

# 乳中に含まれる骨代謝を調節する成分に関する研究

明海大学歯学部口腔解剖学第一講座 教授 久米川 正好

## はじめに

近年、高齢化に伴い骨粗鬆症が深刻な問題となっている。骨粗鬆症は、老年期にみられる典型的な骨の疾患であり、骨の体積あたりの骨量すなわち骨基質と骨塩の両者が減少していくことを特徴としている。骨粗鬆症の予防や骨強化のためには、カルシウム摂取量を増やすことも重要であるが、それだけでは不十分であると考えられる。すなわち、骨は、骨塩とともにコラーゲンなどの骨基質の両者がタイミングよく増加することで、骨量が増加し維持される。そのため、カルシウムのみを摂取しても、骨基質が増えなければ骨粗鬆症の予防および治療に効果が弱いことも考えられる。そこで、骨基質を増加させる骨形成促進物質、および骨基質の減少をくい止める骨吸収抑制物質が求められている。長期間マイルドな条件で摂取し、骨形成を促進し骨吸収を抑制する成分を食品成分中から見つけることができれば、骨粗鬆症の予防および改善に有効であると考えられる。このような作用を有する食品成分の候補として、牛乳由来の乳清タンパク質に注目した。牛乳は、古くから完全栄養食品として飲用されており、豊富なカルシウムを含む。その上、乳児の成長の過程では骨の成長、形成およびリモデリングが活発に行われているので、牛乳中には、カルシウム以外にも、骨代謝に影響を及ぼす成分が含まれていることが推定される。特に、乳清タンパク質は、チーズ製造の副産物であるが、多くの魅力的な成分を含むことが予想された。骨には骨芽細胞、破骨細胞および骨細胞などが存在し、それぞれ相互に重要な役割をしながら、骨が作られ維持されている。骨は、骨芽細胞により骨基質の主成分であるコラーゲンなどが産生され、コラーゲンにヒドロキシアパタイトが沈着して作られる。また、骨吸収は、骨形成とともに骨代謝に重要である。そこで、本研究では、乳清タンパク質のin vitroでの効果を、骨芽細胞および破骨細胞を用いて検討することとした。まず、株化骨芽細胞であるMC3T3-E1細胞およびMG-63細胞を用いて、乳清タンパク質の細胞増殖活性および分化誘導活性について検討した。そして、乳清タンパク質の破骨細胞に及ぼす作用について、うさぎの全骨細胞を用いた破骨細胞による骨吸収評価法と新たに開発した単離破骨細胞の系で評価した。本論文では、これらの乳清タンパク質の骨芽細胞および破骨細胞に及ぼす効果について報告する。

## 材料と方法

### 1. 実験材料

10週齢の日本うさぎは、埼玉実験動物（埼玉）より購入した。 $\alpha$ -Modified minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM) はFlow Laboratories (McLean, VA, USA) から、牛胎児血清 (FBS) はGibco (Grand Island, NY) からそれぞれ購入した。1, 25-DihydroxyvitaminD<sub>3</sub> (1, 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) は帝人より、human

[1-34] parathyroid hormone (h-PTH) は、旭化成より好意で頂いた。Salmon CT (sCT) はUCB-Bio-products (Chemin, Belgium) から、 $[^{125}\text{I}]$ -sCTは、Amersham International (Buckinghamshire, UK) より購入した。コラーゲングル溶液 (type- I collagen, Cell matrix I-A) は新田ゼラチン (大阪)、微生物コラーゲナーゼは和光純薬工業 (大阪)、プロナーゼは科研製薬 (東京) よりそれぞれ購入した。乳清タンパク質は、生乳を遠心分離して乳脂肪を除去した後塩酸でpH4.7にしカゼインを除去し、エバポレーターで濃縮後、透析膜で透析することにより調製した。

## 2. 骨芽細胞培養および破碎

C57BL/6系新生児マウス頭頂骨から樹立した株化骨芽細胞MC3T3-E1および人の骨芽細胞であるMG63細胞は、37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>, 95% air) 内で、 $\alpha$ -MEMに10%血清を補ったものを用いて培養した。細胞継代は、phosphate-buffered saline (PBS) に0.001% pronase E (科研製薬、東京) および0.02% EDTAを加えた溶液で細胞を剥がし、1:5の希釈倍率で3日ごとに行った。細胞は35mmの培養用プラスチックシャーレに40,000個の細胞を播種し、10% FBSを含む $\alpha$ -MEMにより3日間培養した。そして、0.3% FBSを含む $\alpha$ -MEMに乳清タンパク質を添加した培地に交換し、所定の期間培養した。培養終了後、3回PBSで洗浄し、0.2% Nonidet P-40 (Sigma Chemical, St Louis) を2 ml加え、ラバーポリスマンで細胞を剥がして集め、プラスチックチューブに移した。そして、超音波細胞破碎器を用いて細胞を氷冷下で破碎し、各種測定用細胞破碎液とした。

