

mineralized nodule の形成面積を NIH image を用いて測定した。

・p53 mRNA の発現

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。

・統計

それぞれの時点で、同一遺伝子マウスにおける、不動群と正常対照群との間の検定は、Mann-Whitney's U-test で、 $p < 0.05$ を有意とした。

C. 研究結果

・体重、骨長、血清アルカリフォスファターゼ値

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。

・組織形態計測

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

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。

D. 考察

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。

E. 結論

不動化したマウスにおける海綿骨量減少や骨形成低下は、骨髄細胞における p53 遺伝子を介したシグナル伝達の亢進と関連している。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 の形成の実験結果も支持していた。

F. 研究発表

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

1) 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

2) 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

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

3. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)
総合研究報告書

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

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。このマウスは、今後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。iNOS および p53 を遺伝的に欠損するマウスを用いて、非加重状態における骨粗鬆症には p53 が、再荷重時の骨形成促進には iNOS 由来の NO が必須であることを明らかにした。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:力学的負荷、骨細胞、遺伝子、骨粗鬆症、寝たきり

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
整形外科学教室
教授

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が、臥床時の免荷や運動・重力による荷重などの機械的刺激が、どのようなメカニズムで骨で感知され、どのようなシグナル伝達系を介して骨代謝を調節しているかはほとんど解明されておらず謎のままである。本研

究では、骨にもっとも多く存在し、機械的刺激を受ける上で主要な細胞と考えられている骨細胞 (osteocyte) に着目し、骨細胞が特異的に発現する遺伝子群を同定し、それらが果たす機能を明らかにすることによって、骨における機械的刺激の受容の程度を体外から診断し、骨細胞の機能を賦活化するような薬物を開発することを目的に行った。また、iNOS および p53 ノックアウトマウスを用いて、NO や p53 が mechanotransduction に果たす役割を *in vivo* で明らかにした。

B. 研究方法

1. 骨細胞が発現する遺伝子群の探索と機能解析

サブトラクション法を用いて骨細胞に特異的に発現する遺伝子群の探索を行った。8週齢の ICR マウス[♂]から摘出した脛骨を材料とし、それらの結合組織を除去後、1mm 角以下の骨片にした。この骨片を 0.75mg/mL コラゲナーゼで5回処理(37°C振とう、20分×5回)した。コラゲナーゼ処理1回目を行った後に残った骨片を破碎し調整した total RNA を (*leg1.5*) とした。一方、コラゲナーゼ処理 1 回目のコラゲナーゼ液から回収した細胞をコラーゲン I 型コートプレートに

播き、1-2週間後回収した細胞から調整した total RNA を (leg1) とした。同様に、コラゲナーゼ処理2, 3 回目または4, 5 回目のコラゲナーゼ液から回収した細胞を培養後、回収調製した total RNA をそれぞれ (leg2,3), (leg4,5) とした。(leg1,5) をテスター(骨細胞が豊富な分画) とし、(leg1) と (leg2,3) と (leg4,5) を等量混ぜたサンプル (leg1-5) をドライバー(骨芽細胞が豊富な分画) として、テスターからドライバーを差し引いたサブトラクションライブラリーを CLONTECH PCR-Select cDNA Subtraction Kit を用いて作製した。このライブラリーから、テスターにおいて高発現しているクローンをディファレンシャルスクリーニングによりピックアップ後、ノーザンブロットングで確認した。骨細胞における特異的発現は、8 週齢マウス ICR の脛骨凍結切片を用いた in situ ハイブリダイゼーションによって検討した。新規遺伝子についてはデータベースをもとに設計したプライマーを用いて PCR を行い、ヌクレオチド配列の決定を行った。

骨細胞のないマウスを開発するため、まず mouse genomic library Lambda FIX II (Stratagene 社) より 1.0×10^6 個を Mouse DMP15' 上流-3500-3000 (500 bp) をプローブとしてスクリーニングを行い、DMP-1 プロモーターを単離した。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) に組み込み、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, 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。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(DMEM, 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。

