

MU-GAG の産生量についての検討の結果、培養dish 1枚あたりの産生量では OPLL 細胞の方が総 MU-GAG 産生量が多いが、細胞数あたりでは逆に Non-OPLL 細胞の方が産生量が多いことが分かった。OPLL 細胞は高度に重層化して増殖したため、dish の底面に位置する細胞には培地成分が十分に到達しないことが考えられる。そのため、主として表層に近い細胞で GAG 産生が行われ、結果として細胞数あたりの産生量では Non-OPLL 細胞の方が産生量が多くなったと考えられた。

本研究の結果から、Non-OPLL細胞と OPLL細胞が、主として産生する MU-GAG には分子量、酸性度の違いは認められなかった。だが、OPLL細胞は、分子量が小さく、酸性度の低い MU-GAG も産生していることが分かった。また、両細胞の産生する MU-GAG の間には、硫酸化の位置に相違があることも分かった。糖鎖形成において、どの部位が硫酸化されるかは、それぞれの酵素により厳密にコントロールされたプロセスと考えられている。OPLL細胞が正常の細胞と異なる糖鎖を産生していることから、骨化が生じる前段階として、細胞外マトリックス内の糖鎖の変化が生じていることが確認された。

糖鎖の変化が骨化を導く機序についてはまだ明らかにはされていない。成田らはヒドロキシアパタイトカラムに対するデルマトン硫酸とコンドロイチン硫酸との親和性の違いについて報告している¹²⁾。その報告においてデルマトン硫酸の方がヒドロキシアパタイトに対する親和性が高いことから、デルマトン硫酸はカルシウムイオンを保持し、マトリックス内にカルシウムイオンが凝集するのを抑制していると推測している。GAG糖鎖はアニオンの集合体であり、その分子量、硫酸化の程度、部位により荷電は異なる。本研究の結果 OPLL細胞は正常靭帯細胞とは異なる GAG 糖鎖を産生していることが分かった。その機序は明らかではないが、この GAG糖鎖の変化が、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。

[参考文献]

- 1) Okada A, Harata S, Takeda Y, Nakamura T, Takagaki K, and Endo M. (1993). Age-related changes in proteoglycans of human ligamentum flavum. *Spine*. **15**, 2261-2266
- 2) Okayama M, Kimata K, and Suzuki S. (1973). The influence of *p*-nitrophenyl β -D-xyloside on the synthesis of proteo-chondroitin sulfate by slices of embryonic chick cartilage. *J. Biochem*. **74**, 1069-1073
- 3) Fukunaga Y, Sobue M, Suzuki N, Kushida H, Suzuki S. and Suzuki S. (1975). Synthesis of a fluorogenic mucopolysaccharide by chondrocytes in cell culture with 4-methylumbelliferyl β -D-xyloside. *Biochim. Biophys. Acta*. **381**, 443-447
- 4) Kato Y, Kimata K, Ito K, Karasawa K, and Suzuki S. (1978). Effect of β -D-xyloside and cycloheximide on the synthesis of two types of proteochondroitin sulfate in chick embryo cartilage. *J. Biol. Chem*. **253**, 2784-2789
- 5) Takagaki K, Nakamura T, Kon A, Tamura S, and Endo M. (1991). Characterization of β -D-xyloside-induced glycosamino-glycans and oligosaccharides in cultured human skin fibroblast. *J. Biochem*. **109**, 514-519
- 6) Izumi J, Takagaki K, Nakamura T, Shibata S, Kojima K, Kato I, and Endo M. (1994). A novel oligosaccharide, xylosyl β 1-4xylosyl β 1-(4-methylumbelliferon), synthesized by cultured human skin fibroblasts in the presence of 4-methylumbelliferyl- β -D-xyloside. *J. Biochem*. **116**, 524-529
- 7) 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
- 8) Specchia N, Pagnotta A, Gigante A, Logroscino G, and Toesca A. (2001). Characterization of cultured human ligamentum flavum cells in lumbar spine stenosis. *J. Orthop. Res*. **19**, 294-300
- 9) Kolset SO, Ehlorsson J, Kjellen L, and Lindahl U. (1986). Effect of benzyl β -D-xyloside on the biosynthesis of chondroitin sulphate proteoglycan in cultured human monocytes. *Biochem. J*. **238**, 209-216
- 10) Robinson HC, Brett MJ, Tralaggan PJ, Lowther DA, and Okayama M. (1975). The effect of D-xylose, β -D-xylosides and β -D-galactosidesxyloside on chondroitin

- sulfate biosynthesis in embryonic chicken cartilage. *Biochem. J.* **381**, 443-447
- 11) Sobue M, Habuchi H, Ito K, Yonekura H, Oguri K, Sakurai K, Kamohara S, Ueno Y, Noyori R, and Suzuki S. (1987). β -D-xyloside and their analogues as artificial initiators of glycosaminoglycan chain synthesis. *Biochem. J.* **241**, 591-601
 - 12) Narita H, Takeda Y, Takagaki K, Nakamura T, Harata S, and Endo M. (1995). Identification of glycosaminoglycans using high-performance liquid chromatography on a hydroxyapatite column. *Anal. Biochem.* **232**, 133-136

BMPの制御機構

宮園 浩平 (東京大学大学院医学系研究科病因・病理学専攻分子病理学)

【研究要旨】

軟骨分化におけるBMPの細胞内シグナル伝達機構の解明を目的に、初代培養の牛関節軟骨細胞において、BMP-7により活性化される細胞内シグナル伝達機構の解明を試みた。3種類のBMPのI型受容体の活性型を強制発現させると、BMP-7と同様に軟骨細胞への分化が促進された。また、BMP特異型SmadであるSmad1とSmad5はBMP-7による分化誘導の作用を増幅し、抑制型SmadであるSmad6はBMP-7の作用を阻害した。一方、SB202190はBMP-7の作用を阻害した。以上の結果、軟骨分化においてBMPは、BMP特異型Smad1/5経路とp38 MAP kinase経路の二つの経路を活性化し、シグナルを伝達することが示唆された。

A. 研究目的

骨形成因子(Bone Morphogenetic Protein:BMP)は骨に多く局在し、異所性に骨・軟骨組織を誘導するユニークな生理活性物質である。BMPは発生過程における骨・軟骨組織の誘導や骨格形成、成体における骨折治癒など骨・軟骨形成過程に重要な働きを担っている。後縦靭帯骨化症(ossification of the posterior longitudinal ligament; OPLL)患者の靭帯組織を調べると、骨化部近傍の非骨化靭帯組織においてBMPやそのレセプターの発現が増えている。これは、BMPのシグナルが正常の骨形成のみならず、病的な異所性骨化にも関与することを示唆する。本研究では、OPLLの骨化の発生や進展の機序解明を目的に、軟骨分化におけるBMPによる細胞内シグナル伝達機構の解明を試みた。

B. 研究方法

初代培養の牛関節軟骨細胞に、BMPやTGF- β の活性型I型受容体やシグナル伝達因子であるSmadsを、アデノウイルスベクターを用いて細胞内で強制発現させて、軟骨細胞への分化を調べた。軟骨分化度を調べる場合、アデノウイルスベクターを感染させてから6日後に、アルシヤンブルー染色とノーザンブロット法によるタイプIIコラーゲンのmRNAの検出を行った。さらに、同様の系でp38 MAP kinaseに対する阻害剤(SB202190)の効果を調べる実験を行った。

C. 研究結果

初代培養の牛関節軟骨細胞に3種類のBMPのI型受容体の活性型を強制発現させると、BMP-7と同様に軟骨細胞への分化が促進された。また、BMP特

異型SmadであるSmad1とSmad5はBMP-7による分化誘導の作用を増幅し、抑制型SmadであるSmad6はBMP-7の作用を阻害した。一方、SB202190はBMP-7の作用を阻害した。

D. 考察

活性型のBMP I型受容体がBMP-7と同様の作用を発揮することから、軟骨分化においてBMP I型受容体を介したシグナル伝達系の重要性が明らかになった。さらに細胞内ではBMP特異型SmadであるSmad1/5の活性化が必要であった。また、SB202190がBMP-7の作用を阻害したことから、BMPによって活性化されるp38 MAP kinaseが、軟骨分化において重要な働きを担っていることが明らかになった。

E. 結論

軟骨分化においてBMPは、BMP特異型Smad1/5経路とp38 MAP kinase経路の二つの経路を活性化し、シグナルを伝達することが示唆された。

F. 研究発表

1. 発表論文

Nishimori, S., Tanaka, Y., Chiba, T., Fujii, M., Imamura, T., Miyazono, K., Ogasawara, T., Kawaguchi, H., Igarashi, T., Fujita, T., Tanaka, K., and Toyoshima, H. (2001) Smad-mediated transcription is required for TGF- β 1-induced p57Kip2 proteolysis in osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* 276(14), 10700-10705.

Aoki, H., Fujii, M., Imamura, T., Yagi, K., Takehara, K., Kato, M., and Miyazono, K. (2001) Synergistic effects of different bone morphogenetic protein type I receptors on alkaline phosphatase induction. *J. Cell Sci.* 114(8), 1483-1489.

Hanyu, A., Ishidou, Y., Ebisawa, T., Shimanuki, T., Imamura, T., and Miyazono, K. (2001) The N-domain of Smad7 is essential for specific inhibition of transforming growth factor- β signaling. *J. Cell Biol.* 155(6), 1017-1028.

Furuhashi, M., Yagi, K., Yamamoto, H., Furukawa, Y., Shimada, S., Nakamura, Y., Kikuchi, A., Miyazono, K., and Kato, M. (2001) Axin facilitates Smad3 activation in the transforming growth factor β signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 21(15), 5132-5141.

Yagi, K., Furuhashi, M., Aoki, H., Goto, D., Kuwano, H., Sugamura, K., Miyazono, K., and Kato, M. (2002) c-myc is a downstream target of the Smad pathway. *J Biol Chem.* 277(1), 854-861.