## 3. 骨芽細胞のDNA量の測定

骨芽細胞のDNA量は、3,5-diamino benzoic acid (DABA) による蛍光発色法により測定した。上記の方法で得られた細胞破碎液0.1 mlをガラス遠心管に移し、0.6N TCA (trichloroacetic acid) を0.1 ml添加して10分間氷冷した。遠心後、沈殿に3 mlのエタノール (0.1N酢酸カリウムを含む) を加えて攪拌し、10分間氷冷した。遠心により上清を除き、沈殿にエタノールを加えパラフィルムで密封して60℃、15分間脱脂した。脱脂後遠心して上清を除いた後、1N水酸化アンモニウムを0.1 ml加えてエバポレーターで乾燥させた。標準物質として、精製した子牛の胸腺DNAを用いて、50、100、200、400、800、1,000  $\mu$ g のDNAを含む0.1 mlの1N水酸化アンモニウム液をエバポレーターで乾燥させた。また、あらかじめDABAを0.4 g/ml濃度になるように蒸留水で溶解し、活性炭により塩酸塩の色を脱色させた。そして、ガラス試験管にDABAを0.1 ml添加し、パラフィルムで密封した後、60℃で30分間加熱した。冷却後、4 mlの0.6N過塩素酸を加えて遠心した後、上清を蛍光光度計で415nmの励起光における515nmの蛍光を測定した。

## 4. $[^3\text{H}]$ Thymidineの取り込み量の測定

骨芽細胞MC3T3-E1を10% FBSを含む $\alpha$ -MEM培地で1穴当たり2,000個の細胞を96穴プレートに播種し、37℃で24時間培養した。そして、FBSを含まない $\alpha$ -MEM培地で1日間培養後、乳清タン

パク質を培地に添加し、18時間培養した。1穴当たり0.5 $\mu$  Ciの [<sup>3</sup>H] thymidine (20Ci/mmol、第一化学薬品、東京) を添加し、2時間培養後、 [<sup>3</sup>H] thymidineの取り込み量を、液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。

#### 5. ハイドロキシプロリン量の定量およびプロコラーゲンtype-1ペプチド量の測定

コラーゲン量は、Woessnerの方法により、細胞および基質のハイドロキシプロリン量を定量することにより求めた。ハイドロキシプロリン量の定量は、p-ジメチルアミノベンズアルデヒドを用いることにより行った。また、プロコラーゲンtype-1ペプチド (PIP) の測定は、PIP測定キット (宝酒造) により行った。

#### 6. 全骨細胞を用いた骨吸収評価法

全骨細胞は、10日齢のうさぎの大腿骨、脛骨および上腕骨から調製した。摘出した骨の軟組織を取り除き、 $\alpha$ -MEMに5%血清を補った培地中で15分間解剖用ばさみを用いて細かく破碎した。この破碎物をさらにチューブミキサーで30秒間激しく攪拌し、2分間静置することにより大きな破碎物を除いた。生細胞数は血球計測盤で測定し、破骨細胞と骨芽細胞は、それぞれtartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) と alkaline phosphatase (ALP) の染色を行うことにより識別した。破骨細胞による乳清タンパク質の骨吸収活性は、前骨細胞を含んだ5%FBSを補った200 $\mu$  lの $\alpha$ -MEMを96穴プレート中の象牙片上に播種し、2時間培養した後、乳清タンパク質を含む培地に10<sup>-8</sup>M1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>を添加した培地に置き換え、4日間培養することにより行った。培養終了後、96穴プレート中でHandy Engine (吉田精工、東京) にブラシを装着して10秒間作用させることにより細胞を取り除き、acidhematoxylin (Sigma) で3分間染色した。破骨細胞によって形成された骨吸収活性は、ピット数をピットを覆っているメッシュの数を測定することにより行った。

#### 7. 単離した破骨細胞を用いた評価法

全骨細胞を、10日齢のうさぎの大腿骨、脛骨および上腕骨から調製し、 $\alpha$ -MEMに5%血清を補った培地中で、コラーゲンコートしたdishに播種した。4時間培養後、接着していない細胞と細かい骨の破碎物をPBSにより取り除き、培養物を0.02%のEDTAを補った0.001%のプロナーゼで処理して、非接着性の血球細胞とストローマ細胞を取り除いた。そして、0.01%コラゲナーゼを処理して、ストローマ細胞などを完全に取り除き、破骨細胞のみにした。そして、0.1%のコラゲナーゼを処理して破骨細胞を剥がし、低速遠心 (500rpmで2分間) して、単離破骨細胞を集めた。乳清タンパク質の骨吸収活性は、破骨細胞を含んだ5%FBSを補った200 $\mu$  lの $\alpha$ -MEMを96穴プレート中の象牙片上に播種し、2時間培養した。そして、乳清タンパク質を含む培地に10<sup>-8</sup>M1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>を添加した培地に置き換え、2日間培養することにより行った。培養終了後、96穴プレート中でHandy Engine (吉田精工、東京) にブラシを装着して10秒間作用させることにより細胞を取り除き、acidhe-

matoxylin (Sigma) で3分間染色した。破骨細胞によって形成された骨吸収活性は、ピット数とピットを覆っているメッシュの数を測定することにより行った。

