

平成14年度
厚生労働科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)
研究報告書

廃用性骨萎縮のメカニズムと治療法の開発

平成15年3月

主任研究者 池田 恭治

平成14年度 研究報告書 目次

1. 総括研究報告書.....	1
廃用性骨萎縮のメカニズムと治療法の開発	2
国立長寿医療研究センター 老年病研究部 部長	池田 恭治
2. 分担研究報告書.....	8
1. 骨細胞が発現する遺伝子群の同定と機能解析.....	9
国立長寿医療研究センター 老年病研究部 部長	池田 恭治
2. 骨細胞における遺伝子発現と機能解析.....	12
神奈川歯科大学 口腔生化学教室 講師	高垣 裕子
3. 不動性の骨量減少における p53 の役割.....	17
産業医科大学 整形外科学教室 教授	中村 利孝
3. 総合研究報告書.....	21
廃用性骨萎縮のメカニズムと治療法の開発	22
国立長寿医療研究センター 老年病研究部 部長	池田 恭治

1. 総括研究報告書

廃用性骨萎縮のメカニズムと治療法の開発

主任研究者 池田恭治(長寿医療研究センター 老年病研究部長)

研究要旨

骨細胞に発現し石灰化に関わると考えられる新規の遺伝子 GOR1 と GOR2 を単離しノックアウトマウスの作成を行った。In vivo で任意の時期に骨細胞の死滅を誘導できる実験システムの開発を試み、そのようにデザインされたマウスを作成した。このマウスは、骨細胞を標的とした診断・治療法の開発に有用と思われる。ストレスの少ない不動物ラットモデルを開発し、軽度の運動と PTH 投与が骨代謝の維持に効果があることを示した。不動物に伴う骨の減少には p53 が関与しており、p53 を欠くマウスでは非荷重による骨萎縮が見られないことを明らかにした。NO や p53 は廃用性骨萎縮の治療のターゲットになる可能性がある。

キーワード:不動物、骨細胞、遺伝子、骨粗鬆症、p53

池田 恭治 長寿医療研究センター
老年病研究部
部長

高垣 裕子 神奈川歯科大学
口腔生化学教室
助教授

中村 利孝 産業医科大学
整形外科教室
教授

同定するためのシステムとして、マウスがジフテリア毒素に対して抵抗性を示すことを利用し、骨細胞にジフテリア毒素に感受性をもつヒト型受容体を発現させたトランスジェニックマウスを作成し、任意のタイミングで骨細胞のないマウスを樹立するシステムの開発を試みた。一方、既知の遺伝子の荷重・非荷重に対する骨反応における役割を知る目的で遺伝子改変モデルマウスなどを用いて廃用性の骨萎縮のメカニズムを解析した。

A. 研究目的

高齢者における運動低下や寝たきり状態は、骨の粗鬆化を加速させる大きな要因である。こうした力学的刺激の受容やシグナル伝達は主として骨細胞によって行われると考えられている。骨代謝を営む細胞として、破骨細胞や骨芽細胞の機能や発現する遺伝子群については数多く知られ、一部は骨代謝のマーカーとして臨床にも応用されているが、第三の細胞といわれる骨細胞 osteocyte については、特異的な遺伝子産物は知られておらず、in vivo で機能も謎である。

本研究では、骨細胞が果たす役割を in vivo で解明しまた骨細胞特異的な分子マーカーを包括的に

B. 研究方法

1. In vivo で骨細胞の死滅を誘導するトランスジェニックマウスの開発

Mouse genomic library Lambda FIX II (Stratagene 社)より 1.0×10^6 個を Mouse DMP1 5' 上流-3500~-3000 (500 bp) をプローブとしてスクリーニングを行った。得られた陽性クローン全てのファージ DNA を精製し Not I 消化により得られた DNA 断片の塩基配列を決定した。

予想される転写開始点下流230bp から転写開始点上流 1.0 kb 1.5 kb 1.7 kb 2.5 kb までの長さのプロモーター領域を pGL3-Luciferase basic vector (Promega 社) に組み込んだ。それぞれを DMP1 を発現する MC3T3-E1 細胞に導入し48時間後転写活性を調べるためルシフェラーゼ活性を

測定しエンハンサーの含まれる領域を調べた。DMP1をほとんど発現しないST2細胞を陰性対照とした。

標的とする骨細胞特異的に働くことが予想されたマウス DMP1 プロモーター転写開始点上流 1.5 kb および 9.523 kb 下流翻訳開始点(ATG)の3bp手前までを含んだ DNA それぞれを pBluescript II SK(+)+プラスミドベクターのマルチクローニングサイトである Not I サイトに導入した(以下 pDR1.5、pDR9.5)。次に pDR1.5 については、 β -globin イントロン配列下流に HB-EGF cDNA、SV40 poly (A)signal 配列を連結した DNA 断片をマルチクローニングサイトである Bam HI/EcoR V サイトに導入した。また、pDR9.5 は DMP1 イントロン1を含んでいるため HB-EGF cDNA、SV40poly (A)signal 配列連結したものを同様に導入した。

作成した DNA コンストラクト(pDR1.5 および pDR 9.5)と neomycin に対する薬剤耐性をもつ pDsRed2-Nuc(CLONTECH社)を MC3T3 細胞へ 5:1の割合で共にリポフェクションし、37°C、CO₂ インキュベーター中で48時間培養した。その後 G418を投与し G418に耐性である細胞のみを増殖させた後24well プレート 1 well 当たり培養液(DNEM, 10% FBS)500 μ l に 1×10^5 個の細胞を加え蒔きなおした。

12時間後にジフテリアトキシンを最大 10 μ g/ml (0, 0.1, 1.0, 10 μ g/ml)投与し6時間インキュベートした。6時間後培養液を methionine/cysteine-free DMEM (Life Technologies) に 5 μ Ci/ml [35S]methionine/cysteine を加えた培養液で1時間 37°C、CO₂ インキュベーター中で培養した。次に細胞を PBS で2回洗浄した後、0.1 N NaOH で溶解し、細胞溶解液中の蛋白質を 10% trichloro-acetic acid(TCA)にて沈澱させ、glass filter(Whatman,社)に吸着させ、PBS で3回洗浄後 glass filter を乾燥させ、シンチレーション溶液を加え液体シンチレーションカウンターにて蛋白合成に用いられた[35S] methionine / cysteine の放射活性を測定し、蛋白合成阻害率を評価する。

培養細胞の系で毒素感受性獲得を確認したトランスジーン(pDR1.5, pDR9.5)より plasmid を制限酵素 Sac II /Cla I で消化しアガロースゲル抽出した後マウス受精卵へ注入した。離乳後、尻尾より DNA を抽出し、トランスジーンの有無を PCR 法にて確認した。