インスリンシグナルの骨軟骨形成過程における役割の解明 — IRS-1 ノックアウトマウス骨折モデルを用いた検討 —

阿久根 徹 (東京大学整形外科), 川口 浩 (東京大学整形外科),
緒方 直史 (東京大学整形外科), 星 和人 (東京大学整形外科),
下赤 隆 (東京大学整形外科), 星地重都司 (東京大学整形外科),
中村 耕三 (東京大学整形外科)

【研究要旨】

後縦靭帯骨化症 (OPLL) 患者では, 反応性のインスリン分泌が亢進している者ほど OPLL 骨化傾向が高い。そこでインスリンシグナルの骨軟骨形成過程における役割を明らかにする目的で, インスリン受容体基質 (IRS)-1 ノックアウトマウス (IRS-1^{-/-}マウス) 骨折モデルにおける骨軟骨形成過程を解析した。IRS-1^{-/-}マウスでは骨折部位仮骨が低形成で骨癒合率が低く, 組織学的には骨折部位軟骨組織の十分な増殖なしに分化が進行することが明らかとなった。IRS-1^{-/-}培養軟骨細胞では, インスリンや IGF-I 刺激による増殖能と基質合成能の促進作用が抑制されていた。以上より, IRS-1 を介するシグナルは骨折治癒過程における初期の軟骨細胞増殖と基質合成に特に重要であることが明らかとなった。IRS-1 は OPLL などの異所性骨化の骨軟骨形成過程において抑制治療のターゲット分子として利用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

後縦靭帯骨化症 (OPLL) 患者では, 反応性のインスリン分泌が亢進している者ほど骨化傾向が高いことを我々は報告してきた。インスリンは, 細胞膜に存在するレセプターに結合した後, インスリンレセプターから細胞内のシグナル伝達分子に情報を伝えるが, その主要な分子がインスリン受容体基質 (Insulin receptor substrate: IRS) として知られている。IRS は, インスリンおよび IGF-I の受容体キナーゼの共通の基質であり, 種々の細胞内の多岐にわたる作用に関与することが報告されている。インスリンと IGF-I はともに強力な骨形成因子として知られているが, これらのシグナルの骨軟骨系細胞内における作用メカニズムは詳しく明らかにされていない。

ところで OPLL は, 後縦靭帯内の未分化間葉系細胞から生じた軟骨細胞が増殖・分化したのち, 骨組織へ置換されるいわゆる内軟骨性骨化の過程をたどるとされている。そこで, 未分化間葉系細胞からの骨軟骨形成過程におけるインスリンシグナルの役割を明らかにすることを目的として, 門脇らが作製した IRS-1 ノックアウトマウス (IRS-1^{-/-}マウス) を用いて脛骨骨折モデルを作製し, 骨折治癒過程の解析をおこなった。また IRS-1^{-/-}マウスの長管骨成長軟骨より軟骨細胞を分離し, 増殖能・分化能の検討をおこなった。

B. 研究方法

骨折モデルの作製および *in vivo* での検討。8 週齢の WT および IRS-1^{-/-}マウスを麻酔下に, Bone saw により脛骨骨幹部中央を横切した後, スパイナル針を用いて髓内釘固定し, 骨折モデルを作製した (図 1)。対側の脛骨は骨切をおこなわずスパイナル針による髓内釘固定のみをおこない対照とした。経時的に 1 週毎に, 軟 X 線撮影をおこなった。また同時に, 形成された仮骨の大きさ (Area) および骨量 (Bone mineral content: BMC) を測定した。骨折後 1 週の時点における骨折部脱灰組織標本を作成し, Toluidine blue 染色, Type X コラーゲン染色, PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 染色, TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 染色をそれぞれおこない, WT および IRS-1^{-/-}マウスにおける骨折部位の組織学的検討をおこなった。

マウス長管骨成長軟骨からの軟骨細胞単離および *in vitro* での検討。4 週齢の WT および IRS-1^{-/-}マウスより脛骨・大腿骨を採取し, 軟部組織を完全に除去した後, 注射針を成長板に刺入することにより骨端線離開をおこし, 成長軟骨面を露出させた骨標本を得た。これを 0.3% コラゲナーゼ含有 DMEM 中にて 37°C 4 時間処理し, 単離細胞を回収した。得られた細胞を用いて, 増殖能および分化能を検討した。増殖能は, ³H-thymidine の取込により評価し, インスリン (100 nM), IGF-I (10 nM) 刺激に対する増

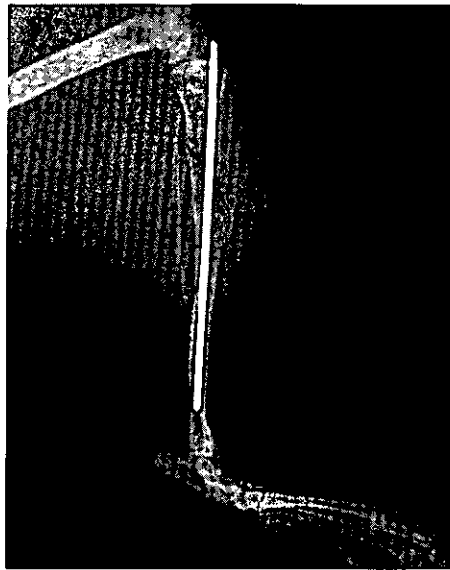


図1 骨折モデル。8週齢マウスの脛骨骨幹部中央を骨切し，髓内釘固定をおこなった。

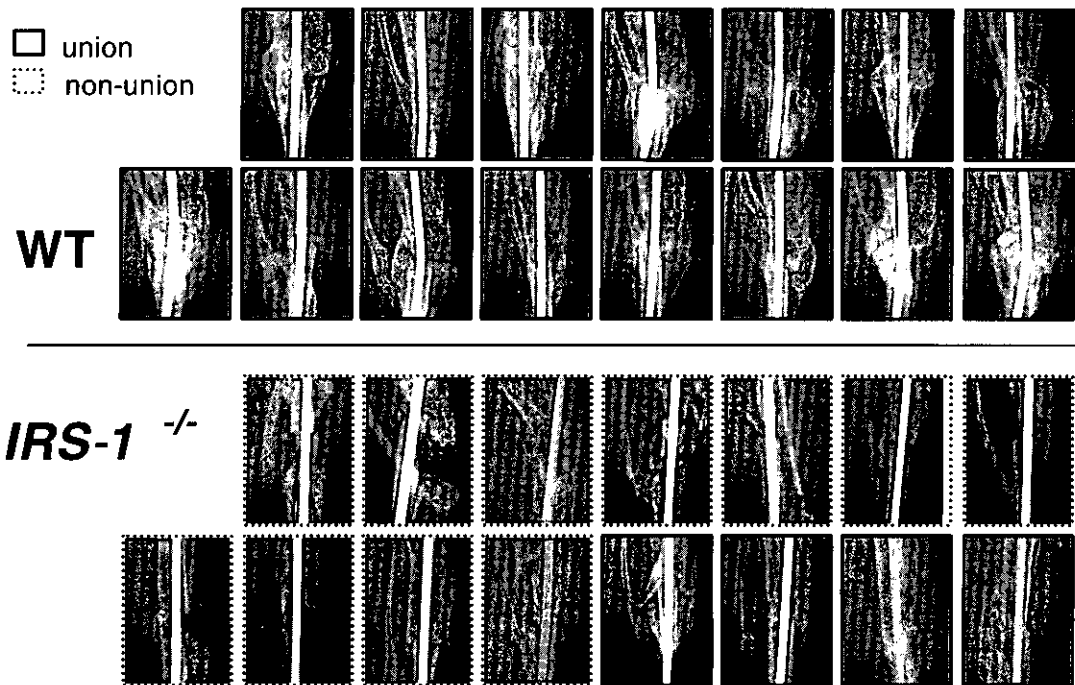


図2 骨折後3週 X-P像。WTでは15例全例が骨癒合したが，IRS-1^{-/-}マウスにおける骨癒合例は4例のみであった。

殖能促進作用への影響を検討した。また分化能は，Alcian Blue 染色により初期分化における基質合成能を評価し，同様にインスリン，IGF-I刺激による基質合成能促進作用への影響を検討した。

C. 研究結果

*In vivo*での解析：

経時的骨折治癒過程の観察。8週齢の WT および

IRS-1^{-/-}マウス各 15 匹に脛骨骨折を作製し，1 週毎に軟 X 線撮影をおこない骨折治癒過程を観察したところ，WT マウスでは骨折後 1 週より仮骨形成が認められ，3 週までに全例で骨癒合が得られた（図2上）。その一方，骨折後3週における IRS-1^{-/-}マウスの骨癒合例は4例のみで，11 例（73%）は偽関節を呈していた（図2下）。この傾向は，その後経時的に観察した結果でも同じで（図3），IRS-1^{-/-}マウスは高