骨芽細胞・骨細胞の調整は、まず軟組織と骨髄を除去後、コラゲナーゼ溶液中、37 度で骨片を振盪する。遊離した細胞を取り出す操作をくりかえして(骨芽細胞分画) 骨片を洗浄し、静置培養する(骨細胞分画)。1 週間後外生した細胞がフィブロブラストの形態を示すときは、骨片を集めて 0.25%トリプシンで 20 分ほど振盪し、ピペッティング操作をくりかえして骨片を洗浄して培養皿に移す。数週間後外生した細胞をサンプルとして回収した。骨髄細胞の採集は定法に従いラット大腿骨より行い、接着細胞を分化させて用いた。

伸展刺激に得意的な遺伝子を解析するには、11 秒

間に1/3Hzで4回伸展・解除した後49秒間静置するサイクルを3時間繰り返した後、更に3時間静置培養して材料とした。大久保らの方法(Nature Genet. 2:173, 1992)に従い約4,200のクローンを無作為抽出し、ベクタープライマーを用いたPCRによりcDNA由来の部位を増幅し、シークエンスを決定した。特異的発現の示唆されたタンパクの抗体を入手し、タンパクレベルでの発現をWestern blot法で調べた。

動物実験は、平成14年度の報告書に記載のとおりの方法による。概略は、30週齢の雌Wistarラットを、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6週間飼育し、カルセインによる二重標識の後屠殺、骨密度、骨形態のパラメータならびに骨中タンパク・mRNAの発現におよぼすPTHの効果を検討した。

2. 力学的負荷に対する骨反応に果たすiNOSおよびp53の役割

iNOS遺伝子欠損マウスはJackson Laboratoryから購入し、p53遺伝子欠損マウスは産業医科大学動物研究センターで作成した。ともに、同センターにて飼育、交配、繁殖した。尾部懸垂や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。

8週齢の雄性、iNOS遺伝子欠損マウスを4群に分けた。グループ1は、1週間の非荷重(尾部懸垂)を行った群である。グループ2は、1週間、正常荷重を行った群である。グループ3は、1週間の非荷重(尾部懸垂)の後、2週間の再荷重を行った群である。グループ4は、3週間、正常荷重を行った群である。それぞれのグループにおいて、iNOS遺伝子欠損マウス(-/-)と野生型マウス(+/+)を比較した。海綿骨量の変化に関しては、ヘテロ型マウス(+/-)も用いた。各遺伝子における各グループあたりのマウス数は、組織形態計測用に6匹、骨髄細胞培養実験用に4匹の計10匹であり、iNOS(+/+)40匹、(+/-)40匹、(-/-)40

匹の合計120匹である。NO補充とNO阻害実験として、上記の4グループとは全く別に実験を組んだ。再荷重時に、iNOS(+/+)マウスにNOS inhibitorであるaminoguanidine 20 mg/dayを投与する実験(投与する群としない群、それぞれ5匹ずつ)と、iNOS(-/-)にNO donorであるnitroglycerin(2% nitroglycerin tapeを貼付)を投与する実験(投与する群としない群、それぞれ5匹ずつ)を行い、組織形態計測と骨髄細胞培養を行った。

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。脛骨を採取した。前額面を5 μmの厚さで薄切した。Villanueva染色、酒石酸抵抗性酸ホスフォターゼ(TRAP)染色も行った。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。iNOS実験では、再荷重後12時間、1、2、3、7、14日に、ウサギ抗iNOS polyclonal抗体を用いて、iNOSの免疫染色を行った。それらの隣接切片にて、アルカリホスフォターゼ(ALP)染色を行った。p53実験では、TUNEL(terminal dUTP nick-end labeling)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ALP濃度を調べた。脛骨長軸の骨長を測定した。

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、ALP

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。

それぞれの時点で、同一遺伝子マウスにおける、非荷重群/再荷重群/不動群と正常対照群との間の検定は、Mann-Whitney's U-test で、 $p < 0.05$ を有意とした。

