

骨のタンパク質・カルシウム代謝に対する牛乳の効果 —特に成長因子群の遺伝子発現に及ぼす影響を中心に—

東京大学大学院農学生命科学研究科 教授 野 口 忠

研究目的

骨粗鬆症は世界的に大きな問題となっている疾病であり、特に閉経後の骨粗鬆症は、治療法も確定せず、早急に研究が必要な領域といえる。

報告者らは、卵巣除去ラットをモデル動物として、閉経後の骨におけるタンパク質代謝・カルシウム代謝に、食餌がどのような影響を与えるかについて分子レベルで解析を進めていたが、本研究においては、この研究を基盤に、閉経後の骨粗鬆症の発症の予防、もしくは進行を遅らせる上で、牛乳がいかに有効であるかを明らかにしようとした。

研究開始時点での研究状況

骨粗鬆症の研究においては、多くの場合カルシウム代謝が注目されていたし、現在もそれに変わりはなく、もとよりカルシウム代謝が重要であることは論をまたないが、骨の成分としては、タンパク質も多くを占めていることから、タンパク質代謝も軽視しえないと考えて、本研究を開始した。

骨のカルシウム代謝、タンパク質代謝がどのような因子によって制御されているかについては、多くの研究があったが、実際に骨粗鬆症が防止できないことを考えると、解明されるべき課題が多いと考えられた。

本研究で特に推進しようとした研究

報告者らは、長年タンパク質代謝の研究に従事し、近年は特にタンパク質代謝におけるインスリン様成長因子-I (以下IGF-I) の生理的意義を分子レベルで明らかにしていた。この研究を発展させる形で、まず骨におけるタイプIコラーゲン、オステオカルシン、オステオポンチン等の基質タンパク質のmRNA量におよぼす食餌タンパク質およびカルシウムの量、および卵巣除去の影響を追求することを計画した。

また、上記IGF-Iをはじめ、IGF-II、IGF結合タンパク質 (以下IGFBPs; 現在6種類が知られ、血漿中のIGFBPsの濃度は、それぞれ食餌タンパク質に特徴的な応答をすることを報告者らは明らかにしている) の骨中のmRNA量をも調べることを計画した。

さらに本研究では、IGFs以外の成長因子群、サイトカイン群、IGFBPs、その他骨基質タンパク質の遺伝子発現状態、遺伝子産物の量、におよぼす乳製品摂取の効果を明らかにし、骨におけるタンパク

質代謝、カルシウム代謝にかかわる諸活性との関連を解析することで、閉経後の骨粗鬆症の防止に寄与することを目的とした。

平成7年度

年度の研究目的

基本的な解析の体系を樹立する目的で、平成7年度は、骨におけるタンパク質代謝・カルシウム代謝に重要な機能を果たしていると考えられる骨基質タンパク質であるI型コラーゲン、オステオカルシン、オステオポンチン、および骨における代謝の制御に重要な機能を果たしていると考えられるインスリン様成長因子I (IGF-I) とその結合タンパク質群 (IGFBPs) に着目し、これらの遺伝子発現が骨でどのような状態であるか、またその発現に食餌性の因子や内分泌学的な因子がどのように関与しているかについて解析を行った。

研究方法

従来から、培養造骨細胞や培養破骨細胞様細胞を用いて骨基質タンパク質等の遺伝子発現を解析した報告は少なくないが、骨という組織の取り扱いの困難さから、*in vivo*における骨そのものを用いて遺伝子発現を解析している研究はほとんど認められない。そこで、本研究ではまず、骨から全RNAを抽出し、上記の諸種の遺伝子発現を解析する方法を検討した。その結果、Chomczynski & Sacchiの方法を部分的に改変することにより、大腿骨から骨端部および骨髓を除去した部分から効率よく全RNAを抽出する方法を確立した(研究論文1)。

研究結果

この方法を用いて、卵巣除去後、5%または20%カゼイン食で飼育したラット大腿骨より全RNAを抽出し、上記諸種のタンパク質のmRNA量をノザンプロットティングにより測定した。I型コラーゲンおよびIGF-IのmRNA量は、20%カゼイン食に比べて5%カゼイン食で著しく低いことが明らかとなった(図1、2)。またI型コラーゲン遺伝子発現量はいずれの食餌条件においても卵巣除去により顕著に増加していた(図1)。一方IGF-I遺伝子発現量については、低タンパク食では発現量が低く、卵巣除去による差違も認められなかったが、20%カゼイン食では卵巣摘出により著しく上昇していた(図2)。オステオカルシン、オステオポンチンの遺伝子発現に対しては、食餌中のタンパク質含量及び卵巣除去はほとんど影響を与えないことが判明した。

一方、副腎皮質ホルモンも、骨代謝に多大の影響を及ぼすことが明らかにされている。すなわち、グルココルチコイドを投与すると、急速な骨量の減少が惹起されることが知られている。そこで本研究では体重kgあたり0.01、0.1、1.0mgのデキサメタゾン(Dex)をラットに投与して5日後に大腿骨を採取し、前項と同様に遺伝子発現量を測定した。その結果、Dex投与によりIGFBP-3の遺伝子発現が顕著に増加することが明らかとなった(図3)。3種の骨基質タンパク質、IGF-I、IGFBP-3以外のIGFBPsの遺伝子発現についてはDex投与による大きな変化は認められなかった。グルココルチコイドによりIGFBP-3遺伝子の発現が特異的に増加したことから、グルココルチコイド誘導性の骨代謝異常

にIGFBP-3が深く関与していることが示唆された。

考 察

以上、平成7年度は、骨におけるタンパク質代謝・カルシウム代謝にかかる重要な因子であるI型コラーゲン、オステオカルシン、オステオポンチン、IGF-I、IGFBPsの遺伝子発現を解析する基本的な方法を確立し、卵巣除去動物とグルココルチコイド投与動物という2種類の典型的な骨代謝異常を示すモデル動物において測定を行った。その結果、骨のタンパク質代謝・カルシウム代謝には、これらの因子がそれぞれ独自の様式で関与している状況が推察された。

特に我々が注目した現象として、高回転型も骨代謝異常症（卵巣摘出動物）の場合にIGF-I遺伝子の高発現が認められたこと、低回転型の骨代謝異常症（グルココルチコイド投与動物）においてIGFBP-3遺伝子の高発現が認められたことを指摘したい。

図1 I型コラーゲン、オステオカルシン、オステオポンチン遺伝子発現量に対する食餌タンパク質含量及び卵巣摘出の影響

各レーンに個々のラットより調製したRNAを5 μ g供し、Northern blot分析を行った。50C：5%カゼイン食、200C：20%カゼイン食、Sham：疑似手術、OVX：卵巣摘出