## 8. 電子顕微鏡による観察

象牙片上に培養された破骨細胞は、1.25% glutaraldehyde (0.1% cacodylate 緩衝液、pH7.4) で固定し、10日間0.1M EDTAで脱灰し、1% osmium tetroxideで更に固定した。そして、エタノールで脱水してエポン樹脂包埋し、ダイヤモンドナイフでカットした薄切サンプルを2000C透過型電子顕微鏡 (JEOL、東京) で観察した。

## 9. [<sup>125</sup>I]s-CT-結合実験

2,000のうさぎ単離破骨細胞を96穴multiscreen filter plate (Nihon Millipore、東京) に160 $\mu$  lの10%FBSを含む $\alpha$ -MEMに播種した。そして、20 $\mu$  l [<sup>125</sup>I]sCT(最終濃度0.5nM; 非活性74kBq/pmol) と20 $\mu$  lの各濃度のsCTまたはhCTを添加した。細胞は、4℃で1時間培養し、10%FBSを含む $\alpha$ -MEMで5回洗浄した。フィルターは、パンチアウトして、 $\gamma$ カウンター (ARC-600、アロカ) にて計測した。

## 10. 統計処理

すべてのパラメーターの統計処理は一元配置の分散分析を行い、平均値の差の検定は、Tukey-Kramer法による多重比較法により行った。

## 結果および考察

### I 乳清タンパク質の骨芽細胞による評価

乳清タンパク質が骨芽細胞にどのような効果を示すかについて、骨芽細胞MC3T3-E1細胞およびMG-63細胞を用いて検討した。乳清タンパク質は、骨芽細胞MC3T3-E1への [<sup>3</sup>H]thymidineの取り込み量とDNA量を濃度依存的に増加させた (Fig.1, 2)。そして、MG-63細胞においても、 [<sup>3</sup>H]thymidineの取り込み量とDNA量を濃度依存的に増加させた (Data not shown)。このことから、乳清タンパク質は、骨芽細胞の増殖を促進させることが明らかとなった。次に、乳清タンパク質の骨芽細胞MC3T3-E1およびMG-63細胞に対する分化誘導作用について調べた。コラーゲンに特徴的なヒドロキシプロリン量は、乳清タンパク質の添加により濃度依存的に増加した (Fig.3)。そして、プロコラーゲンtype-1ペプチド量は、乳清タンパク質により濃度依存的に増加した (Fig.4)。このことから、乳清タンパク質は、骨の基質であるコラーゲンの合成を促進することがわかった。乳清タンパク質が、骨芽細胞の増殖と分化誘導の2面性の活性を示すことは、たいへん興味深い。乳清タンパク質中には、牛乳中の成長を助ける多くの有効成分が存在することが知られている。これらのいく

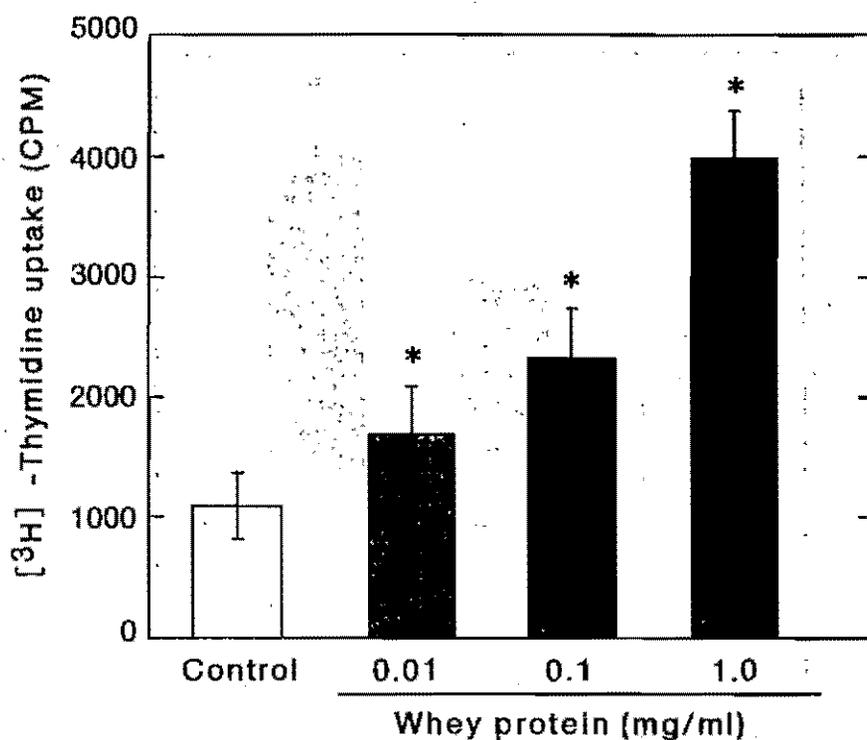


Fig.1. Effect of whey protein on [<sup>3</sup>H]thymidine uptake in osteoblastic MC3T3-E1 cells. Values are means  $\pm$  SD. \* Significantly different from the control group ( $P < 0.05$ ).

