

## 平成13年度研究奨励金交付に伴う研究成果報告書

## 骨折及び骨粗鬆症の分子生物学的解析とその栄養学的予防法確立に関する研究

研究代表者 和田 政裕

高度高齢化社会を迎え、骨折及びその原因の一つとなる骨粗鬆症や関節症などが増加している。高齢者の骨折は直接生命にかかわる問題ではないが、QOLの著しい低下をまねき、不動（寝たきり）や痴呆の原因ともなっている。一方、最近のわが国では、高齢者の独り暮らしや高齢夫妻の二人暮らしの急増加に伴う、食事内容の量的質的低下が指摘されている。この栄養状態の低下が、骨・軟骨の量的質的な変化を惹起し、関節症による行動の制限や骨粗鬆症による骨量の減少が骨折の原因の一つになっていると考えられる。

骨では骨芽細胞や破骨細胞の作用で骨代謝が営まれ、常に強度の高い骨が維持されている。また、関節軟骨は軟骨細胞の働きで正常な軟骨組織が維持されている。適切な栄養管理を怠ると、これらの細胞の正常な「いとなみ」が阻害され、特に高齢者の場合には、老人性骨粗鬆症が発症し、それに伴い骨折の頻度が増加するものと考えられる。また、老人性関節症の発症により、身体の物理的な動きが不自由となり、QOLが著しく低下する。

また、食事は複数の成分を同時に摂取するため、その調理法や食べ合わせなどで様々な栄養成分を破壊し、また、消化吸收を阻害する。例えば、ほうれん草は骨代謝に有効なビタミンCやカルシウムを多く含むが、これらを分解し、吸収を阻害すると考えられているシュウ酸も多く含む。

本研究では、細胞レベルや遺伝子レベルで骨粗鬆症や関節症の発症メカニズムを解明し、さらに、食事内容及びその調理方法などが栄養成分に及ぼす影響を解析し、骨折および骨粗鬆症の栄養学的予防法の確立を目指した。

## 実験材料および実験方法

## 成熟破骨細胞の分離培養法

10日令ウサギの長管骨をMEM/5% FBS中で細切し、上清をUnfractionated Bone Cell(UBC)とした。通常のシャーレで培養したUBCを、0.001% Pronase E/0.02% EDTAで処理し破骨細胞以外の細胞を除去し、培養破骨細胞として使用した。また、UBCをコラーゲンゲル上で培養し、0.001% Pronase E/0.02% EDTA、0.01% Collagenase、0.1% Collagenaseで段階処理して、破骨細胞浮遊液を調整した(図1)。

## ピットアッセイ

破骨細胞の骨破壊・吸収活性はピットアッセイで解析した。象牙片上で破骨細胞(2~3 X 10<sup>2</sup> 破骨細胞/well)あるいはUBC(1~4 X 10<sup>5</sup> 破骨細胞/well)を培養した後、各因子を添加して培養した。その後、スクレーパーで細胞を剥がし、破骨細胞が形成した象牙片上の吸収窩を酸ヘマトキシリンで染色し、顕微鏡で吸収窩の数、面積を測定した。