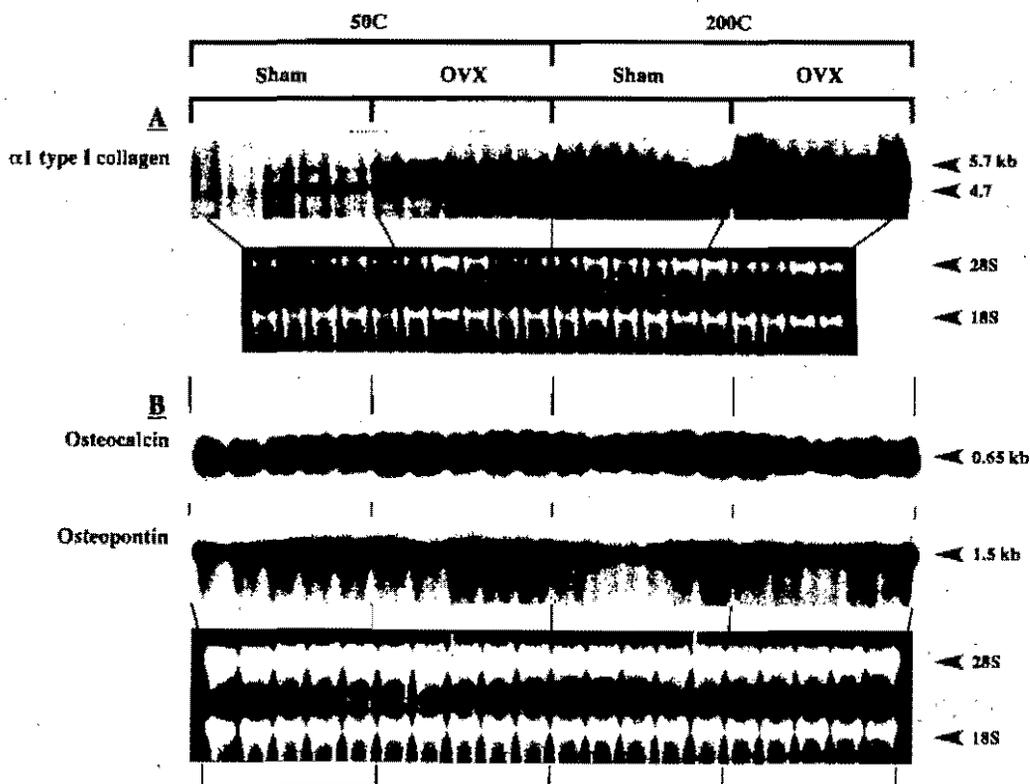


図2 IGF-I遺伝子発現量に対する食餌タンパク質含量及び卵巣摘出の影響
 各レーンに個々のラットより調製したRNAを40 μ g供しNorthern blot分析を行った。50C：5%カゼイン食、200C：20%カゼイン食、Sham：疑似手術、OVX：卵巣摘出

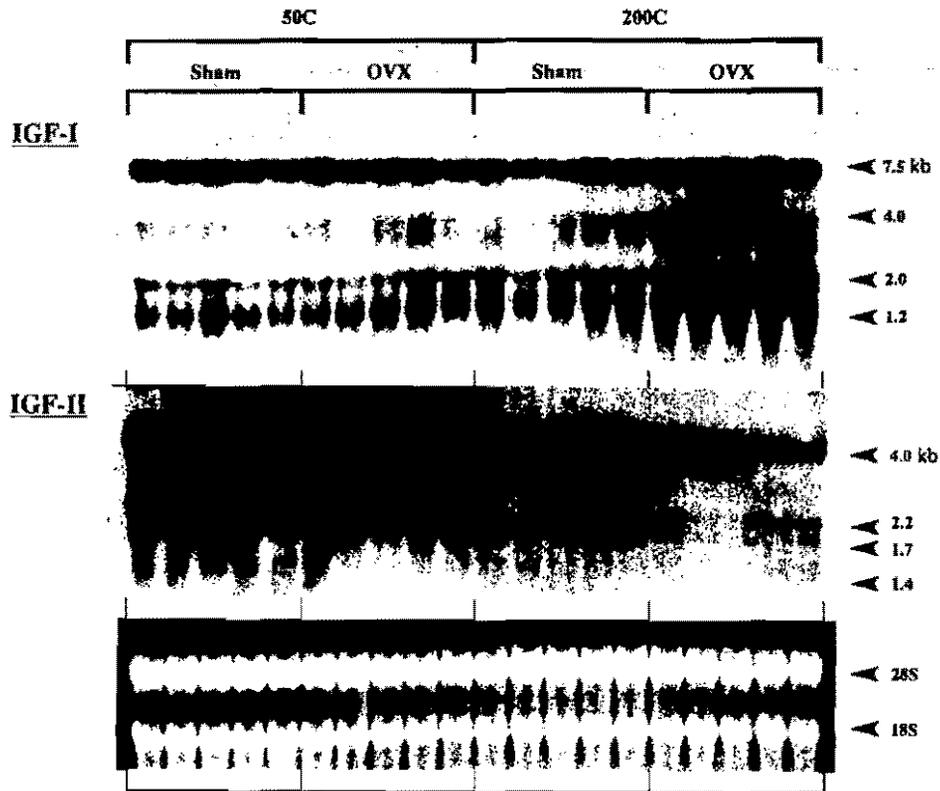
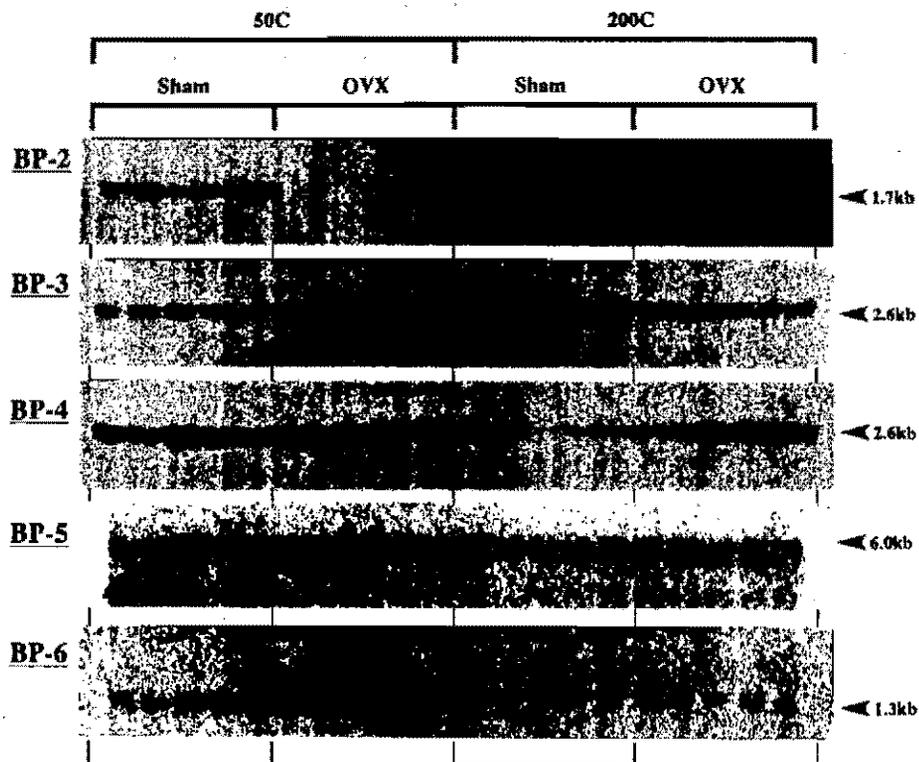