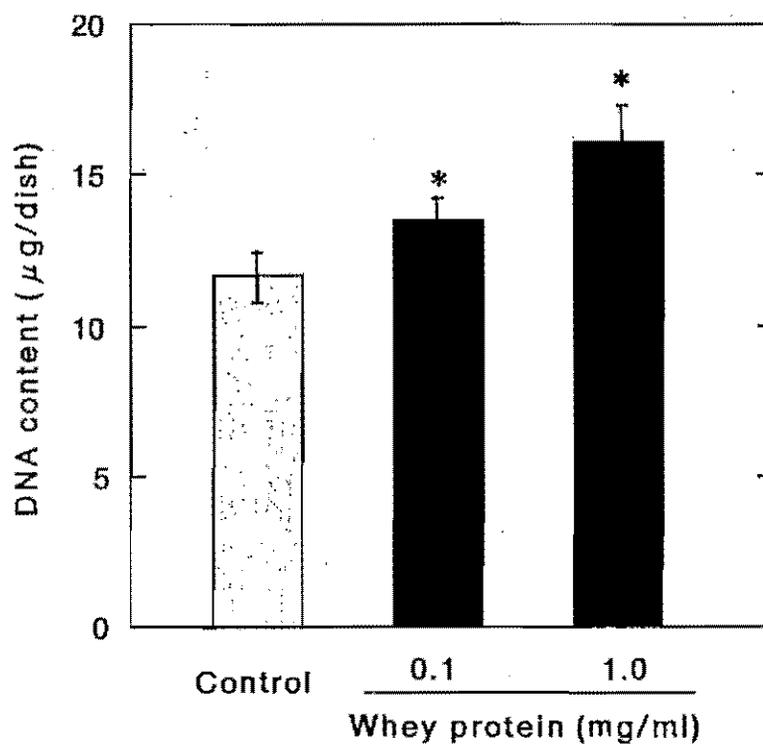


Fig.2. Effect of whey protein on DNA content in osteoblastic MC3T3-E1 cells. Values are means  $\pm$  SD. \* Significantly different from the control group ( $P < 0.05$ ).

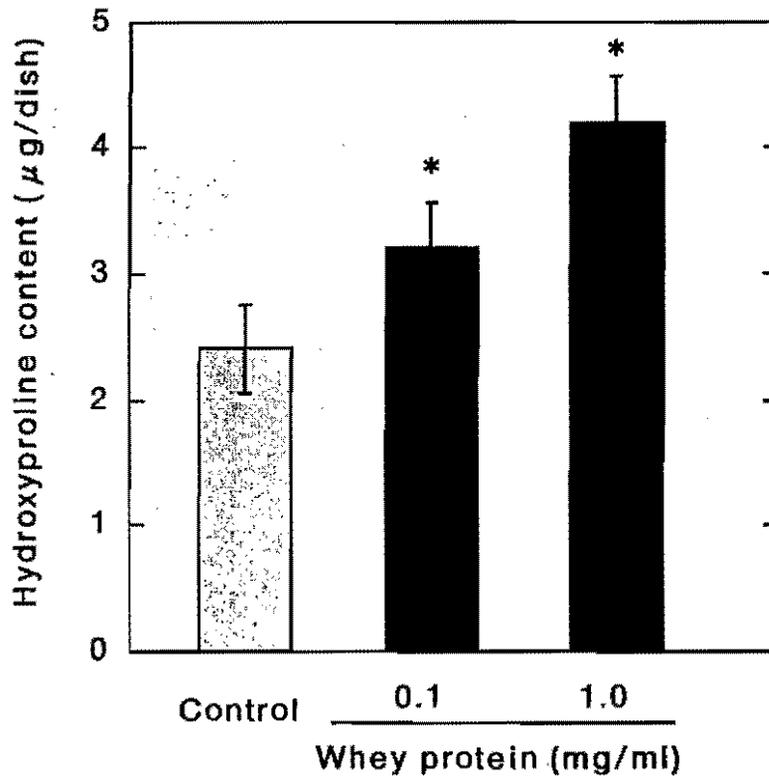


Fig.3. Effect of whey protein on hydroxyproline content in osteoblastic MC3T3-E1 cells. Values are means  $\pm$  SD. \* Significantly different from the control group ( $P < 0.05$ ).