2. 不動化ラットモデルにおける PTH と運動負荷の効果

30週齢の雌 Wistar ラットを、大学動物舎の基準下に自由活動させる(フリー)か、狭めたマウスケージ内で飼育する(運動制限)条件でそれぞれ PTH とプラセボ投与下に6週間飼育し、骨密度、骨形態のパラメータならびに骨中タンパク・mRNA の発現を検討した。PTH は旭化成(株)より供与された酢酸テリパラチドを、10 μ g/kg ないしそれ以下の濃度で週3回皮下に投与した。体重あたりの摂餌量は、粉碎したペレットを 1/2 量の苜蓿と混ぜて寒天で固化したものを摂餌量の多い個体に必要量与えて調節した。

3. 不動化による骨萎縮に果たす p53 の役割

産業医科大学動物研究センターで、p53 遺伝子欠損マウスを作成し、同センターにて飼育、交配、繁殖した。後肢を不動化した状態でも、ケージ内にある程度自由に移動でき、摂食、飲水は自由に可能である。正常対照群も同じデザインのケージで飼育した。食餌は、標準的な CE-2(Clea Japan Inc., 東京)であり、1.25%カルシウムと 1.06%リン、2.0 IU/g ビタミン D₃ を含有している。8週齢の雄性マウスを実験に用いた。摂餌量はすべての実験群間でマッチさせた。なお、実験のプロトコールは、産業医科大学動物実験倫理委員会において承認されている。

8週齢の雄性、p53 遺伝子欠損マウス p53(-/-)、野生型マウス p53(+/-)をそれぞれ2群に分けた。グループ1は、1週間の不動化(後肢を膝関節伸展位でバンデージ固定)を行った群である。グループ2は、1週間、正常荷重を行った群(対照群)である。それぞれのグループにおいて、p53(-/-)と p53(+/-)を比較した。各遺伝子における各グループあたりのマウス数は、組織形態計測用に6匹、骨髄細胞培養実験用に6匹、RT-PCR 用に3匹の計15匹であり、p53(+/-)30匹、(-/-)30匹の合計60匹である。

屠殺の6日前と2日前に6 mg/kg calcein を腹腔内投与し、骨梁表面に蛍光二重標識した。エーテルで麻酔し、心臓採血あるいは頸椎脱臼にて屠殺した。右側の脛骨を採取し、10%ホルマリンで固定、methylnmethacrylate resin (MMA) で包埋し、Villanueva 染色を行った。前額面を5 μ m の厚さで薄切した。一部の標本は、パラフィンで包埋した後、酒石酸抵抗性酸ホスホターゼ(TRAP)染色と TUNEL (terminal dUTP nick-end labeling) 染色を行った。

脛骨近位二次海綿骨で骨形態計測を行った。海

綿骨量(BV/TV)、骨石灰化速度(MAR)、骨形成率(BFR/BS)を調べ、TRAP 染色標本で、破骨細胞数(Oc.N/BS)と破骨細胞骨接触面(Oc.S/BS)を調べた。TUNEL 染色で、骨梁内部に存在する骨細胞と骨梁表面に存在する骨芽細胞の中の陽性細胞を調べた。

屠殺時に、心臓採血を行い、血清中のアルカリフォスファターゼ濃度を調べた。脛骨長軸の骨長を測定した。

尾部懸垂後の骨髄における骨芽細胞への分化過程に対する p53 の影響を知るために、脛骨から骨髄細胞を採取した。15 % FCS、10 mmol/l dexamethazone、50 µg/ml ascorbic acid、10 mmol/l sodium β-glycerophosphate の存在下の α-MEM で細胞培養した。培養開始後 8 日目に、アルカリフォスファターゼ染色を行い、形成されたコロニー数をカウントした。培養開始後 21 日目に、培養 dish に接着した細胞集団を alizarin red で染色し、mineralized nodule の形成面積を NIH image を用いて測定した。

右脛骨の骨髄細胞から mRNA を採取し、RT-PCR を用いて p53 mRNA の発現を調べた。Thermal cycler のサイクル数を変えて半定量的に検出した。

C. 研究結果と考察

1. In vivo で骨細胞の死滅を誘導するトランスジェニックマウスの開発

マウス DMP1 遺伝子プロモーターを単離するため、マウスゲノムライブラリー Lambda FIX II (Stratagene) から転写開始点上流配列を持つクローンをスクリーニングした。1.2 x 10⁶ 個のプラークをスクリーニングし、14 個の陽性クローンを得た。それぞれのクローンの塩基配列を決定した結果、最もプロモーター領域が長く含まれている2つのクローンを同定した。これらのクローンは翻訳開始点上流 300 bp より転写開始点上流 9523bp、までを含んだ同一のものであった。

スクリーニングにより得られた配列から転写活性に必要な領域を、DMP1 を発現することを確認したマウス骨芽細胞株(MC3T3-E1)を用いてルシフェラーゼアッセイ法によって調べた。その結果、転写開始点から上流 1.5 kb および 2.5 kb を含むフラグメントで高い転写活性が見られた。さらに転写開始点 1.0 kb 以下に欠失すると転写活性は著しく低下し

た。またハムスター線維芽細胞株(CHO)ではどのフラグメントにも転写活性が見られなかった。このことからマウス MC3T3-E1 細胞で転写活性を示すのに必要なマウス DMP1 プロモーター領域は 1.5 kb 以内に存在することが分かった。この結果は、ラット DMP1 プロモーターの解析より組織特異性を調節する配列は転写開始点上流 2.0 kb 以内にあるとの報告(Thotakura, S. R., Karthikeyan, N., Smith, T., Liu, K., George, A. (2000) J Biol Chem. 275 10272-7.)と矛盾しない。

方法に記載したジフテリア毒素受容体(HB-EGF)遺伝子の cDNA を二種類の DMP1 プロモーター(1.5 kb および 9.5kb)の下流に連結したトランスジーン(pDR 1.5 kb もしくは pDR 9.5 kb)を MC3T-E1 細胞にリポフェクション法で導入した。ジフテリア毒素に対する感受性を調べるため、毒素による蛋白合成阻害効率を測定した。両トランスジーンを導入した細胞ともに、コントロールとして用いた遺伝子導入していない細胞に比べて、最大70%の蛋白合成阻害が見られた。またマウス骨髄由来ストローマ細胞株(ST2)を用いた場合には顕著な蛋白合成阻害は見られなかった。以上の結果から構築された二種類のコンストラクトは少なくとも DMP1 遺伝子を発現する細胞特異的に機能的なジフテリア毒素受容体を発現する能力があることが分かった。

pDR 1.5 kb は、1回目は受精卵215個に DNA を打ち込み、離乳子数は6匹(♂4匹 ♀2匹)、うち transgene の存在を確認したのは3匹(♂2匹 ♀1匹)である。これらは、PCR 法より DMP1 promoter から β globin の配列の一部を増幅することで確認した。2回目は受精卵100個に inject し、産子数は13匹で4月上旬までには離乳の予定である。

pDR 9.5kb に関しては、受精卵216個に injection を行い、3月中ごろに出産の予定である。

2. 不働化ラットモデルにおける PTH と運動負荷の効果

拘束開始後7日目未明の血中コルチゾール濃度の比較より、本実験系による運動制限の条件はラットにいわゆるストレスを与えないと考えられた。比較のために測定した尾部懸垂条件においては血中コルチゾールは有意に高値で、ラットがストレス下にることが判った。