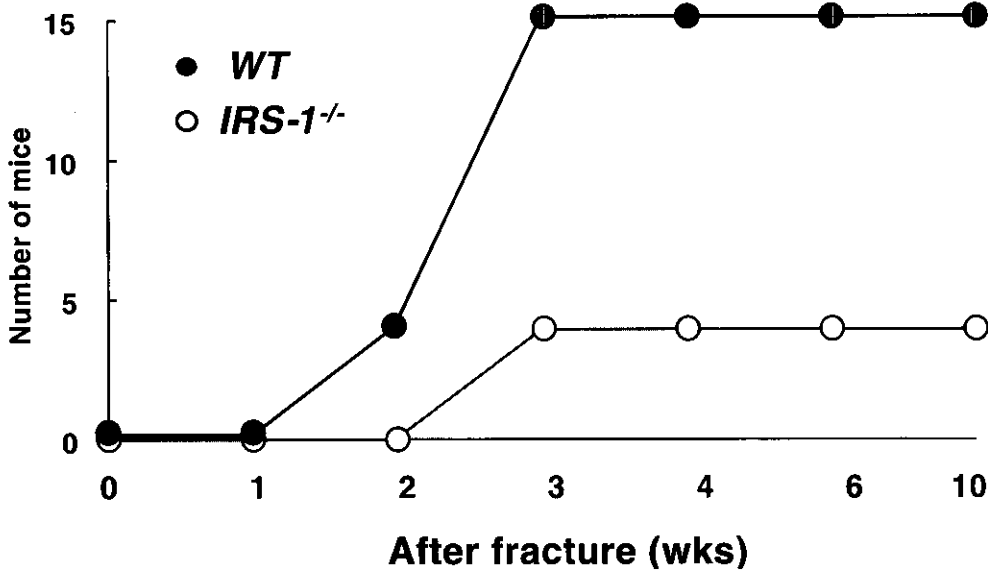


図3 経時的骨折癒合率。骨折モデル15例の骨癒合数の経時的変化。

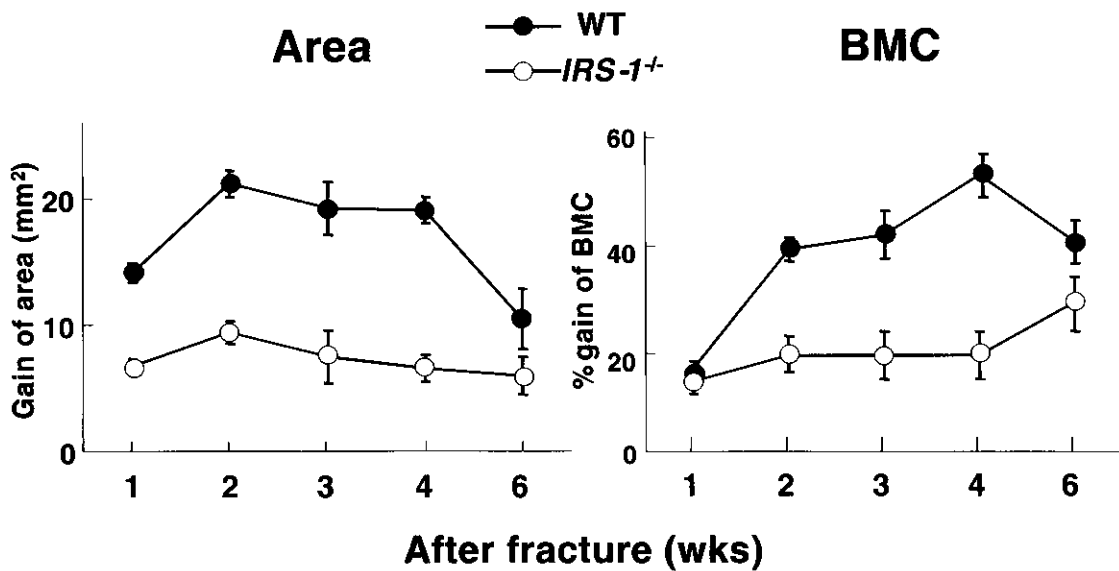


図4 経時的仮骨形成。骨折部に形成された仮骨の大きさ (Area)・仮骨量 (BMC) とともに, WT に比較し IRS-1^{+/-} では低下を示した。

率に偽関節を示すことが明らかとなった。一方, 経時的に骨折部仮骨の大きさ (Area) および骨量 (BMC) を測定した結果は図4に示す通りで, IRS-1^{+/-} マウスでは骨折部の仮骨の大きさも骨量もともに WT に比べて低下していた。

組織学的検討。骨折後1週の骨折部脱灰組織標本を作製し, Toluidine blue 染色をおこなったところ, WT と異なり IRS-1^{+/-} マウスではメタクロマジーを示し (図5左), また Type X コラーゲン陽性の肥大化軟骨様細胞が IRS-1^{+/-} マウスにおいて観察された

(図5右)。一方, 同様に骨折後1週における同部位の PCNA 染色では, WT の軟骨様組織では陽性細胞が多くみられたのに対して, IRS-1^{+/-} マウスの軟骨様組織ではほとんど存在せず (図6左), 反対に TUNEL 染色における陽性細胞は, WT の軟骨様組織ではみられないのに対して, IRS-1^{+/-} マウスの軟骨様組織では多く観察された (図6右)。以上より, IRS-1^{+/-} マウスでは, 骨折後に出現した軟骨様組織が十分に増殖することなしに, 肥大化軟骨様細胞への分化やアポトーシスが進行するため, 仮骨形成量

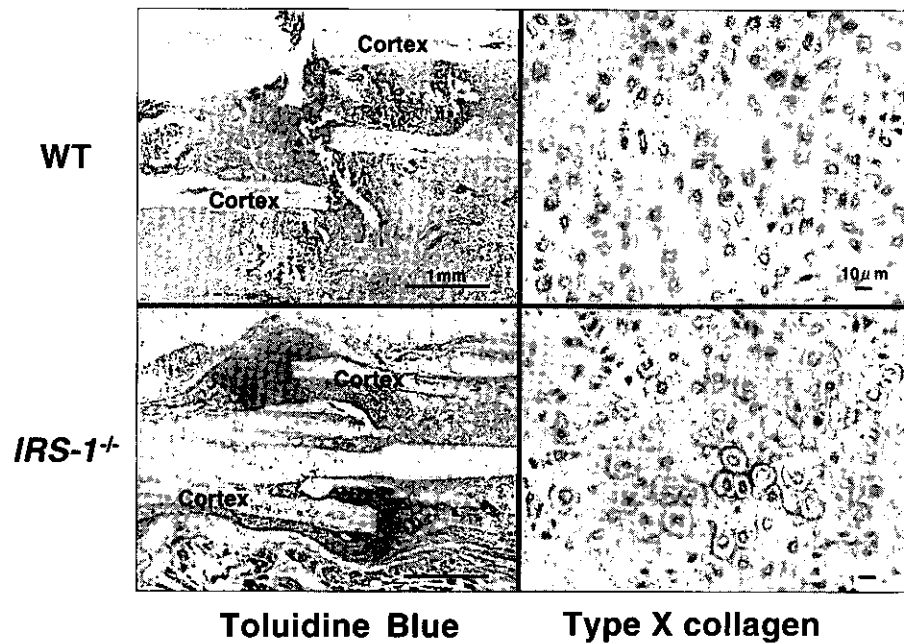


図5 骨折部位 (1w) における軟骨様組織の分化。骨折後1週の時点で, IRS-1^{-/-} ではWTに比べてメタクロマジーが強く(左), また Type X コラーゲン陽性の肥大軟骨様細胞が出現していた(右)。

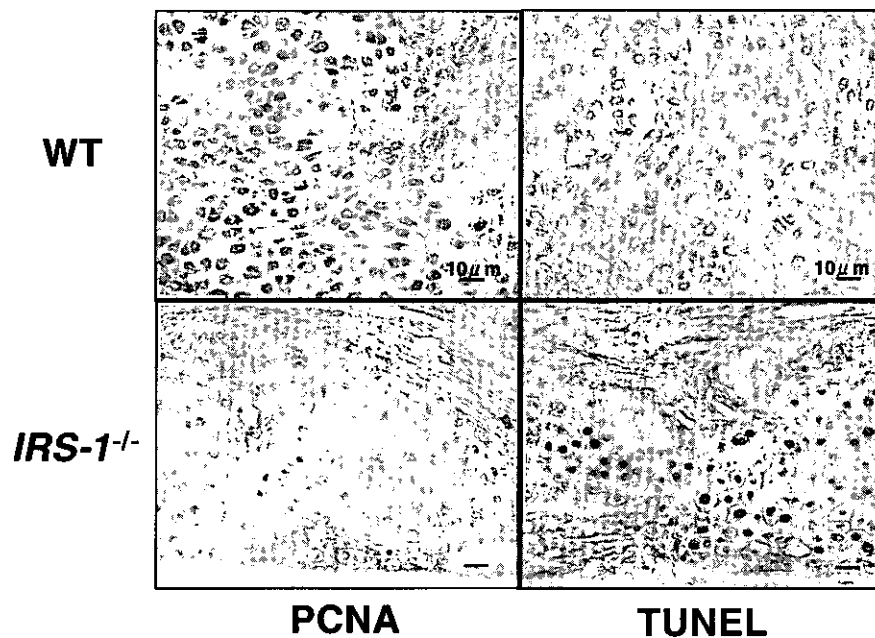


図6 骨折部位 (1w) における増殖とアポトーシス。WTと異なり IRS-1^{-/-} では, 骨折後1週の時点で, PCNA 陽性細胞がほとんどない(左) 一方, TUNEL 陽性を示す細胞が多かった(右)。

が少なく, 高率に偽関節を呈することが明らかとなった。

In vitroでの解析:

培養軟骨細胞の増殖能。4週齢の WT および IRS-1^{-/-} マウスの長管骨成長軟骨由来の培養軟骨細

胞における増殖能を, ³H-thymidineの取込により評価し, インスリン (100 nM), IGF-I (10 nM) 刺激に対する増殖能促進作用への影響を検討したところ, WT由来の軟骨細胞では, thymidineの取込がそれぞれ1.4倍, 1.8倍に増加した(図7)。それに対して, IRS-1^{-/-} 由来の軟骨細胞ではインスリンおよび

