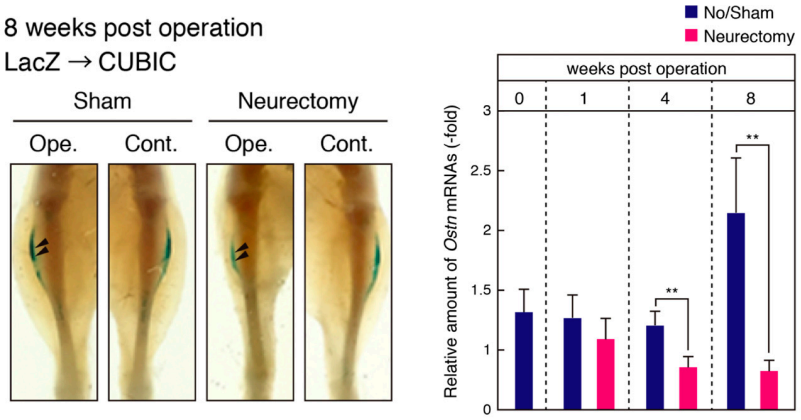
143　骨膜分泌性因子Osteocrinによる新規骨伸長機構の解明	高野　晴子

【目的】長管骨の成長は、軟骨細胞依存の長軸成長と骨芽細胞依存の短軸成長により達成される。長軸成長は、成長板における軟骨細胞の増殖、肥大軟骨細胞への分化とそれに続く骨への置換という一連の流れから構成される、いわゆる「軟骨内骨化」により行われる。一方で、短軸成長は骨芽細胞が石灰化を引き起こす「膜性骨化」が骨膜上で行われる。骨成長時には、軟骨内骨化による骨の伸長と、これを支えるための骨径の増加が同時に起こるので、強度が維持されると考えられる。したがって、骨成長に伴った「長軸ー短軸成長のカップリング機構」が存在すると考えられるが、不明である。私たちが着目している Osteocrin（OSTN）はナトリウム利尿ペプチド（NP ファミリー：ANP、BNP、CNP）様配列を含むが環状構造をとらないので、ANP や BNP 受容体（GC-A，GC-B）とは結合しない。しかし、NP のクリアランス受容体（NPR3）には結合するために OSTN は NP の分解を阻害することで、生理作用を発揮すると考えられる。内因性 OSTN の生理機能について OSTN-KO マウスを用いて解析したところ、OSTN は骨の長軸ー短軸成長を促進することが明らかになった。さらに OSTN 遺伝子座に LacZ をノックインして、全身性に発現解析を行うと、OSTN は脛骨の内側面に高発現しており、伸展刺激のかかる部位と一致していることがわかった。そこで、本研究では内因性 OSTN が如何に発現制御されるかについて、荷重刺激に着目して解析する。

【方法】OSTN の発現が荷重によって制御される可能性を、マウス個体と骨膜細胞を用いた *in vitro* のアッセイにより検討した。荷重免除モデルとしては、大腿坐骨神経切除を採用した。また、機械刺激非依存的な骨量低下モデルとして卵巣摘出モデルを適用した。発現部位のモニターには OSTN の遺伝子座に LacZ をノックインしたマウスを使用して LacZ の活性染色により検討した。発現量の定量は qPCR により検討した。

【結果】脛骨にかかる荷重を免除するために、マウスの片脚に大腿・坐骨神経切除手術を施し、OSTN の発現量を qPCR によって検討した結果、OSTN の発現部位には顕著な変化を認めなかったが、OSTN の発現レベルの低下を認めた。さらに OSTN 量を qPCR により定量化した結果、OSTN の発現量は術後、4 週から対照群の約半分程度にまで有意に低下した。一方で、卵巣摘出により骨量低下を引き起こしても、OSTN の発現量は低下しないことから、OSTN の発現は骨量には依存せず、荷重刺激が必要であることが明らかになった。