脛骨近位端近傍の皮質骨において、骨密度は運動制限個体で最も低かった。フリー、フリー/PTH の順で有意に高かった。運動制限個体の骨密度に運動と PTH それぞれに由来する上昇分を加えた値よりも、両者の存在下に飼育したフリー/PTH 個体の BMD 値が有意に高かった。

骨中の細胞がアナボリックな応答で発現する COX-2 や IGF-I の mRNA レベルは運動制限下で特に低く、PTH 投与と歩行により回復し、フリー/PTH においては前項と同様相乗的な上昇が見られた。逆にカタボリックな応答で破骨細胞が発現する TRAP は、運動制限個体の骨にのみ見られた。

皮質骨を細分化して検討したところ、運動制限群と比してコントロール群では歩行によってあまり大きな負荷のかからない部位で PTH による骨形成 BFR の増大が顕著に見られ、そのような部位では骨細胞が活性化されていた。大きな負荷のかかる部位では BFR は大きく、PTH による更なる増大は顕著でなかった。

3. 不動化による骨萎縮に果たす p53 の役割

実験期間中に、各遺伝子のマウス群間で、体重および脛骨長軸の長さには有意な差は認めなかった。マウス血清中のアルカリフォスファターゼ値は、不動群も対照群も、p53(-/-)が p53(+/+)よりも高く、p53(+/+)では、不動化により減少した。

固定していないマウスの脛骨では、海綿骨構造、骨形成、骨吸収は、p53(-/-)と p53(+/+)で差はなかった。p53(+/+)では、海綿骨量(BV/TV)は、不動後 1 週で、正常対照群の 77%にまで有意に減少したが、p53(-/-)では、減少しなかった。Calcein による二重標識面、骨石灰化速度(MAR)、骨形成率(BFR/BS)は、p53(+/+)では、不動後 1 週で、正常対照群に比べて有意に減少したが、p53(-/-)では、減少しなかった。不動化後の破骨細胞数(Oc.N/BS)と破骨細胞骨接触面(Oc.S/BS)は、p53(+/+)では、有意に増加したが、p53(-/-)では、増加しなかった。

TUNEL 染色で陽性の骨細胞と骨髄細胞が、p53(+/+)では不動化後に増加していたが、p53(-/-)では変化がなかった。

骨髄細胞培養実験で、アルカリフォスファターゼ陽性 CFU-f と mineralized nodule の形成が、p53(+/+)では、有意に減少したが、p53(-/-)では、減少しなかった。不動化した脛骨の骨髄細胞では、

p53 mRNA の発現が亢進していた。

我々は、TUNEL 陽性の骨細胞と骨芽細胞が、p53(+/+)では、不動化により増加するが、p53(-/-)では、増加しないことを示した。今までに、グルココルチコイド誘発性骨粗鬆症においては、骨細胞や骨芽細胞のアポトーシスが生じているという報告はある。我々は、力学的負荷が欠如した状態でも同様の所見があることを明らかにした。このアポトーシスは p53 mRNA の亢進と関連し、p53(-/-)では、不動化によるアポトーシスの増加がなかったことから、主に、p53 を介したアポトーシスであると考えられた。

アルカリフォスファターゼ陽性 CFU-f は、不動化により、p53(+/+)では、有意に減少したが、p53(-/-)では、減少しなかった。Total CFU-f のコロニー数は、p53(+/+)でも p53(-/-)でも、また不動化群でも対照群でも、差がなかったが、アルカリフォスファターゼ陽性 CFU-f にこのような差がみられたことから、不動化は、比較的分化した段階の骨芽細胞に影響を与えていると考えられた。

D. 結論

骨細胞にヒトジフテリア毒素受容体を発現するマウスを作成し、毒素の投与によって発生・成長・老化など任意の時期に *in vivo* で骨細胞の死滅を誘導できるシステムを開発した。ストレスの少ない不動化ラットモデルを開発し、軽度の運動と PTH 投与が骨代謝の維持に効果があることを示した。p53 ノックアウトマウスを用いて、不動化に伴う骨萎縮に p53 が必須の役割を果たすことを明らかにした。

E. 研究発表

主任研究者

1. 論文発表

Uchiyama Y, Higuchi Y, Takeda S, Masaki T, Shira-ishi A, Sato K, Kubodera N, Ikeda K, Ogata E: ED-71, a vitamin D analog, is a more potent inhibitor of bone resorption than alfacalcidol in an estrogen-deficient rat model of osteoporosis. *Bone* 30:582-588, 2002

Shibata T, Shira-ishi A, Sato T, Masaki T, Sasaki A, Masuda Y, Hishiya A, Ishikura N, Higashi S, Uchida Y, Saito M, Ito M, Ogata E, Watanabe K, Ikeda K: Vitamin D hormone inhibits osteoclastogenesis *in vivo* by decreasing the pool of osteoclast precursors in bone marrow. *J Bone Miner Res* 17:622-629, 2002

Watanuki M, Sakai A, Sakata T, Tsurukami H,

Miwa M, Uchida Y, Watanabe K, Ikeda K, Nakamura T: Role of inducible nitric oxide synthase in the skeletal adaptation to acute increases in mechanical loading. **J Bone Miner Res** 17:1015-1025, 2002

Sasaki A, Ikeda K, Watanabe K: A RING finger protein Praja 1 regulates Dlx5-dependent transcription through its ubiquitin ligase activity for the Dlx/Msx-interacting MAGE/Necdin family protein, Dlxin-1. **J Biol Chem** 277:22541-22546, 2002

Furukawa-Hibi Y, Yoshida-Araki K, Ohta T, Ikeda K, Motoyama N: FOXO Forkhead transcription factors induce G2-M checkpoint in response to oxidative stress. **J Biol Chem** 277:26729-26732, 2002

Takai H, Naka K, Okada Y, Watanabe M, Ikeda K, Motoyama N: Chk2-deficient mice exhibit increased resistance to ionizing radiation and defective p53-mediated transcription. **EMBO J** 19:5195-5205, 2002

Kobayashi Y, Watanabe M, Okada Y, Takai H, Sawa H, Nakanishi M, Suzuki H, Nagashima K, Ikeda K, Motoyama N: Hydrocephalus, situs inversus, chronic sinusitis, and male infertility in DNA polymerase λ -deficient mice: possible implication for the pathogenesis of immotile cilia syndrome. **Mol Cell Biol** 22:2769-2776, 2002

2. 学会発表

菱谷彰徳、伊東昌子、池田恭治、渡辺 研: Ataxia Telangiectasia Mutated (Atm) ノックアウトマウスにおける骨形成の低下をともなう骨量減少
日本骨代謝学会第20回年会 岡山 7月25日—27日

Hishiya A, Ito M, Ikeda K, Watanabe K: Decreased bone formation in ataxia telangiectasia mutated (ATM) knockout mice. The 24th annual meeting, Am. Soc. Bone Miner. Res., San Antonio, USA, September 20-24, 2002

Ikeda K: Mode of action of alfacalcidol versus plain vitamin D on bone remodeling and bone quality, World Congress on Osteoporosis, Lisbon, May 10-14, 2002

分担研究者

高垣 裕子

1. 論文発表

Naruse, K., Miyauchi, A., Itoman, M. and Mikuni-Takagaki, Y: Distinct anabolic response

of osteoblast to low-intensity pulsed ultrasound. **J. Bone Miner. Res.**, 18:360-369, 2003

Mikuni-Takagaki, Y., Bone Formation Induced by Pulsed Ultrasound. **Bulletin of Kanagawa Dental College**, 30:5P-7P, 2003

Naruse, K., Urabe, K., Mukaida, T., Ueno, T., Migishima, F., Oikawa, A., Mikuni-Takagaki, Y., and Itoman, M.: Spontaneous Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Available from Fetal Rat Circulation., **Stem Cells** in press.