図3 IGFbPs遺伝子発現に対するデキサメタゾン投与の影響

- A) Northern blot分析結果。各群の典型的な2例についての結果を示した。1: Vehicle群、2: Dex0.01mg/kg投与群、3: Dex0.1mg/kg投与群、4: Dex1.0mg/kg投与群
- B) 定量結果をVehicle群の平均を100として相対値で示した。



平成8年度

年度の研究目的

平成7年度は基本的な解析の体系を樹立する目的で、骨におけるタンパク質代謝・カルシウム代謝に重要な機能を果たしていると考えられる骨基質タンパク質であるI型プロコラーゲン、オステオカルシン、オステオポンチン、および骨における代謝の制御に重要な機能を果たしていると考えられるインスリン様成長因子I (IGF-I) とその結合タンパク質群 (IGFBPs) に着目し、これらの遺伝子発現が骨でどのような状態であるか、またその発現に食餌性の因子や内分泌学的な因子がどのように関与しているかについて解析を行った。本年度は、平成7年度からの継続課題である骨代謝に対するインスリンの影響を明らかにすると同時に、近年骨代謝との関連が特に注目されているTGF- β などの因子群についても解析を進めた。

研究方法

- (1) 平成7年度に確立した大腿骨から骨端部および骨髄を除去した部分から効率よく全RNAを抽出する方法(研究論文I)を用いて、骨のI型プロコラーゲン、オステオカルシン、オステオポンチン、および骨における代謝の制御に重要な機能を果たしていると考えられるインスリン様成長因子I (IGF-I) とその結合タンパク質群 (IGFBPs) のmRNA量におよぼすストレプトゾトシン糖尿病の影響を調べた。

Wistar系雌ラット(8週齢)に、streptozotocinを20mg/kg体重投与し、6日目に屠殺して大腿骨を取り、昨年と同様上記の項目の分析をノザンプロット法により行った。

- (2) RT-PCR法によりTGF- β 1を取得し、卵巣除去ラットにエストロゲンを投与した場合にこの遺伝子がどのように応答するかを解析した。

8週齢の雌ラットの両卵巣を除去し、3週間飼育した後、エストロゲンを15 μ g/kg体重、もしくは30 μ g/kg体重を毎日皮下注射に投与した。1週間もしくは2週間後に、ラットを屠殺し、大腿骨を取ってTGF- β 1のmRNAをノザンプロット法により分析した。

研究結果

- (1) 大腿骨における骨基質タンパク質およびIGF-I関連因子のmRNA量におよぼすストレプトゾトシン投与の影響

インスリンは、骨のタンパク質代謝・カルシウム代謝においても重要な機能を果たしていると推定されている。実際図4に示したように、ストレプトゾトシンを投与して動物を糖尿病に陥らせると、プロコラーゲンのmRNA量には影響は認められなかったが、オステオカルシン、オステオポンチンのmRNA量は、顕著に減少した。IGF-IのmRNA量にも明確な減少が認められた(図5)。IGF結合タンパク質(IGFBP)1~6については、骨で発現が極めて少ないIGFBP-2を除いて分析した

結果、顕著な差は認められなかった（結果は示していない）。このように、インスリンは骨基質タンパク質、および骨組織中のIGF-IのmRNA量に顕著な影響をおよぼすことが明らかになった。

(2) 骨組織におけるTGF- β 1遺伝子の発現とそれにおよぼすエストロゲンの影響

報告されているTGF- β 1のcDNAの赤下線部分（図6）をクローニングし、プローブとした。図7に示したように、卵巣除去ラットにエストロゲンを1週間もしくは2週間投与すると、TGF- β 1のmRNAは減少する傾向を示した。しかし、影響は顕著なものとは言い難く、エストロゲンが直接TGF- β 1のmRNAを制御している可能性は少ないと考えられた。

考 察

インスリンが直接骨のタンパク質代謝に影響を及ぼしていることは、今回の実験でも明らかである。すなわち、ストレプトゾトシンによって糖尿病を誘発したラットの大腿骨では、オステオカルシン、オステオポンチンのmRNA量が顕著に減少したばかりか、IGF-IのmRNA量にも明確な減少が認められた（図4）。オステオカルシンは、ビタミンDに应答して誘導される骨基質タンパク質で、骨のカルシウム代謝に重要な役割を果たしていると考えられている。このタンパク質は、ビタミンKに依存したカルボキシル化反応によって生成する γ -カルボキシグルタミン酸を分子内にもっており、カルシウムとの親和性が強いことから、カルシウム代謝における重要性が推定される。一方、オステオポンチンは、破骨細胞に発現しており、この細胞の機能に重要な役割を果たしていることが推定されている。このような、骨タンパク質・カルシウム代謝において重要であると推定されるタンパク質分子のmRNA量が、インスリン欠乏によって顕著に減少したことは、インスリンが骨のタンパク質代謝・カルシウム代謝においても注目すべきホルモンであることを如実に示している。

TGF- β 1のmRNAについては、今後、卵巣を除去していない動物との対比を行うなど、より詳細に検討して、骨の代謝におけるこの因子の機能を明らかにしていく必要がある。

前年度は、食餌タンパク質と副腎皮質ホルモンが、骨代謝に多大の影響を及ぼすことを、骨のカルシウム代謝、タンパク質代謝において重要な因子と考えられているIGF-I等への影響を明らかにすることによって示すことができた。本年度の研究では、さらにインスリンの影響についても解析をすすめ、それがやはり重要な機能をはたしていることを推定させる結果を得た。このように、骨のカルシウム代謝、タンパク質代謝においては、多くの因子が複雑に作用しあっているものと推定される。

次年度は、さらに骨の代謝を制御している因子の候補として、LIF (leukemia inhibitory factor) やインターロイキンにも研究対象を広げ、総合的に骨のカルシウム、タンパク質代謝の解析を行い、これらの研究を通して、ある種の生理的条件下、とくに閉経後のモデルになる卵巣除去動物に、食餌因子がどのような影響をおよぼすのかを実証していくことを計画した。

