-II column (4.6 \times 250 mm, YMC Co., Japan) を用いて測定した。緩衝液は NaH₂PO₄ (pH 6.8) を用い, 0.03 M から 0.47 M まで直線濃度勾配をかけた (0 分—60 分)。流速は 1.0 ml/min とし, 232 nm の紫外線で検出した。

C. 研究結果

1. Mineralization assay

β GP, アスコルビン酸を培地に添加し, 8 週間培養を続けると, OPLL 細胞では培養 dish に白い結晶が沈着した。この dish に対しアリザリンレッド染色を施行した結果, 培養 dish のほぼ全面が赤色に染色され, OPLL 細胞では培養 dish 上にカルシウムが沈着していることが証明された。一方で Non-OPLL 細胞は培養を続けても培養 dish に結晶が沈着することなく, アリザリンレッド染色を施行しても全く染色性を示さなかった。

靱帯骨化症患者から採集した靱帯細胞の中にも, β GP, アスコルビン酸を添加しても細胞の増殖形態に変化を見せず, アリザリンレッド染色に対し染色性を示さない細胞も存在した。本研究では β GP, アスコルビン酸添加に対して培養 dish 上で変化を示す細胞を, OPLL 細胞の持つ骨形成細胞としての性質をより発現している細胞と考え, この細胞を継代, 増殖して, 以下の実験に用いた。

2. 培地中に産生される MU-GAG 量の経時変化

培地中に産生される MU-GAG 量の変化を測定するために, 培地を毎日回収し, イオン交換

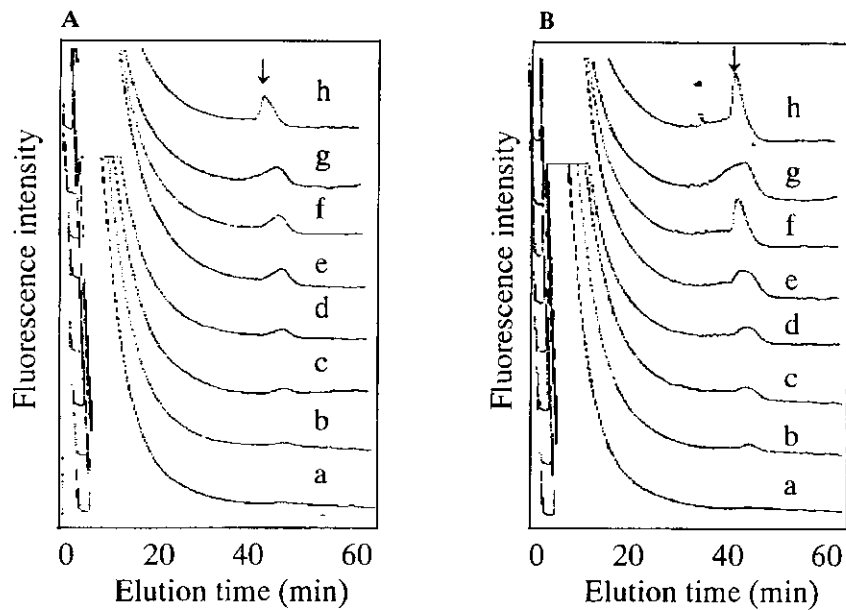


Figure 1 陰イオン交換クロマトグラフィーによる、培地中 MU-GAG 量の経時変化の測定。培養靱帯細胞の培地を毎日回収し、TSK gel DEAE-5PW column ($\phi 7.5 \times 75$ mm) を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにて解析した。溶出液には NaCl を用い、流速は 1.0 ml/min とし、0.25 M—1.0 M の直線濃度勾配をかけた (20—60 分)。A, Non-OPLL 細胞; B, OPLL 細胞。矢印は MU-GAG の溶出位置を示す。

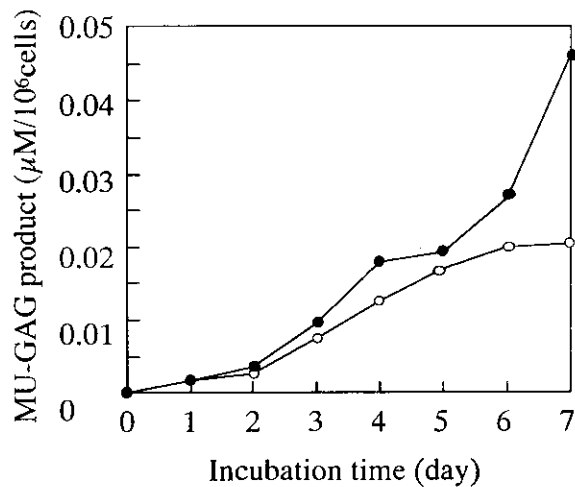


Figure 2 細胞数 106 個あたりの MU-GAG 産生量経時変化。Non-OPLL 細胞 (●), OPLL 細胞 (○) それぞれの細胞数を測定し、MU-GAG 産生量の経時変化を、細胞数 106 個あたりの濃度で表記した。