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.

2. 学会発表

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, 東京 .2002

成瀬康治, 向井田智之, 占部憲, 糸満盛憲, 高垣裕子: 超音波パルスによる COX2 およびオステオカルシン発現増加の機序 第6回超音波骨折治療研究会, 2003

A. Miyauchi, M. Goto, K. Notoya, T. Sugimoto, Y. Takagi, K. Jinnai, Y. Yoshimoto, K. Chihara, T. Fujita, K. Okabe, Y. Mikuni-Takagaki: Mechano-sensing By Stretch-activated Calcium Influx Pathways In Human Chondrocytes. **American Society for Bone and Mineral Research 24th Annual Meeting**, 2002.

Y. Mikuni-Takagaki, K. Aoki, M. Takahashi, K. Ohya, M. Itoman: Daily Activity Triples the Efficacy of PTH on Cortical Bone Formation in Adult Female Rat. **American Society for Bone and Mineral Research 24th Annual Meeting**, 2002.

H. Sekiya, Y. Mikuni-Takagaki, A. Miyauchi, T. Kondoh, K. Seto: Different Response of Human Mandibular Bone Osteoblast and Osteocyte to Mechanical Loading. **American Society for Bone and Mineral Research 24th Annual Meeting**, 2002.

高垣裕子, 青木和広, 大谷啓一, 糸満盛憲: ラット頰骨近位端近傍の皮質骨において、軽度の運動は

PTH のアナボリックな作用に対して相乗的に働く
第 20 回日本骨代謝学会, 2002

中村 利孝

1. 論文発表

A. Sakai, T. Nakamura, et al. Disruption of the p53 gene results in preserved trabecular bone mass and bone formation after mechanical unloading. *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol.17, No. 1, 119-127, 2002

M. Watanuki, A. Sakai, K. Watanabe, K. Ikeda, T. Nakamura, et al. Role of inducible nitric oxide synthase in skeletal adaptation to acute increases in mechanical loading. *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol.17, No. 6, 1015-1025, 2002

R. Okazaki, A. Sakai, T. Nakamura, et al.: Apoptosis and p53 expression in chondrocytes relate to degeneration in articular cartilage of immobilized knee joints. *J Rheumatol* (in press), 2003

2. 学会発表

H. Otomo, A. Sakai, T. Nakamura, et al. Flt-1 tyrosine kinase-deficient homozygous mice result in decreased trabecular bone turnover and bone strength. 24th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. San Antonio, Texas, USA. 2002年9月
酒井昭典、中村利孝 不動態における骨吸収機構. 第 17 回日本整形外科学会基礎学術集会. 青森. 2002年10月

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

2. 分 担 研 究 報 告 書

厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)
分担研究報告書

骨細胞が発現する遺伝子群の同定と機能解析

分担研究者 池田恭治(長寿医療研究センター 老年病研究部長)

研究要旨

マウス脛骨から調製した骨細胞が豊富な分画から骨芽細胞が豊富な分画を差し引いたサブトラクション法により、新たな遺伝子 GOR1 および GOR2 を同定し、ノックアウトマウス作成のための ES 細胞を樹立した。骨細胞にヒトジフテリア毒素受容体を発現するマウスを作成し、毒素の投与によって発生・成長・老化など任意の時期に *in vivo* で骨細胞の死滅を誘導できるシステムの開発を試みた。

キーワード: 骨細胞、石灰化、機械受容、マウスモデル

A. 研究目的

破骨細胞や骨芽細胞の遺伝子産物についてはいくつかが知られており一部は骨代謝のマーカースとして臨床にも応用されているが、第三の細胞といわれる骨細胞 osteocyte については、特異的な遺伝子産物は知られておらず、*in vivo* での機能も推測の域を出ていない。骨細胞は、骨組織に最も多く存在するが、骨芽細胞が終末分化した細胞で休止期にあって増殖せず、硬組織に埋没しているため単離もきわめて困難である。細胞突起といった形態学的な特徴を頼りに単離しても、*in vitro* での遺伝子の発現パターンは *in vivo* とはかなり異なるため、*in vivo* で存在するままの骨細胞の生物学的特性を捉える必要がある。

そこで本研究では、マウスがジフテリア毒素に対して抵抗性を示すことを利用して、骨細胞にジフテリア毒素に感受性をもつヒト型受容体を発現させたトランスジェニックマウスを作成し、任意のタイミングで骨細胞のないマウスを樹立するシステムの開発を試みた。

B. 研究方法

1) マウス DMP1 プロモーターの単離

Mouse genomic library Lambda FIX II (Stratagene 社)より 1.0×10^6 個を Mouse DMP1 5' 上流-3500~-3000(500 bp)をプローブとしてスクリーニングを行った。得られた陽性クローン全てのファージ DNA を精製し NotI 消化により得られた DNA 断片の塩基配列を決定した。

2) マウス DMP1 プロモーターの転写活性の評価

予想される転写開始点下流 230bp から転写開始点上流 1.0 kb 1.5 kb 1.7 kb 2.5 kb までの長さのプロモーター領域を pGL3-Luciferase basic vector (Promega 社) に組み込んだ。それぞれを DMP1 を発現する MC3T3-E1 細胞に導入し 48 時間後転写活性を調べるためルシフェラーゼ活性を測定しエンハンサーの含まれる領域を調べた。DMP1 をほとんど発現しない ST2 細胞を陰性対照とした。

3) トランスジェニックマウス作成のための DNA コンストラクトの作成

標的とする骨細胞特異的に働くことが予想されたマウス DMP1 プロモーター転写開始点上流 1.5 kb および 9.523 kb 下流翻訳開始点(ATG)の 3bp 手前までを含んだ DNA それぞれを pBluescript II SK(+)-プラスミドベクターのマルチクローニングサイトである NotI サイトに導入した(以下 pDR1.5、pDR9.5)。次に pDR1.5 については、 β -globin イントロン配列下流に HB-EGF cDNA、SV40poly (A)signal 配列を連結した DNA 断片をマルチクローニングサイトである Bam HI/EcoR V サイトに導入した。また、pDR9.5 は DMP1 イントロン1 を含んでいるため HB-EGF cDNA、SV40poly (A)signal 配列連結したものを同様に導入した。

