

---

メカニカルストレスと骨芽細胞・骨芽様細胞を用いた骨形成・骨再生の総合的基礎研究：周期的伸展刺激された細胞による骨形成の *in vitro*・*in vivo* 両面からの解析

---

(課題番号：17592063)

平成17年度～平成18年度科学研究費補助金（**基盤研究（C）**）研究成果報告書

平成19年3月

研究代表者 楠 美 昭 則  
(弘前大学医学部附属病院助手)

## 目 次

- I. はしがき  
p 3
- II. 本研究結果の要約  
p 3 ~ 5
- III. 研究組織・研究経費・交付決定額・購入備品・研究発表  
p 5 ~ 6
- IV. Regulation of synthesis of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand in normal human osteoblasts via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by the application of cyclic tensile strain.  
Kusumi A, Sakaki H, Kusumi T, Oda M, Narita K, Nakagawa H, Kubota K, Satoh H, Kimura H.  
p 7
- V. Osteochondritis dissecans of the elbow: histopathologic assessment of the articular cartilage and subchondral bone with special emphasis on their damage and repair.  
Kusumi T, Ishibashi Y, Tsuda E, Kusumi A, Tanaka M, Sato F, Toh S, Kijima H.  
p 8
- VI. 高齢者骨疾患の病理  
楠美智巳、楠美昭則、佐藤冬樹、鬼島 宏  
p 9
- VII. Emerging Theories of Host Defense.  
The influence of serial passage on cyclic tensile strain-induced osteoprotegerin synthesis from normal human osteoblasts *in vitro*.  
Kusumi A, Sakaki H, Kusumi T, Nakagawa H, Kubota K, Oda M, Satoh H, Kimura H  
p 1 0

## I. は し が き

メカニカルストレスと骨形成、骨リモデリングは深く関与していることは報告されているが、そのメカニズムの解明は進んでいない。

本研究では、一軸方向周期的伸展刺激（以下、周期的伸展刺激）負荷による正常ヒト骨芽細胞の生物学的反応、骨代謝調節因子産生などシグナル伝達経路を含め検討した。特に、骨代謝調節因子産生やシグナル伝達経路関連因子の解析には、real-time RT-PCR、ウエスタンブロッティング法の他に、未知の関連遺伝子の検索のため、DNA array 法を用いて解析を進めた。

更なる発見として、正常ヒト骨芽細胞の継代による細胞の特徴の変化について見出し、継代の影響によって、骨芽細胞からの OPG や RANKL 産生の影響や、DNA array の結果から、Ras 遺伝子の深い関与についても見出した。

## II. 本 研 究 結 果 の 要 約

### 1. ヒト骨芽細胞に対する周期的伸展刺激負荷による骨代謝調節因子産生の影響及びシグナル伝達経路の解析

#### 1-1. 周期的伸展刺激による骨芽細胞内 p38MAPK 経路による OPG、sRANKL 産生関与の解析及びその他骨代謝調節因子産生の解析

申請者らは、正常ヒト骨芽細胞とその専用培地は、三光純薬から購入した。細胞伸展装置（スカラテック社、当研究室所有）を用いて、正常ヒト骨芽細胞に、1日4時間3日間、7%、0.25Hz 周期的伸展刺激負荷によって骨芽細胞内の p38MAPK 経路による OPG 産生亢進と sRANKL 産生抑制について報告した（Kusumi A. et al. J Bone Mine Metab 23. 373-381. 2005）。

つまり、静置した骨芽細胞に p38MAPK 阻害剤（SB250380）を 0.1、1、10  $\mu$ M で処理し、培養したところ、むしろ、濃度依存的に OPG 産生が抑制された。これに、伸展刺激を加えて、同様の解析を行ったところ、培養上清中の OPG と sRANKL の濃度を ELISA で測定したところ、周期的伸展刺激誘導性 OPG は SB250380 の濃度依存性に産生が抑制され、sRANKL は SB250380 の濃度依存性に産生が亢進していた。同様に骨芽細胞内の mRNA の発現について real-time RT-PCR 法で解析を行ったところ、同様の結果が得られた。