図4 骨組織におけるI型プロコラーゲン、オステオカルシン、オステオポンチン遺伝子発現量に対するストレプトゾトシン糖尿病の影響

各レーンに個々のラットより調製したRNAを5 μ g 供し、Northern blot分析を行った。

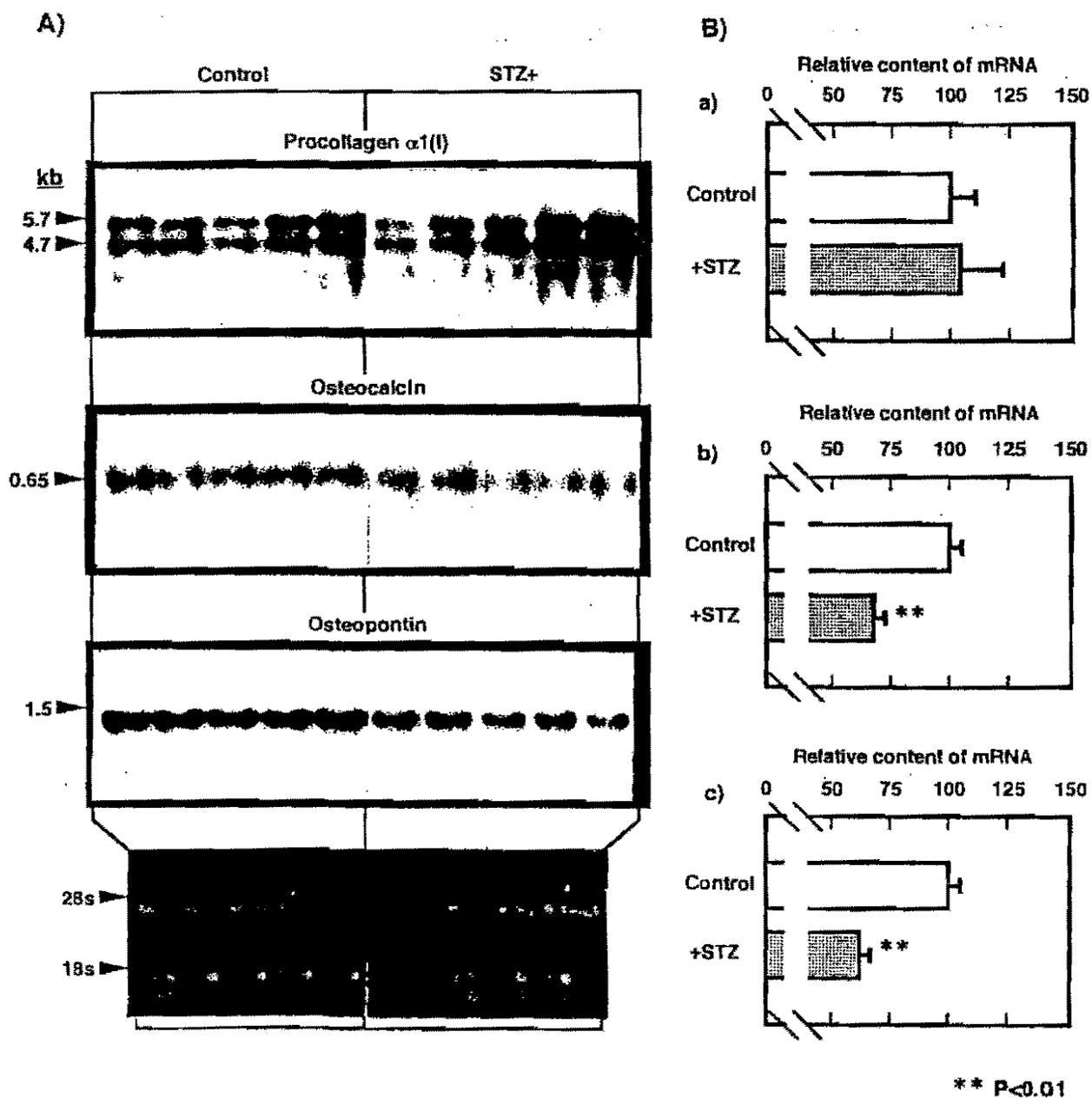


図5 骨組織におけるIGF-I遺伝子発現量に対するストレプトゾトシン糖尿病の影響
 各レーンに個々のラットより調製したRNAを40 μ g 供しNorthern blot分析を行った。

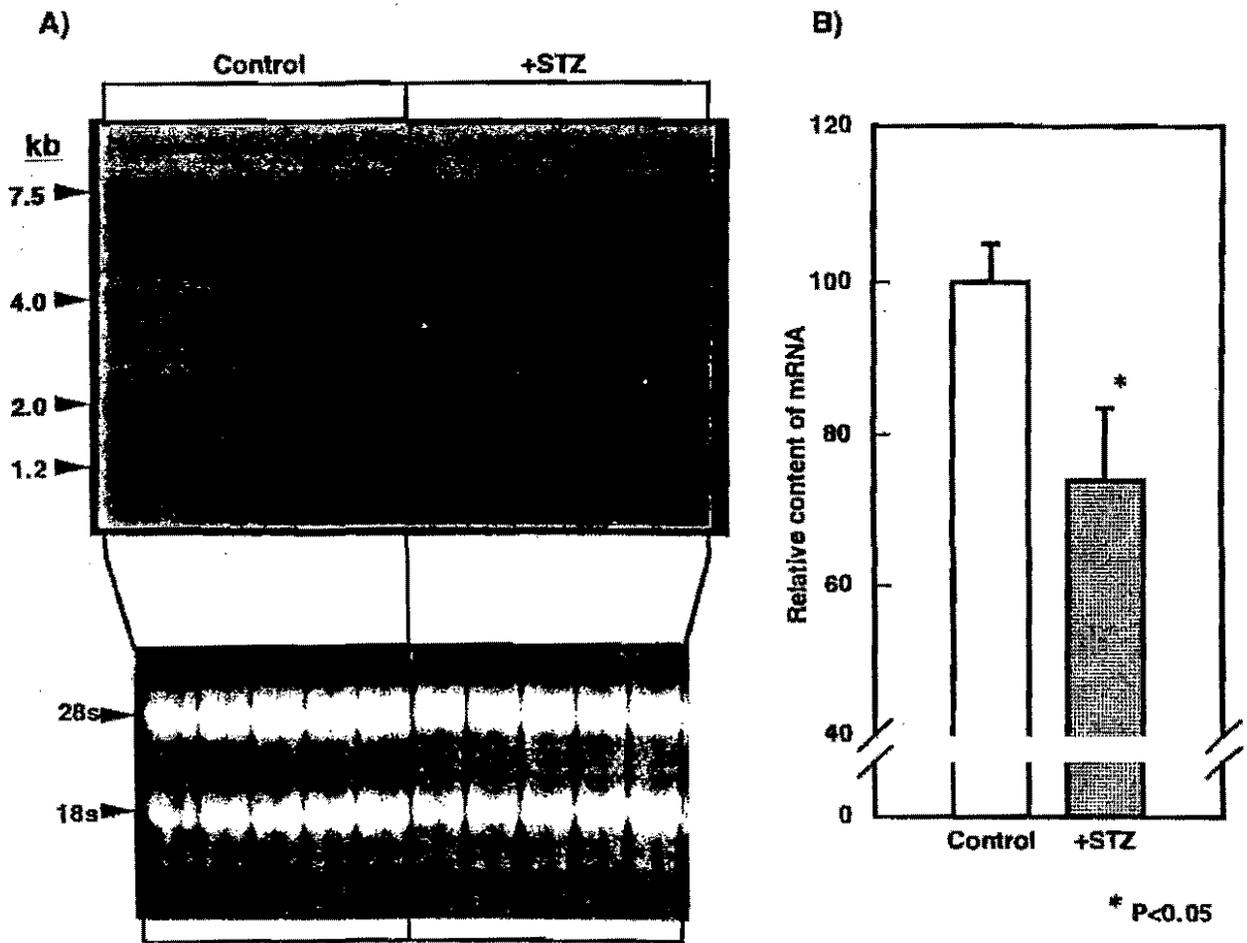
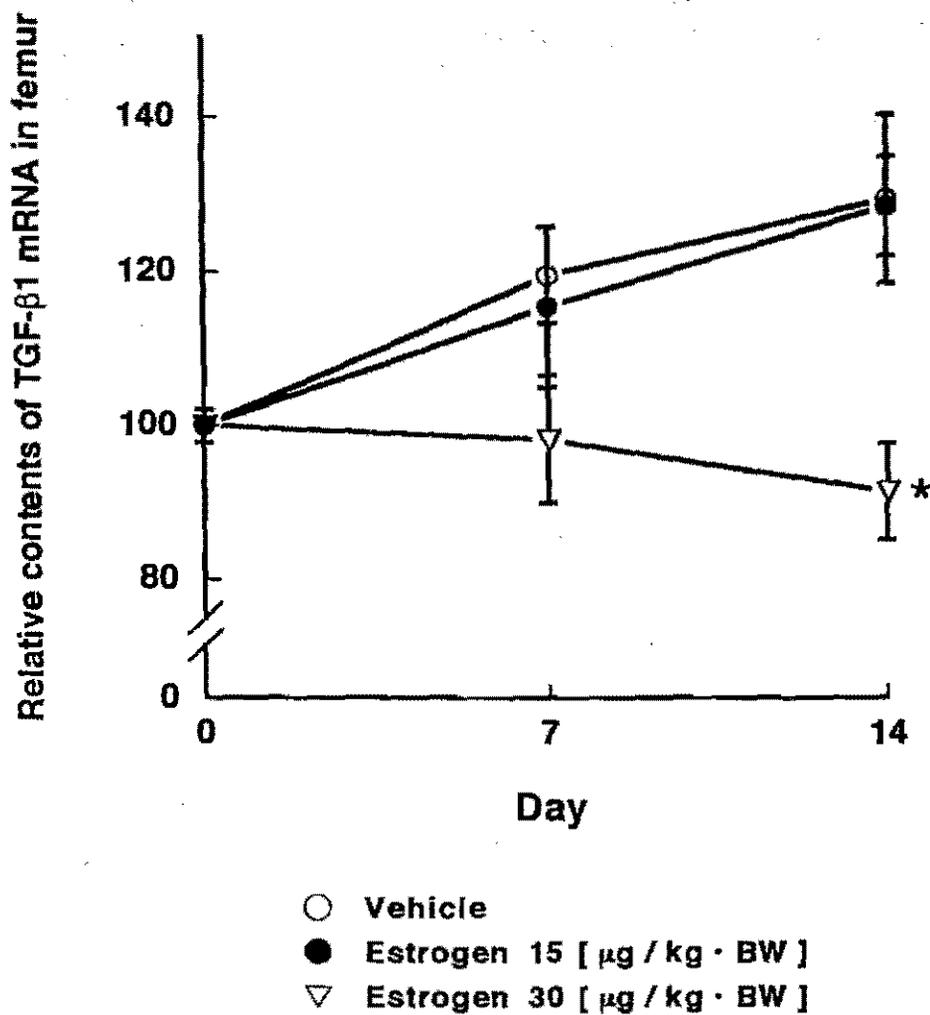