4) ジフテリア毒素による蛋白合成阻害の確認

作成した DNA コンストラクト(pDR1.5 および pDR9.5) と neomycin に対する薬剤耐性をもつ pDsRed2-Nuc (CLONTECH 社) を MC3T3 細胞へ 5:1 の割合で共にリポフェクションし、37°C、CO₂ イン

キュベーター中で48時間培養した。その後 G418 を投与し G418 に耐性である細胞のみを増殖させた後24well プレート1 well 当たり培養液(DNEM, 10 % FBS)500 ul に 1×10^5 個の細胞を加え蒔きなおした。

12時間後にジフテリアトキシンを最大 $10 \mu\text{g/ml}$ (0, 0.1, 1.0, $10 \mu\text{g/ml}$) 投与し6時間インキュベートした。6時間後培養液を methionine/ cysteine-free DMEM (Life Technologies) に $5 \mu\text{Ci/ml}$ [^{35}S]methionine/cysteine を加えた培養液で1時間 37°C , CO_2 インキュベーター中で培養した。次に細胞を PBS で2回洗浄した後、0.1 N NaOH で溶解し、細胞溶解液中の蛋白質を 10% trichloro-acetic acid(TCA)にて沈澱させ、glass filter(Whatman,社)に吸着させ、PBS で3回洗浄後 glass filter を乾燥させ、シンチレーション溶液を加え液体シンチレーションカウンターにて蛋白合成に用いられた [^{35}S] methionine / cysteine の放射活性を測定し、蛋白合成阻害率を評価する。

5)トランスジェニックマウスの作製および解析

培養細胞の系で毒素感受性獲得を確認したトランスジーン(pDR1.5 , pDR9.5)より plasmid を制限酵素 Sac II /Cla I で消化しアガロースゲル抽出した後マウス受精卵へ注入した。離乳後、尻尾より DNA を抽出し、トランスジーンの有無を PCR 法にて確認した。

C. 研究結果および考察

1. マウス DMP1 遺伝子のプロモーター領域のクローニング

マウス DMP1 遺伝子プロモーターを単離するため、マウスゲノムライブラリー Lambda FIX II (Stratagene)から転写開始点上流配列を持つクローンをスクリーニングした。 1.2×10^6 個のプラークをスクリーニングし、14 個の陽性クローンを得た。それぞれのクローンの塩基配列を決定した結果、最もプロモーター領域が長く含まれている2つのクローンを同定した。これらのクローンは翻訳開始点上流 300 bp より転写開始点上流 9523bp、までを含んだ同一のものであった。

2. DMP1 プロモーターの解析

スクリーニングにより得られた配列から転写活性に必要な領域を、DMP1 を発現することを確認したマウス骨芽細胞株(MC3T3-E1)を用いてルシフェラーゼアッセイ法によって調べた。その結果、転写開始点から上流 1.5 kb および 2.5 kb を含むフラグメントで高い転写活性が見られた。さらに転写開始点 1.0 kb 以下に欠失すると転写活性は著しく低下した。またハムスター線維芽細胞株(CHO)ではどのフラグメントにも

転写活性が見られなかった。このことからマウス MC3T3-E1 細胞で転写活性を示すのに必要なマウス DMP1 プロモーター領域は 1.5 kb 以内に存在することが分かった。この結果は、ラット DMP1 プロモーターの解析より組織特異性を調節する配列は転写開始点上流 2.0 kb 以内にあるとの報告(Thotakura, S. R., Karthikeyan, N., Smith, T., Liu, K., George, A. (2000) J Biol Chem. 275 10272-7.)と矛盾しない。

3. TRECK 法を利用した標的細胞(マウス骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞)特異的なジフテリア毒素感受性

方法に記載したジフテリア毒素受容体(HB-EGF)遺伝子の cDNA を二種類の DMP1 プロモーター(1.5 kb および 9.5kb)の下流に連結したトランスジーン(pDR 1.5 kb もしくは pDR 9.5 kb)を MC3T-E1 細胞にリポフェクション法で導入した。ジフテリア毒素に対する感受性を調べるため、毒素による蛋白合成阻害効率を測定した。両トランスジーンを導入した細胞ともに、コントロールとして用いた遺伝子導入していない細胞に比べて、最大70%の蛋白合成阻害が見られた。またマウス骨髄由来ストローマ細胞株(ST2)を用いた場合には顕著な蛋白合成阻害は見られなかった。以上の結果から構築された二種類のコンストラクトは少なくとも DMP1 遺伝子を発現する細胞特異的に機能的なジフテリア毒素受容体を発現する能力があることが分かった。

4. トランスジェニックマウスの作出

pDR 1.5 kb は、1回目は受精卵215個に DNA を打ち込み、離乳子数は6匹(♂4匹 ♀2匹)、うち transgene の存在を確認したのは3匹(♂2匹 ♀1匹)である。これらは、PCR 法より DMP1 promoter から β globin の配列の一部を増幅することで確認した。2回目は受精卵100個に inject し、産子数は13匹で4月上旬までには離乳の予定である。

pDR 9.5kb に関しては、受精卵216個に injection を行い、3月中ごろに出産の予定である。

D. 研究発表

1. 論文発表

Uchiyama Y, Higuchi Y, Takeda S, Masaki T, Shira-ishi A, Sato K, Kubodera N, Ikeda K, Ogata E: ED-71, a vitamin D analog, is a more potent inhibitor of bone resorption than alfacalcidol in an estrogen-deficient rat model of osteoporosis. *Bone* 30:582-588, 2002

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

Ikeda K: Vitamin D hormone inhibits osteoclastogenesis *in vivo* by decreasing the pool of osteoclast precursors in bone marrow. **J Bone Miner Res** 17:622-629, 2002

Watanuki M, Sakai A, Sakata T, Tsurukami H, Miwa M, Uchida Y, Watanabe K, Ikeda K, Nakamura T: Role of inducible nitric oxide synthase in the skeletal adaptation to acute increases in mechanical loading. **J Bone Miner Res** 17:1015-1025, 2002

Sasaki A, Ikeda K, Watanabe K: A RING finger protein Praja 1 regulates Dlx5-dependent transcription through its ubiquitin ligase activity for the Dlx/Msx-interacting MAGE/Necdin family protein, Dlxin-1. **J Biol Chem** 277:22541-22546, 2002

Furukawa-Hibi Y, Yoshida-Araki K, Ohta T, Ikeda K, Motoyama N: FOXO Forkhead transcription factors induce G2-M checkpoint in response to oxidative stress. **J Biol Chem** 277:26729-26732, 2002

Takai H, Naka K, Okada Y, Watanabe M, Ikeda K, Motoyama N: Chk2-deficient mice exhibit increased resistance to ionizing radiation and defective p53-mediated transcription. **EMBO J** 19:5195-5205, 2002

