

乳成分中の骨の成長に関わる成分と軟骨内骨代謝に関する研究 (中間報告)

明海大学歯学部 口腔解剖第一 教授 久米川 正 好

1 はじめに

乳中のカルシウムが、カルシウム吸収の促進や骨粗鬆症の改善に効果があり、骨形成を高めることは数多く報告されている。しかし、乳中の成分中には、カルシウム以外にも骨代謝に関与する物質が存在することが明らかにされている。例えば、牛乳中の乳清画分には、骨芽細胞を増殖・分化させたり、破骨細胞の活性化を制御する成分が明らかになっている。

一方、授乳期の骨は、軟骨内骨化様式によって成長する。この骨の成長にも乳成分は深く関わっていることが考えられる。しかし、乳成分の骨成長への作用については、解明が進んでいない。授乳期における乳幼児の骨の成長は、主として軟骨内骨代謝様式によっておこる。これまでに、我々は、大阪大学の開先生らと共同研究で、軟骨基質から軟骨内骨化に関係している成分を分離してきた。その中で、angiogeninを大量に精製し、破骨細胞に対する効果を調べている。これまでの検討の結果から、angiogeninは、骨吸収を促進することがわかり、また内軟骨性骨化に重要な役割を果たす可能性が示唆された。そして、angiogeninと同様の血管新生因子である血管内皮細胞増殖因子（VEGF）が、骨の細胞、特に破骨細胞にどのような効果を示すかについて調べてangiogeninの作用と比べるとともに、血管新生因子と骨の成長がどのように関わるかについて調べることにした。

2 方 法

2-1 骨吸収活性

成熟破骨細胞は、7日齢のウサギの大腿骨および脛骨から調製した。摘出した骨の軟組織を取り除き、MEM中で5分間解剖バサミを用いて細かく破碎した。この破碎物を4分間静置することにより大きな破碎物を除いた。得られた全骨細胞をコラーゲンゲル上に播種し、プロナーゼ・EDTA、希釈コラーゲナーゼ処理にて破骨細胞以外の細胞を除去したのち、コラーゲナーゼで破骨細胞のみを回収した。その細胞を象牙片上に播種し、象牙片上に形成された吸収窩の数および面積を測定し、活性を評価した。

2-2 チロシンキナーゼの活性化

VEGFによる骨吸収活性とチロシンキナーゼとの関連を明らかにするために、抗ホスホチロシン抗体によるウエスタンブロット分析により調べた。さらに、VEGFによる骨吸収活性とチロシンキナーゼとの関連について、チロシンキナーゼの阻害剤であるherbimycinAを用いて調べた。

2-3 VEGF受容体のRT-PCRによる発現

7日齢のウサギから総RNAを抽出し、first-strand cDNAを作製した。そして、GenBankのデータベースから調べたシーケンスから、VEGF受容体 (Fit-1、KDR/Flk-1) を増幅するために、プライマーを設計した。

Fit-1 TATGATGCCAGCAAGTGGG

TGCCAGCAGTCCAGCATGAT

Flk-1 CAAGTGGCTAAGGGCATGGA

CAGCAGTCCAGCATGGTCTG

RT-PCRの条件は、30サイクル (90°C、30s、58°C、30s、72°C、1 min) により行った。

PCR 産物は、pCR3.1ベクターに連結し、シーケンスにより確認した。

2-4 VEGF受容体のタンパクレベルの発現

全骨細胞を固定し、抗Flk-1抗体を作用させることにより、破骨細胞による発現を調べた。また、VEGF受容体のタンパク質レベルの発現は、抗Flk-1抗体を用いて、ウエスタンブロット法により行った。

3. 結果

VEGFを単離した成熟破骨細胞に作用させたところ、VEGFが1から100ngまで有意に濃度依存的に破骨細胞による骨吸収を増加させた。そして、破骨細胞の生存も有意に高めた。また、骨吸収は、24時間以内にほぼ行われており、VEGFが、ダイレクトに破骨細胞に作用して、骨吸収活性を高めたことが示唆された (Fig. 1)。