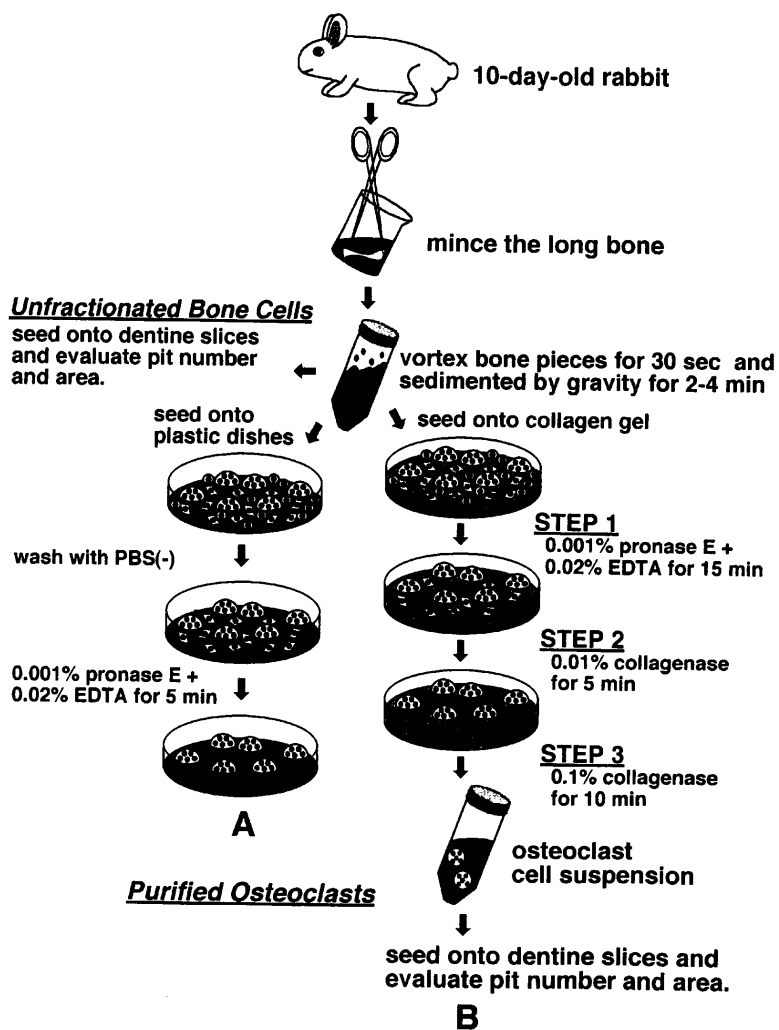


図1 成熟破骨細胞解析スキーム

### 遺伝子発現解析

破骨細胞の遺伝子発現は、ノザン解析法、RT-PCR法などを用い解析した。培養ディッシュ上で培養した破骨細胞のRNAをAGPC法で抽出し、常法に従って、ノザン解析を行った(軟骨細胞を用いた遺伝子解析を参照)。

### 培養軟骨細胞の培養

細胞はATDC5を用いた。Ca添加培地はD-MEM/F1中のCa由来成分がCaCl<sub>2</sub>(1mM)であったので、通常培地に塩化カルシウム二水和物(和光)をtotal 6mMになるように添加した。ATDC5は5%CO<sub>2</sub>インキュベータ?で培養し、100%コンフルエントの状態(約7×10<sup>3</sup>cells/ml)で植継ぎを行った。

### RNA抽出

細胞をPBSで洗いTRIZOL Reagent (Gibco BRL)1mlを入れCELL LIFTER (COSTAR)を用いて、1.5ml サンプリングチューブに回収した。常法にしたがってRNAを精製した。

### アルカリフォスファターゼ染色(ALP)

ALPの試薬は0.05mol/l AMP Buffer(pH9.8) 5ml中にNAPHTHOL AS-BI PHOSPHATE(SIGMA)0.025gとFASTRED VIOLET LB SALT (SIGMA) 0.025gを溶解させたものをALP solとして使用し、20%ホルマリンで15min固定後、水で洗い、ALP solを100μl入れ37℃インキュベータ?中で15min染色した後、再度水で洗った。

### アリザリンレッド染色(AR)

試薬はALIZARIN RED S-Certified(SIGMA)を蒸留水に1%になるように溶かした。次にpH6.38になるように0.028%アンモニア水0.1mlを用いてアリザリンレッド液を調整し、20%ホルマリンで15min固定後水で洗い、アリザリンレッド液を100μl入れ室温中で5min置いた後、水で洗浄した。アリザリンレッド染色によりプレート内のCa沈着部位が塊状で観察されたので、接眼メッシュ(10×10マス)を用いて、染色されている割合をマス数を計測することにより、Ca沈着数を測定した。

### RT-PCR

抽出したRNAをSuper ScriptIIを用い逆転写を行った。PCRはEx Taqを用い、94℃5min、(94℃30sec, 58℃30sec, 72℃3min)×18Times、4℃ONで反応させた。

### 結果及び考察

未分画骨細胞および成熟破骨細胞において、ビタミンK<sub>2</sub>はPit解析で骨吸収高量を顕著に減少させた。ビタミンD<sub>3</sub>には純粋な成熟破骨細胞の骨吸収に全く作用しないことから、ビタミンK<sub>2</sub>はストローマ細胞を介さなくとも成熟破骨細胞に作用することを明らかにした(図2上段)。

さらに、ビタミンK<sub>2</sub>は破骨細胞特異的遺伝子の一つであるカテプシンKのmRNA量を顕著に減少させ

た（図2下段）。カテプシンKは破骨細胞による骨吸収において、骨基質中のコラーゲンなどの分解に中心的役割を果たすプロテアーゼであることから、ビタミンK<sub>2</sub>による破骨細胞骨吸収抑制には、カテプシンKの発現制御が関与している可能性が示唆された。

