

骨芽細胞の石灰化に対するアシドーシスの影響

竹 内 祥 子

愛知学院大学歯学部薬理学講座
(主任・指導：戸荻彰史教授)

ACIDOSIS INHIBITS MINERALIZATION IN HUMAN OSTEOBLASTS

SHOKO TAKEUCHI

Department of Pharmacology,
School of Dentistry, Aichi Gakuin University
(Chief and Director : Prof. A. Togari)

タイトル：ACIDOSIS INHIBITS MINERALIZATION IN HUMAN OSTEOBLASTS

著者：Shoko TAKEUCHI, Koji HIRUKAWA, Akifumi TOGARI

所属：Department of Pharmacology, School of Dentistry, Aichi Gakuin University,
1-100 Kusumoto-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8650, Japan

掲載誌名：Calcified Tissue International, **93**(3): 233-240, 2013.

目 次

I. 緒 言	1
II. 実験材料および方法	1
1. 実験材料	1
2. 細胞培養	1
3. 石灰化形成の測定	2
4. RT-PCR と定量的 RT-PCR による mRNA の分析	2
5. OPG 産生の分析	3
6. 遺伝子発現の抑制実験	3
7. 統計上の分析	3
III. 結 果	3
1. ヒト骨芽細胞の石灰化におけるアシドーシスの効果	3
2. ヒト骨芽細胞の mRNA 発現におけるアシドーシスの効果	3
3. ヒト骨芽細胞の OPG 産生におけるアシドーシスの効果	5
4. ヒト骨芽細胞の OPG タンパク質産生における c-Jun siRNA の効果	5
5. ヒト骨芽細胞の石灰化における c-Jun siRNA の効果	5
6. ヒト骨芽細胞の石灰化における OPG siRNA の効果	6
7. マウス骨芽細胞の石灰化における OPG タンパク質の効果	7
IV. 考 察	7
V. 結 論	9
謝 辞	9
文 献	9

I. 緒 言

骨組織はリモデリングと呼ばれる機構により骨改築が繰り返され、常に新鮮な組織が維持されるとともに、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成により骨量が恒常的に維持される。骨芽細胞は未分化間葉系細胞を起源とし、骨形成における有機質の産生とそれに続く石灰化に中心的な役割を果たす。一方、破骨細胞は造血幹細胞を起源とする多核の巨細胞で、単球・マクロファージ系細胞が分化・融合して形成されるが、この破骨細胞の分化の過程や機能調節にも、骨芽細胞や骨髄細胞由来のストローマ細胞が密接に関連することが知られている。

骨芽細胞には、破骨細胞の分化調節因子としてマクロファージ刺激因子 (monocyte-macrophage colony stimulating factor: M-CSF)、破骨細胞分化誘導因子 (receptor activator of NF- κ B ligand: RANKL)、破骨細胞分化抑制因子 (osteoprotegerin: OPG)、インターロイキン (interleukin: IL)-6、IL-11、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor: TNF) など、多くの因子の発現が知られている。特に RANKL は破骨細胞の分化に関与するだけでなく、細胞の伸展、遊走、骨吸収作用などの機能調節にも関与する重要な因子として知られている。一方、OPG は RANKL と RANKL の受容体である RANK の結合過程において、競合的に拮抗する。すなわち、RANKL の「おとり受容体」として機能し、破骨細胞の分化と機能を抑制することが知られている。この様に、骨芽細胞の産生する OPG や RANKL 発現が破骨細胞に与える影響について明らかにされているにも関わらず、骨芽細胞自身に対する OPG と RANKL の作用は未だ不明である。

一方、炎症等により引き起こされる局所のアシドーシスは、骨芽細胞における石灰化の抑制と破骨細胞の活性化により¹⁻⁴、骨吸収を引き起こすことが知られている。また、骨芽細胞に対する塩酸 (HCl) 添加のアシドーシス刺激において、特異的な骨基質タンパク質の遺伝子発現およびアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の低下による骨形成の抑制が報告されている⁵。また、その他の *in vitro* におけるアシドーシス刺激の方法として、培養の際の O₂ 濃度を減少させる方法や、CO₂ 濃度を増加させる方法が用いられているが、これらの方法による骨系細胞の反応は一概ではなく様々な結果が報告されている^{2,5,6,7}。また、代謝性アシドーシスの研究では、塩酸や塩化アンモニアを使用する研究も多いが、骨芽細胞の石灰化への影響を検討するためには長期間の培養が必要であるため、本研究では、培養期間中に安定したアシドーシス刺激を加えることのできる呼吸性アシドーシスを使用した。

本研究で注目した AP-1 (activator protein-1) は NF- κ B と同様にストレス応答性の転写因子であり、その発現が

pH 変動により影響を受ける事が知られている^{8,9}。また、AP-1 は、Jun タンパク質 (c-Jun, JunB, JunD) と Fos タンパク質 (c-Fos, Fra-1, Fra-2, FosB) あるいは ATF タンパク質 (ATF-2, ATF-3, ATFa, ATF-4) で構成されるヘテロ二量体であり、細胞の増殖、分化、アポトーシスに関与することも知られている¹⁰。また、AP-1 は骨芽細胞や破骨細胞に発現が認められ、骨芽細胞ではオステオカルシン遺伝子などのプロモーターに結合して骨芽細胞の増殖と分化を調節し^{11,12}、破骨細胞では、NF- κ B により誘導される NFATc1 (nuclear factor of activated T cell c1) に結合することで、RANK-RANKL による破骨細胞の分化を調節するなど、骨組織の生理的機能に重要な役割を担っていることが知られている¹³。