さらに、これまで周期的伸展刺激負荷により産生が亢進されるオステオポンチン（OPN）、Cox-2、一酸化窒素（Nitric oxide、NO）について、それぞれの無刺激と刺激負荷後の骨芽細胞から分離された mRNA の発現量の定量を LightCycler™（ロッシュ社、当科既設）を用いて解析し、さらに大きく変化を認められた因子については、無刺激、刺激後の骨芽細胞の培養上清を採取し、ELISA で解析したところ、OPG は、タンパク産生、mRNA 発現ともに周期的伸展刺激により亢進し、Cox-2 mRNA 発現は周期的伸展刺激により亢進し、NO 産生は、Griess 法を用いたところ周期的伸展刺激により亢進した。

#### 1-2. p38MAPK の上流域の解析

#### 1-3. OPG と sRANKL の転写因子部位の特定の解析

これらの解析は、申請当時の解析方法が進化し、DNA array 法として Sentrix™ Human-6 Expression BeadChip（モリテックス社）を用いて 48,000 転写産物解析した。MAPK や転写因子にとらわれず、多数の遺伝子発現を解析することを優先とした。その結果、正常ヒト骨芽細胞内では周期的伸展刺激負荷に関与する遺伝子は、Ras の他、TNF レセプター family、チューブリン family

などであった。この Ras 遺伝子発現が、この2年間の本研究の大きな飛躍となる。

#### 1-4. p38MAPK の下流域と骨芽細胞分化及び、骨形成に関与する転写因子の解析

骨形成に関与する核内転写因子 (NF- $\kappa$ B, Runx2/Cbfa1, Osterix, Msx, Dlx5, Smad ファミリー等については、DNA array では特に変化は認められなかった。

#### 2. 周期的伸展刺激負荷された、当大学樹立マウス骨腫瘍由来細胞株 NHOS のマウス皮下移植による異所性骨形成の影響の解析

これらの課題は、2年目で行う予定だったが、本学動物実験施設内で害虫が広範囲で発生し、駆除のため施設の閉鎖の時期が長く実験できなかった。

#### 11. 更なる発展としての周期的伸展刺激負荷による骨芽細胞と Ras 遺伝子関与

正常ヒト骨芽細胞の解析を進めるに当たり、更なる発展・発見があった。上記の報告 (1-1) は、他の従来報告といくつか違った点があった。

①RANKL 産生に違いがある。

②MAPK 活性化に違いがある。

その理由について、解析を行った (Emerging Theories of Host Defense. Hirosaki University Press. 2007. in press.)。

#### 11-1. OPG 産生の継代による影響

購入している正常ヒト骨芽細胞は5-6継代可能である。OPG 産生は、継代し続けるに従って、産生能は更新する。そこで、周期的伸展刺激負荷した骨芽細胞の第一継代と第三継代から産生される OPG は第一継代では周期的伸展刺激負荷により誘導されるが、継代を重ねるに従って逆転し、第三継代では逆に OPG 産生が抑制される。

#### 11-2. 周期的伸展刺激負荷した第一継代と第三継代正常ヒト骨芽細胞からの OPG と RANKL 産生の影響

OPG はタンパク及び RNA 発現とともに、第一継代細胞と第三継代細胞で逆転している。

RANKL については、sRANKL 産生では第一継代細胞と第三継代細胞では有意差は認められなかったが、RANKL mRNA の発現では、第一継代細胞では、周期的伸展刺激負荷により RANKL 発現が抑制されるが、第三継代細胞では、RANKL 発現が増強された。

#### 11-3. 周期的伸展刺激負荷した第一継代と第三継代正常ヒト骨芽細胞からの骨代謝調節因子産生の影響

メカニカルストレスで産生・発現が誘導されるオステオポンチン (OPN) のタンパク・mRNA、Cox-2 mRNA、一酸化窒素 (NO) 産生については、継代にかかわらず周期的伸展刺激負荷により産生・発現は誘導された。

#### 11-4. 周期的伸展刺激負荷した第一継代と第三継代正常ヒト骨芽細胞の MAPK 活性化の影響

MAPK の発現を解析した。第一継代細胞と第三継代細胞で周期的伸展刺激負荷後ウエスタンブロットティング法で解析したところ、第一継代細胞では、p38MAPK は周期的伸展刺激負荷後15分で活性化し、その後不活化した。ところが、第三継代細胞では、p38MAPK は活性化されなかった。一方、ERK1/2 の活性化は、第一継代細胞では、周期的伸展刺激負荷後でも不活化状態だが、第三継代細胞でCTS負荷後15分で強く活性化する。つまり、第一継代細胞は周期的伸展刺激負荷によって活性化しないが、第三継代細胞では周期的伸展刺激負荷により ERK1/2 が活性化することを見出した。