また、VEGF受容体の発現をRT-PCRにより調べた。GenBankのデータベースから調べたシーケンスから、VEGF受容体 (Fit-1、KDR/Flk-1) を増幅するために、プライマーを設計した。RT-PCR法により成熟した破骨細胞には、VEGF受容体 (Fit-1、KDR/Flk-1) の発現が認められた (Fig. 2)。増幅されたウサギのKDR/Flk-1遺伝子は、ヒトおよびマウスKDR/Flk-1遺伝子と相同性があることを確認した。

そして、細胞でのVEGF受容体の発現を調べるために、細胞免疫学的標識、およびウエスタンブロットによる解析を行った。抗Flk-1抗体を用いて細胞免疫標識をしたところ、破骨細胞にVEGFの発現があることがわかった。また、ウエスタンブロットにより解析したところ、KDR/Flk-1において200kDaと230kDaの2つのバンドが特異的に染色され、Fit-1において180kDaのバンドが染色された (Fig. 3)。

さらに、VEGFによる骨吸収活性とチロシンキナーゼとの関連を明らかにするために、抗ホスホチロシン抗体によるウエスタンブロット分析により調べたところ、チロシンリン酸化が促進していることがわかった (Fig. 4)。このVEGFの骨吸収促進は、チロシンキナーゼの阻害剤であるherbimycinAにより、抑制された。

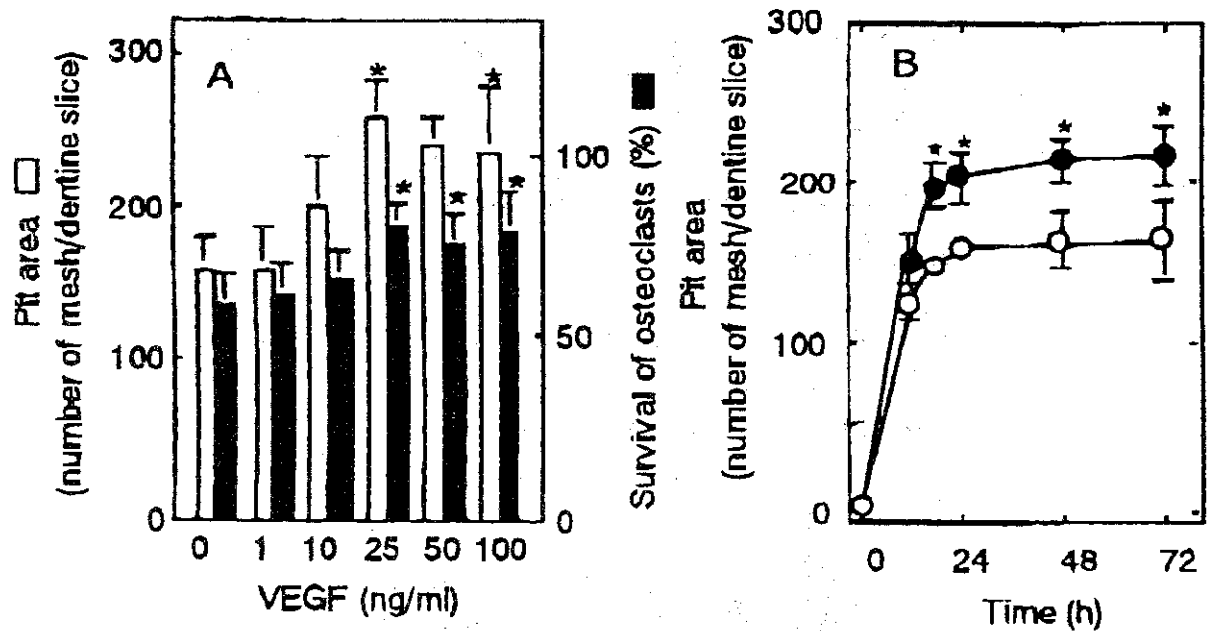


Fig 1

Dose- and time-dependent effect of VEGF on bone resorption by mature osteoclasts. Isolated mature osteoclasts (200 cells) were incubated with various concentrations of VEGF for 24h (A), or incubated without (open circle) or with VEGF (100 ng/ml, closed circle) for the indicated times (B). Then, the areas of pits excavated by the isolated osteoclasts were measured. The numbers of TRAP-positive osteoclasts on the dentine slice were counted and the percentage to the number of initially seeded osteoclasts was indicated as survival rate. The experiments were performed four times, and the values are means \pm S. D. for five cultures in a representative experiment. * $P < 0.01$ vs. untreated cells.