Kobayashi Y, Watanabe M, Okada Y, Takai H, Sawa H, Nakanishi M, Suzuki H, Nagashima K, Ikeda K, Motoyama N: Hydrocephalus, situs inversus, chronic sinusitis, and male infertility in DNA polymerase λ -deficient mice: possible implication for the pathogenesis of immotile cilia syndrome. **Mol Cell Biol** 22:2769-2776, 2002

2. 学会発表

菱谷彰徳、伊東昌子、池田恭治、渡辺 研: Ataxia Telangiectasia Mutated (Atm) ノックアウトマウスにおける骨形成の低下をともなう骨量減少 日本骨代謝学会第20回年会 岡山 7月25日—27日

Hishiya A, Ito M, Ikeda K, Watanabe K: Decreased bone formation in ataxia telangiectasia mutated (ATM) knockout mice. The 24th annual meeting, Am. Soc. Bone Miner. Res., Sam Antonio, USA, September

20-24, 2002

Ikeda K: Mode of action of alfacalcidol versus plain vitamin D on bone remodeling and bone quality, World Congress on Osteoporosis, Lisbon, May 10-14, 2002

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

骨細胞における遺伝子発現と機能解析

分担研究者 高垣裕子（神奈川歯科大学 口腔生化学教室 助教授）

研究要旨

我々は、これまでに骨細胞が伸展刺激の受容・伝達において重要な役割を果たし、それには副甲状腺ホルモン PTH が相乗的に働いていることを、単離した骨細胞において示してきた。周知のように PTH は、骨形成促進作用に基づいた骨粗鬆症治療薬としては唯一認可された薬品（米国：2002 年 12 月）であるが、全身の部分による効果の差など、作用機序には不明点も多い。我々は、上述の *in vitro* の結果から、高齢者に起こりがちな運動量低下の状態において、また全身的な不動化や更には廃用性骨萎縮の状態において PTH が骨形成促進作用を示すかどうかを知るための実験を検討した。骨のレベルで実験する場合、一般的に用いられている系はラットの尾部懸垂や坐骨神経切除など局所の免荷の系であり、全身的な不動化ではない。そこで、マウスに比して無抵抗なラットの利点を活かして狭めたケージ内で飼育する試みを行い、歩行の有無と PTH の効果の関係を明らかにした。

キーワード：骨形成、力学的刺激、骨細胞、不動化、PTH

A. 研究目的

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

一方来るべき高齢化社会を念頭に置くと、骨粗鬆症を予防し免荷による骨萎縮が防げれば、個人の

QOL を保つばかりでなく社会的に医療費支出を軽減できるという大きなメリットがある。長期的な視点からは、宇宙開発に伴う必要性も含まれる。現在までの所、化学療法的な骨粗鬆症の治療薬、投与法の開発により、骨吸収を抑制するビスフォスフォネート、ビタミン D 及びカルシトニン製剤、エストロゲン補充療法などが実用に至っている。しかし、重力を含めた力学的負荷（mechanical loading）の骨量維持・増強効果に関しては、その作用機作がおおかた不明であったため、運動療法と日常的な運動による予防以外、治療・予防を目指した直接的な応用研究の対象とはなりにくかった。しかし骨折治療、歯周病治療などに超音波や磁波の照射が有効であることが判明し、骨内の細胞を標的とする直接的作用が予想され、非侵襲的な物理療法を骨粗鬆症や免荷による骨萎縮の予防・治療に応用する可能性が考えられるに至った。

本研究ではまず、成熟ラットの全身性不動化モデルでは、歩行ができないため下肢骨が曝される機械的刺激は最小限度に留まり、運動負荷とカルシトニックホルモンの個体組織レベルにおける協同作用の特徴を明らかにする上で優れたモデルであることを示

し、次に骨粗鬆症の治療薬としての PTH の作用機作を良く理解するため、骨量の減少した全身性不動化ラット大腿骨において、歩行運動負荷と PTH との協同作用により骨形成能を回復せしめる際の至適条件を求める、ことを目的とした。

B. 研究方法

30 週齢の雌 Wistar ラットを、大学動物舎の基準下に自由活動させる(フリー)か、狭めたマウスケージ内で飼育する(運動制限)条件でそれぞれ PTH とプラセボ投与下に 6 週間飼育し、骨密度、骨形態のパラメータならびに骨中タンパク・mRNA の発現を検討した。PTH は旭化成(株)より供与された酢酸テリパラチドを、10 μ g/kg ないしそれ以下の濃度で週三回皮下に投与した。体重あたりの摂餌量は、粉碎したペレットを 1/2 量の苜蓿と混ぜて寒天で固化したものを摂餌量の多い個体に必要量与えて調節した。

C. 研究結果

拘束開始後 7 日目未明の血中コルチゾール濃度の比較より、本実験系による運動制限の条件はラットにいわゆるストレスを与えないと考えられた。比較のために測定した尾部懸垂条件においては血中コルチゾールは有意に高値で、ラットがストレス下にあることが判った。

脛骨近位端近傍の皮質骨において、骨密度は運動制限個体で最も低かった。フリー、フリー/PTH の順で有意に高かった。運動制限個体の骨密度に運動と PTH それぞれに由来する上昇分を加えた値よりも、両者の存在下に飼育したフリー/PTH 個体の BMD 値が有意に高かった。

骨中の細胞がアナボリックな応答で発現する COX-2 や IGF-I の mRNA レベルは運動制限下で特に低く、PTH 投与と歩行により回復し、フリー/PTH においては 2. と同様相乗的な昂進が見られた。逆にカタボリックな応答で破骨細胞が発現する TRAP は、運動制限個体の骨にのみ見られた。

皮質骨を細分化して検討したところ、運動制限群と比してコントロール群では歩行によってあまり大きな負荷のかからない部位で PTH による骨形成 BFR の増大が顕著に見られ、そのような部位では骨細胞が活性化されていた。大きな負荷のかかる部位では BFR は大きく、PTH による更なる増大は顕著でなかった。

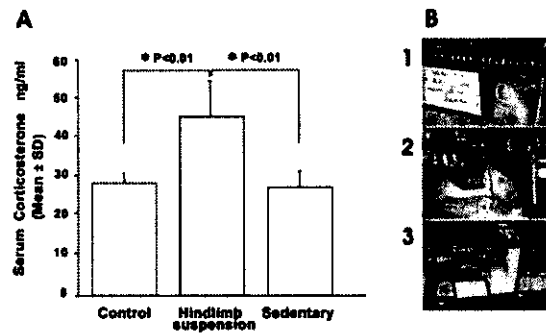


Fig. 1 Basal serum corticosterone levels at 9 a.m. after 7-day restraint or free activity (A). Results from four rats each were compared among sedentary, head-down hind limb suspension restraint, and free activity control. B. Sedentary rat of restricted activity. 1, at play; 2, eating; and 3, sleeping.