最新の研究では、*in vitro* において RANKL と RANK の結合が血管平滑筋細胞の石灰化を促進すること¹⁴、動脈硬化等に認められる炎症性刺激やストレスにより、血管平滑筋細胞の石灰化を誘導すること、さらに OPG の血中濃度が異所性石灰化に影響を及ぼすことなど、RANK-RANKL システムの骨組織以外での生理的役割が注目されている。

本研究では、アシドーシス刺激がヒト骨芽細胞の石灰化に与える影響と転写因子である AP-1 との関連について検討し、骨粗鬆症や歯周病等による炎症性骨吸収に対する治療法開発の一助になることを期待する。

II. 実験材料および方法

1. 実験材料

ヒト骨膜由来の骨芽細胞 (SaM-1 細胞)、および C57BL/6J マウス頭蓋骨より分離した骨芽細胞を実験に用いた。SaM-1 細胞は 20 歳男性の外傷性骨折の外科手術に際して、インフォームドコンセントを行った上で尺骨骨膜より分離した骨芽細胞で、腰原康子博士 (東京都老人総合研究所) から供与された。SaM-1 細胞の分裂能は有限であるが、34 回の継代 (population doubling levels: PDLs) まで石灰化能などの骨芽細胞の特徴を維持していることが確認されている。本研究では分裂能力が十分備わっている 22-23 PDLs を用いた¹⁵。マウス頭蓋骨由来の骨芽細胞は、出生直後の C57BL/6J マウス頭蓋骨より前頭骨、頭頂骨、後頭骨を一塊にして摘出した後、皮膚を含めた頭蓋冠周囲の軟組織を可及的に除去し、0.1% のコラゲナーゼを含む培養液にて 37°C、60 分攪拌し回収した。C57BL/6J マウスは Japan SLC Inc., Hamamatsu, Japan により購入し、「愛知学院大学歯学部動物実験実地規定」に従い、愛知学院大学歯学部動物実験委員会の承認 (承認番号: AGUD 129) を受けて実地した。

2. 細胞培養

培養液には Alpha-minimum essential medium (α -MEM;

Gibco/Invitrogen Co., Grand Island, NY, USA) に 10% の牛胎仔血清 (fetal calf serum: FCS; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) を添加したものを使用した。SaM-1 細胞の培養にはこの培養液に 60 $\mu\text{g/ml}$ カナマイシンを添加した培養液 (SaM-1 細胞に対するノーマル培養液: normal medium) を使用し、新生マウス骨芽細胞の培養液には 100 IU/ml ペニシリンと 100 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシンを添加した培養液 (新生マウス骨芽細胞に対するノーマル培養液) を使用した。また、石灰化を促進させるための培養液として、それぞれのノーマル培養液に 50 $\mu\text{g/ml}$ アスコルビン酸と 5 mM の β -グリセロリン酸を添加した (石灰化培養液: calcifying medium¹⁶⁾)。また、アシドーシス条件として、CO₂ 濃度を 10% に変更して培養した。このアシドーシス条件による pH の実測値は、培養 16 時間後で 7.03 \pm 0.03 (n=12) であった。また HCl 添加によるアシドーシス刺激は、SaM-1 細胞を 6 穴プレートにて培養し、1 穴あたり 2700 μl の培養液に対し 0.1N の HCl を 400 μl 添加した。この際の pH の実測値は対照群が 7.4 であったのに対し、HCl 添加アシドーシス群 (HCl 添加群) では添加直後の pH は 6.9 であった。

3. 石灰化形成の測定

SaM-1 細胞を、6 穴プレートにて石灰化培養液で培養し、培養後 21、23、25 日における細胞層の石灰化部を von Kossa 染色法にて染色した。von Kossa 染色は通法に従い、それぞれの細胞層をリン酸緩衝溶液にて 2 回洗浄後、100% エタノールにて固定し、5% 硝酸銀液にて染色した。石灰化部が黒く染色されたことを確認し、5% チオ硫酸ナトリウム液にて定着し、核染色にはケルンエヒトロート液を使用した。染色後、各プレートを顕微鏡下

にてデジタル画像として撮影し、その画像上で黒染した石灰化部分の総面積を画像解析ソフト NIH Image を用いて解析した。

新生マウスの骨芽細胞は 12 穴プレート (3.6cm²) にて石灰化培養液で 16 日間培養し、3 日毎の培養液交換の際、コントロール条件で培養した細胞の一部には、20 ng/ml OPG タンパク質 (OPG-FC; recombinant human osteoprotegerin, R & D systems, Minneapolis, MIN, U.S.A) を添加した。培養終了後に石灰化部を von Kossa 染色し、SaM-1 細胞と同様に、石灰化部の面積を NIH Image で解析した。

4. RT-PCR と定量的 RT-PCR による mRNA の分析

SaM-1 細胞を 70% コンフルエントになるまで培養し、酸性グアニジンチオシアネートフェノールクロロホルム (AGPC) 法にて total RNA を抽出した。抽出した total RNA は DNase I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) にて処理し、Oligo (dT) プライマー (Amersham Bioscience UK Ltd., Little Chalfont Buckinghamshire, UK) と逆転写酵素 M-MLV RT (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて cDNA を作製した。ヒト c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2, c-Jun, JunB, JunD, Egr-1, osteoprotegerin (OPG), RANK, RANKL, α -1 type I collagen (COLA1A), ALP, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA 発現は、表 1 に示すプライマーを用い、RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 法にて増幅した。GAPDH は house keeping gene として内部標準に用いた。PCR 産物は 2% アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色し、蛍光スキャナー