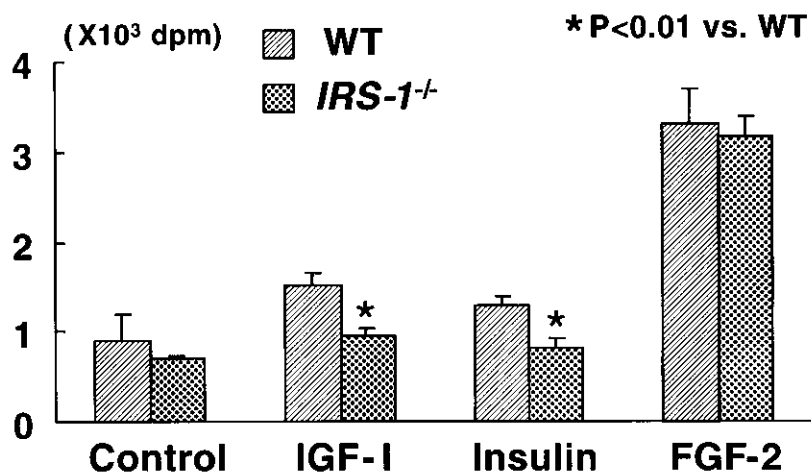


図7 [3H]-thymidine 取り込み試験。IRS-1^{-/-} 軟骨細胞の増殖能は、IGF-I/インスリン刺激により促進されない。

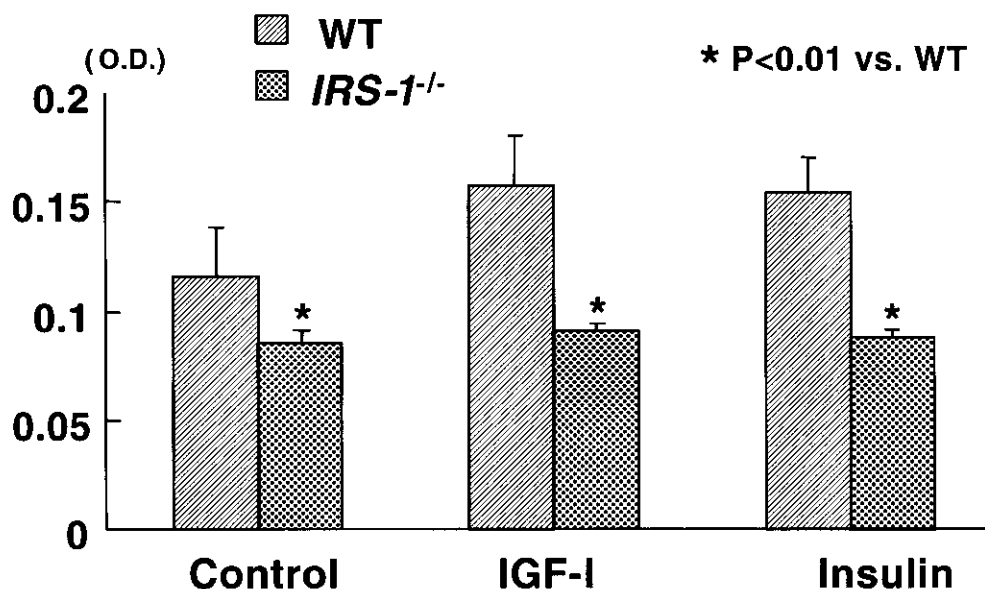


図8 Alcian blue 染色 (定量)。IRS-1^{-/-} 軟骨細胞の初期分化における基質合成能は、IGF-Iやインスリン刺激により促進されない。

IGF-I 刺激に対する取込の増加は、それぞれ 1.2 倍、1.3 倍にとどまり、IRS-1^{-/-} 由来の軟骨細胞では、インスリン、IGF-I 刺激に対する増殖能の促進作用が抑制されていた (図7)。

培養軟骨細胞の基質合成能。培養細胞が confluent に達した後、インスリン (100 nM)、IGF-I (10 nM) を添加した medium へ交換し、3 週後に Alcian Blue 染色をおこなったところ、WT 由来の培養軟骨細胞では、インスリン、IGF-I 刺激に対して、Alcian Blue 染色による基質合成能が促進していた (図8)。しかし、IRS-1^{-/-} 由来の細胞では、インスリン、IGF-I 刺激に対する基質合成能の促進はほとん

どみられなかった (図8)。

以上より、IRS-1^{-/-} 由来の培養軟骨細胞は WT 由来の細胞に比較して、インスリンおよび IGF-I 刺激による増殖能の促進作用が低下するとともに、初期分化の指標である Alcian Blue 染色による基質合成能の促進作用も同様に低下していることが明らかとなった。

D. 考察

OPLL は、中年以降の日本人の約 3% に単純レントゲンレベルでその存在が確認され、剖検レベルではそれよりもはるかに高率に存在すると考えられて

いる Common disease である。OPLL で臨床的に問題となるのは、OPLL の骨化巣増大による脊髄圧迫から麻痺を生じる例であるが、それは OPLL 全体のごく一部にすぎない。OPLL は多因子疾患とされており、骨化巣の発現・進展には遺伝的因子や環境因子を含む種々の因子が関与していると考えられているが、OPLL による重篤な脊髄麻痺を予防するためには、OPLL の骨化巣の増大に関与するリスクファクターを明らかにし、そのメカニズムを細胞・分子レベルで詳細に解明し、骨化進展を抑制する手段の開発の可能性につなげていくことが極めて重要である。

OPLL 患者には、糖代謝異常が関与しているとの指摘が以前よりなされていたが、糖代謝関連各因子と OPLL 骨化傾向との関連を検討した結果、糖尿病の程度と OPLL 骨化傾向は、むしろ負の相関性を示すことが明らかとなった。すなわち、耐糖能分類で正常型と境界型を示す者に OPLL 骨化傾向が高いのに対して、糖尿病型に属する者は OPLL 骨化傾向がむしろ低いという結果が得られた。糖代謝関連因子の中で、糖尿病の指標とされる空腹時血糖値やヘモグロビン A1c と OPLL 骨化傾向との関連性はなかった。正常型と境界型のような軽度耐糖能異常者において OPLL 骨化傾向が高いという事実を更に詳しく検討していくと、正常型や境界型に属する者の中でも、高い OPLL 骨化傾向を示すものと低い者とがあり、その両者を分ける指標がインスリン分泌反応性であることが明らかとなった。

インスリンは膵臓のβ細胞から分泌され、筋肉・肝臓・脂肪を主要標的臓器とし、これらの細胞における糖代謝調節作用との関係で、血中インスリン分泌量がコントロールされている。正常型や境界型で高い OPLL 骨化傾向を示す者は、空腹時におけるインスリン値は特に異常を示さないが、食事摂取など糖負荷がかかった状態で血糖値が上昇した場合に、それを下げるために多量のインスリン分泌を必要とする者である。すなわち、まず主要標的臓器におけるインスリン抵抗性が存在し、かつそれを代償する十分なインスリン分泌が可能で、インスリン分泌反応性の亢進した者ほど、OPLL 骨化傾向が高いことが明らかとなった。

インスリンは、骨形成因子として強力な Anabolic function を有することが知られているが、このような糖負荷時に間欠的に分泌される高濃度のインスリンが、脊椎後縦靭帯の中に存在する未分化間葉系細胞から軟骨細胞さらには OPLL 骨化巣にいたる一連

の骨軟骨形成過程に、細胞・分子レベルでどのように作用するかについては明らかではない。我々は、インスリン作用の細胞・分子レベルでのメカニズムの解明を進めるため、インスリン受容体基質 (IRS) という分子に着目した。IRS には IRS-1 と IRS-2 が主なものとして知られている。そこでまず、それぞれの分子を介するシグナルの骨代謝調節機構における役割を検討した結果、IRS-1 を介するシグナルは骨代謝回転の維持に必須で、その欠損により著明な低回転型骨粗鬆症を呈することを明らかにし、また、IRS-2 を介するシグナルは、骨芽細胞内で骨形成を促進する一方 RANKL 発現による破骨細胞形成支持能を抑制することで、骨形成と骨吸収とのバランスを維持する重要な作用をもつことを明らかにし、それぞれ過去に報告をおこなってきた。

今回の検討では、IRS-1^{-/-} マウスにおける骨折モデルの解析を通じて、未分化間葉系細胞からの骨軟骨形成過程における IRS-1 を介するシグナルの役割に関して検討をおこなったが、その結果、IRS-1^{-/-} マウスでは骨折部における軟骨増殖が十分におこらず仮骨形成量低下のため高率に偽関節を呈することが明らかとなり、IRS-1 を介するシグナルが初期の軟骨細胞の増殖と基質合成に特に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

今後は更に、細胞間および細胞内におけるシグナル伝達機構とその作用機序の解明を進め、OPLL などの異所性骨化の発現・進展機構を細胞・分子レベルで更に明らかにしてゆき、将来的には OPLL 骨化進展抑制治療の可能性につなげていきたいと考えている。

E. 結論

IRS-1 を介するシグナルは、骨折治癒過程における初期の軟骨細胞増殖および基質合成に重要である。IRS-1 シグナルの抑制は OPLL などの異所性骨化の骨軟骨形成過程の抑制治療のターゲットとなり得る可能性が示唆された。

[参考文献]

- 1) Akune T, et al : Insulin secretory response is positively associated with the extent of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. J Bone Joint Surg Am. 83-A : 1537-1544, 2001.
- 2) Ogata N, et al : Insulin receptor substrate-1

in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover. *J Clin Invest.* 105 : 935-943, 2000.

3) Tamemoto H, et al : Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372 : 182-186, 1994.

4) Kubota N, et al : Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes* 49 : 1880-1889, 2000.

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Akune T, Ogata N, Seichi A, Ohnishi I, Nakamura K and Kawaguchi H. Insulin secretory response is positively associated with the extent of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J Bone Joint Surg Am.* 83-A : 1537-1544, 2001.