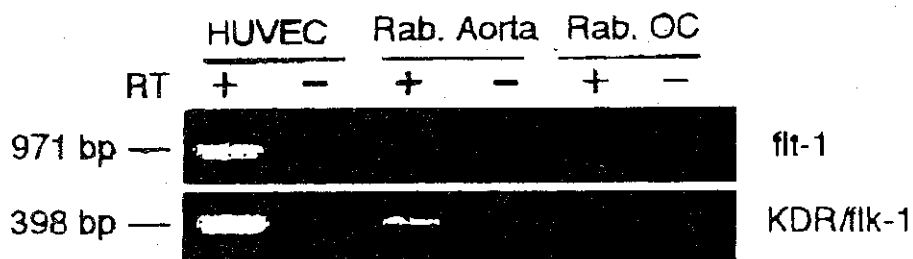


Fig 2

RT-PCR analysis for the expression of VEGF receptors in mature osteoclasts. (A) Equal amounts of total RNA from endothelial HUVEC cells, rabbit (Rab.) aorta and isolated rabbit osteoclasts (Rab. OC) were reverse-transcribed (RT, +), or not (RT, -), and then the samples were amplified with Flt-1 or KDR/Flk-1 primers. The PCR products for Flt-1 and KDR/Flk-1 were 971 bp and 398 bp, respectively.

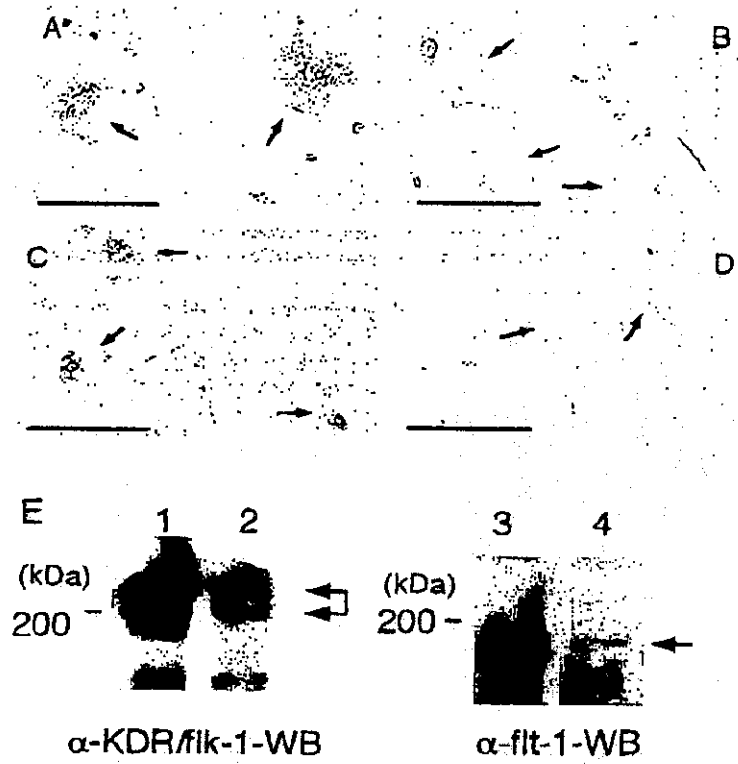


Fig. 3

Expression of VEGF receptor proteins in mature osteoclasts. Rabbit unfractionated bone cells were immunostained with polyclonal rabbit anti-Flt-1 IgG (A), monoclonal mouse anti-KDR/Flk-1 IgG (C) antibody, non-immune rabbit IgG (B) or non-immune mouse IgG (D). Note that multinucleated osteoclasts (arrows) were positively immunoreactive for two distinct receptors of VEGF. Bar in each photograph indicates 100 μm. (E) Western blotting analysis for VEGF receptors expressed on mature osteoclasts. Membrane proteins were extracted from HUVEC cells (lanes 1 and 3) and isolated mature osteoclasts (lanes 2 and 4), and used for Western blotting analysis of KDR/Flk-1 (lanes 1 and 2) and Flt-1 (lanes 3 and 4). Arrows indicate immunoreactive bands for KDR/Flk-1 and Flt-1, respectively.