<p>表 1 PCRプライマーの塩基配列 Calcified Tissue International,93(3): 235参照</p>
--

(Typhoon9410; Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)にて目的のDNA断片を検出した。また、c-JunについてはTaqMan probeを用いた定量的PCR (real-time PCR)法にてmRNAの定量分析を行った。

5. OPG産生の分析

SaM-1細胞を12穴プレートにて培養後、石灰化培養液1 mlに交換して24時間の前培養を行った。その後、コントロール条件、または、アシドーシス条件にて培養し、培養液交換2日または3日後の培養液を回収した(図1)。回収した培養液は、遠心分離により細胞残渣などを除去した後、分析に用いた。OPGタンパク質濃度の測定には、ヒトOPGに対する二つの抗体(MAB8051, BAF805; R&D systems, Minneapolis, MIN, U.S.A)を用いたサンドイッチELISA法を用いた。

6. 遺伝子発現の抑制実験

c-Jun siRNA (ID #115274, #145018)、OPG siRNA (ID #11187) およびそれぞれのnegative controlのsiRNA (Silencer negative control #1)をAmbion Inc. (Austin, TX, USA)より購入し、トランスフェクション試薬(Lipofectamine 2000, Invitrogen)を用いて細胞にc-Jun、OPGおよびnegative controlのsiRNAを形質導入した。

7. 統計上の分析

得られたデータは平均値±標準誤差で示し、ANOVA、Student' *t*-test、またはpost-hoc Bonferroni検定を用いて統計的有意差を判定した。

Ⅲ. 結 果

1. ヒト骨芽細胞の石灰化におけるアシドーシスの効果 ヒト骨芽細胞の石灰化に与えるアシドーシスの影響を

調べるため、SaM-1細胞を石灰化培養液にて培養し、10%CO₂のアシドーシス刺激による効果を調べた。対照群はノーマル培養液にてコントロール条件(5%CO₂)で培養した。また、石灰化培養液での培養では、一週間のうち0、1、2、7日間をアシドーシス条件にて培養し、培養23日後にvon Kossa染色を行った。その組織所見を図2Aに示したが、石灰化培養液群ではノーマル培養液群よりも顕著に石灰化が促進され、石灰化培養液により促進された石灰化はアシドーシス刺激により著しく抑制された。画像解析ソフトNIH Imageによる石灰化領域の解析結果を図2Bに示した。石灰化培養液群では、ノーマル培養液群に比べ有意な石灰化面積の増加が認められた。一方、この石灰化培養液により誘導された石灰化は、アシドーシス刺激により著しく抑制された。また、その抑制は一週間のうち1日のアシドーシス刺激群においても顕著な抑制であった。

2. ヒト骨芽細胞のmRNA発現におけるアシドーシスの効果

図2において、石灰化培養液により石灰化が促進され、アシドーシス刺激にて石灰化が抑制されることが示された。そこで、ヒト骨芽細胞における石灰化抑制の機構を解析するため、SaM-1細胞における転写因子(c-Fos、FosB、Fra-1、Fra-2、c-Jun、JunB、JunD、Egr-1)と骨由来遺伝子(OPG、RANK、RANKL、COLA1A、ALP)発現に対するアシドーシス刺激の影響を検討した。SaM-1細胞を石灰化培養液にて培養し、アシドーシス条件にて0、1、3、6、24時間培養後のmRNA発現をRT-PCR法を用いて分析した(図3)。SaM-1細胞は骨芽細胞の必須遺伝子であるCOLA1AとALPを強く発現するとともに、OPG、RANK、RANKLのmRNAも恒常的に発現していた。また、対象とした転写因子では、JunD