C. 研究結果と考察

1. 骨細胞が発現する遺伝子群とそれらの機能

サブトラクション法によるスクリーニングを行った。1300 クローンをディファレンシャルスクリーニングにかけ、テスターにおいて高発現している 47 個 16 種類の遺伝子を単離した。内 39 個 10 種が既知遺伝子、8 個 6 種が EST であった。これらの内、complement factor H および機能未知の EST クローンの 2 クローンにおいてノーザンブロッティングによりテスター>ドライバーという発現量差が確認されたが、ともに *in situ* ハイブリダイゼーションでは検出限界以下であった。この EST クローンについて、ヌクレオチド配列の決定を行ったところ、365a.a. の新規蛋白をコードしていることが予測された。ホモロジー検索の結果、そのヒト相同遺伝子と一次構造にホモロジーの高いマウスの遺伝子がそれぞれ検出され、GOR1、GOR2 と命名した。これらはいずれも 6 カ所の疎水領域があり、膜蛋白である可能性が示された。ノーザンブロッティングの結果、leg bone と un-pregnant uterus において特に発現していることが確認された。また、ST2、MC3T3-E1、KUSA-A1 などの間葉系または骨芽細胞様の細胞株においては発現が確認されなかった。興味深いことに石灰化条件下(アスコルビン酸および β グリセロフォスフェート存在下で 52 日間培養)の MC3T3-E1 において発現の顕著な増加が確認され、骨芽細胞の石灰化能促進因子である可能性あるいは骨芽細胞系の後期分化の指標になる可能性が考えられた。ノックアウトマウス作成のため、それぞれの ES 細胞を樹立した。今後はこれらのマウスの解析から、*in vivo* における GOR1 および GOR2 の機能を解明することが重要である。

骨細胞が発現する遺伝子群を包括的に同定する目

的で骨細胞のないマウスの開発を行った。まずマウス DMP1 遺伝子プロモーターを単離し、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)を用いてルン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。

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 遺伝子が発現する細胞特異的に機能的なジフテリア毒素受容体が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。

げっ歯類頭蓋冠ないしげっ歯類およびヒト下肢骨より単離した骨の細胞を、一部基底膜由来のマトリックス(マトリゲル)上で培養する事により積極的に増殖を停止させて分化を誘導し、骨芽細胞から骨細胞にわたる分化段階の異なるについて力学刺激に対する応答を検討した。同時にげっ歯類下肢骨骨髄より骨髄細胞を得、骨芽細胞にいたる前駆細胞についても同様に検討した。これまでの実験では、仔ラット頭蓋冠より単離した細胞の伸展刺激に対する応答は成熟骨芽細胞よりも分化した、幼若骨細胞の反応性が最も高く、伸展刺激負荷後の細胞内においてmRNA レベルの変化を経時的に比較した結果、タンパクにより主に5つのパターンを示すことを見出している(Kawata and Takagaki, 1998)。1) cfos 型:一過性に初期(immediate-early)に上昇する一峰型、2) COX 2 型:1)に加えて12時間後に再上昇する二峰型、3) IGF-I・オステオカルシン型:初期の上昇の後一旦下降し、24時間後に再上昇する二峰型、4) iNOS 型:なだらかに上昇してゆっくり下降し、24時間ではほぼ元に戻る一峰型、5) COX 1 型:無変化型の5つのタイプである。3)の遅延型の応答の情報伝達は、週に2-3回の運動の効果が持続的であることをよく説明し、重要であると考えている。高周波パルスによる低出力超音波パルス刺激(超音波骨折治療器)の場合には骨細胞は格段の応答を示さず、逆に骨芽細胞が最もよく応答した。応答したタンパクの種類は多少異なるものの、超音波パルス刺激によっても基本的には上述のような5パターンの応答が得られ、IGF-Iの遅延型応答はここでも成り立っていた。

拘束(歩行運動を制限する)によってラットにいわゆるストレスを与えずに全身的な不動化や廃用性骨萎縮の状態を再現するモデルが作成された。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単独の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個体の値が有意に高かった。3)運動制限により生じる骨中のIGF-Iや基質タンパクmRNAの発現低下は、運動制限下でもPTH投与により回復するが、フリー/PTHにおいては2)と同様相乗的な昂

進が見られた。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。

2. 力学的負荷に対する骨反応に果たすiNOSおよびp53の役割

海綿骨量(BV/TV)は、非荷重後1週で、iNOS(+/+), (+/-), (-/-)ともに同程度、正常荷重群に比べて有意に減少した。骨形成率(BFR/BS)は、非荷重後1週で、正常荷重群に比べて有意に減少した。破骨細胞骨接触面(Oc.S/BS)は、正常荷重群に比べて、いずれの遺伝子型においても増加した。