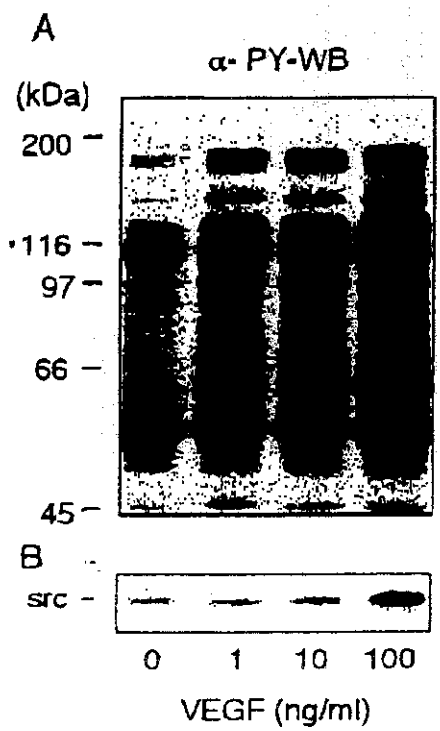


Fig. 4

Involvement of protein tyrosine phosphorylation in the stimulatory effect of VEGF on osteoclastic bone resorption. Isolated osteoclasts were stimulated with various concentrations of VEGF for 2 min (A, B). Proteins in cell lysates were electrophoresed and then Western-blotted with anti-phosphotyrosine (A) and anti-c-src (B) antibodies. A c-Src signal in each lane serves as quantitative internal control.

4 考 察

授乳期の骨は、軟骨内骨化様式によって成長する。この骨の成長にも乳中成分は深くかかわっていることが考えられる。しかし、乳成分の骨成長への作用についての研究はあまり多くない。授乳中における乳幼児の骨の成長は、主として軟骨内成長様式によって起こる。胎児期では軟骨モデルが主体で、出産後急激に成長する。軟骨細胞の増殖・分化そして軟骨基質の石灰化を繰り返して骨は長くなる。次いで、石灰化した軟骨基質を血管の新生と破骨細胞によって吸収して骨髓腔を形成するとともに、2次海綿骨を作って骨へと転換する。この骨の形成によって身体を支え運動の起点となる骨格が形成される。この骨の形成、特に軟骨内骨化の過程に乳成分がどう関わっているのかを明らかにすることは、たいへん重要であると考えられる。一方、私どもの研究室では、大阪大学の開先生らと共同で、軟骨基質から軟骨内骨化に関係している成分を分離してきた。その内にangiogeninが大量に含まれており、血管新生とともに破骨細胞の形成・活性化に関与することを明らかにした。乳中にangiogeninが大量に含まれていることから、乳中angiogeninが、なんらかの成長に関わる可能性が考えられた。

本研究で、angiogeninと同様に血管の新生に関わる血管内皮細胞増殖因子（VEGF）が、骨の細胞にどのように関わるかということについて検討した。その結果、VEGFは、直接破骨細胞に作用し、骨吸収を促進することがわかった。VEGFは、骨芽細胞や間葉系の細胞から発現することも報告されている。このことにより、骨組織の形成過程において、骨芽細胞や間葉系の細胞から分泌されるVEGFが血管の侵入と破骨細胞による骨吸収の両方に関与していることが示唆される。また、VEGFによる骨吸収促進活性促進機構は、成熟破骨細胞に発現するVEGF受容体を介して、破骨細胞内のチロシンキナーゼが活性化され、骨吸収活性が促進することが示された。最近の報告で、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）が骨の成長に大きく関わっていることが示された（Engsig, M. T. et al: J. Cell Biol., 154, 879-889 (2000))。これまで、我々が明らかにしてきた結果と仮説がこの論文で証明されたことになる。さらに、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）が、内軟骨性骨化に重要な作用を及ぼしていることが考えられた。このことは、angiogeninにも、内軟骨性骨化作用があり、重要な作用を及ぼしていることが考えられる。今後は、成長過程における血管新生因子の役割について検討し、牛乳中の血管新生因子について調べる。さらに、乳成分に含まれる軟骨内骨化に関与する成分を中心として、成長への乳成分の作用、その軟骨細胞、破骨細胞などへの作用を明らかにしたい。最終的には、乳成分中の成長に関するメカニズムの解明をしていきたいと考えている。