クロマトグラフィーを施行した (Fig. 1)。蛍光強度を測定した結果、培養開始時には存在しなかった約 41 分に溶出されるピークが培養を続けると出現するようになった。回収した培地をコンドロイチナーゼ ABC を用いて酵素消化すると、イオン交換クロマトグラムにおいてこのピークは消失した。従ってこの部位が MU-GAG

の溶出部位であると確認した。このピークの面積は Non-OPLL 細胞, OPLL 細胞ともに経時的に増加しており、MU-Xyl をプライマーとした糖鎖伸長が行われ、その量は経時的に増加することが分かった。

総 MU-GAG 産生量は OPLL 細胞の方が多かった。だが、OPLL 細胞は培養 dish 上で重層

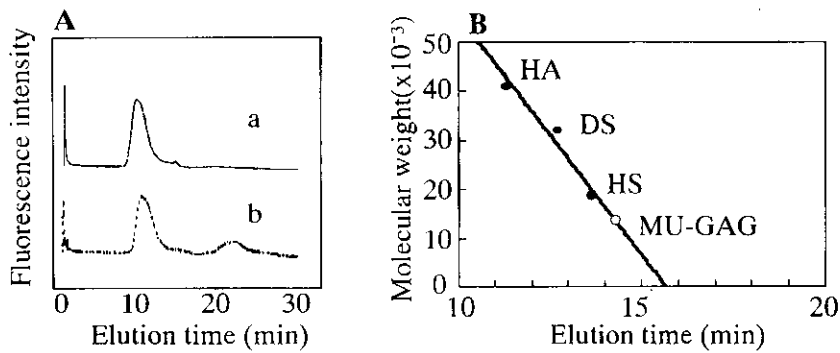


Figure 3 ゲル濾過クロマトグラフィーによる、MU-GAGの分子量測定。
 培地より回収したMU-GAGをShodex OHpak SB-803 column ($\phi 8 \times 300$ mm)を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにて解析した。溶出液には0.2 M NaClを用い、流速は0.5 ml/minとして測定した。
 A, Non-OPLL細胞 (a), OPLL細胞 (b) の産生するMU-GAGのゲル濾過クロマトグラム;
 B, 分子量既知のスタンダードを用いて作成した検量線。HA, ヒアルロン酸 (分子量41,000);
 DS, デルマトン硫酸 (分子量32,000); HS, ヘパラン硫酸 (分子量19,000)

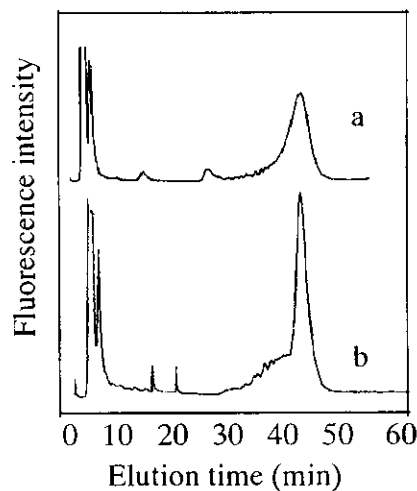


Figure 4 陰イオン交換クロマトグラフィーによる、MU-GAGの酸性度の比較。
 回収したNon-OPLL細胞 (a), OPLL細胞 (b) のMU-GAGを、TSK gel DEAE-5PW column ($\phi 7.5 \times 75$ mm)を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにて解析した。溶出液にはNaClを用い、流速は1.0 ml/minとして、0.25 M—1.0 Mの直線濃度勾配をかけた (20—60分)。

化を呈するため、総細胞数はNon-OPLL細胞よりも多くなった。そのため、培地中に産生される、1細胞あたりのMU-GAG産生量を比較すると、Non-OPLL細胞の方がOPLL細胞よりも多くなった (Fig. 2)。

3. MU-GAG分子量の測定

培地中に産生されたMU-GAGの分子量は、ゲル濾過クロマトグラフィーにて測定した。Shodex OHpak SB-803 HQ columnを用いて、まずHA (分子量41,000), DS (分子量32,000),

HS (分子量19,000)の溶出位置を測定し、分子量と溶出時間との検量線を作成した (Fig. 3B)。

次に同条件でNon-OPLL細胞, OPLL細胞それぞれのMU-GAGの溶出時間を測定した。両細胞ともに溶出時間は約14分で変化が無く、検量線から分子量は約14,000と測定された (Fig. 3A)。以上より、両細胞はほぼ同じ分子量のMU-GAGを産生していることが分かった。