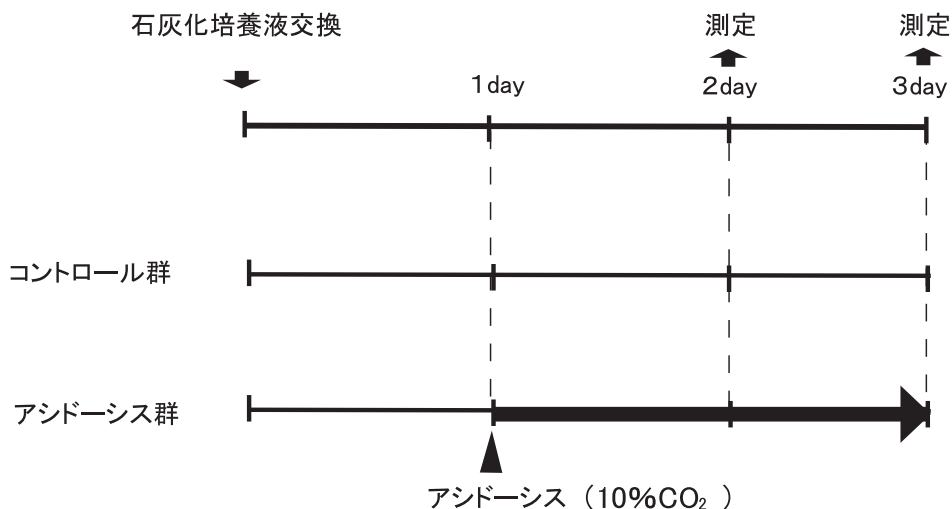


図1 OPGタンパク質産生の実験方法

図2 ヒト骨芽細胞の石灰化におけるアシドーシスの効果
 Calcified Tissue International,93(3): 236参照

図2 ヒト骨芽細胞の石灰化におけるアシドーシスの効果

SaM-1 細胞をコントロール (5%CO₂) 条件において、ノーマル培養液または石灰化培養液で培養した。石灰化培養液で培養したものは一週間毎に0、1、2、7日間アシドーシス (10%CO₂) 刺激を行った。A: 培養23日後の von Kossa 染色像 (弱拡大)。B: 石灰化した面積の解析結果。石灰化面積 (%) は平均値 ± 標準誤差 (n=10) で示した。* *P<0.001 はノーマル培養液のコントロール群との比較、##P<0.001 は石灰化培養液のコントロール群との比較。

図3 ヒト骨芽細胞のmRNA発現におけるアシドーシスの効果
 Calcified Tissue International,93(3): 236参照

図3 ヒト骨芽細胞の mRNA 発現におけるアシドーシスの効果

SaM-1 細胞を石灰化培養液で培養し、アシドーシス刺激 (10%CO₂) 0、1、3、6、および24時間後の mRNA 発現を RT-PCR 法により解析した。ゲルの左側レーンには DNA サイズマーカー (ϕ X174/HaeIII digest) を泳動し、写真の右括弧内には PCR のサイクル数を示した。

を除くすべてが恒常的に発現していた。一方、アシドーシス刺激は c-Jun mRNA の発現を刺激3~24時間で経時的に抑制し、逆に OPG mRNA の発現を刺激6~24時間で増加した。また、その他の mRNA の発現には変化は見られなかった。

そこで、短時間のアシドーシス刺激の影響を調べるた

め、HCl 添加のアシドーシスによる c-Jun の mRNA 発現を検討した。ノーマル培養液で培養した SaM-1 細胞に、HCl 添加によるアシドーシス (pH6.9) 刺激の0.5、1、3、6時間培養後、HCl 非添加では0、0.5、1時間培養後に total RNA を抽出し、RT-PCR 法にて c-Jun の mRNA 発現を分析した。SaM-1 細胞における c-Jun の mRNA 発現は、

HCl 添加によるアシドーシス刺激でも著しく抑制されることが確認された (図 4)。

3. ヒト骨芽細胞の OPG 産生におけるアシドーシスの効果

図 3 において、アシドーシス刺激により OPG mRNA の発現増加が見られたため、ヒト骨芽細胞におけるアシドーシス刺激の OPG タンパク質産生への影響を検討した。SaM-1 を石灰化培養液にて 1 日前培養し、アシドーシス刺激を行った。アシドーシス刺激 1、2 日培養後の培養液を回収し、OPG タンパク質濃度を ELISA 法で測定した。OPG タンパク質産生は対照群とアシドーシス刺激群の両方で経時的に増加した。またアシドーシス刺激は SaM-1 細胞における OPG 産生を有意に促進した (図 5)。

4. ヒト骨芽細胞の OPG タンパク質産生における c-Jun siRNA の効果

ヒト骨芽細胞に対するアシドーシス刺激が、c-Jun mRNA 発現の抑制と OPG mRNA 発現と OPG タンパク質産生の増加を引き起こすことが示された。そこで、ヒト骨芽細胞における c-Jun と OPG の関連性を検討する目的で、c-Jun siRNA による OPG タンパク質産生への影響を検討した。SaM-1 細胞に対し、2 種類の c-Jun siRNA (#115274, #145018) とその negative control 25nM を形質導入し、まず c-Jun siRNA の抑制効率を確認した。すなわち形質導入された SaM-1 を 1、2、3 日培養した後に total RNA を抽出し、real-time RT-PCR 法により c-Jun mRNA の発現を分析した。2 種類の c-Jun

siRNA 群と negative control 群で c-Jun mRNA 発現を比較し、2 種類とも c-Jun を抑制する事を確認するとともに、#145018 の c-Jun siRNA の抑制効率がより優れていることを確認した (図 6A)。また同時に、c-Jun 形質導入した SaM-1 細胞から培養 1、2、3 日後の培養液を回収し、OPG タンパク質濃度を ELISA 法にて分析した。使用した 2 種類の c-Jun siRNA 群は negative control 群と比較すると OPG タンパク質産生を有意に促進した。また、c-Jun mRNA の抑制効率がより強い c-Jun siRNA (#145018) は OPG 産生を強く促進することが認められた (図 6B)。

5. ヒト骨芽細胞の石灰化における c-Jun siRNA の効果

c-Jun mRNA 発現と OPG タンパク質産生に関係性が認められたことから c-Jun siRNA がヒト骨芽細胞の石灰化に与える影響について検討した。SaM-1 細胞に対し c-Jun siRNA (#145018) およびその negative control 100nM を形質導入し、5%CO₂ で石灰化培養液にて培養した。培養 25 日後に von Kossa 染色法を用いて石灰化部を染色した (図 7A)。組織所見にて、両群とも石灰化が認められたが、c-Jun siRNA (#145018) 群では negative control 群と比較して顕著な石灰化の形成抑制が観察された (図 7A)。画像解析ソフト NIH Image による石灰化面積の解析結果においても、c-Jun siRNA (#145018) 群の石灰化面積は negative control 群に対して著しく抑制された (図 7B)。これらの結果より、ヒト骨芽細胞における c-Jun mRNA の抑制は、OPG タンパク質産生を増加させるとともに、石灰化を抑制することが確認された。