満腹中枢破壊ラットの脊柱靭帯における骨化関連因子に関する免疫組織学的検討（経過報告）

木村 大（東京医科大学整形外科学教室），今給黎篤弘（東京医科大学整形外科学教室），
山本 謙吾（東京医科大学整形外科学教室），町田 英明（東京医科大学整形外科学教室），
中谷 知薫（東京医科大学整形外科学教室），反町 武史（東京医科大学整形外科学教室），
海老原善郎（東京医科大学第二病理学教室）

【研究要旨】

新生仔ラットに Monosodium Glutamate (MSG) を投与すると、視床下部満腹中枢が破壊され、後天的にインスリン非依存性糖尿病が発症することが知られている。本研究では、MSG 投与ラットを用い、糖代謝異常と脊柱靭帯骨化との関係を免疫組織学的に検討した。MSG 投与ラットは、4ヶ月齢頃より空腹時血糖値および血中インスリン濃度が、高い値を示したが、4ヶ月齢までに、椎間板、脊柱靭帯に明らかな細胞増殖等の変化は認めなかった。また、免疫染色でも、インスリン、IGF-I、CTGF とともに、有意な発現は認めなかった。

A. 研究目的

脊柱靭帯骨化の発生機序は未だ不明な点が多いが、耐糖能異常、特に高インスリン血症に伴い発生する頻度が高いことが近年報告されている。我々は昨年、脊柱靭帯骨化自然発生モデルであり、レプチンレセプター遺伝子のミスセンスによるレセプター構造異常に起因する先天性インスリン非依存性糖尿病（以下NIDDM）を発症する Zucker Fatty Rat（以下ZFR）を使用し、脊柱靭帯骨化にインスリン、IGF-I が関与することを報告した。

以前より新生仔ラットに Monosodium Glutamate（以下MSG）を投与することにより、満腹中枢である視床下部腹内側核が破壊され、後天的にNIDDMが発症することが知られている。今回、MSG投与ラットを使用して、後天的に発症した糖代謝異常と骨化関連因子との関係を免疫組織学的に検討した。

B. 研究方法

実験動物として、初回妊娠のWister系ラットより分娩された新生ラットを用い、出生日より5日間MSG（4mg/g体重/日）を連日皮下投与したラット群（MSG投与群）、および同量の生理食塩水を投与したラット群（生食投与群）を対象とし、両群とも生後28日で完全に離乳させ、温度、湿度、照明時間を一定の条件下で飼育した。実験には生後1～4ヶ月齢の雄性ラット各群12匹を使用し、以下の項目につき比較検討した。

1. 空腹時血糖値、血中インスリン、IGF-I濃度の

測定

ジエチルエーテルにて吸入麻酔下に開胸後、左心室より採血した。採血後、4%パラフォルムアルデヒドにて還流固定とした。

2. 免疫染色

還流固定後、脊椎を採取し、さらに4%パラフォルムアルデヒドにて24時間固定した。固定後、20% EDTAにて1週間脱灰、パラフィン包埋し、4 μ mの連続矢状切片を作製した。作製した切片に対し、HE染色、トルイジンブルー染色、および抗インスリン抗体、抗IGF-I抗体、抗IRS-I抗体、抗CTGF抗体、抗osteocalcin抗体、抗osteopontin抗体を用いてABC法（ニチレイ社製SAB-POキット）にて免疫染色を施行した。

（倫理面への配慮）

東京医科大学動物実験倫理委員会の規定に基づき実験を施行した。

C. 研究結果

生後4ヶ月齢まで観察を続けた。

- 空腹時血糖値は、4ヶ月齢頃よりMSG投与群の方が生食投与群に比し、やや高い値を示した（図1）。血中インスリン濃度も、4ヶ月齢より高い値を示した（図2）。血中IGF-I濃度は、各月齢とも明らかな差は認めなかった（図3）。
- HE染色では、4ヶ月齢までに明らかな椎間板の変性は認めない。トルイジンブルー染色

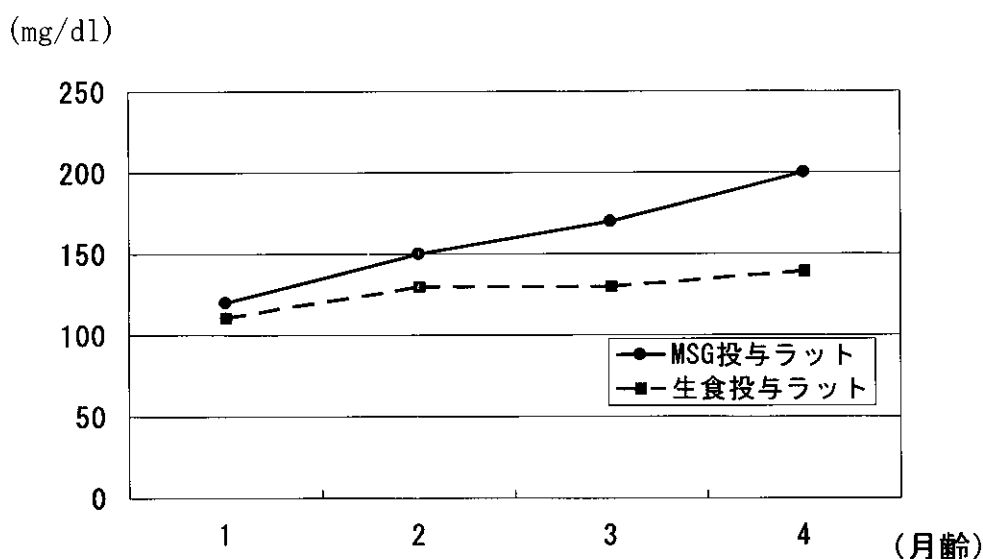


図1 空腹時血糖値

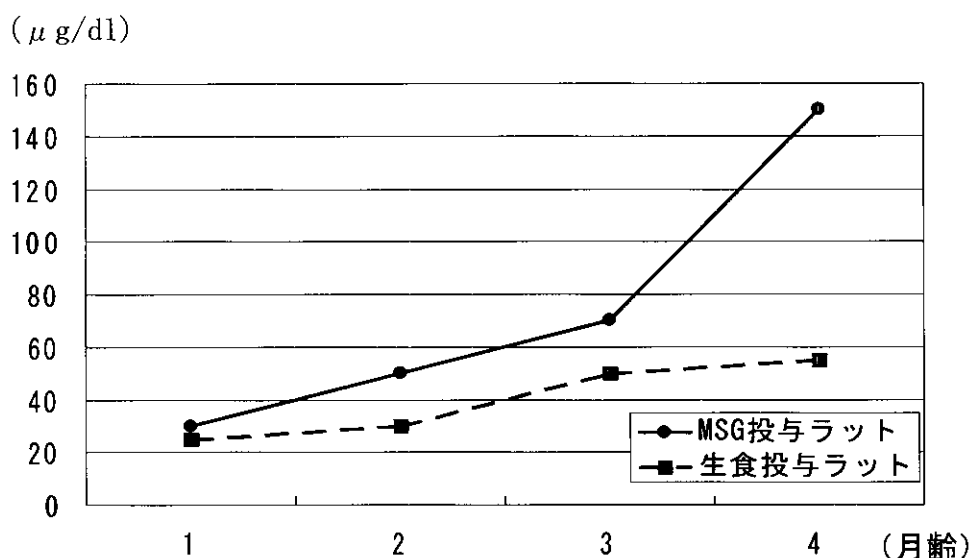


図2 血中インスリン濃度

においても、軟骨様細胞の増勢等の所見は認めなかった。免疫染色では、4ヶ月齢までにインスリン、IGF-I、IRS-I、CTGF、osteopontin、osteocalcinの有意な発現は認めなかった。

D. 考察

L型アミノ酸であるMSGを新生仔動物に投与すると、満腹中枢である視床下部腹内側核が選択的に破壊され、高度の肥満を呈することがこれまで報告されてきた。Olneyによれば、出生直後のマウスにMSGを皮下投与したところ、わずか数時間で視床下部腹内側核が壊死に陥ったと報告しており、古川は

MSG投与マウスが8週齢頃より肥満傾向および高インスリン血症を呈することを報告している。今回我々は、Wister系新生仔ラットにMSGを皮下投与し、4ヶ月齢より軽度の高血糖と、高インスリン血症を認める結果を得られたが、組織学的には脊柱靭帯骨化の所見は認められなかった。

我々は昨年、脊柱靭帯骨化モデル動物であるZucker Fatty Ratを使用し、耐糖能異常と脊柱靭帯骨化との関連を報告した。Zucker Fatty Ratは、1ヶ月齢より軽度の高血糖を認め、2ヶ月齢より高インスリン血症を呈し、4ヶ月齢より腹側椎間板線維輪部に紡錘形細胞と軟骨細胞様細胞の増殖を認め、こ

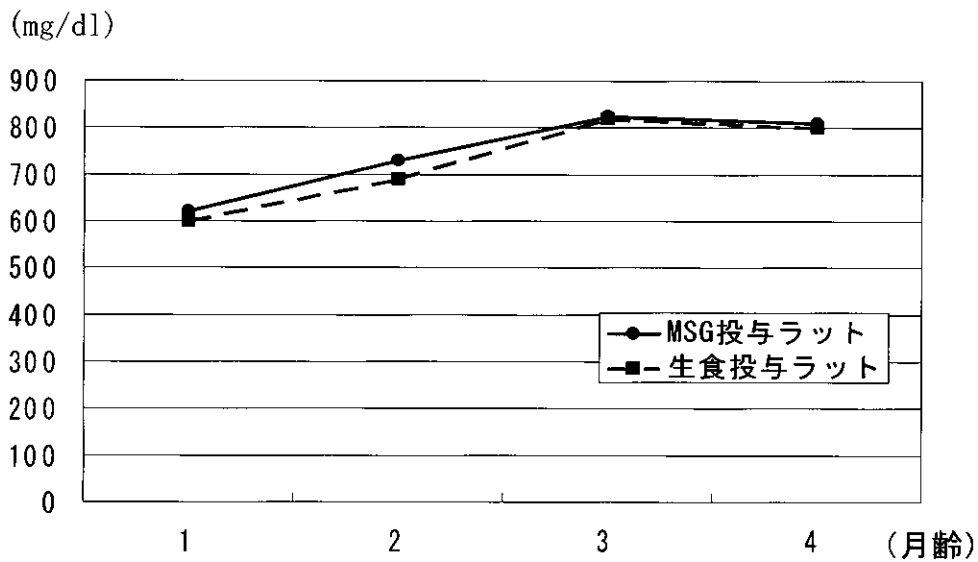


図3 血中IGF-I濃度

の過程において、インスリンがインスリンレセプターおよびIGF-Iレセプターを介し細胞増殖作用をもたらすことを報告した。

今回のMSG投与ラットとZucker Fatty Ratとの結果の差異を比較すると、一つには高インスリン血症発症後の観察期間である。Zucker Fatty Ratは、高インスリン血症発症後約2ヶ月で、椎間板に変化が認められるが、今回MSG投与ラットでは、高インスリン血症発症直後までしか観察できず、その結果、椎間板の変化を認めていないことが考えられる。そのため、今後高月齢のMSG投与ラットに対し、調査が必要と考えられた。