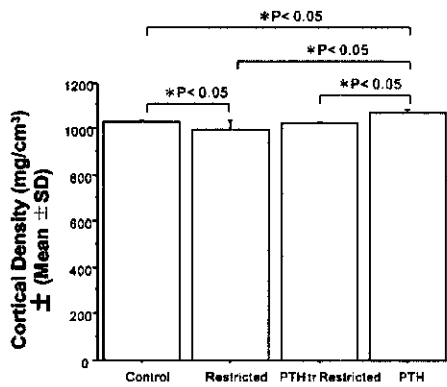


Fig. 2 Bone Mineral Density (BMD) of tibia in a restrained rat compared to the control, free-moving rat. Cortical BMD were measured as described in Materials and Methods near the proximal end of tibia after 6-week experiment.

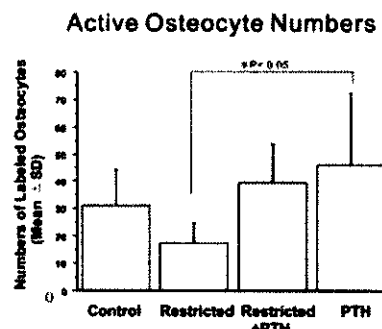
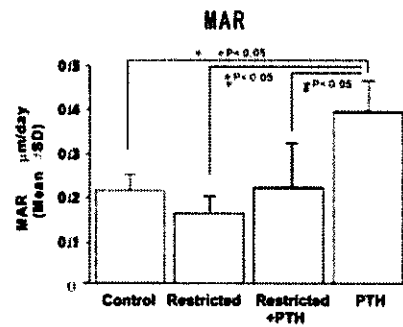
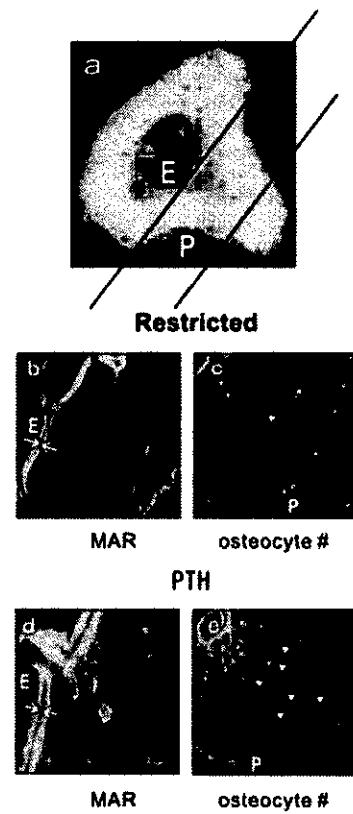


Fig. 3 Osteoblastic and osteocytic activities in the tibia of restrained rat. Osteoblastic activity (Mineral apposition rate; MAR) and osteocytic activity (number of calcein labeled cells) were compared among experimental and control rats. Panel a represent the area (between two lines) of tibial cortical bone where fluorescent osteocytes were counted. Mechanical load is reported not significant in this area during walking (Demes, et al., 2001). P represents periosteal and E, endocortical. Sample pictures were shown in upper panels for RESTRICTED (b and c) and PTH (d and e) groups. MAR is measured between the arrows (panels b and d). Osteocytes and Haversian canals are pointed by white and yellow arrow heads, respectively (c and e).

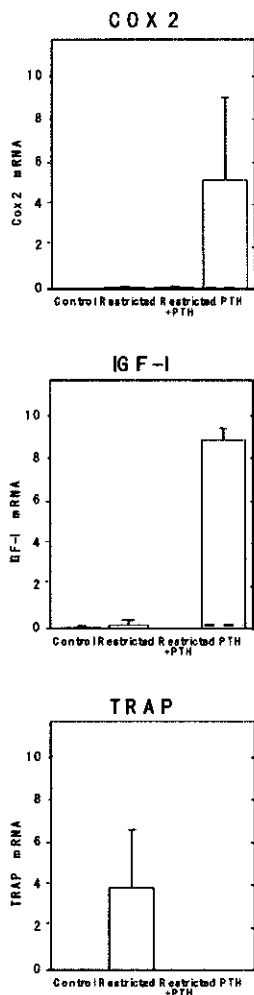


Fig. 4 Expression of messages in cortical bone of experimental and control rat tibia. By RT-PCR experiments using cortical bone pulverized by CRYO-PRESS, mRNA levels of COX 2, IGF-I and TRAP (tartrate resistant acid phosphatase, a marker enzyme for osteoclasts) are shown.

E. 結論

全身性の不動化あるいは運動量の低下による骨萎縮のより自然なモデルと考えられるラットの系を得た。骨粗鬆症の治療と予防あるいはリハビリテーションの一環として、PTH 療法と軽い運動ないし機械的刺激を組み合わせることで PTH の所要量を下げ、侵襲度の低い治療を行える可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Naruse, K., Miyauchi, A., Itoman, M. and Mikuni-Takagaki, Y.: Distinct anabolic response of osteoblast to low-intensity pulsed ultrasound. *J. Bone Miner. Res.*, 18:360-369, 2003

Mikuni-Takagaki, Y., Bone Formation Induced by

Pulsed Ultrasound. *Bulletin of Kanagawa Dental College*, 30:5P-7P, 2003

Naruse, K., Urabe, K., Mukaida, T., Ueno, T., Migishima, F., Oikawa, A., Mikuni-Takagaki, Y., and Itoman, M.: Spontaneous Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Available from Fetal Rat Circulation., *Stem Cells* in press.

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.

2. 学会発表

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, 東京 .2002

成瀬康治, 向井田智之, 占部憲, 糸満盛憲, 高垣裕子:超音波パルスによる COX2 およびオステオカルシン発現増加の機序 第6回超音波骨折治療研究会, 2003

A. Miyauchi, M. Goto, K. Notoya, T. Sugimoto, Y. Takagi, K. Jinnai, Y. Yoshimoto, K. Chihara, T. Fujita, K. Okabe, Y. Mikuni-Takagaki: Mechano-sensing By Stretch-activated Calcium Influx Pathways In Human Chondrocytes. *American Society for Bone and Mineral Research 24th Annual Meeting*, 2002.

Y. Mikuni-Takagaki, K. Aoki, M. Takahashi, K. Ohya, M. Itoman: Daily Activity Triples the Efficacy of PTH on Cortical Bone Formation in Adult Female Rat. *American Society for Bone and Mineral Research 24th Annual Meeting*, 2002.

H. Sekiya, Y. Mikuni-Takagaki, A. Miyauchi, T. Kondoh, K. Seto: Different Response of Human Mandibular Bone Osteoblast and Osteocyte to Mechanical Loading. *American Society for Bone and Mineral Research 24th Annual Meeting*, 2002.