非荷重後の再荷重で、BV/TVは、iNOS(+/+)では、正常荷重群レベルまで増加したのに対し、(-/-)は低下したままであった。iNOS(+/-)は、(+/+)と(-/-)の中間値まで増加した。BFR/BSは、再荷重で、iNOS(+/+)は、正常荷重群レベルまで増加したのに対し、(-/-)は低下したままであった。Oc. N/BSおよびOc.S/BSは、非荷重後1週で、iNOS(+/+)と(-/-)は同程度に増加した。再荷重で、iNOS(+/+)は、正常荷重群レベルまで低下したのに対し、(-/-)は増加したままであった。

Mineralized noduleの形成は、非荷重後1週の脛骨から採取した骨髄細胞では、iNOS(+/+)と(-/-)は同程度に低下した。再荷重の脛骨から採取した骨髄細胞では、iNOS(+/+)は正常荷重群レベルまで増加したのに対し、(-/-)は低下したままであった。

iNOS(-/-)の再荷重時にみられた骨量、骨形成、mineralized noduleの形成の低下は、NO donorであるnitroglycerin投与により回復した。逆に、iNOS(+/+)の再荷重時にみられた骨量、骨形成、mineralized noduleの形成の回復は、NOS inhibitorであるaminoguanidine投与により抑制された。

iNOS(+/+)において、骨芽細胞は、非荷重により扁平化し、再荷重で立方形になった。非荷重状態では、免疫染色で、骨芽細胞や骨細胞にiNOS蛋白は検出できなかった。再荷重後12時間で、立方形になった

骨芽細胞に、iNOS 蛋白の発現を認め、同時に ALP 染色で強い陽性を示した。iNOS 蛋白は、再荷重時の骨細胞にも検出された。ALP 陽性細胞は、再荷重後 12 時間の骨梁表面と皮質骨内面に存在していた。再荷重 1 日以降の切片では、iNOS および ALP の染色性は低下してきた。

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。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、ALP 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。

iNOS 実験の結果から、尾部懸垂による非荷重では、iNOS 遺伝子に関係なく、骨量減少、骨形成低下、骨吸収亢進が同じように認められた。一方で、再荷重に対する骨形成ないし骨吸収反応は、iNOS(-/-)で欠如し、nitroglycerin の投与で回復、iNOS(+/-)においても aminoguanidine 投与により抑制されたことから、iNOS 遺伝子由来の NO は、非荷重後の再荷重における骨形成反応に必須であることが、組織形態計測および ex vivo の骨髄細胞培養の結果から明らかとなった。

また、p53 実験の結果から、後肢不動化により p53(-/-)では、骨量減少、骨形成低下、骨吸収亢進が認められなかった。p53(+/-)では、不動化により、骨細胞や骨芽細胞の TUNEL 陽性細胞の増加がみられたが、p53(-/-)ではみられなかった。不動化による骨量減少には、p53 遺伝子を介したシグナル伝達の亢進が重要であることが、組織形態計測および ex vivo

の骨髄細胞培養の結果から明らかとなった。

力学的刺激が、骨形成系細胞に至るシグナル伝達経路において、NO が重要であることを示唆する過去の報告はある。Chow ら(J Bone Miner Res 13: 1039-1044, 1998)は、ラットの尾骨を急激に圧迫することにより、尾骨の石灰化面と海綿骨量が増加したことと、NO donor である S-nitroso-N-acetyl-D, L-penicillamineあるいはS-nitroso-glutathioneを投与することで、さらにこれらのパラメーターが増加したことを報告している。一方で、NO inhibitor である L-N^G-monomethyl-arginine を力学刺激の 15 分前に投与しておく、骨形成の増加が抑制されたと報告している(Am J Physiol 270: E995-E960, 1996)。これらの報告は、再荷重時の骨形成反応に NO が必須であるという今回の研究結果と一致している。また、一方で、今回の研究結果から、力学刺激消失時(非荷重時)の骨量減少や骨形成低下は、NO の存在に依存しないことがわかった。

我々は、非荷重後の再荷重時に、iNOS 蛋白を骨細胞や骨芽細胞に認めた。iNOS の発現は、サイトカイン刺激下や新生児の骨細胞では検出されている(J Bone Miner Res 12: 1108-1115, 1997)。eNOS 蛋白は恒常的に発現しているが、iNOS 蛋白は、非常に限られた環境で発現し、正常荷重時には認められないのかもしれない。

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(Endocrinology 142: 1333-1340, 2001)。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 の亢進と関連している。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、不動化状態でみられるアポトーシスは、主に、p53 を介したものであると考えられた。