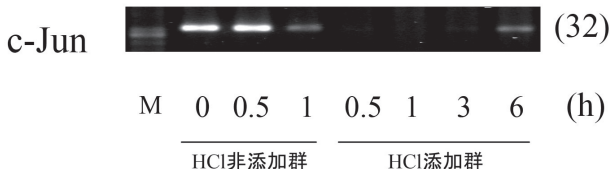


図 4 ヒト骨芽細胞の c-Jun mRNA 発現に及ぼす HCl 添加の効果
培養液 2700 μ l に対して 0.1N の HCl を 400 μ l 添加して SaM-1 細胞を培養した。この際の pH の実測値はコントロール群 (HCl 非添加) が 7.4 であったのに対し、アシドーシス群 (HCl 添加群) は添加直後で 6.9 であった。HCl 非添加のものは 0、0.5、1 時間培養し、HCl 添加は 0.5、1、3、6 時間培養した。total RNA を抽出し、c-Jun の遺伝子発現を RT-PCR 法により解析した。ゲルの左側レーンには DNA サイズマーカー (ϕ X174/HaeIII digest) を泳動し、写真の右括弧内には PCR のサイクル数を示した。

図 5 ヒト骨芽細胞の OPG 産生におけるアシドーシスの効果
Calcified Tissue International,93(3): 237参照

図 5 ヒト骨芽細胞の OPG 産生におけるアシドーシスの効果
SaM-1 細胞を石灰化培養液にて 24 時間前培養し、コントロール条件 (5% CO₂)、または、アシドーシス条件 (10% CO₂) にて、さらに 1 日または 2 日培養した。培養液交換 2 または 3 日後の、培養液中の OPG タンパク質産生量を ELISA 法で測定した。タンパク質量 (ng/ml) は平均値 \pm 標準誤差 (n=6) で示した。
**P<0.001 は同日のコントロール群との比較。

図6 c-Jun mRNAによるc-Jun発現の抑制効率とc-Jun mRNAによるOPGタンパク質産生
Calcified Tissue International,93(3): 237参照

図6 c-Jun siRNAによるc-Jun mRNA発現の抑制効率とc-Jun siRNAによるOPGタンパク質産生

A: c-Jun siRNAによるc-Jun mRNA発現の抑制効率

SaM-1細胞にnegative controlと2種類のJun siRNA (#115274、#145018)を形質導入し、1、2、3日後のc-Jun mRNAの発現をreal-time PCR法により解析した。*** $p < 0.001$ 、* $p < 0.1$ はnegative control群との比較。

B: c-Jun siRNAによるOPGタンパク質産生

SaM-1細胞を1、2、3日間培養後の培養液を回収し、OPGタンパク質産生量を測定した。OPGタンパク質量 (ng/ml)は平均値±標準誤差 (n=6)で示した。*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ はnegative control群との比較。

図7 ヒト骨芽細胞の石灰化におけるc-Jun siRNAの効果
Calcified Tissue International,93(3): 238参照

図7 ヒト骨芽細胞の石灰化におけるc-Jun siRNAの効果

SaM-1細胞にnegative controlとc-Jun siRNA (#145018)を形質導入し、5%CO₂下にて石灰化培養液で培養した。

A: 培養25日後のvon Kossa染色像(弱拡大)。

B: 石灰化した面積の解析結果。石灰化面積(%)は平均値±標準誤差(n=10~15)で示した。*** $p < 0.001$ はnegative control群との比較。

6. ヒト骨芽細胞の石灰化におけるOPG siRNAの効果

c-Jun siRNAにより、ともに影響が確認されたOPGと石灰化の関係性を検討するため、ヒト骨芽細胞におけるOPG siRNAの石灰化への影響について検討した。SaM-1

細胞に対し、OPG siRNA (#11187)およびそのnegative controlを形質導入し、5%CO₂にて石灰化培養液で培養した。培養21日後にvon Kossa染色法を用いて石灰化部を染色した(図8A)。組織所見にて両群とも

石灰化部が観察されたが、OPG siRNA (# 11187) 群において negative control 群に比べ石灰化の形成促進が観察されていた。画像解析ソフト NIH Image による石灰化面積の解析結果は、OPG siRNA (# 11187) の石灰化面積が negative control に比較して有意に増加し、この石灰化面積の増加作用は OPG siRNA 10nM と 100nM の間で濃度依存的であった (図 8B)。

7. マウス骨芽細胞の石灰化における OPG タンパク質の効果

新生マウス骨芽細胞を、12 穴プレートに 8×10^5 になるように播種し、石灰化培養液 1 ml にて培養し、OPG の石灰化に及ぼす影響について検討した。対照群は 5%CO₂、アシドーシス群は 10%CO₂ にて培養した。OPG タンパク質添加群には、3 日毎の培養液交換の際に、20ng/ml の OPG タンパク質を添加した。16 日培養後、von Kossa 染色法を用いて石灰化部を染色した (図 9A)。組織所見において、対照群では石灰化結節が確認できたが、アシドーシス群では石灰化結節形成の明らかな抑制が認められた。また OPG タンパク質添加群では、さらに石灰化結節の強い抑制が観察された。画像解析ソフト NIH Image による石灰化面積の解析結果においても、アシドーシス群と OPG タンパク質添加群は対照群に比し著しい石灰化面積の抑制を示した (図 9B)。