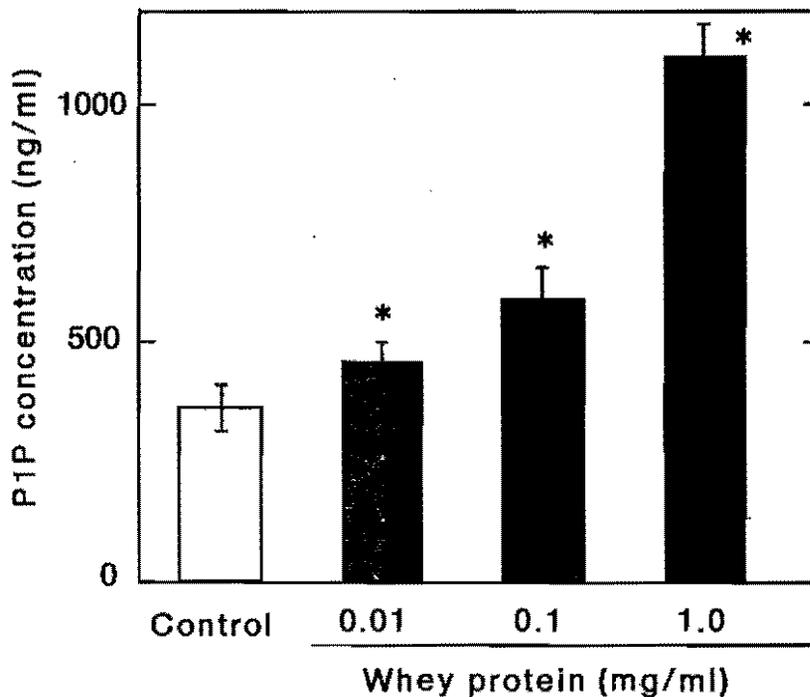


Fig.4. Effect of whey protein on collagen production in osteoblastic MG63 cells. Values are means  $\pm$  SD. \* Significantly different from the control group ( $P < 0.05$ ).

つかが、骨芽細胞の増殖を促進し、コラーゲンなどの合成を促進する分化誘導活性を有していたものと考えられる。乳清タンパク質は、骨芽細胞による骨形成を促進することが考えられ、今後その有効成分について検討していきたいと考えている。いずれにしても、乳清タンパク質が、骨芽細胞による骨形成を促進することから、骨粗鬆症の予防および改善に有効である可能性が示唆された。

## II 乳清タンパク質の破骨細胞による評価

乳清タンパク質の破骨細胞による骨吸収活性に及ぼす効果を調べるために、うさぎの破骨細胞による骨吸収測定を行った。既存の破骨細胞による骨吸収評価系において、乳清タンパク質は濃度依存的に破骨細胞による骨吸収を抑制した (Fig.5)。全骨細胞による骨吸収抑制作用が示されたことから、この作用が直接かまたは間接作用かを調べるために、単離破骨細胞の骨吸収評価系を確立することとした。全骨細胞を、10日齢のうさぎの大腿骨、脛骨および上腕骨から調製し、 $\alpha$ -MEMに5%血清を補った培地中で、コラーゲンコートしたdishに播種したところ、多数の血球細胞、ストローマ細胞、繊維芽細胞、骨芽細胞などが観察された (Fig.6A)。4時間培養後、多核の大きな細胞は、コラーゲンコートしたdishに接着していた。接着していない細胞と細かい骨の破砕物をPBSにより取り除き、培養物0.02%のEDTAを補った0.001%のプロナーゼで処理して、非接着性の血球細胞とストローマ細胞を取り除いた (Fig.6B)。そして、0.01%コラゲナーゼを処理して、ストローマ細

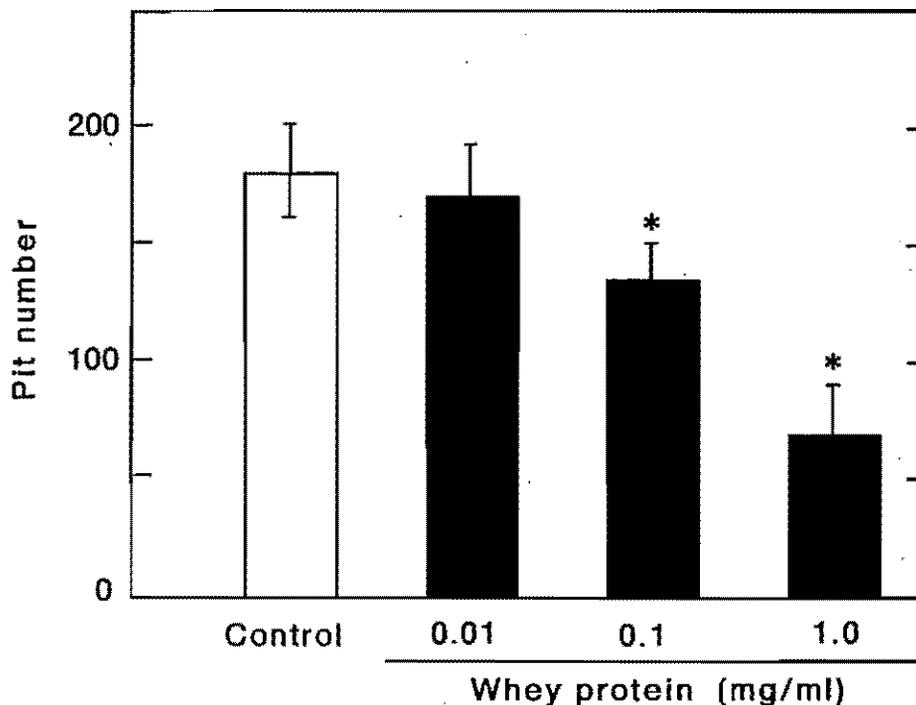


Fig.5. Effect of whey protein on osteoclastic bone resorption. Values are means  $\pm$  SD for four cultures. \* Significantly different from the control group ( $P < 0.05$ ).