第二の点は、遺伝的骨化素因の有無である。これまで幾種かのNIDDMモデル動物の長期観察結果の報告では、脊柱靭帯骨化の所見が観察されないことが多いことが報告されている。臨床報告においても高インスリン血症の患者の大部分に脊柱靭帯骨化が認められるわけではない。これらを考慮すると、インスリンは、骨化そのものよりむしろ、遺伝的要素を含めた何らかの骨化素因が存在する時に骨化増強因子として作用する可能性が示唆される。今回観察期間が短いため今後、高月齢ラットに対し調査し、報告する予定である。

E. 結論

MSG投与ラットでは4ヶ月齢以降、高血糖、高インスリン血症を認めたが、4ヶ月齢までにおいては明らかな脊柱靭帯骨化の所見は認めなかった。今後更に、高月齢のラットに対し調査し報告する。

〔参考文献〕

- 1) Olney, J. W. : Brain lesion, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, 164 : 719-721, 1969
- 2) 古川宣明 : Monosodium L-glutamate 過剰投与による肥満マウスの糖代謝に関する研究 1. 肝の糖質生能および解糖能について. *京府医大誌*:90: 339-350, 1981.
- 3) 田中 恵 : Zucker Fatty Ratに関する実験的脊柱靭帯骨化に関する研究. *東京医大雑誌*: 52(1): 19-32, 1994.
- 4) 今給黎篤弘ら : Zucker Fatty Ratの脊柱靭帯骨化における免疫組織学的検討. 脊柱靭帯骨化症に関する調査研究班平成12年度研究報告書 : 69-74, 2001.
- 5) Yano H, et al. : Effects of insulin on in vitro bone formation in fetal rat parietal bone. *Endocrine Journal*. 41(3) : 293-300, 1994

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

脊柱靱帯骨化症の起点となる石灰化機構に関する微細形態学的・分子生物学的研究

星 和人 (東京大学医学部整形外科), 川口 浩 (東京大学医学部整形外科),
星地亜都司 (東京大学医学部整形外科), 中村 耕三 (東京大学医学部整形外科)

【研究要旨】

脊柱靱帯骨化症の初期病態を明らかにするため、骨形成蛋白を用いたマウス黄色靱帯骨化症モデルを作成し、形態学的に解析した¹⁾。その結果、刺激を受けた靱帯付着部の線維芽細胞が軟骨細胞様細胞へと分化し、さらに軟骨化した靱帯組織が内軟骨性骨化で異所性骨へと変化する過程で、軟骨細胞様細胞の石灰化が異所性骨化の起点となることが明らかとなった。石灰化現象は、発生・発育期の生理的骨形成においても観察されるが、カルシウムやリン酸が過飽和状態で存在している生体環境において、骨などの特定の部位にのみ石灰化が生じる機構は依然不明な点が多い。石灰化の分子機構を明らかにし、脊柱靱帯骨化症の発症機構解明の一助とするためには、有機質の形態・局在変化に伴うミネラル微小環境の変化を解析する必要があると思われる。本稿では、微細形態学的手法で明らかになった有機質とミネラルの相互関係も、あわせて報告する。

A. 研究目的

脊柱靱帯骨化症は言うまでもなく脊椎外科の主要疾患であるが、異所性骨化という点で生物学的にも極めて興味深い現象である。成因に関しては、複数の原因遺伝子と環境因子の相互作用によって発症する多因子遺伝子・生活習慣病であると考えられているが、依然不明な点も多い。

臨床病理学的検索においては、骨形成に深く関与する蛋白である bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) と transforming growth factor- β (TGF- β) を含む TGF- β スーパーファミリーが脊柱靱帯骨化症の発症に何らかの因果関係があると予想される²⁾。実際、Miyamoto et al は実際に、粗製 BMP を pellet 状にしてマウスの腰椎の背部脊髄硬膜外腔に外科的に移植し、粗製 BMP が in vivo で靱帯に骨化を誘導できることを確認した³⁾。

筆者は、異所性骨化現象のモデルである脊柱靱帯骨化症の解析が、骨の形成・再生機構を明らかにする上で重要な情報を提供すると考え、脊柱靱帯骨化症における靱帯の骨化機構解明の一助とする目的で、BMP-2 を用いた実験モデルを作成した。本稿では、この実験モデルが靱帯の骨化を再現し、その過程を微細形態学的に解析できる事を紹介するとともに、このモデルにより得られた形態学的知見を報告する。また、細胞外基質において起こる生物学的石灰化現象は内軟骨性骨化や膜性骨化における主要な過程の一つであり、異所性骨化においても重要な発症起点となる。生物学的石灰化機構を解明するため、

新しいタイプの電子顕微鏡を用いて骨の石灰化に関する微細形態学的研究を行い、新しい知見を得たので併せて報告する。

B 研究方法および C 実験結果

BC-1 脊柱靱帯骨化症実験モデルの作成

12 週齢の雄 ddY マウスの腰椎黄色靱帯に注射針を刺入し、recombinant human BMP-2 40 μ g/100 μ l (山之内製薬株式会社からのご供与) を浸潤した。対照群には同方法で溶解液のみを 100 μ l 注入した。BMP-2 注入直後すなわち 0 週、あるいは注入後 1, 2, 3, 6 週に屠殺し、腰椎黄色靱帯を Azan 染色組織切片で経時的に観察した¹⁾。

BMP-2 を注入したマウス 50 匹のうち 14 匹に黄色靱帯またはその周囲に軟骨及び骨形成が観察された。その他のマウス 36 匹では、黄色靱帯以外の組織の反応、すなわち筋肉や皮下組織の軟骨化あるいは骨化が見られたか、もしくは全く反応が見られなかった。脊柱管の狭窄率は BMP-2 注入 1 週では 10% 程度、2 週では 20%、3 週では 30—50% の狭窄が見られたが、6 週では 10% 以下に減少していた。対照群の黄色靱帯では特異的な反応は見られなかった。

BMP-2 注入後 0 週あるいは対照群の Azan 染色像では、黄色靱帯は、頭側と尾側の椎弓をつなぐ線維性結合組織として観察され、正常組織と同様な像を呈していた (図 1)。BMP-2 注入後