図7 骨組織におけるTGF- β 1 mRNAの量におよぼす卵巣除去とエストロゲン投与の影響

8週齢の雌ラットの両卵巣を除去し、3週間飼育した後、エストロゲンを $15\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、もしくは $30\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重を毎日皮下注射に投与した。1週間もしくは2週間後に、ラットを屠殺し、大腿骨を取って、TGF- β 1 mRNA量をノザンプロット法により分析した。



* $P < 0.05$

平成9年度

年度の研究目的

平成8年度までの研究をさらに発展させる目的で、骨代謝を制御していると推定される因子に関する研究をさらに継続した。

1997年に、cbfa-1 (core binding factor a1) とよばれる因子をknock outしたマウスが作成された。このマウスは驚くべきことに、軟骨は正常であるにも関わらず、そのカルシウム化が全く起こらないまま、誕生することが明らかになった。この因子cbfa-1は、骨芽細胞の前駆細胞が骨芽細胞へと分化する過程に必須の因子である。

そこで、本年の課題として、この新因子cbfa-1の骨組織における遺伝子発現制御が前年までに調べてきた卵巣除去ラットおよびそれらにエストロゲンを投与したラットでどのように変化するのかを解析した。cbfa-1の発現調節機構の研究は、骨形成促進剤の開発や骨粗鬆症の治療に結びつく可能性を持っていると考えた。

研究方法

(1) ラットcbfa-1のクローニングと、その部分アミノ酸配列のE. coliにおける発現。

マウスのcbfa-1はすでにクローニングされているが、ラットについては報告がない。そこで、マウスのcbfa-1のcDNAの塩基配列(図8)を参考に、ラットのcbfa-1のcDNAをRT-PCR法により取得することを試みた。

(2) クローニングしたラットcbfa-1 cDNAを、pQE32 (QIAGEN社) ベクター系を用いて、N末端にヒスチジンtagをつけたタンパク質として、E. coliを用いて作製した。

(3) 抗ラットcbfa-1ウサギ抗体の作製：調製したラットcbfa-1の部分タンパク質に対する抗体をウサギを用いて常法により調製した。

(4) 昨年度までに確立した大腿骨から骨端部および骨髄を除去した部分から効率よく全RNAを抽出する方法(研究論文1)を用いて、骨組織におけるcbfa-1の遺伝子発現をNorthern blot法で解析した。

(5) 動物の条件：昨年と同様Wistar系雌ラット(8週齢)の両卵巣を除去し、3週間飼育し、その間1週間毎にラットを屠殺し、大腿骨を取ってcbfa-1のmRNAをノザンプロット法により分析した。また、卵巣除去して3週間経過した後、エストロゲンを $15\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、もしくは $30\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重を毎日皮下に投与した。投与開始から1週間もしくは2週間後にラットを屠殺し、大腿骨を取ってcbfa-1のmRNAをノザンプロット法により分析した。また、破骨細胞の活性の指標とする目的で、別途tartarate resistant acid phosphataseのcDNAを調製し、同じくNorthern blot分析を行った。

研究結果

大腿骨におけるcbfa-1の遺伝子発現における卵巣除去およびエストロゲン投与の影響について次の

結果を得た。

図9に示したように、ラットの卵巣を除去すると、3週間後にはcbfa-1のmRNA量は増加した。この卵巣除去ラットにエストロゲンを2週間投与しても有意な変化は観察されず、高い水準を維持した(図10)。この結果は、卵巣除去した動物では、造骨活性が上昇することを示唆しており、一方エストロゲンを再投与しても、2週間では効果が現れないことを示唆している。この卵巣除去3週間の結果は、卵巣除去動物における高代謝回転型の骨粗鬆症モデルをよく説明するものである。