胞などを完全に取り除き、破骨細胞のみにした (Fig.6C)。そして、0.1%のコラゲナーゼで処理し破骨細胞を剥がし、低速遠心 (500rpmで2分間) して単離破骨細胞を集めた。一匹のうさぎから、40,000-50,000のTRAP陽性破骨細胞が得られた (Fig.7)。コラーゲンコートした破骨細胞は、電子顕微鏡で観察すると、よく発達したruffled border-like membraneとClear Zoneが観察することができ、よりin vivoに近い形態をしていた (Fig.8)。<sup>125</sup>sCTラベルによるカルシトニン結合性を調べたところ、カルシトニン結合部位を有していることが確認された (Fig.9)。単離破骨細胞について、細胞数を変えて象牙上に作用させたところ、細胞数に応じて、骨吸収活性が高いことが示された (Fig.10)。そして、各種骨吸収に関与するホルモンである1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>、hPTHおよびsCTについての効果について今回確立した単離破骨細胞の系で調べた。その結果、破骨細胞に直接作用を及ぼすカルシトニンのみに骨吸収抑制作用がみられ、stromal細胞を介して作用する1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>、hPTHは、骨吸収に影響を及ぼさなかった (Fig.11)。さらに、stromal細胞を作用させた時のみ、骨吸収促進が見られた (Fig.12)。このことから、今回確立した単離破骨細胞の分離とこれを用いた単離破骨細胞の評価系は、直接作用調べる優れた系であると考えられる。この手法を用いて、乳清タンパク質の骨吸収抑制作用を調べたところ、破骨細胞による骨吸収を乳清タンパク質の濃度依存的に抑制していた (Fig.13)。このことから、乳清タンパク質は、破骨細胞に直接作用することによって、骨吸収の抑制を行っていることが明らかとなった。今後、乳清タンパク質の骨吸収抑制成分の解明とメカニズムを明らかにしていく必要がある。そして、この成分が骨代謝にどのような影響を及ぼすかについて明らかにしていくとともに、骨粗鬆症の予防および改善に有効である可能性について研究していきたいと考えている。



Fig. 6. Unfractionated bone cells on collagen gel during the isolation process. A; Phase-contrast micrograph of unfractionated bone cells before enzymatic digestion. B; After digestion with pronase E/EDTA. C; After digestion with collagenase at a low concentration.

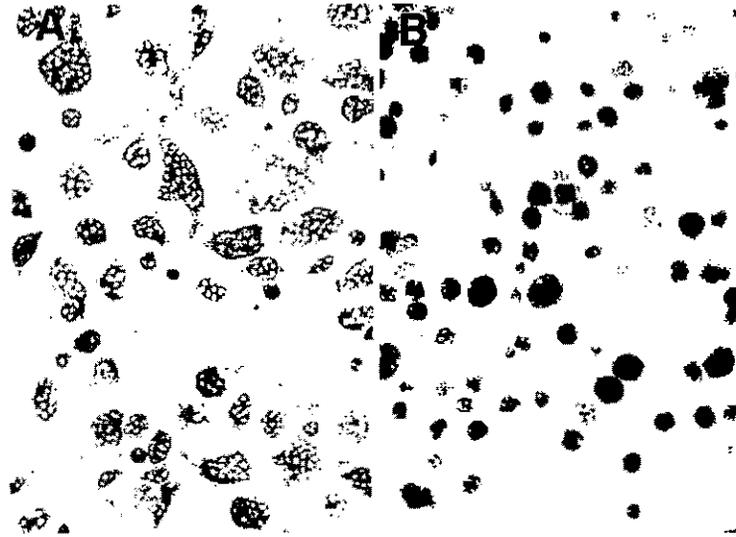


Fig. 7. Tartrate-resistant acid acid phosphatase (TRAP)-stained cells isolated from a collagen gel.  
A; Tissue culture dish. B; Dentine slice.

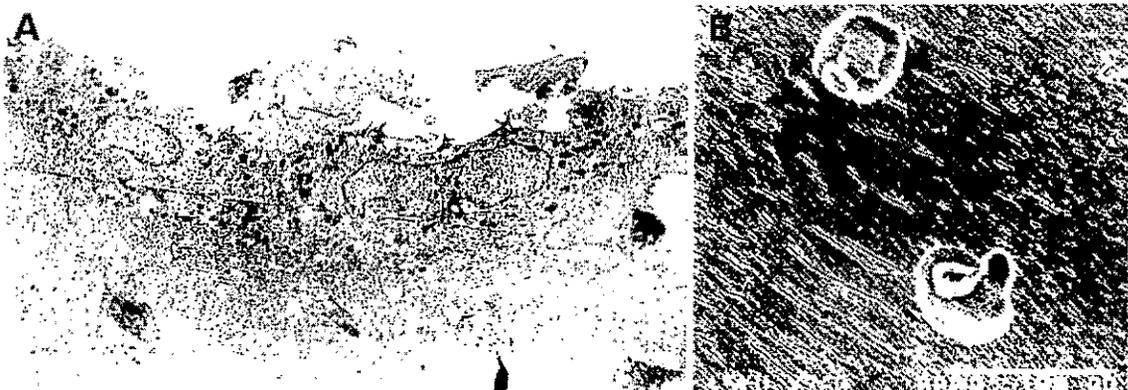


Fig. 8. Transmission (A) and scanning (B) electron micrographs of the isolated osteoclasts on the dentine slices.