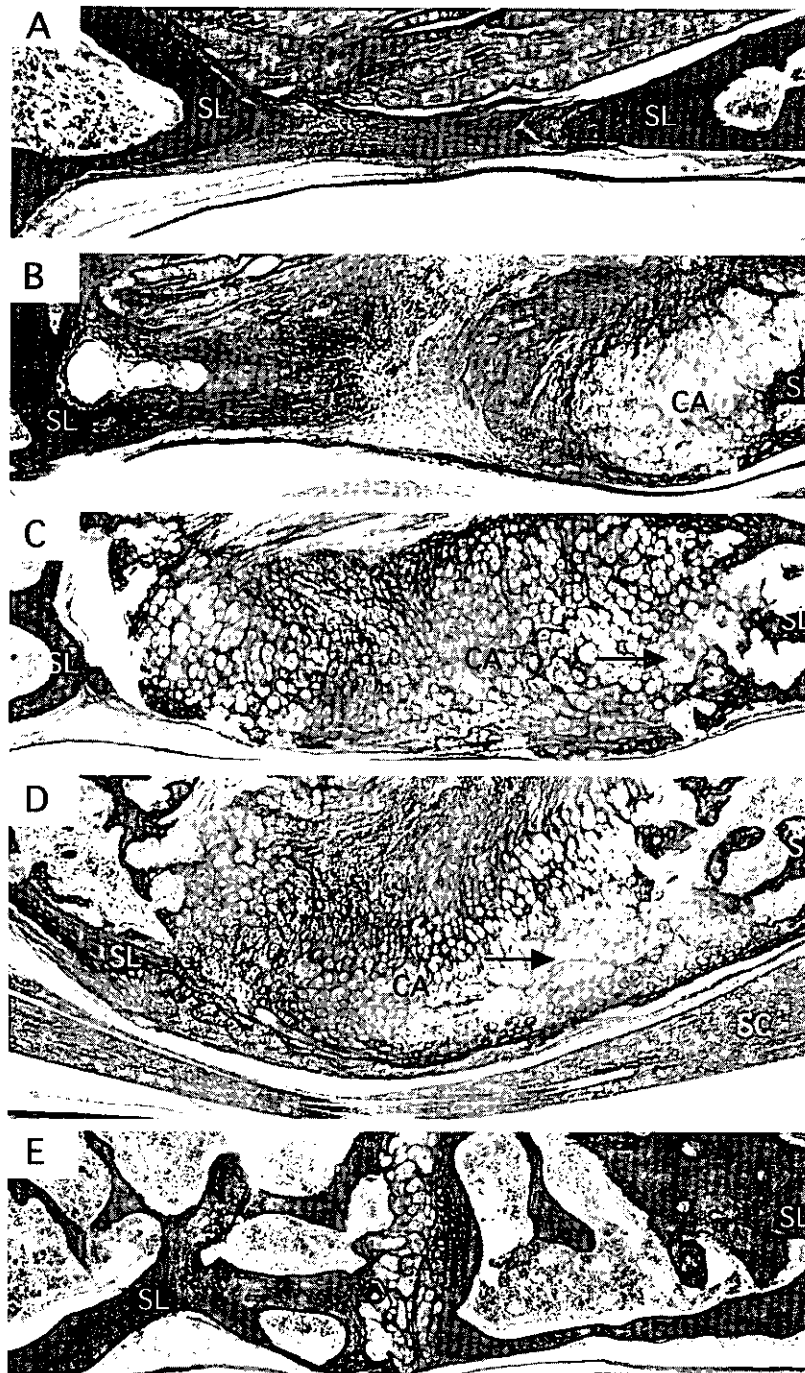


図1 黄色靱帯の組織学的変化, Azan 染色

- A, BMP-2 注入後 0 週: 黄色靱帯はコラーゲン線維に富んでいるため青色に濃染される。
- B, 1 週: 黄色靱帯の椎弓への付着部に軟骨の形成が観察される。この領域のコラーゲン線維は著明に減少していた。靱帯の中央部でのコラーゲン線維の配列は粗造になっていた。
- C, 2 週: 靱帯組織はほぼ軟骨により置換されていた。靱帯中央部では増殖軟骨細胞様細胞が観察される一方、付着部では肥大化軟骨細胞様細胞が観察された。付着部周囲では血管侵入が見られた (矢印)。
- D, 3 週: 骨化が進行し、脊髄を圧迫していた。両側の靱帯付着部に血管侵入が観察される (矢印)。靱帯中央部は肥大化軟骨細胞様細胞で占められており、ごく一部に増殖軟骨細胞様細胞が見られる。
- E, 6 週: BMP により誘導された軟骨は、中央部にわずかに残るのみでほぼ骨に置換されていた。
- CA: 軟骨組織, D: 脊髄硬膜, M: 筋肉, SC: 脊髄神経, SL: 椎弓 (文献1より改変)

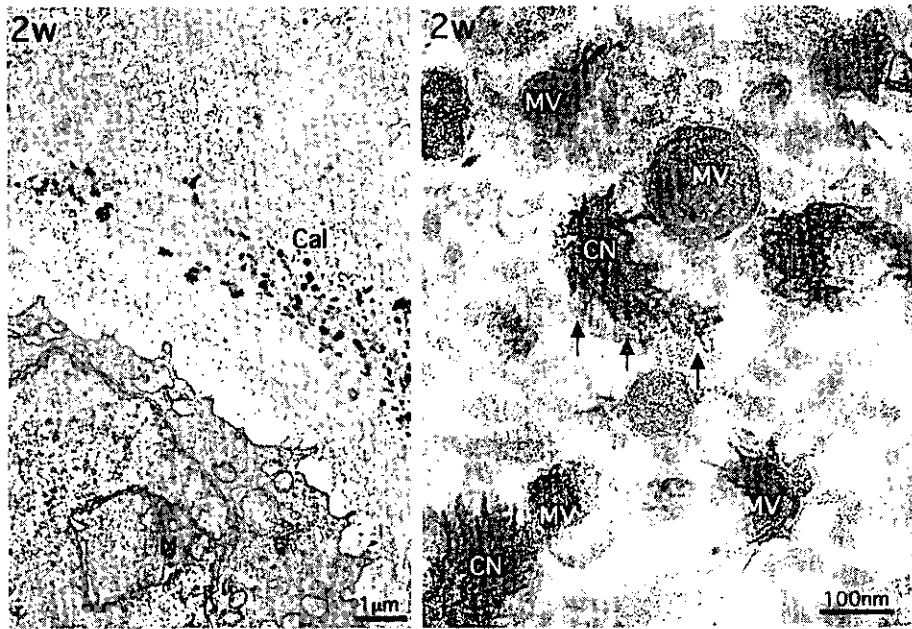


図2 BMP注入後2週の黄色靱帯の微細形態

左：細胞の肥大化が観察され、硝子軟骨における肥大化軟骨細胞様の像を呈した。

右：肥大化軟骨細胞様細胞周囲の石灰化領域では、直径30nmから数百nmの基質小胞が見られ、それらのいくつかは針状結晶を有していた。(文献4より引用)

1週では靱帯付着部で、線維成分が減少し、軟骨が出現した。また靱帯中央部でも線維芽細胞が増殖していた(図1)。注入後2週では、靱帯組織は軟骨組織に置換されていた。これらの軟骨組織には、増殖軟骨細胞及び肥大化軟骨細胞様細胞が観察された。この時期の靱帯中央部の多くの細胞は増殖軟骨細胞様細胞の形態を呈している一方、靱帯付着部の細胞は肥大化軟骨細胞様細胞の像を呈していた。さらに、靱帯付着部周辺には、血管侵入が観察された(図1)。3週ではBMP-2により誘導された骨及び軟骨による脊髄への圧迫が著明となった(図1)。6週では、BMP-2で誘導された軟骨はほぼ完全に骨組織で置換されており、かつての靱帯中央部にわずかな軟骨組織を残すのみとなった(図1)。

BC-2 脊柱靱帯骨化症実験モデルの解析

上記モデルにおける細胞や細胞外基質の構造変化を、脱灰あるいは非脱灰のトルイジンブルー準超薄切片組織像や透過型電子顕微鏡(TEM)像で観察した¹⁴⁾。また、細胞外基質の組成の変化を検索するために、骨基質に多く含まれているI型コラーゲンあるいは軟骨基質に特異的なII型コラーゲンの免疫組織化学を行っ

た。破骨細胞の局在を同定するために酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ(TRAP)を酵素組織化学的に検出した¹⁾。

対照群あるいはBMP-2注入0週のトルイジンブルー切片では、扁平な線維芽細胞が観察されたのに対し、BMP-2注入後1週では靱帯線維の間に軟骨細胞様細胞が散在しており、その軟骨細胞様細胞周囲にはメタクロマジーを示す領域も観察された。さらに2週では肥大化軟骨細胞様細胞が出現し、その周囲には石灰化部位と思われるトルイジンブルー陽性領域が観察された。

TEM像でも、靱帯線維芽細胞が経時的に軟骨細胞様細胞へと変化する過程が観察された。BMP-2注入後0週の細胞はI型コラーゲンと思われる太いコラーゲン細線維に囲まれた扁平な線維芽細胞であった。一方、1週では、靱帯細胞は紡錘化し、軟骨細胞様を呈した。この粗面小胞体に富んだ軟骨細胞様細胞はI型コラーゲンと思われる太いコラーゲン細線維と細い細線維が混在する細胞外基質を有しており、線維軟骨の軟骨細胞に類似した形態を呈していた。注入後2週では細胞の肥大化が観察され、これらの細胞の多くは、II型コラーゲンと思われる細

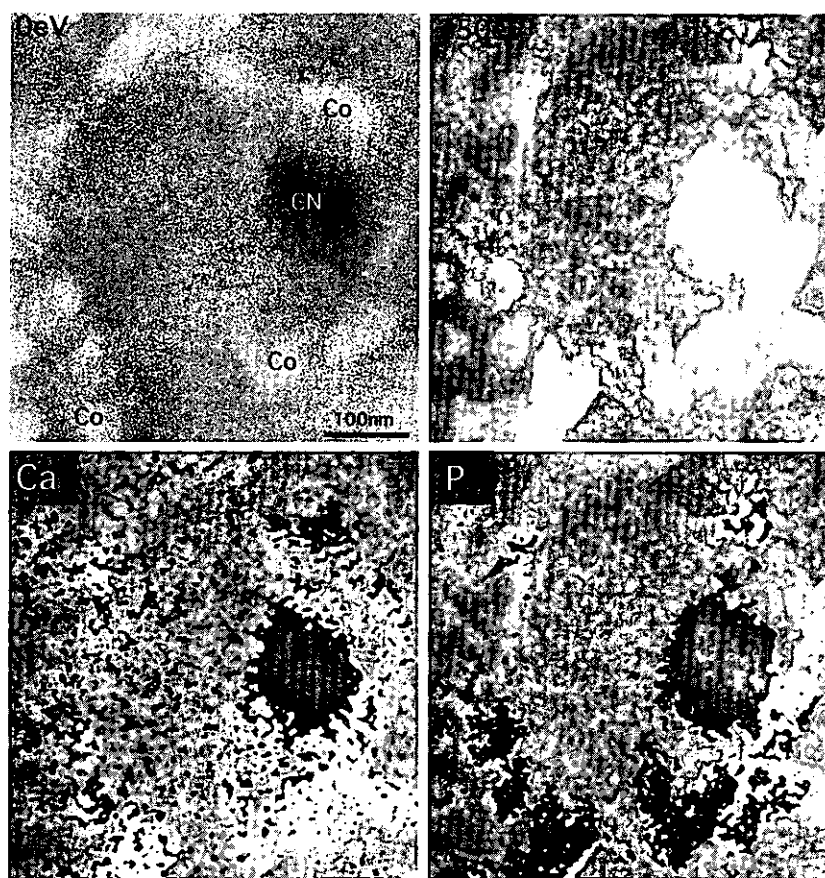


図3 EFTEMによるカルシウムおよびリンの元素マッピング
 電子エネルギー損失を0eVに設定すると高解像度のTEM像が観察され(左上), 250eVに設定すると、炭素以外の元素が光るので、通常のTEM像のnegative image様を呈する(右上)。250eV像に、カルシウムの局在を青で、リンの局在を緑で示すと石灰化球(CN)においては、Ca, Pの共局在が観察されるが、非石灰化部位においては、CaとPの集積部位が異なる(左右下)。星印は同一部位を示す。(文献5より引用)

いコラーゲン細線維を含む細胞外基質と明瞭な軟骨小腔に囲まれ、硝子軟骨における肥大化軟骨細胞様の像を呈していた。しかし、細胞外基質にI型コラーゲンと思われる太いコラーゲン線維が散見される部位や、太いコラーゲン細線維と顆粒状の多糖体様構造とが複雑な網状構造を呈して、軟骨小腔を形成している部位もあり、正常の硝子軟骨では観察されない特異的な形態も観察された。肥大化軟骨細胞様細胞周囲の石灰化領域では、直径30nmから数百nmの基質小胞が見られ、それらのいくつかは針状結晶を有しており、また、コラーゲン細線維に沿った石灰化も見られ、内軟骨石灰化の過程が観察された(図2)。