一方、tartarate-resistant acid phosphataseのmRNA量は卵巣除去3週間までに、特に有意差のある変化を示さなかった(図11)。また、その後にエストロゲンを投与しても、対照区と比べて有意な差は認められなかった(図12)。この酵素のmRNA量が、破骨細胞の活性を代表していると考えれば、この結果は、高代謝回転型の骨粗鬆症モデル、すなわちこの型の骨粗鬆症では造骨活性も破骨活性も上昇するというモデルでは解釈できず、卵巣除去によって、破骨活性は大きな影響を受けないと考えられる。

次に、タンパク質としてのcbfa-1の検出をimmunoblot法で試みたところ、検出することができなかった。その原因として、骨組織中のcbfa-1の量が極めて少ないこと、抗体の力価が低くて検出できないこと、などが考えられる。調製した抗原との反応性から判断すると、前者の可能性が高いと考えている。

考 察

平成9年度の研究では、骨代謝とくに骨のカルシウム化において、重要な機能を果たしていることが明確になったcbfa-1の遺伝子発現量を、卵巣除去動物およびそれにエストロゲンを投与した動物で明らかにした。結果は、卵巣除去動物で、高代謝回転型の骨粗鬆症が誘起されるとの仮説に有利な結果を得た。一方、破骨細胞の活性に関しては、高代謝回転型の骨粗鬆症のモデルを必ずしも支持しなかったが、これをtartarate-resistant acid phosphataseの遺伝子発現のみで判断するのは適当とは言えないであろう。

平成9年度の結果では、cbfa-1のタンパク質としての検出には成功していない。cbfa-1は、細胞分化を司る因子であり、その発現量は極めて少量である可能性が高い。しかし、今後検討を重ねるべき課題と考えている。

骨代謝は、極めて多くの因子によって、巧妙に制御されていると考えられている。有効な骨粗鬆症の治療法がない現在、骨代謝の制御機構は未知の部分が極めて多いと判断せざるを得ない。

図8 取得したラットcbfa-cDNAの塩基配列を既知のヒト、マウスの配列と比較した

四角で囲った部分はprimerに用いた配列。下線部はrunt domain、点線部はグルタミンの繰り返し部分の配列、波線部はアラニンの繰り返し部分の配列を示す。

```

human  CAAAATGAGCGACGTGAGCCCCGGTGGTGGCTGCG-----CAACAGCAGCAG---CA
mouse  CAAGATGAGCGACGTGAGCCCGGTGGTGGCTGCGCAGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCA
rat     CGGTAGTGGCTGCTCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA

human  ACAGCAGCAGCAGCAAACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAA---CAGCAGCAGCAGCAGCAGGA
mouse  ACAGCAGCAGCAAACAGCAAACAGCAAACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGGA
rat     A---CAGCAGCAAACAGCAGCAGCAGCAGCAA-----CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGGA

human  GGGCGCGCGCGCGGCTGCGGGCGCAGCGGCGGCTGCGGCGGCGGCAGCT---GCAGTGCC
mouse  GGCGGCGCGCAGCAGCAGCGGGCGCAGCGGCGGCGGCAGCAGCGGCGGCGGCGGCAGTGCC
rat     GGGCGGCGCAGCAGCAGCAGCGGGCAGCGGCGGCGGCAGCAGCGGCGGCAGCC---GTGCC

human  CCGGTTGCGGCGCCCCACGACAACCGCACCATGGTGGAGATCATCGCCGACCAACCCGGC
mouse  CCGATTGAGGCCGCCGCACGACAACCGCACCATGGTGGAGATCATCGCGGACCAACCCGGC
rat     CCGGTTGAGGCCGCCGCACGACAACCGCACCATGGTGGAGATCATCGCGGACCAACCCGGC

human  CGAACTCGTCCGCACCGACAGCCCCAACTTCCTGTGCTCGGTGCTGCCCTCGCACTGGCG
mouse  CGAACTGGTCCGCACCGACAGTCCCAACTTCCTGTGCTCCGTGCTGCCCTCGCACTGGCG
rat     CGAACTGGTCCGCACCGACAGCCCCAACTTCCTGTGCTCCGTGCTGCCCTCGCACTGGCG

human  CTGCAACAAGACCCTGCCCGTGGCCTTCAAGGTGGTAGCCCTCGGAGAGGTACCAGATGG
mouse  GTGCAACAAGACCCTGCCCGTGGCCTTCAAGGTGGTAGCCCTCGGAGAGGTACCAGATGG
rat     GTGCAACATGACCCTGCCCGTGGCCTTCAAGGTGGTAGCCCTCAGAGAGGTACCCGATGG

human  GACTGTGGTTACTGTTCATGGCCGGTAACGATGAAAATTATTCTGCTGAGCTCCGGAATGC
mouse  GACTGTGGTTACCGTCATGGCCGGGAATGATGAGAACTACTCCGCCGAGCTCCGAAATGC
rat     GGCCGTGGTTACCGTCATGGCCGGGAATGATGAGAACTACTCTGCCGAGCTACGAAATGC

human  CTCTGCTGTTATGAAAAACCAAGTAGCAAGGTTCAACGATCTGAGATTTGTGGGCCGGAG
mouse  CTCCGCTGTTATGAAAAACCAAGTAGCCAGGTTCAACGATCTGAGATTTGTGGGCCGGAG
rat     CTCTGCTGTTATGAAAAACCAAGTGCCAGGTTCAACGATCTGAGATTTGTAGGCCGGAG

human  TGGACGAGGCAAGAGTTTCACTTGACCATAACCGTCTTCACAAATCCTCCCCAAGTAGC
mouse  CGGACGAGGCAAGAGTTTCACTTGACCATAACAGTCTTCACAAATCCTCCCCAAGTAGC
rat     CGGACGAGGCAAGAGTTTCACTTGACCATAACCGTCTTCACAAATCCTCCCCAAGTAGC

human  TACCTATCACAGAGCAATTAAGTTACAGTAGATGGACCTCGGGAACCCAGAAGGCACAG
mouse  CACTTACCACAGAGCTATTAAGTGACAGTGGACGGTCCCCGGGAACCAAGAAGGCACAG
rat     CACTTACCACAGAGCTATTAAGTGACAGTGGACGGTCCC
    
```