ALP 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、ALP 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

骨細胞を豊富に含む分画からサブトラクション法を用いて新規遺伝子 GOR1 および GOR2 を同定し、ノックアウトマウスの作成を行った。今後、これらの機能を細胞培養およびマウス遺伝学などの方法により明らかにしていく予定である。iNOS および p53 ノックアウトマウスを用いて、荷重刺激に対する骨形成反応に iNOS が産生する NO や 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

Masuda Y, Sasaki A, Ikeda K, Watanabe K: Dlxin-1, a novel protein that binds Dlx5 and regulates its transcriptional function. *J Biol Chem* 276:5331-5338, 2001

Sasaki A, Masuda Y, Ikeda K, Watanabe K: Filamin associates with Smads and regulates TGF- β signaling. *J Biol Chem* 276:17871-17877, 2001

池田恭治: 退行期骨粗鬆症の病態生理 ホルモンと臨床 48:4-12, 2000

Sato T, Shibata T, Ikeda K, Watanabe K: Generation of bone-resorbing osteoclasts from B220-positive cells: its role in accelerated osteoclastogenesis due to estrogen deficiency. *J*

Bone Miner Res 16:2215-2221, 2001

Ikeda K, Ogata E Modulation of bone remodeling by active vitamin D: its role in the treatment of osteoporosis. **Mech Age Dev** 116:103-11, 2000

Tojima Y, Fujimoto A, Delhase M, Chen Y, Hatakeyama S, Nakayama K, Kaneko Y, Nimura Y, Motoyama N, Ikeda K, Karin M, Nakanishi M NAK is an I κ B kinase-activating kinase. **Nature** 404:778-782, 2000

Takai H, Tominaga K, Motoyama N, Nagahama H, Ikeda K, Nakayama K, Nakanishi M, Nakayama K-I Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1^{-/-} mice. **Genes & Dev** 14:1439-1447, 2000

Yamamoto A, Hashimoto Y, Kohri K, Ogata E, Kato S, Ikeda K, Nakanishi M Cyclin E as a co-activator of the androgen receptor. **J Cell Biol** 150:873-879, 2000

Yamada Y, Harada A, Hosoi T, Miyauchi A, Ikeda K, Ohta H, Shiraki M: Association of transforming growth factor β 1 genotype with therapeutic response to active vitamin D for postmenopausal osteoporosis. **J Bone Miner Res** 15: 415-420, 2000.

Kanematsu M, Sato T, Takai H, Watanabe K, Ikeda K, Yamada Y Prostaglandin E2 induces expression of receptor activator of nuclear factor κ B ligand/osteoprotegerin ligand on pre-B cells: implications for accelerated osteoclastogenesis in estrogen deficiency. **J Bone Miner Res** 15:1321-1329, 2000

Shiraishi A, Takeda S, Masaki T, Higuchi Y, Uchiyama Y, Kubodera N, Sato K, Ikeda K, Nakamura T, Matsumoto T, Ogata E Alfacalcidol inhibits bone resorption and stimulates formation

in an ovariectomized rat model of osteoporosis: distinct actions from estrogen. **J Bone Miner Res** 15:770-779, 2000.

Yamada Y, Okuizumi H, Miyauchi A, Takagi Y, Ikeda K, Harada A Association of transforming growth factor β 1 genotype with spinal osteophytosis in Japanese women. **Arthritis Rheum** 43:452-460, 2000

Endo K, Katsumata K, Hirata M, Masaki T, Kubodera N, Nakamura T, Ikeda K, Ogata E 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ as well as its analogue OCT lower blood calcium through inhibition of bone resorption in hypercalcemic rats with continuous parathyroid hormone-related peptide infusion. **J Bone Miner Res** 15: 175-181, 2000

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

新鞍陽平、菱谷彰徳、佐々木文、池田恭治、渡辺 研 コラーゲン受容体 DDR2 のシグナル伝達機構 第 19 回日本骨代謝学会年会 8 月 8 日—11 日 名古屋

佐々木文、増田芳子、池田恭治、渡辺 研 Dlx5

の転写機能は RING finger 蛋白 prajal によって制御される 第 19 回日本骨代謝学会年会 8 月 8 日～11 日 名古屋

菱谷彰徳、石倉信之、伊東昌子、佐々木文、柴田猛、池田恭治、油谷浩幸、渡辺 研 老齢マウスにおける低形成性骨粗鬆症と DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現プロファイル 第 19 回日本骨代謝学会年会 8 月 8 日～11 日 名古屋