また、われわれは、ビタミンK<sub>2</sub>は破骨細胞のアポトーシスを誘導することも報告しており、ビタミンK<sub>2</sub>は複数のメカニズムで成熟破骨細胞の骨吸収を調節することが明らかになった。

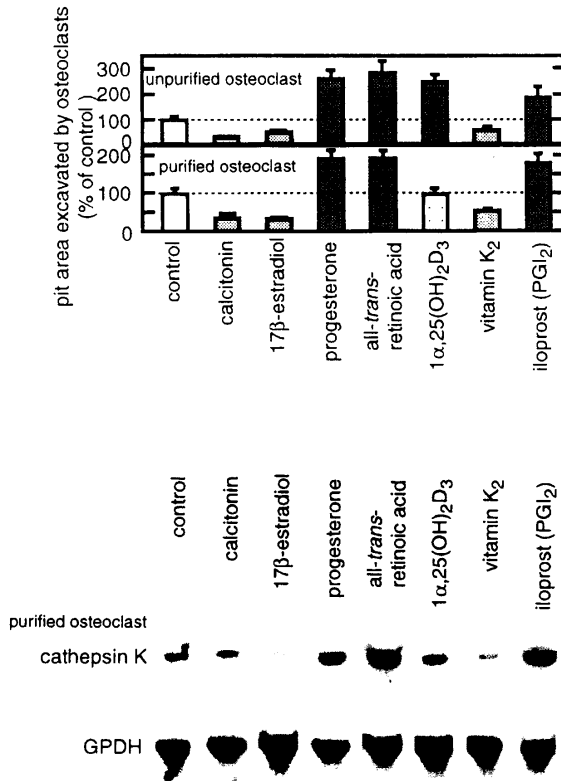


図2 破骨細胞の骨吸収に対する食品成分の作用

純粋成熟破骨細胞あるいは未分化骨細胞をもちいた Pit 解析（上段）

純粋成熟破骨細胞のカテプシンKのノザンブロットィング（下段）

ALP 活性は通常培地で培養した場合は、1 週間目辺りから活性が上がり初め、時間を追うごとに活性が高くなった。一方、6mM Ca 添加培地で培養した細胞の ALP 活性は約 2 週間目まで通常培地で培養した細胞より速く活性が上がり、また通常培地の細胞と比べ活性が高かった。しかしその後徐々に ALP 活性は下がり始め 4 週目には通常細胞と比べ ALP 活性は低くなっていた。(図 3)

細胞で Alizarin Red Stain により生じた Ca 沈着は、4 週目以降から観察できた。一方 6mM Ca 添加培地で培養した細胞では 2 週目より Ca 沈着が観察され始め、その後箇所数、大きさ共に増えていった。(図 4)