4. MU-GAGの酸性度の比較

両細胞の産生するMU-GAGの酸性度は、陰

Table 2 Relative composition of MU-GAG from spinal ligament cells

	Δ Di-0S	Δ Di-4S	Δ Di-6S
Non-OPLL cell	29.7%	37.9%	32.4%
OPLL cell	34.3%	28.9%	36.9%

イオン交換クロマトグラフィーを用いて比較した (Fig. 4)。図に示すように、両細胞とも主なピークの溶出位置はほぼ同じであり、主に産生される MU-GAG の酸性度はほぼ等しいことが分かった。だが、OPLL 細胞では主なピークの出現前から、緩やかな基線の上昇を認め、この部位に酸性度の低い分子が溶出していることが示された。

5. MU-GAG の不飽和二糖分析

両細胞の産生する MU-GAG の糖構成の割合を検討するため、MU-GAG をコンドロイチナーゼ ABC を用いて酵素消化を行った。酵素消化により、MU-GAG を構成していた糖鎖は、二糖単位に分解された。この二糖単位には 4 位が硫酸化された不飽和二糖 (Δ Di-4S)、6 位が硫酸化された不飽和二糖 (Δ Di-6S)、硫酸化されていない不飽和二糖 (Δ Di-0S) とが含まれている。硫酸化の程度の異なる各二糖単位の量を、YMC-Pack Polyamine-II column を用いて測定した。測定の結果、OPLL 細胞では、Non-OPLL 細胞に比べて、 Δ Di-4S の割合が減少し、 Δ Di-0S、 Δ Di-6S の割合が増加していた (Table 2)。陰イオン交換クロマトグラフィーの結果から、OPLL 細胞が酸性度の低い MU-GAG を産生していることが分かったが、この酸性度の低下は、硫酸化の程度が低いことに起因していることが分かった。

D. 考察

これまで弘前大学整形外科学教室並びに第 1 生化学教室では、加齢に伴い黄色靭帯の骨化の頻度が増加することに着目した。そして細胞外マトリックス中の PG の変化のが骨化発症に及ぼす影響を検討するため、加齢に伴う黄色靭帯の PG 構成の変化について検討した。その結果、コアタンパク-糖鎖結合領域の近傍で、加齢に伴いデルマタン硫酸がコンドロイチン 6 硫酸に変化していること、コンドロイチ

ナーゼ ABC 消化後の糖鎖の組成分析により、加齢や骨化した靭帯では Δ Di-4S の代わりに Δ Di-6S が増加していることを報告した⁷⁾。また、プロテオグリカンは主にデコリンとバイグリカンであり、その糖鎖はデルマタン硫酸又はコンドロイチン硫酸鎖であることも報告した⁷⁾。このことから、靭帯骨化の発症の一つの機序として、細胞外マトリックス中 PG の変化が関与していることが示唆されている。

この PG の変化と骨化発症との関係をさらに明らかにするため、本研究では培養 dish 上でカルシウムの沈着を生じる、脊柱靭帯骨化症患者から explant した靭帯細胞を用い、骨化発症に先立つ細胞外マトリックス中の GAG 糖鎖の変化について検討した。本研究では手術時に採集した靭帯より explant した細胞を培養に用いた。OPLL 細胞と Non-OPLL 細胞とでは諸家の報告にあるように、培養 dish 上で明らかに異なる外観を呈し、また β GP、アスコルビン酸添加に対する反応が明らかに異なっていた⁸⁾。この点から本研究で用いた OPLL 細胞は正常な靭帯細胞とは異なり、骨形成細胞としての性質を有していることが確認された。従ってこの OPLL 細胞を骨形成マトリックスのモデルとしてその後の実験に用いることは適切であると考えた。

本研究では各細胞が培地中に産生する GAG 糖鎖の性状を検討するために、培地に MU-X を添加し、MU-X をプライマーとして伸長する GAG の形で培地から回収した。培養細胞の産生する GAG の変化を測定する他の方法としては、プロテオグリカンを回収して、酵素消化によりその糖鎖を分離する方法や、アイソトープを利用し、GAG 産生量の変化を測定する方法も考えられる⁹⁻¹¹⁾。だが、培養細胞の産生する PG 量は少量であり、PG の形で回収するのは困難であること、また、アイソトープを用いる方法では微量な差を検討することが困難なことを考慮し、MU-GAG の形で GAG を回収する方法を選択した。この方法であれば MU の持つ蛍光を測定することにより、GAG 産生量の経時変化など、微量な変化を検討することが可能となる利点がある。