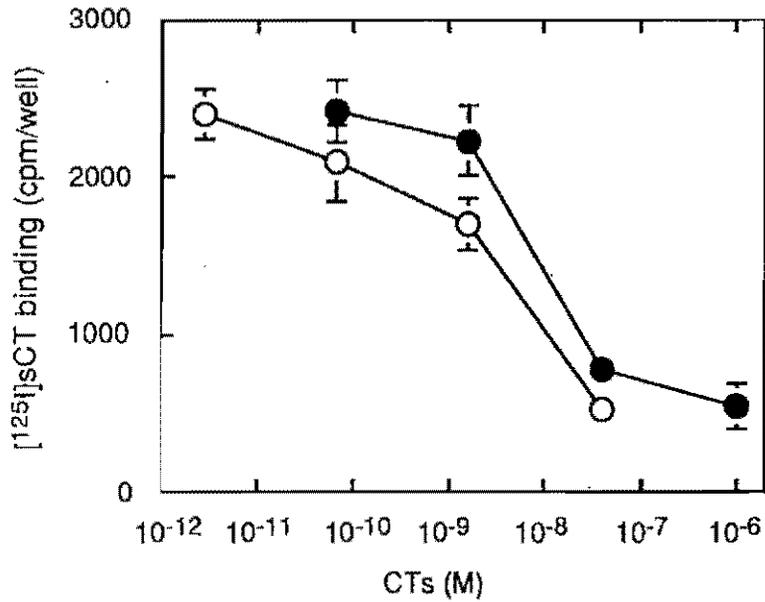


Fig. 9. Displacement curve for <sup>125</sup>I-sCT binding to the isolated multinucleate cells (MNCs) with unlabeled salmon calcitonin (sCT) or human calcitonin (hCT).

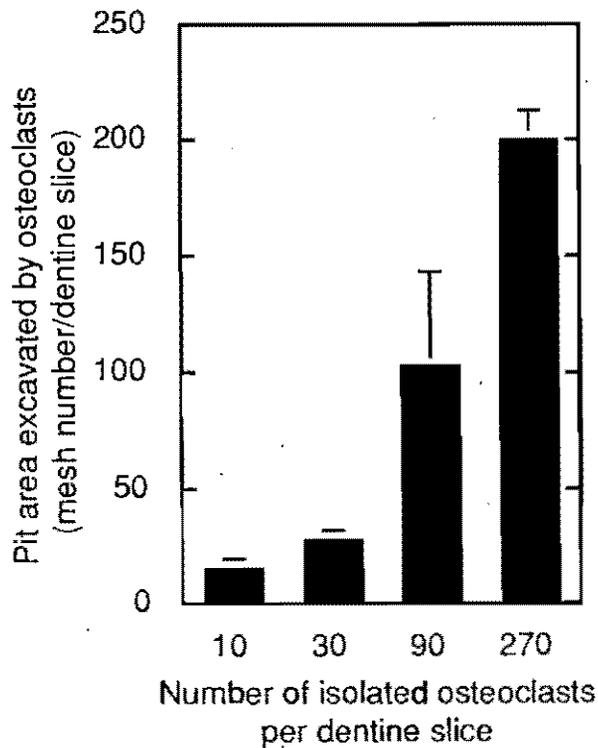


Fig. 10. Relationship between the number of isolated osteoclasts and the pit number and area formed on the dentine slices. Values are means  $\pm$  SD for four cultures.

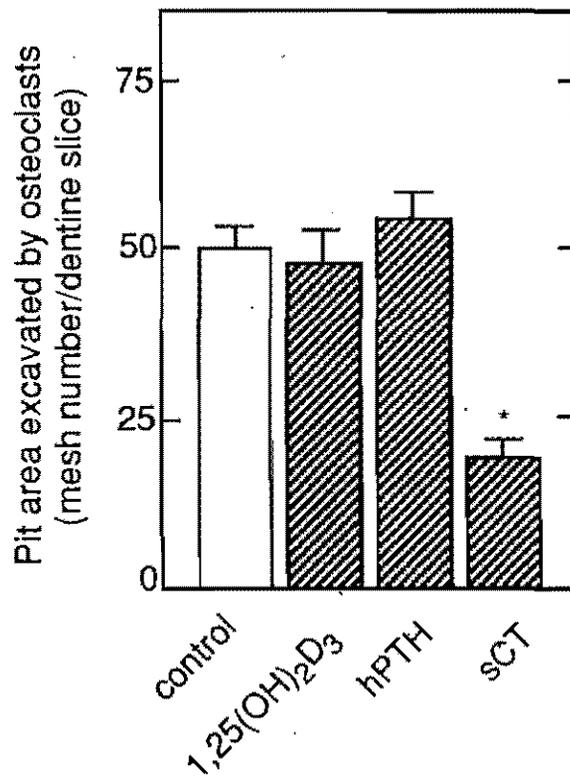


Fig. 11. Effect of osteotropic hormones on dentine-resorbing activity of isolated osteoclasts. Values are means  $\pm$  SD for four cultures.