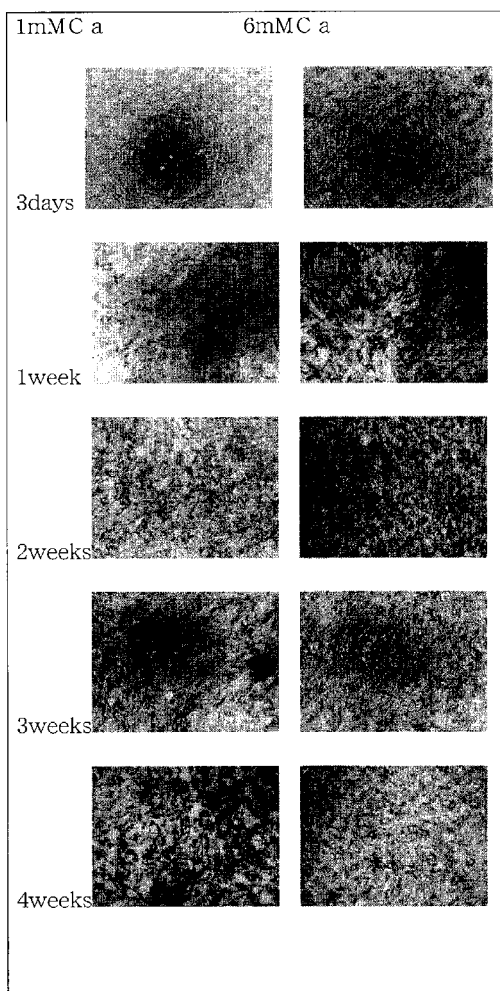


図 3 ATDC5 の ALP 活性の変化

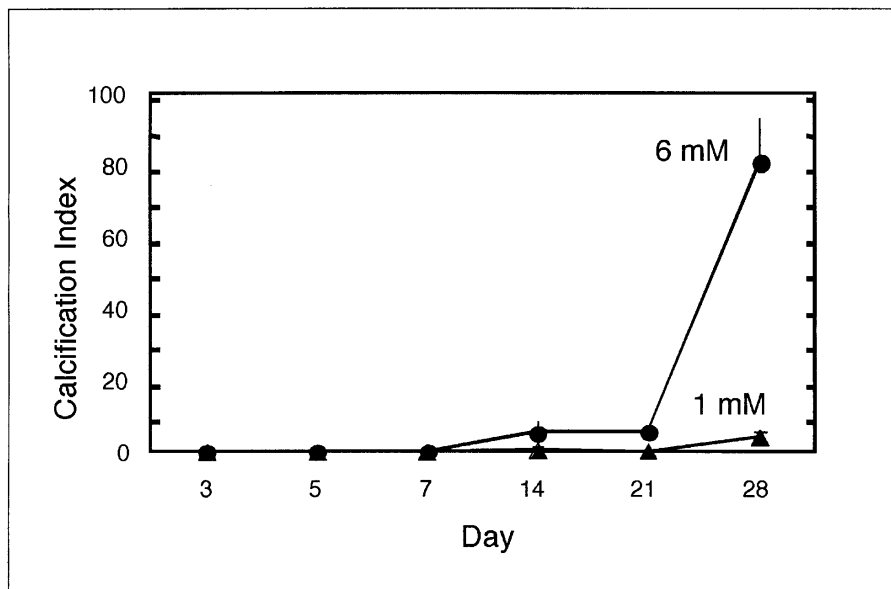


図4 ATDC5 における Alizarin Red Stain による Ca 沈着数

通常細胞では MGP の mRNA の発現は時間と共に増加した。一方、6mM Ca 添加培地では、3days で増加した MGP mRNA は 7DAYS で一度減少し、その後再び増加していった。(図5)

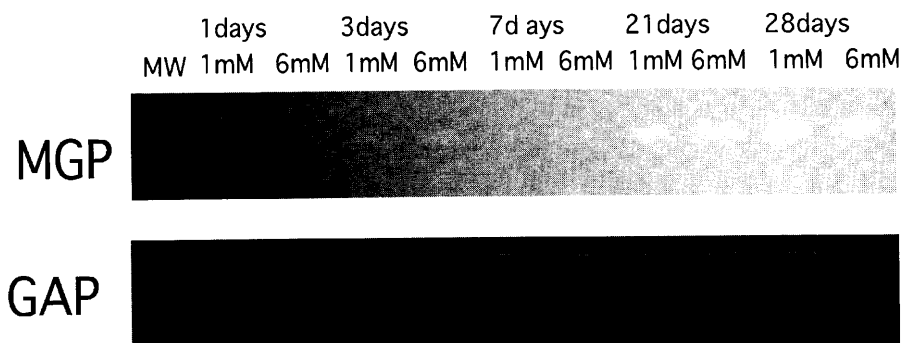


図5 RT-PCR により半定量した MGP mRNA の発現

#### まとめ

本研究の結果、骨や軟骨に関連する疾病の予防などに有効であるといわれてきた食品成分（カルシウムやビタミン K）の細胞レベル・分子レベルの作用機構を明らかにした。

最近、ビタミンK<sub>2</sub>は骨粗鬆症に対する治療薬として用いられるようになっている。ビタミンDやカルシウムは以前から骨粗鬆症などの治療薬として用いられている。このように、食品成分が医薬品として使用され、食薬区分の点からも骨代謝疾患は興味深い。治療薬として、高濃度で作用した場合の研究は進んでいるが、食品成分として作用する濃度での、細胞レベルおよび分子レベルでの作用機構に関しては不明な点が多い。

我々は、これらのビタミン K やカルシウムなどの作用機構を解明する *in vitro* 系アッセイ系を確立した。今後さらに、詳細な解析を進めて得られた結果を、薬学、栄養学の分野でおおいに活用したい。本実験では、残念ながらメニュープランニングまでは至らなかったが、今後の研究で骨代謝・軟骨代謝疾患に適する食事の確立が望まれる。

#### 謝辞

本研究は平成 13 年度研究奨励金を用いおこなわれたことに感謝いたします。