IV. 考 察

AP-1 は、Jun タンパク質 (c-Jun、JunB、JunD) と Fos タンパク質 (c-Fos、Fra-1、Fra-2、FosB)、または ATF タンパク質 (ATF-2、ATF-3、ATFa、ATF-4) で構成されるヘテロ二量体である。AP-1 はストレス応答性の転写因子として知られており、骨芽細胞や破骨細胞の生理的機能に重要な役割を担う。特に c-Fos は発達段階の軟骨や骨で発現が強く認められ、無機質代謝に重要な役割を担うことが知られている。例えば、c-Fos 遺伝子の欠損マウスでは骨大理石病を生じ^{17,18)}、c-Fos 過剰発現系である遺伝子導入マウスでは骨肉腫を発症する¹⁹⁾。また、c-Fos 欠損マウスに対し、同じ Fos ファミリーである Fra-1 遺伝子を導入することにより、破骨細胞形成が回復すること²⁰⁾、さらに、Fra-1 が骨芽細胞や軟骨細胞における骨基質産生促進作用を示すことは²¹⁾、Fos ファミリーの骨組織への関与を強く示唆するものである。

アシドーシスによる骨組織への影響は、*in vivo* において、代謝性アシドーシスが、骨芽細胞による特異的基質タンパク質合成とアルカリフォスファターゼ活性を抑制するだけでなく、PGE₂ 産生を介した RANKL 合成促進が、破骨細胞を活性化することで骨組織に大きな影響を与えることが知られている²⁾。また、*in vitro* の研究では、慢性の代謝性アシドーシスが、骨組織に多く含まれる非コラーゲン性タンパク質質のマトリックス Gla タンパク質やオステオポンチンの合成を抑制することによ

図8 ヒト骨芽細胞の石灰化における OPG siRNA の効果
Calcified Tissue International,93(3): 238参照

図8 ヒト骨芽細胞の石灰化における OPG siRNA の効果

SaM-1 に negative control と OPG siRNA (# 11187) を形質導入し、5%CO₂ 下にて石灰化培養液で培養した。

A : 培養 21 日後の von Kossa 染色像 (弱拡大)。

B : 石灰化した面積の解析結果。石灰化面積 (%) は平均値 ± 標準誤差 (n=10) で示した。* * P<0.001 は negative control 群との比較。

図9 マウス骨芽細胞の石灰化におけるOPGタンパク質の効果
 Calcified Tissue International,93(3): 239参照

図9 マウス骨芽細胞の石灰化における OPG タンパク質の効果

新生マウスの骨芽細胞を石灰化培養液にて培養し、コントロール (5%CO₂) またはアシドーシス (10%CO₂) で培養し、OPG 群は5% CO₂にて培養し、培養液交換の際に、20ng/mlOPG タンパク質を添加した。

A: 培養 16 日後の von Kossa 染色像 (弱拡大)。

B: 石灰化した面積の解析結果。石灰化面積 (%) は平均値±標準誤差 (n=12) で示した。**p<0.001 はコントロール群 (5%CO₂) との比較。

り成熟骨基質の形成を抑制することも知られている²²⁾。一方、アシドーシスと AP-1 の関連では、マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞における急性の代謝性アシドーシスが、Egr-1 と I 型コラーゲンの mRNA 発現を抑制⁹⁾ することは、骨基質の合成と AP-1 分子との関連を示唆するものである。またヒト間葉系細胞における慢性の代謝性アシドーシスは、多くの骨関連遺伝子やタンパク質合成に影響を与えることで、骨芽細胞への分化を抑制することも報告されている⁷⁾。本実験で使用した SaM-1 細胞は正常のヒト骨芽細胞であるが、アシドーシス刺激により石灰化が抑制されことをヒト骨芽細胞において認めたのみならず、石灰化と AP-1 との関連性を強く示唆するものである。

一般に、骨、軟骨、腎臓、血管、骨芽細胞は、TNF スーパーファミリーに属する OPG²⁴⁾ を強く発現しており、OPG の作用では RANKL-RANK システムを介した破骨細胞の分化と機能の抑制がよく知られている。また、骨芽細胞における代謝性アシドーシスで誘導される RANKL 発現は、成熟破骨細胞による骨の吸収を刺激し破骨細胞のアポトーシスを抑制することも報告されている^{2,23)}。本実験ではヒト骨芽細胞の単独培養系であるにも関わらず、アシドーシス刺激による OPG タンパク質産生の促進が骨芽細胞の石灰化を抑制させたことに加

え、アシドーシスと同じように OPG タンパク質の添加により骨芽細胞の石灰化が抑制されたことを示している。また、RANK-RANKL システムが *in vitro* で血管の石灰化を引き起こすことが報告されるなど¹⁴⁾、RANKL の新たな機能についても注目されている。例えば、血液透析患者で引き起こされる冠状動脈の石灰化が血中 OPG 濃度と関係していることや^{25,26)}、炎症部位における OPG タンパク質産生の促進や血中の OPG 濃度の上昇²⁷⁾、さらに、アテローム斑のような異所性石灰化における OPG の関与²⁸⁾ などである。OPG が石灰化に関わる RANKL 作用に「おとり受容体」として作用している可能性があり、今後の研究が待たれるところである。