## 結論

申請者らは、周期的伸展刺激負荷された正常ヒト骨芽細胞では p38MAPK 活性化による OPG 産生亢進、RANKL 産生抑制を報告した。さらに細胞の継代の影響により、活性化する MAPK が変わること、骨芽細胞の産生する骨代謝因子が変わることを示してた。このことが、他の cell line の報告と申請者らの正常細胞の結果との違いと思われる。さらに、ERK1/2 の活性化は、Ras 遺伝子の関与の可能性がある。つまり申請者らが見ている現象は、継代培養を続けた細胞老化の現象を解析している可能性があり、場合によっては、個体の老化にアプローチできる可能性がある画期的な方向へ進む可能性が出てきた。

この2年の本研究は、マウスの研究については、進めることはできなかったが、ヒト骨芽細胞の解析に集中することで大きな発見があり、今後の研究に更なる飛躍が期待できるものとなった。

## Ⅲ. 研究組織・研究経費・交付決定額・購入備品・研究発表

### 研究組織

研究代表者：楠美 昭則 (弘前大学医学部附属病院助手)  
研究分担者：佐藤 寿 (弘前大学医学部附属病院助手)  
研究分担者：榊 宏剛 (弘前大学医学部附属病院助手)  
研究分担者：楠美 智巳 (弘前大学医学部講師)  
(研究協力者：織田 光夫、中川 祥、久保田 耕世)

### 交付決定額 (配分額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	2,300	0	2,300
平成18年度	1,200	0	1,200
総計	3,500	0	3,500

### 購入備品

微量高速遠心機 日立・CF-15RX 一式 購入価 573,300 円  
設置研究機関 弘前大学

### 研究発表

(1) 原著・症例報告

(2005年)

1. Kusumi A, Sakaki H, Kusumi T, Oda M, Narita K, Nakagawa H, Kubota K, Satoh, T, Kimura H. Regulation of synthesis of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand in normal human osteoblasts via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by the application of cyclic tensile strain. *Journal of Bone Mineral and Metabolism* 23:373-381.2005.
2. Sakaki H, Imaizumi T, Matsumiya T, Kusumi A, Nakagawa H, Kubota K, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, Satoh K, Kimura H. Retinoic acid-inducible gene-I is induced by interleukin-1 $\beta$  in cultured human gingival fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol.* 20:47-50.2005.
3. Kusumi T, Nishikawa S, Tanaka M, Ogawa T, Jin H, Sato F, Toh S, Hasegawa T, Kijima H. Low-grade fibromyxoid sarcoma arising in the big toe. *Pathol Int.* 55:802-806.2005.

4. Murata A, Tanaka M, Kusumi T, Kudo H. An immunohistochemical evaluation of enzymes in metaplastic Paneth cells in ulcerative colitis. *Hirosaki Med J*.57.9-16.2005.

(2006年)