高垣裕子, 青木和広, 大谷啓一, 糸満盛憲:ラット頸骨近位端近傍の皮質骨において、軽度の運動は PTH のアナボリックな作用に対して相乗的に働く 第 20 回日本骨代謝学会, 2002

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)

分担研究報告書

不動性の骨量減少における p53 の役割

分担研究者 中村 利孝(産業医科大学整形外科学教室 教授)

研究要旨

マウスの後肢をバンデージで不動化すると、約1週間で急激な海綿骨量減少が生じる。この急激な海綿骨量減少は、p53 を介したアポトーシスが骨芽細胞や骨細胞に生じたためであるという仮説を立てた。この仮説を検証する目的で実験を行った。8週齢の雄性、p53 遺伝子欠損マウス p53(-/-)、野生型マウス p53(+/-)を用いた。マウスの右後肢を膝関節伸展位でバンデージ固定し、固定していない別のマウスの右後肢を対照として比較した。

固定していないマウスの脛骨では、海綿骨構造、骨形成、骨吸収は、p53(-/-)と p53(+/-)で差はなかった。p53(+/-)では、1週間の不動化により、海綿骨量(BV/TV)は、対照群の77%にまで有意に減少したが、p53(-/-)では、減少しなかった。不動化後の骨形成率(BFR/BS)は、p53(+/-)では、有意に減少したが、p53(-/-)では、減少しなかった。不動化後の破骨細胞数(Oc.N/BS)と破骨細胞骨接触面(Oc.S/BS)は、p53(+/-)では、有意に増加したが、p53(-/-)では、増加しなかった。骨髄細胞培養では、アルカリフォスファターゼ陽性 CFU-f と mineralized nodule の形成が、p53(+/-)では、有意に減少したが、p53(-/-)では、減少しなかった。マウス血清中のアルカリフォスファターゼ値は、不動群も対照群も、p53(-/-)が p53(+/-)よりも高く、p53(+/-)では、不動化により減少した。不動化した脛骨の骨髄細胞では、p53 mRNA の発現が亢進していた。TUNEL(terminal dUTP nick-end labeling)法で陽性の骨細胞と骨髄細胞が、p53(+/-)では不動化後に増加していたが、p53(-/-)では変化がなかった。

これらのデータは、不動化したマウスにおける p53 遺伝子の欠損が、海綿骨量減少の防止や骨形成低下の防止と関連していることを示している。このような in vivo の現象は、骨髄細胞におけるアルカリフォスファターゼ陽性 CFU-f と mineralized nodule の形成の結果と一致していた。骨髄細胞内の p53 遺伝子を介したシグナル伝達の亢進が、不動性の骨量減少に関与していると考えられた。

キーワード: 後肢固定モデル、荷重、非荷重、p53

A. 研究目的

四肢の不動は、ヒトでも動物でも局所の骨量を減少させ、関節軟骨を変性させる。不動化された実験動物は、神経麻痺、ギプス固定、長期間の臥床などの廃用性の骨や関節の状態を模倣している。神経麻痺の患者や、坐骨神経を切除したマウスにおける骨量減少は、骨吸収の増加と骨形成の低下の両者によるものであることが報告されている。マウスの尾部懸垂モデルによる非荷重でも、また、骨形成率(BFR/BS)の低下と、破骨細胞数(Oc.N/BS)と破骨細胞骨接触面(Oc.S/BS)の増加が認められた。マウスの不動化後、骨形成は7日から14日にかけて低下し、21日から42日にかけて回復してくることが知られているが、そのメカニズムについては不明である。

p53 遺伝子は、アポトーシスや細胞周期を制御しており、成長因子、熱ショックタンパク、低酸素や放射線照射などの各種の刺激に反応して、シグナルを伝達する。p53 遺伝子の発現とアポトーシスは、骨髄細胞で既に観察されている。アポトーシスは、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞で観察されている。我々は、p53 遺伝子が、不動化後の骨髄細胞分化や骨代謝回転の調節において重要な役割を担っていると考えた。特に、四肢不動化後の海綿骨量と骨形成の急激な減少は、骨髄細胞における p53 を介したシグナルの亢進によるという仮説を立てた。本年度の研究の目的は、この仮説を検証することである。骨量減少の急性期における p53 遺伝子を介したシグナルの役割を明らかにする目的で、1 週間の不動化期間を選択した。

B. 研究方法

・動物

産業医科大学動物研究センターで、p53 遺伝子欠損マウスを作成し、同センターにて飼育、交配、繁殖した。後肢を不動化した状態でも、ケージ内をある程度自由に移動でき、摂食、飲水は自由に可能である。正常対照群も同じデザインのケージで飼育した。食餌は、標準的な CE-2(Clea Japan Inc.、東京)であり、1.25%カルシウムと1.06%リン、2.0 IU/g ビタミン D₃を含有している。8 週齢の雄性マウスを実験に用いた。摂餌量はすべての実験群間でマッチさせた。なお、実験のプロトコールは、産業医科大学動物実験倫理委員会において承認されている。

・実験群のデザイン

8 週齢の雄性、p53 遺伝子欠損マウス p53(-/-)、野生型マウス p53(+/-)をそれぞれ 2 群に分けた。グループ1は、1 週間の不動化(後肢を膝関節伸展位でバンデージ固定)を行った群である。グループ2は、1 週間、正常荷重を行った群(対照群)である。それぞれのグループにおいて、p53(-/-)と p53(+/-)を比較した。各遺伝子における各グループあたりのマウス数は、組織形態計測用に6匹、骨髄細胞培養実験用に6匹、RT-PCR用に3匹の計15匹であり、p53(+/-)30匹、(-/-)30匹の合計60匹である。

・組織形態計測

屠殺の6日前と2日前に6 mg/kg calceinを腹腔内投与し、骨梁表面に蛍光二重標識した。エーテルで麻酔し、心臓採血あるいは頸椎脱臼にて屠殺した。右側の脛骨を採取し、10%ホルマリンで固定、methylmethacrylate resin(MMA)で包埋し、Villanueva染色を行った。前額面を5 μmの厚さで薄切した。一部の標本は、パラフィンで包埋した後、酒石酸抵抗性酸ホスホターゼ(TRAP)染色とTUNEL(terminal dUTP nick-end labeling)染色を行った。

脛骨近位二次海綿骨で骨形態計測を行った。海綿骨量(BV/TV)、骨石灰化速度(MAR)、骨形成率(BFR/BS)を調べ、TRAP染色標本で、破骨細胞数(Oc.N/BS)と破骨細胞骨接触面(Oc.S/BS)を調べた。TUNEL染色で、骨梁内部に存在する骨細胞と骨梁表面に存在する骨芽細胞の中の陽性細胞を調べた。

屠殺時に、心臓採血を行い、血清中のアルカリフォスファターゼ濃度を調べた。脛骨長軸の骨長を測定した。

・骨髄細胞培養

尾部懸垂後の骨髄における骨芽細胞への分化過程に対する p53 の影響を知るために、脛骨から骨髄細胞を採取した。15% FCS、10 mmol/l dexamethazone、50 μg/ml ascorbic acid、10 mmol/l sodium β-glycerophosphateの存在下のα-MEMで細胞培養した。培養開始後8日目に、アルカリフォスファターゼ染色を行い、形成されたコロニー数をカウントした。培養開始後21日目に、培養dishに接着した細胞集団をalizarin redで染色し、