さらに、細胞外基質の経時的変化を評価するため、I型及びII型コラーゲンの免疫染色を

行った。BMP-2注入後1週では、異所性軟骨組織内に見られる太い線維束がI型で染色され、II型は軟骨小腔の縁に沿って強く染色された。注入後2週ではI型で染色される太い線維束は減少し、細胞外基質におけるII型の染色性が増加した8。注入後2週のII型コラーゲンを多く含む軟骨組織において、血管侵入が観察され、この領域にはTRAP陽性の破軟骨細胞が観察された。

BC-3 骨石灰化機構の微細形態学的解析

上記結果から、細胞外基質の石灰化は靭帯骨化の重要な起点となっていることが示唆される。本章では、生体内での石灰化の分子機構の解明を目的として、骨の初期石灰化における有機質の構造的・局在的变化を微細形態学的・組

組織細胞化学的に検索するとともに、近年開発されたエネルギーフィルター透過型電子顕微鏡 (energy-filtering transmission electron microscopy, EFTEM) の手法を導入し、有機質の変化に伴う微小ミネラル環境の変化を解析した。

EFTEM は特定のエネルギー損失を有する電子線を可視化することができる。すなわち、電子エネルギー損失が 0eV の電子線を像にすれば、非弾性散乱電子を除去できるため従来の TEM 像より高分解能の像を得ることができ、またある元素に固有の電子エネルギー損失を伴った電子線を像にするとその元素を TEM レベルの分解能でマッピングすることができる (electron energy loss spectroscopic imaging, ESI)。これらの手法を応用することにより、試料作成が困難な石灰化組織において、より詳細な微細形態学的・細胞化学的知見が得られるとともに、TEM レベルの元素マッピングにより、石灰化に伴う主要元素の分子レベルでの局在変化を解析することが可能となる。

実験には胎生期 19.5 日齢ラット頭蓋骨を用いた。胎生期頭蓋骨をアルデヒド化学固定あるいは凍結固定し、化学固定をした一部の試料は 4.13% EDTA で脱灰した。組織学的観察の他、微細形態学観察を EFTEM である Carl Zeiss 902 A を用いて行った。微細構造の組成同定のため、Cuprolinic blue によるプロテオグリカンの電顕的局在、およびアルカリ性ホスファターゼ (ALP) の酵素あるいは免疫電顕的局在を検討した。さらに、Carl Zeiss 902 A を用いて、石灰化の主要元素であるカルシウム、リンの分子レベルのマッピングを行った⁵⁾。

ラット胎仔頭蓋骨では、基質小胞内での結晶析出から、石灰化球の形成、コラーゲン性石灰化による広範な石灰化基質の確立にいたる一連の過程が観察できる。非石灰化部位である類骨においては約 640 nm の周期構造を有する直径 40 nm 程度の I 型コラーゲン細線維が観察され、その周囲にはプロテオグリカンの線維構造が網目状に存在していた。この部位では、Ca はこれらのプロテオグリカンの網目状線維構造の領域にほぼ一致して局在しており、一方、P はコラーゲン細線維の部位に多く局在していた。石灰化が始まる基質小胞の膜には ALP が局在し、これらの小胞には結晶を含まない小胞でも Ca・

P 両者の集積が観察された。基質小胞由来の石灰化球が形成されると、石灰化球の結晶や結晶間隙の電子密領域にも Ca・P の共局在が見られ、そこには ALP と断片化されたプロテオグリカンの局在が観察された。さらに ALP と断片化したプロテオグリカンが局在する部位を前線として Ca・P が共在する石灰化領域が拡大した (図 3)。

D. 考察

本実験モデルでは、BMP-2 の注入により靭帯付着部で軟骨が形成され、軟骨形成が靭帯中央部まで及び、さらに靭帯付着部の軟骨細胞が肥大化し、血管進入を受け、靭帯付着部で生じた骨化が靭帯中央部へ向かって拡大する過程が観察された。靭帯付着部から生じた軟骨化あるいは骨化が靭帯中央部まで及び、脊椎の圧迫を来す過程は、病巣に軟骨が混在することや、骨化が骨付着部より生じることを記載した過去の臨床病理像と一致しており、実際の病態においても同様な過程で靭帯組織が骨へと置換されて行くものと推測されたり。したがって、本実験モデルは脊柱靭帯骨化症における靭帯の病理変化に類似すると考えられた。

このモデルを TEM を用いて詳細に観察すると、BMP-2 を投与した靭帯組織において、扁平な線維芽細胞、紡錘形細胞、軟骨細胞様細胞が、経時的に現れ、扁平な線維芽細胞が外因性の BMP-2 により軟骨細胞様細胞に分化する事が示唆された。

また線維芽細胞が軟骨細胞様細胞への分化に伴い、細胞外基質の変化が観察された。コラーゲン線維については、免疫組織化学的検索により、靭帯組織の細胞外基質の主要な組成であるの一つである I 型コラーゲンが、BMP の投与により II 型コラーゲンによって置換されることが明らかとなった。TEM による観察の結果を免疫組織化学の所見と照らしあわせると、扁平な線維芽細胞や紡錘形細胞の周囲の太い細線維は I 型コラーゲンに対応し、細い細線維は II 型コラーゲンに対応しており、靭帯線維芽細胞が、線維軟骨の軟骨細胞を経て硝子軟骨における肥大化軟骨細胞様細胞へと分化する過程が明らかとなった。肥大化軟骨細胞様細胞には、軟骨小腔内に、I 型コラーゲンと思われる太い細線維とプロテオグリカンがネットワークを形成している特殊な細胞外基質を持つものも観察された。この構造は BMP-2 誘導細胞で観察され、線維軟骨と硝子軟骨の中間形態を示すものと推測された。

肥大化軟骨細胞様細胞へと分化し、おそらくは基質小胞を介して石灰化した硝子様軟骨は血管侵入を受けた。この血管の周囲には、TRAP陽性破軟骨細胞が観察され、破軟骨細胞による石灰化基質の吸収に引き続き、内軟骨性骨化が生じることから、内軟骨石灰化が靭帯骨化の一つの起点になっていると思われる。

靭帯骨化の重要な起点となっている生物学的石灰化機構に関しては、有機質と無機質の相互関係が主要な役割を担っていることが明らかとなった。非石灰化部位では、プロテオグリカンがCaを保持しているが、Pはコラーゲン細線維の部位に局在しており、両元素の共在は認められなかった。石灰化結晶が認められない基質小胞にもCa・Pの集積があることから、基質小胞には特異的なCa・P集積機構が存在することが示唆された。類骨におけるコラーゲン細線維周囲のプロテオグリカンは、おそらくは骨芽細胞あるいは基質小胞が分泌する蛋白分解酵素によって断片化されて石灰化球に集積する一方、保持されていたCaは、同じく石灰化球に局在するALPにより形成されるPと結合して、石灰化球の増大に関与するものと考えられた。したがって、非石灰化部位ではCaが主にプロテオグリカンに、Pがコラーゲン細線維に局在し、局所のイオン積の上昇を抑制するとともに、石灰化進行部位では断片化されたプロテオグリカンやALPがCaとPの共在化を促し、石灰化結晶が析出すると考えられた。

E. まとめ

石灰化機構は促進機構と抑制機構の巧妙なバランスによって生理的な状態を保っている。一方、病的な状態においてはこのバランスが崩れていると考えられる。今後は、他の実験モデルなどを加え、病的石灰化・骨化機構を明らかにするとともに、これらの結果を踏まえ、臨床病理へと研究を展開し、脊柱靭帯骨化症の病態解明を図りたい。

〔参考文献〕

- 1) Hoshi K, Amizuka N, Sakou T, Kurokawa T, Ozawa H 1998 Fibroblasts of Spinal ligaments Pathologically Differentiate Into Chondrocytes Induced by Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2: Morphological Examinations for Ossification of Spinal Ligaments. *Bone* 2 : 155-162
- 2) Kawaguchi H, Kurokawa T, Hoshino Y,

Kawahara H, Ogata E, Matsumoto T 1992 Immunohistochemical demonstration of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor- β in the ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine. *Spine* 17 : S33-S36

- 3) Miyamoto S, Takaoka K, Yonenobu K, Ono K 1992 Ossification of the ligamentum flavum induced by bone morphogenetic protein. An experimental study in mice. *J Bone Joint Surg* 74-B : 279-283
- 4) Hoshi K, Amizuka N, Kurokawa T, Ozawa H 1997 Ultrastructure and Immunolocalization of transforming growth factor- β in chondrification of murine ligamentous fibroblasts and endochondral calcification induced by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Acta Histochem Cytochem* 30 : 371-379
- 5) Hoshi K, Ejiri S, Ozawa H 2001 Localizational alterations of calcium, phosphorus, and calcification-related organics such as proteoglycans and alkaline phosphatase during bone calcification : *J Bone Miner Res* 16 : 289-298

F. 研究発表

1. 論文発表

Hoshi K, Ejiri S, Ozawa H. Organic components of crystal sheaths in bones : *Journal of Electron Microscopy* 50(1) 33-40, 2001

Hoshi K, Ejiri S, Ozawa H. Localizational alterations of calcium, phosphorus, and calcification-related organics such as proteoglycans and alkaline phosphatase during bone calcification : *Journal of Bone and Mineral Research* 16(2) 289-298, 2001

Hoshi K, Ejiri S, Probst W, Seybold V, Kamino T, Yaguchi T, Yamahira N, Ozawa H. Observation of human dentine by focused ion beam and energy-filtering transmission electron microscopy : *Journal of Microscopy* 201(Pt1) 44-49, 2001