渡辺 研、内山也寸志、杉田敦子、武田 聰、菱谷彰徳、安居輝人、菊谷 仁、池田恭治 エストロゲン欠乏骨粗鬆症における T 細胞および CD40 を介した T-B シグナリングの関与 第 19 回日本骨代謝学会年会 8 月 8 日～11 日 名古屋

Watanabe K, Uchiyama Y, Sugita A, Takeda S, Hishiya A, Ikeda K. Role of T cells and T to B signaling through CD40 in the pathogenesis of estrogen deficient osteoporosis. The 23rd annual meeting, American Society for Bone & Mineral Research. 10 月 12 日～10 月 16 日 Phoenix, Arizona, USA.

Hishiya A, Mizuno K, Niikura Y, Sasaki A, Ikeda K, Watanabe K. DDR2, a collagen receptor, interacts with Jab-1 and activates MMP1 promoter through AP-1. The 23rd annual meeting, American Society for Bone & Mineral Research. 10 月 12 日～10 月 16 日 Phoenix, Arizona, USA.

Sasaki A, Ikeda K, Watanabe K. The transcription function of Dlx5 is regulated by a RING-finger protein praja-1 through ubiquitin-dependent degradation of Dlxin-1, a Dlx/Msx-interacting protein. The 23rd annual meeting, American Society for Bone & Mineral Research. 10 月 12 日～10 月 16 日 Phoenix, Arizona, USA.

日比陽子、荒木聖美、池田恭治、本山 昇 マウ

ス筋芽細胞 C2C12 の分化および脱分化におけるフォークヘッド型転写因子 AFX の機能解析 日本分子生物学会第 24 回年会 12 月 9 日～12 日 横浜

菱谷彰徳、新鞍陽平、佐々木文、池田恭治、渡辺研 コラーゲン受容体のシグナル伝達機構 日本分子生物学会第 24 回年会 12 月 9 日～12 日 横浜

柴田 猛、白石綾子、佐藤卓也、正木敏美、佐々木文、増田芳子、東佐由美、内田泰弘、斉藤元男、伊東昌子、尾形悦郎、渡辺 研、池田恭治 活性型ビタミン D の骨吸収に及ぼす in vivo での効果 第 18 回日本骨代謝学会 平成 12 年 7 月 19 日～22 日 広島

佐々木文、増田芳子、池田恭治、渡辺 研 アクチン結合蛋白 Filamin による Smad シグナル経路の制御 第 18 回日本骨代謝学会 平成 12 年 7 月 19 日～22 日 広島

綿貫 誠、酒井昭典、阪田武志、鶴上 浩、三輪政夫、内田泰弘、渡辺 研、池田恭治、中村利孝 非荷重後の再荷重における骨形成の亢進は NO に依存する 第 18 回日本骨代謝学会 平成 12 年 7 月 19 日～22 日 広島

Sasaki A, Ohta Y, Ikeda K, and Watanabe K. Filamin, a Cytoskeletal Actin-binding Protein is a Potential Regulator of Smad-mediated Signaling. The 22nd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Toronto, Canada, September 22-26, 2000

Shibata T, Shira-ishi A, Sato T, Masaki T, Sasaki A, Masuda Y, Higasi S, Uchida Y, Saito M, Ito M, Ogata E, Watanabe K, and Ikeda K. Active Vitamin D Inhibits Osteoclastogenesis In Vivo by Decreasing the Pool of Osteoclast Precursors in Bone Marrow. The 22nd Annual Meeting of American Society for

Bone and Mineral Research, Toronto, Canada, September 22-26, 2000

Watanuki M, Sakai A, Sakata T, Tsurumi H, Miwa M, Uchida Y, Watanabe K, Ikeda K, and Nakamura T. Evidence for Essential Role of NO in the Osteogenic Response to Mechanical Loading In Vivo: Studies in iNOS Knockout Mice. The 22nd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Toronto, Canada, September 22-26, 2000

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.

高垣裕子:骨形成の力学的要因—骨芽細胞の分化・局在に伴う応答のバリエーションと細胞間共同作用—, 日本骨形態計測学界雑誌 in press,

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.