5. Kusumi T, Ishibashi Y, Tsuda E, Kusumi A, Tanaka M, Sato F, Toh S, Kijima H. Osteochondritis dissecans of the elbow: histopathologic assessment of the articular cartilage and subchondral bone with special emphasis on their damage and repair. *Pathol Int* 56.604-612.2006.
6. Yoshida H, Imaizumi T, Tanji K, Sakaki H, Metoki N, Sato Y, Wakabayashi K, Kimura H, Satoh K. Interleukin-1 $\beta$  enhances the angiotensin-induced expression of plasminogen activator inhibitor-1 through angiotensin receptor upregulation in human astrocytes. *Brain Res*.16.1073-1074.2006.
7. Kubota K, Sakaki H, Imaizumi T, Nakagawa H, Kusumi A, Kobayashi W, Satoh K, Kimura H. Retinoic Acid-Inducible Gene-1 is induced in gingival fibroblasts by LPS or poly IC : possible roles in Interleukin-1 $\beta$ , -6 and -8 expression. *Oral Microbiol Immunol* 21.399-406.2006.
8. Hatakeyama M, Imaizumi T, Sakaki H, et al. IL-1 induces the expression of vascular endothelial growth factor in human pericardial mesothelial cell. *Heart Vessels*.2006.in press.
9. Hosono A, Yamaguchi U, Makimoto A, Endo M, Watanabe A, Shimoda T, Kaya M, Mitsunori T, Sonobe H, Kusumi T, Yamaguchi T, Hasegawa T. Utility of immunohistochemical analysis for cyclooxygenase-2 (COX-2) in the differential diagnosis of osteblastoma and osteosarcoma. *J Clin Pathol*.2006. in press.
10. Kondo J, Sato F, Fujimoto K, Kusumi T, Imanaka T, Kawamoto T, Uk B, Noshiro M, Kato Y, Sato T, Kijima H. 57Arg in the bHLH transcription factor DEC2 is essential for the suppression of CLOCK/BMAL2-mediated transactivation. *Int J Mol Med*.17.1053-1056.2006.

(2007年)

11. Nakagawa H, Matsumiya T, Sakaki H, Imaizumi T, Kubota K, Kusumi A, Kobayashi W, Kimura H. Expression of vascular endothelial growth factor by photodynamic therapy with mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) in an oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 24. 2007. in press.
12. Kusumi A, Sakaki H, Kusumi T, Nakagawa H, Kubota K, Oda M, Satoh H, Hiroto Kimura H. The effects of serial passage on cyclic tensile strain-induced osteoprotegerin synthesis from normal human osteoblasts. *J Bone Mine Res*. 2007. in preparation.

(2) 総説

(2006年)

13. 楠美智巳、楠美昭則、佐藤冬樹、鬼島 宏、高齢者骨疾患の病理. *日本臨床* 64. 1578-1582. 2006.

(3) 書籍

(2007年)

14. Nakane A et al eds. *Emerging Theories of Host Defense*. Hirosaki University Press. 2007. in press.

IV.

Regulation of synthesis of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand in normal human osteoblasts via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by the application of cyclic tensile strain

AKINORI KUSUMI<sup>1</sup>, HIROTAKA SAKAKI<sup>1</sup>, TOMOMI KUSUMI<sup>2</sup>, MITSUO ODA<sup>1</sup>,  
KENJI NARITA<sup>1</sup>, HIROSHI NAKAGAWA<sup>1</sup>, KOHSEI KUBOTA<sup>1</sup>, HISASHI SATOH<sup>1</sup>,  
and HIROTO KIMURA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Dentistry and Oral Surgery, National University Corporation, Hirosaki University School of Medicine, Hirosaki, Japan

<sup>2</sup>Second Department of Pathology, National University Corporation, Hirosaki University School of Medicine, Hirosaki, Japan

J Bone Mine Metab. 23.373-381.2005.

V.

Osteochondritis dissecans of the elbow: histopathologic assessment of the articular cartilage and subchondral bone with special emphasis on their damage and repair.

Kusumi T<sup>1</sup>, Ishibashi Y<sup>2</sup>, Tsuda E<sup>2</sup>, Kusumi A<sup>3</sup>, Tanaka M<sup>4</sup>, Sato F<sup>1</sup>, Toh S<sup>2</sup>, Kijima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Second Department of Pathology, Hirosaki University School of Medicine

<sup>2</sup>Department of Orthopedic Surgery, Hirosaki University School of Medicine

<sup>3</sup>Department of Dentistry and Oral Surgery, Hirosaki University School of Medicine

<sup>4</sup>Department of Pathology and Laboratory Medicine, Hirosaki Municipal Hospital

Pathol Int 56.604-612.2006.



VI.

高齢者骨疾患の病理

楠美智巳<sup>1</sup>、楠美昭則<sup>2</sup>、佐藤冬樹<sup>1</sup>、鬼島 宏<sup>1</sup>

<sup>1</sup>弘前大学医学部病理第二講座

<sup>2</sup>弘前大学医学部歯科口腔外科学講座

日本臨床 64. 1578-1582. 2006.

VII.

Emerging Theories of Host Defense.

Nakane A et al eds.

Hirosaki University Press. 2007. in press.