本研究では、ヒト骨芽細胞を用い、骨形成を誘導する石灰化条件において²⁹⁾、c-Jun mRNA 発現の抑制による OPG 産生促進が石灰化を抑制し、OPG mRNA 発現抑制が石灰化を促進したこと、さらに、新生マウス骨芽細胞における石灰化の過程において、OPG タンパク質の添加が石灰化を著しく抑制したことより、骨芽細胞の石灰化に OPG が関与することが明らかとなった。また、OPG 欠損マウスでは、骨吸収と骨形成がともに亢進し、高代謝回転型の骨粗鬆症を呈すること^{30,31)} もこの考察を支持する結果であると思われる。また、ヒト骨芽細胞が、OPG、RANK、および RANKL の mRNA 発現を恒

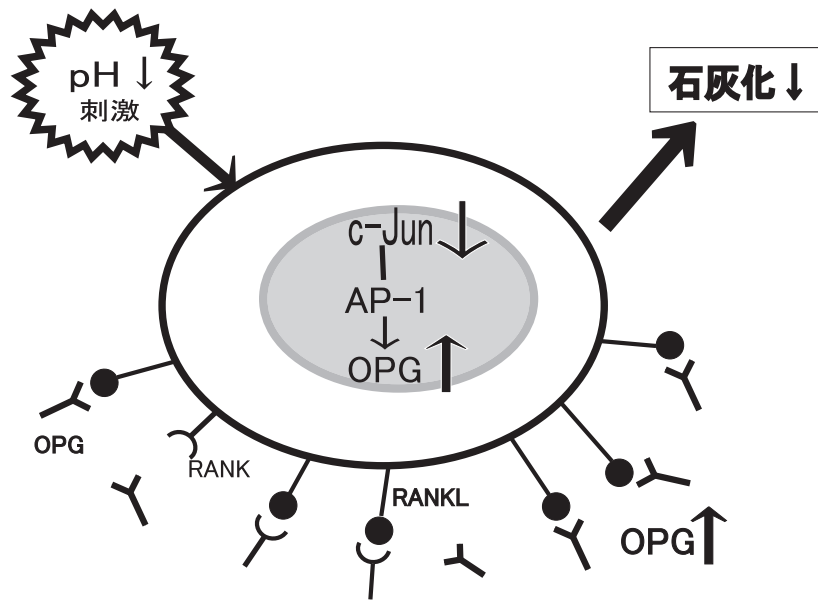


図10 アシドーシスによる骨芽細胞の骨形成抑制作用

常に発現していたことから、OPG タンパク質が石灰化に関わる RANK-RANKL システムを抑制することにより、骨芽細胞の石灰化を抑制する可能性を示唆している (図10)。

V. 結 論

本研究では、アシドーシスが骨芽細胞に与える影響について明らかにするため、ヒト骨芽細胞とマウス骨芽細胞を用い、アシドーシス刺激が骨芽細胞の石灰化に及ぼす影響を検討し、以下の結果を得た。

1. ヒト骨芽細胞、およびマウス骨芽細胞において、石灰化培養液により誘導される石灰化促進作用は、アシドーシス刺激により著しく抑制された。
2. ヒト骨芽細胞におけるアシドーシス刺激は、c-Jun mRNA 発現を抑制するとともに、OPG の mRNA 発現およびタンパク質産生を促進した。
3. ヒト骨芽細胞において、OPG、RANK、および RANKL の mRNA の恒常的な発現が認められた。
4. ヒト骨芽細胞における c-Jun mRNA の抑制は、OPG タンパク質産生を増加させるとともに、石灰化を抑制した。
5. ヒト骨芽細胞における OPG mRNA の抑制は、石灰化を促進した。
6. マウス骨芽細胞において、石灰化培養液により誘導される石灰化促進作用は、OPG タンパク質の添加により著しく抑制された。

以上の結果よりヒト及びマウス骨芽細胞において、アシドーシスが石灰化を抑制する機構には c-Jun と OPG タンパク質が関与し、c-Jun の抑制と OPG タンパク質の

産生促進を介している事が示された。すなわち本実験で解明された事は、骨芽細胞の石灰化が細胞外の OPG タンパク質濃度により影響を受け、骨芽細胞における OPG 産生には核内の AP-1 分子が強く関与している可能性が示されるとともに、骨芽細胞における RANKL 発現の促進が破骨細胞を誘導するというこれまでの作用の他に、骨芽細胞自身の石灰化促進作用に関与している可能性が示された。そして、歯周病などの局所の炎症をコントロールすることは、骨粗鬆症やがん患者の顎骨壊死の予防に繋がる可能性があることが示唆された。

謝辞 稿を終えるにあたり、始終御懇篤なご指導と御校閲を賜りました薬理学講座戸苅彰史教授に深く感謝致します。また、本研究に際し、ご指導、御協力を頂きました薬理学講座員の皆様に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Arnett TR: Acidosis, hypoxia and bone. Arch Biochem Biophys, 503: 103-109, 2010.
- 2) Krieger NS, Frick KK, Bushinsky DA : Mechanism of acid-induced bone resorption. Curr Opin Nephrol Hypertens, 13: 423-436, 2004.
- 3) Arnett TR, Boyde A, Jones SJ, Taylor ML: Effects of medium acidification by alteration of carbon dioxide or bicarbonate concentrations on the resorptive activity of rat osteoclasts. J Bone Miner Res, 9: 375-379, 1994.
- 4) Arnett TR: Extracellular pH regulates bone cell function. J Nutr, 138: 415S-418S, 2008.
- 5) Brandao-Burch A, Utting JC, Orriss IR, Arnett TR: Acidosis inhibits bone formation by osteoblasts *in vitro* by preventing