Miyauchi, A., Notoya, K., Mikuni-Takagaki, Y., Takagi, Y., Goto, M., Miki, Y., Takano-Yamamoto,

T., Fujii, Y., Jinnai, K., Takahashi, K., Kumegawa, M., Chihara, K., and Fujita, T.: Parathyroid hormone-activated volume sensitive calcium influx pathways in mechanically loaded osteocytes. J. Biol. Chem., 275:3335-3342, 2000.

Naruse, K., Mikuni-Takagaki, Y., Azuma, Y., Ito, M., Oota, T., Kameyama, K. and Itoman, M.: Anabolic response of mouse-bone-marrow-derived stromal cell clone ST2 cells by low-intensity pulsed ultrasound. Biochem. Biophys. Res. Comm., 268:216-220, 2000

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.

成瀬康治, 宮部基, 大貫裕子, 宮内章光, 糸満盛憲, 高垣裕子: 低出力超音波パルスによる骨形成-分化段階と共に変化する骨髄細胞の応答. 第19回日本骨代謝学会, 東京 2001.

Y. Mikuni-Takagaki, K. Naruse, A. Miyauchi, Y. Onuki, T. Izumi, and M. Itoman: Bone marrow derived osteogenic cells, but not mature osteoblasts/osteocytes, are the target cells for the anabolic response to therapeutic low-intensity, pulsed ultrasound, American Society for Bone and Mineral Research 23rd Annual Meeting, 2001.

高垣裕子: 骨形成の力学的要因 第21回日本骨形態計測学会, 2001.

Y. Mikuni-Takagaki: The role of calcium channels in osteocyte function. The 31st International Sun Valley hard tissue workshop. 2001.

A. Miyauchi, K. K. Naruse, M. Itoman, M. Goto, K. Notoya, K. Okabe, Y. Takagi, K. Jinnai, Y. Yoshimoto, T. Sugimoto, K. Chihara, T. Fujita, Y. Mikuni-Takagaki, PTH Potentiates Volume Sensitive Calcium Influx in Mechanically Stretched Human Osteocytes. American Society for Bone and Mineral Research 23rd Annual Meeting, 2001.

高垣裕子: メカニカルストレスに対する細胞応答としての骨・軟骨形成作用 第4回超音波骨折治療研究会, 2001

中村 利孝

1. 論文発表

A Sakai, T Nakamura: Changes in trabecular bone turnover and bone marrow cell development in tail-suspended mice. J Musculoskel Neuron Interact 1: 387-392, 2001

R Okazaki, A Sakai, T Nakamura, et al: Sequential changes in transforming growth factor (TGF)- β 1 concentration in synovial fluid and mRNA expression of TGF- β 1 receptors in chondrocytes after immobilization of rabbit knees. J Bone Miner Metab 19: 228-235, 2001

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

T. Nakamura, et al. Recovery of bone mass, trabecular bone turnover and marrow cell development in mice tibia by reloading after tail-suspension. The 2nd International Workshop on Musculoskeletal Interactions. Delphi, Greece. 2000年5月

綿貫誠、中村利孝ほか. 非荷重後の再荷重にける骨形成の亢進はNOに依存する:iNOS ノックアウトマウ

スを用いた in vivo における解析. 第 18 回日本骨代謝学会. 広島. 2000 年 7 月

M. Watanuki, T. Nakamura, et al. Evidence for essential role of NO in the osteogenic response to mechanical loading in vivo: studies in iNOS knockout mice. 22nd Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Toronto, Canada. 2000 年 9 月

A. Sakai, T. Nakamura, et al. Trabecular bone mass and bone formation are preserved after mechanical unloading in p53 knockout mice. 1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the European Calcified Tissue Society, Madrid, Spain. 2001 年 6 月

酒井昭典、中村利孝ほか. 非荷重による骨量減少は、p53 を介した骨髄細胞のアポトーシスの亢進による. 第 19 回日本骨代謝学会. 名古屋. 2001 年 8 月

S. Uchida, A. Sakai, T. Nakamura, et al. Localized expression of hypoxia inducible factor family and differential expression of VEGF splice isoforms in neovascularization and bone formation during regenerating bone and bone marrow after drill-hole injury. 23rd annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Phoenix, Arizona, USA. 2001 年 10 月

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