図9 骨組織におけるcbfa-1 mRNA量におよぼす卵巣除去の影響

8週齢の雌ラットの両卵巣を除去し、3週間飼育する過程で1週毎にラットを屠殺し、大腿骨を取って、cbfa-1 mRNA量をノザンプロット法により分析した。

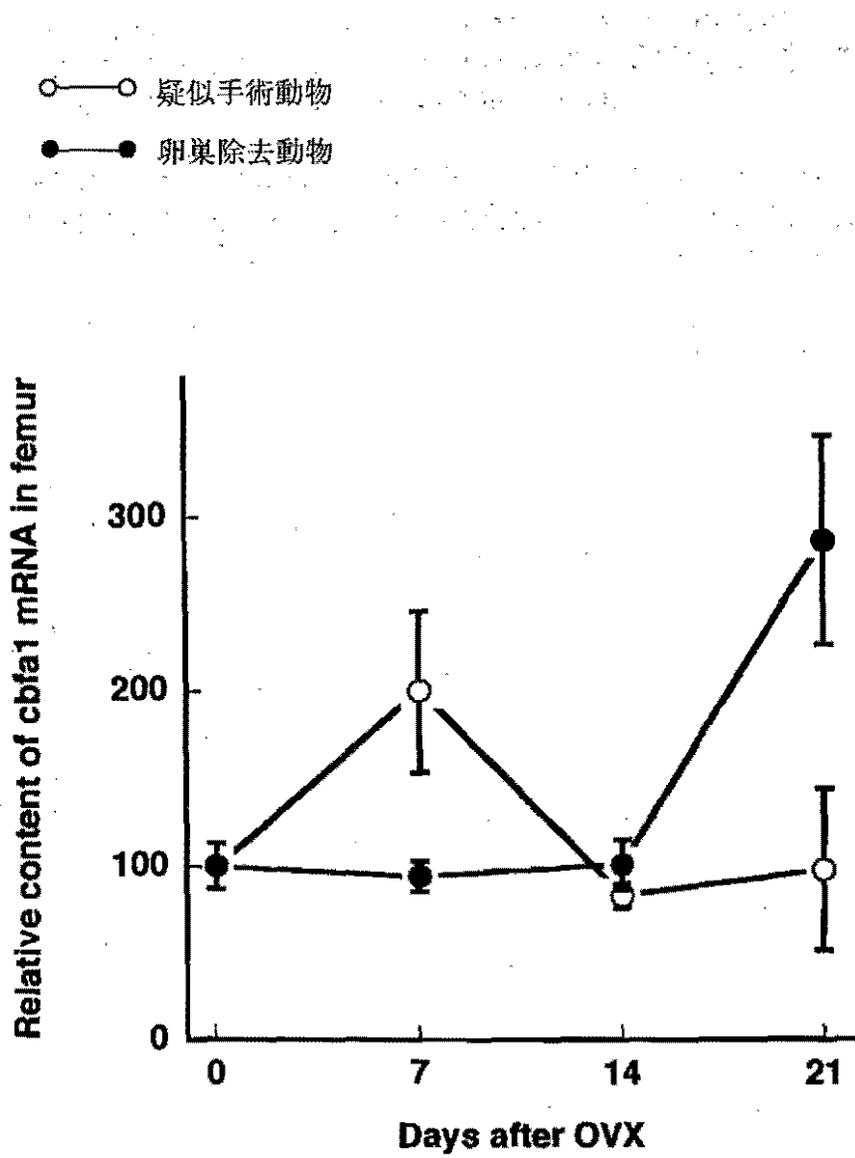


図10 卵巣除去動物の骨組織におけるcbfa-1 mRNA量におよぼすエストロゲン投与の影響

8週齢の雌ラットの両卵巣を除去し、3週間飼育した後、エストロゲンを $15\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、もしくは $30\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重を毎日皮下注射に投与した。1週間もしくは2週間後にラットを屠殺し、大腿骨を取って、cbfa-1 mRNA量をノザンプロット法により分析した。

OVX 対照動物 (卵巣除去、エストロゲン非投与、溶媒のみ投与)

15 エストロゲン投与動物 (卵巣除去、エストロゲンを $15\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、毎日皮下注射に投与)

30 エストロゲン投与動物 (卵巣除去、エストロゲンを $30\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、毎日皮下注射に投与)

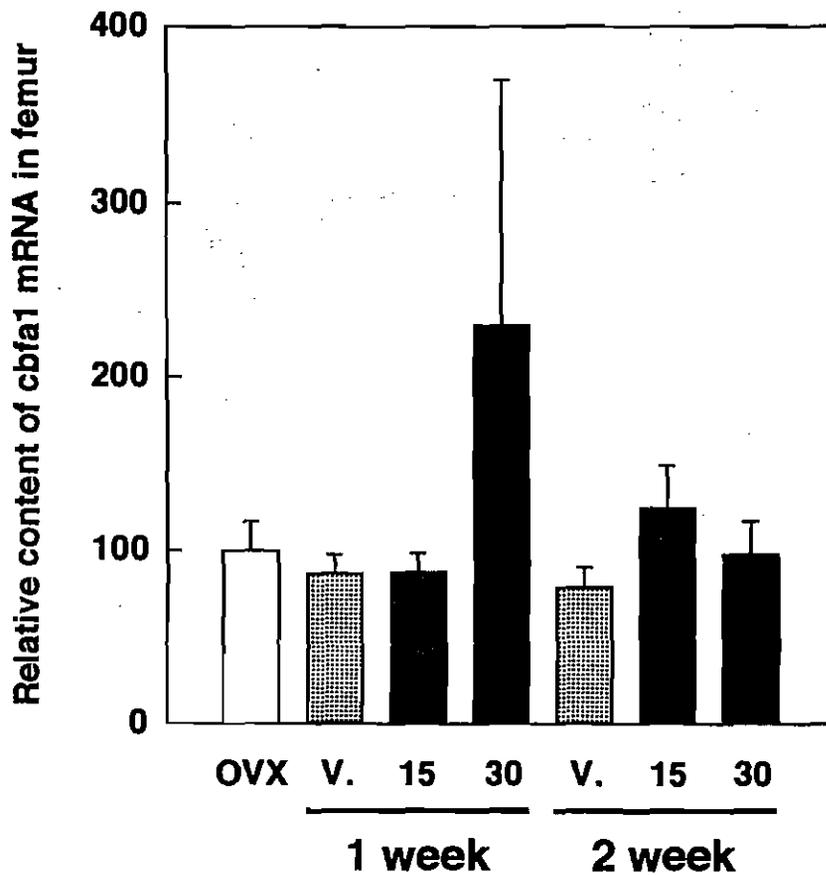


図11 骨組織におけるtartarate resistant acid phosphataseのmRNA量に及ぼす卵巣除去の影響

8週齢の雌ラットの両卵巣を除去し、3週間飼育する過程で1週毎にラットを屠殺し、大腿骨を取って、tartarate resistant acid phosphatase mRNA量をノザンプロット法により分析した。