- mineralization. *Calcif Tissue Int*, **77**: 167-174, 2005.
- 6) Frick KK, Bushinsky DA: *In vitro* metabolic and respiratory acidosis selectively inhibit osteoblastic matrix gene expression. *Am J Physiol*, **277**: F750-F755, 1995.
 - 7) Disthabanchong S, Radinahamed P, Stitchantrakul W, Hongeng S, Rajatanavin R: Chronic metabolic acidosis alters osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells. *Kidney Int*, **71**: 201-209, 2007.
 - 8) Yamaji Y, Moe OW, Miller T, Alpern RJ: Acid activation of immediate early genes in renal epithelial cells. *J Clin Invest*, **94**: 1297-1303, 1994.
 - 9) Frick KK, Jiang LI, Bushinsky DA: Acute metabolic acidosis inhibits the induction of osteoblastic egr-1 and type 1 collagen. *Am J Physiol*, **272**: C1450-C1456, 1997.
 - 10) Shaulian E, Karin M: AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*, **4**: E131-136, 2002.
 - 11) Stein GS, Lian JB, Van Wijnen AJ, Montecino M: Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol Rev*, **76**: 593-629, 1996.
 - 12) Rubin J, Fan D, Wade A, Murphy TC, Gewant H, Nanes MS, Fan X, Moerenhout M, Hofstetter W: Transcriptional regulation of the expression of macrophage colony stimulating factor. *Mol Cell Endocrinol*, **160**: 193-202, 2000.
 - 13) Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T: Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*, **3**: 889-901, 2002.
 - 14) Panizo S, Cardus A, Encinas M, Parisi E, Valcheva P, López-Ongil S, Coll B, Fernandez E, Valdivielso JM: RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circ Res*, **104**: 1041-1048, 2009.
 - 15) Koshihara Y, Kawamura M, Oda H, Higaki S: In vitro calcification in human osteoblastic cell line derived from periosteum. *Biochem. Biophys. Res Commun*, **145**: 651, 1987.
 - 16) Ecarot-Charrier B, Glorieux FH, van der Rest M, Pereira G: Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J Cell Biol*, **96**: 639-643, 1983.
 - 17) Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, Wagner EF: c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science*, **266**: 443-448, 1994.
 - 18) Wang ZQ, Ovitt C, Grigoriadis AE, Möhle-Steinlein U, Rütther U, Wagner EF: Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature*, **360**: 741-745, 1992.
 - 19) Grigoriadis AE, Schellander K, Wang ZQ, Wagner EF: Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *J Cell Biol*, **122**: 685-701, 1993.
 - 20) Fleischmann A, Hafezi F, Elliott C, Remé CE, Rütther U, Wagner EF: Fra-1 replaces c-Fos-dependent functions in mice. *Genes Dev*, **14**: 2695-2700, 2000.
 - 21) Eferl R, Hoebertz A, Schilling AF, Rath M, Karreth F, Kenner L, Amling M, Wagner EF: The Fos-related antigen Fra-1 is an activator of bone matrix formation. *EMBO J*, **23**: 2789-2799, 2004.
 - 22) Frick KK, Bushinsky DA: Chronic metabolic acidosis reversibly inhibits extracellular matrix gene expression in mouse osteoblasts. *Am J Physiol*, **275**: F840-F847, 1998.
 - 23) Frick KK, Bushinsky DA: Metabolic acidosis stimulates RANKL RNA expression in bone through a cyclo-oxygenase-dependent mechanism. *J Bone Miner Res*, **18**: 1317-1325, 2003.
 - 24) Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ: Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, **89**: 309-319, 1997.
 - 25) Barreto DV, Barreto Fde C, Carvalho AB, Cuppari L, Draibe SA, Dalboni MA, Moyses RM, Neves KR, Jorgetti V, Miname M, Santos RD, Canziani ME: Association of changes in bone remodeling and coronary calcification in hemodialysis patients: a prospective study. *Am J Kidney Dis*, **52**: 1139-1150, 2008.
 - 26) Mikami S, Hamano T, Fujii N, Nagasawa Y, Isaka Y, Moriyama T, Matsuhiya M, Ito T, Imai E, Hori M: Serum osteoprotegerin as a screening tool for coronary artery calcification score in diabetic pre-dialysis patients. *Hypertens Res*, **31**: 1163-1170, 2008.
 - 27) Asanuma Y, Chung CP, Oeser A, Solus JF, Avalos I, Gegretsadik T, Shintani A, Raggi P, Sokka T, Pincus T, Stein CM: Serum osteoprotegerin is increased and independently associated with coronary-artery atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis*, **195**(2): 135-141, 2007.
 - 28) Shioi A: Vascular calcification and Remodeling in Diabetes. *J Jpn Coll Angiol*, **50**: 561-567, 2010.
 - 29) Komoto S, Kondo H, Fukuta O, Togari A: Comparison of β -adrenergic and glucocorticoid signaling on clock gene and osteoblast-related gene expression in human osteoblast. *Chronobiology International*, **29**: 66-74, 2012.
 - 30) Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al: Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*, **12**: 1260-1268, 1998.
 - 31) Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Iigashino K, Ozawa H: Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/ osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun*, **247**: 610-615, 1998.