\* Significantly different from the control group ( $P < 0.05$ ).

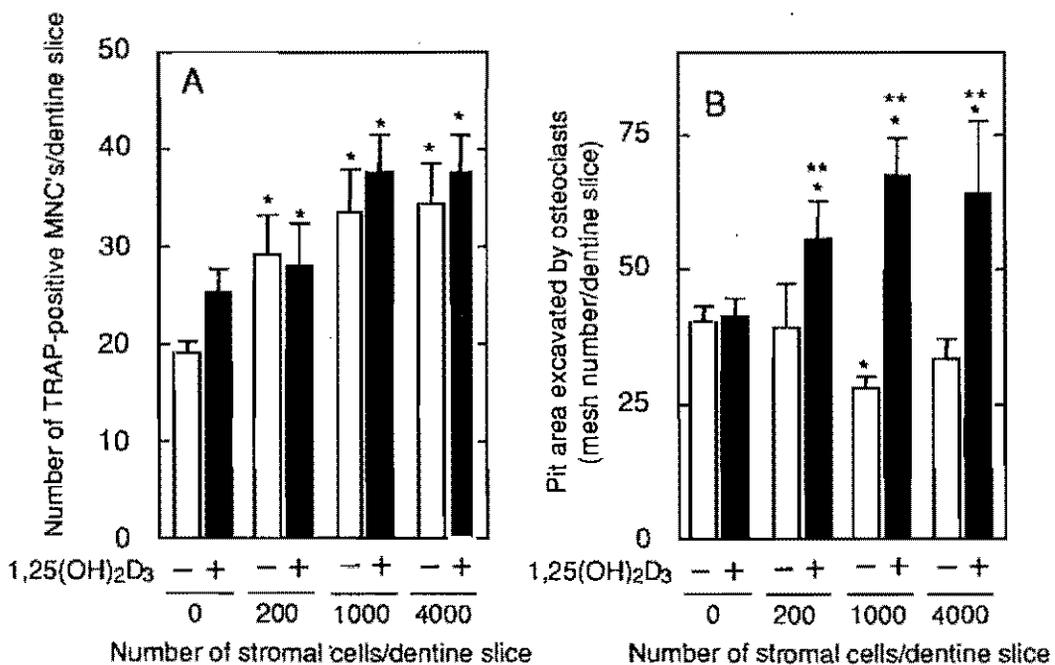


Fig. 12. Effects of rabbit bone-derived stromal cells on the responsiveness of dentine-resorbing activity of isolated osteoclasts to 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

Values are means  $\pm$  SD for four cultures.

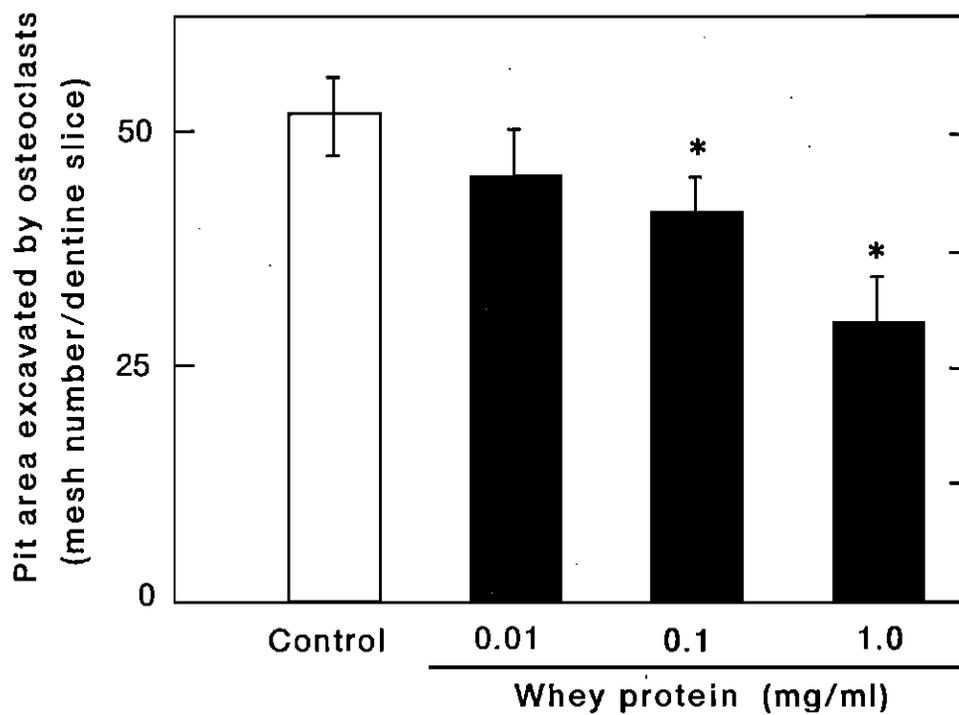


Fig.13. Effect of whey protein on dentine-resorbing activity of isolated osteoclasts (100 cells). Values are means  $\pm$  SD for four cultures. \* Significantly different from the control group ( $P < 0.05$ ).