- 疑似手術動物
- 卵巣除去動物

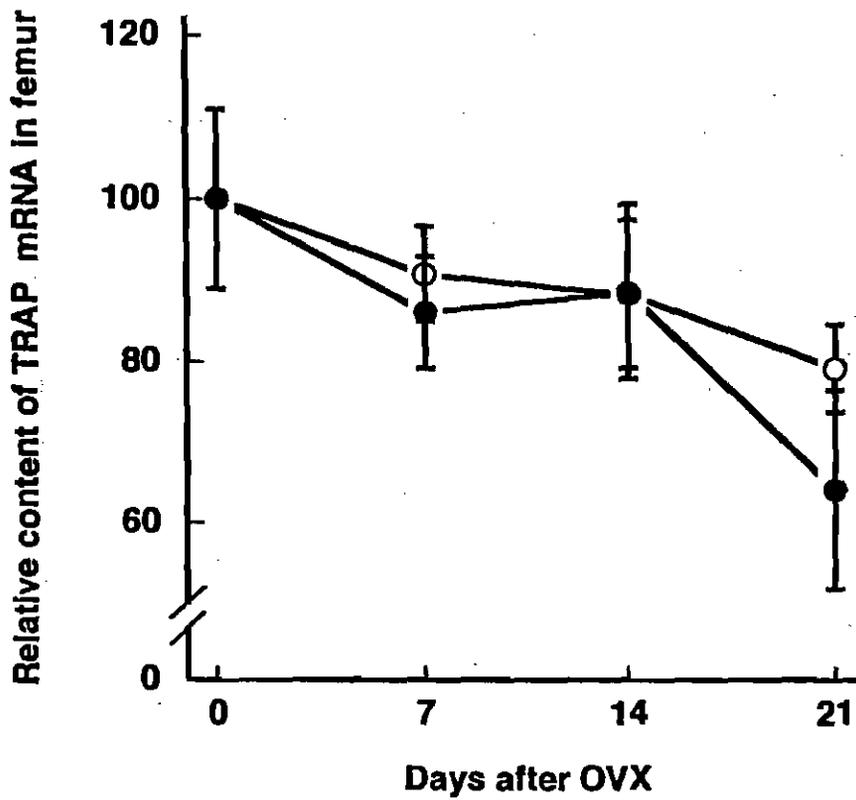


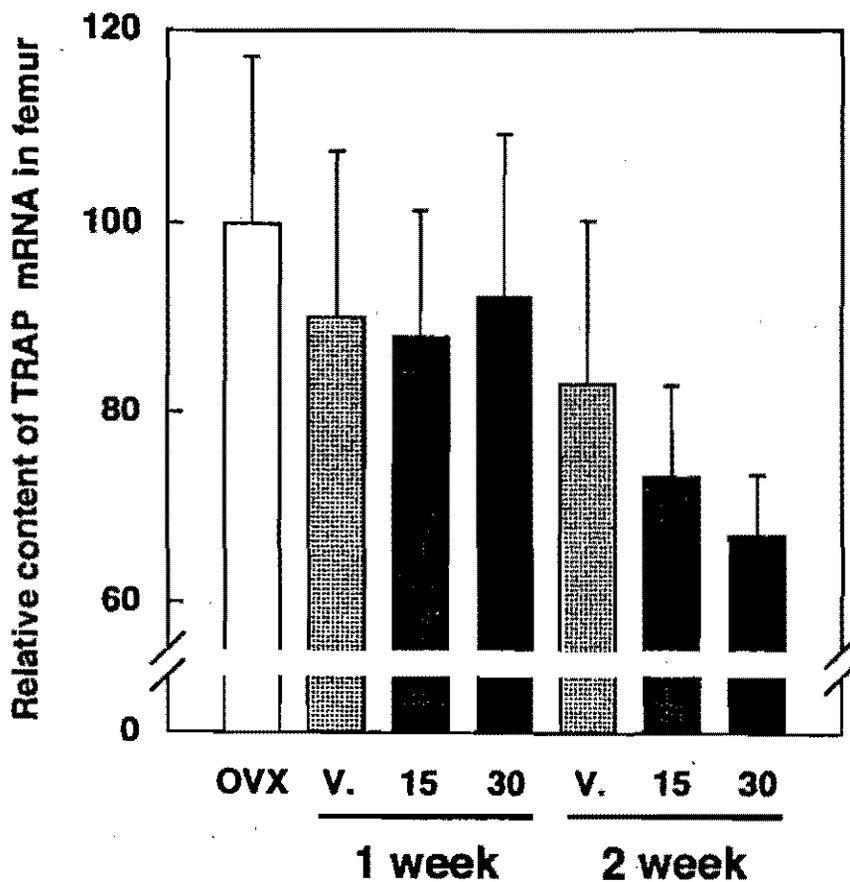
図12 卵巣除去動物の骨組織における tartarate resistant acid phosphatase mRNA量におよぼすエストロゲン投与の影響

8週齢の雌ラットの両卵巣を除去し、3週間飼育した後、エストロゲンを $15\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、もしくは $30\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重を毎日皮下注射に投与した。1週間もしくは2週間後に、ラットを屠殺し、大腿骨を取って、tartarate resistant acid phosphatase mRNA量をノザンプロット法により分析した。

OVX 対照動物 (卵巣除去、エストロゲン非投与、溶媒のみ投与)

15 エストロゲン投与動物 (卵巣除去、エストロゲンを $15\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、毎日皮下注射に投与)

30 エストロゲン投与動物 (卵巣除去、エストロゲンを $30\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、毎日皮下注射に投与)



結 語

牛乳を摂取することは、骨粗鬆症対策として明らかに有効な手段であることから、その有効性がどの作用点にあるのかを探ることは、骨粗鬆症対策の面からも興味をもたれるところである。1997年7月4日に行われた牛乳栄養学研究会第12回国際学術フォーラムにおいても議論されたように、骨のカルシウム代謝、タンパク質代謝には極めて多くの因子が関与しており、それぞれの役割には不明な点が多い。これらの因子が、卵巣除去をはじめとする骨代謝異常の条件下でどのように変化するかを明確にして、骨のカルシウム損失との相関関係を解明していくことは、回り道のようにみえても解明の遅れている骨のカルシウム代謝の機構およびその調節機構を明らかにする近道ではないだろうか。

3年間におよぶ本研究によって、*in vivo*での骨組織において、広く関心を集めている諸種の因子、特にインスリン様成長因子-Iおよびその結合タンパク質群、また、I型コラーゲンなどが、食餌因子によって重要な遺伝子発現制御を受けることを証明してきた。牛乳タンパク質がこれらの因子を望ましい方向に変化させることも証明できた。しかし、多くの因子を手がけるあまり、例えば、インスリン様成長因子-Iおよびその結合タンパク質群、およびI型コラーゲンなど、今回の研究で、食餌応答が明確になった因子について、例えば全脂粉乳を対象として、その中の特に有効な因子を検索するといった研究に着手することができなかった。今後機会をみて、それらの研究を推進したいと計画している。

3年間にわたり、多大なご援助を戴いた全国牛乳普及協会に深甚の謝意を表する次第です。有り難うございました。

研究論文 (すでに公表されているもの、および掲載の決定したもの)

(1) Higashi, Y., Takenaka, A., Takahashi, S.-I., Noguchi, T., Effect of Protein Restriction on the Messenger Ribonucleic Acids Contents of Bone Matrix Proteins, Insulin-Like Growth Factors and Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins in Femur of Ovariectomized Rats. *Brit. J. Nutr.* 75, 811-823 (1996).

(2) Higashi, Y., Takenaka, A., Takahashi, S.-I., Noguchi, T., Effect of Protein Restriction on Messenger Ribonucleic Acid of Insulin-like Growth Factor-I and Insulin-like Growth Factor Binding Proteins in Liver of Ovariectomized Rats. *Brit. J. Nutr.*, in press (1998).