OSTN の発現は機械ストレスにより制御される



143. 骨膜分泌性因子 Osteocrin による新規骨伸長機構の解明

高野　晴子

国立循環器病研究センター研究所　細胞生物学部

Key words：骨形成，軟骨内骨化，膜性骨化，ナトリウム利尿ペプチド

緒　言

長管骨の成長は、軟骨細胞依存の長軸成長と骨芽細胞依存の短軸成長により達成される。長軸成長は、成長板における軟骨細胞の増殖、肥大軟骨細胞への分化とそれに続く骨への置換という一連の流れから構成される、いわゆる「軟骨内骨化」により行われる。一方で、短軸成長は骨芽細胞が石灰化を引き起こす「膜性骨化」が骨膜上で行われる。骨成長時には、軟骨内骨化による骨の伸長と、これを支えるための骨径の増加が同時に起こるので、強度が維持されると考えられる［1］。したがって、骨成長に伴った「長軸－短軸成長のカップリング機構」が存在すると考えられるが、不明である。私たちが着目している Osteocrin（OSTN）はナトリウム利尿ペプチド（NP ファミリー：ANP、BNP、CNP）様配列を含むが環状構造をとらないので、ANP や BNP 受容体（GC-A，GC-B）とは結合しない。しかし、NP のクリアランス受容体（NPR3）には結合するために OSTN は NP の分解を阻害することで、生理作用を発揮すると考えられる。私たちのグループは、これまでに OSTN を肝臓にて過剰に発現する Tg マウスや OSTN 合成ペプチドを用いて、骨の伸長および血圧降下などの生理活性を明らかにした［2～4］。また、内因性 OSTN の生理機能について、OSTN-KO マウスを用いて解析したところ、OSTN は骨の長軸－短軸成長を、促進することが明らかになった。OSTN の発現部位を LacZ をノックインして全身性に解析すると、OSTN は一部の遠位骨に発現していることがわかった。脛骨においては、内側面にほぼ特異的に高発現しており、荷重負荷によって伸展刺激がかかる部位と一致していることがわかった。そこで本研究では、内因性 OSTN が如何に発現制御されるかについて、荷重負荷に着目して検討した。

方　法

1. 骨膜細胞の採取と培養

8 週齢の雄マウスから脛骨を採取し、筋肉を剥離した。3 mg/ml Collagenase、4 mg/ml Dispase、1XGlutamax を含む a-MEM 培地に入れ、37℃で 10 分間インキュベートした。その上清を捨て、さらに同じ培地中で 37℃で 60 分間インキュベートした。Vortex で数秒混合し、10% FBS、1XGlutamax を含む a-MEM 培地を加え、100 μm のメッシュを通し、1,500 rpm で 5 分間室温にて遠心し、細胞を回収した。脛骨 2 本分につき、100 mm ディッシュ 1 枚に播種し、37℃、5% CO_2 存在下で 4 日間培養、さらに 100 mm ディッシュ 3 枚に継代した。その後、ゲル上に播種し、48 時間後に RNA を回収した。

2. 大腿・坐骨神経切除、卵巣摘出術

8 週齢の野生型、あるいは HT マウスの雄マウスの右脚大腿神経および坐骨神経を再接合しないよう 5 mm 以上麻酔下にて切除した。切除手術を施した後、一定期間飼育し、両脚から脛骨を採取した。卵巣摘出については、麻酔下にて 8 週齢の野生型あるいは HT 雌マウスの背側皮膚を切開し、両側の子宮を一部結束して卵巣を摘出、その後、縫合した。

3. 脛骨からの RNA の採取と qPCR

神経切除あるいは卵巣摘出手術を施した後に脛骨を採取し、TRIZOL 中にてポリトロンホモジナイザーを使用して、破砕した。メーカー推奨の方法に従い TRIZOL を用いて RNA を採取した。さらに抽出した RNA は RNeasy mini kit（QIAGEN）にて精製した。精製した RNA は超微量分光光度計にて測定し、2 μg の RNA を使用して cDNA を作製した。cDNA の合成には SuperscriptIII（Invitrogen）を用いて、メーカー推奨の方法に従った。qPCR は KOD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)を使用し、Eppendorf Mastercycler ep realplex を用いて解析した。

結果および考察

1. OSTN の発現は機械ストレスにより制御される

脛骨における OSTN の発現部位が伸展刺激のかかる部位と一致していたことから、機械ストレスが OSTN の発現制御に関わる可能性を検討した。脛骨に負荷される荷重を免除するために、マウスの片脚に大腿・坐骨神経切除手術を施して、OSTN の発現量を qPCR によって検討した。CT による解析から、術後 8 週には顕著な海綿骨量の低下が認められた（図 1A，B）。荷重免除下における OSTN の発現部位を明らかにするために、OSTN-HT マウスに同様の大腿・坐骨神経切除手術を施して、LacZ の活性染色を行った。手術後 8 週にて OSTN の発現低下が認められたが、OSTN の発現部位には顕著な変化を認めなかった（図 1C）。そこで OSTN の発現低下をさらに明らかにするために、大腿・坐骨神経切除手術を施して、手術後 1、4、8 週で脛骨から継時的に RNA を採取して、OSTN 量を qPCR により定量化した。その結果、OSTN の発現量は手術後、4 週から未手術の脚に比較して、約半分程度にまで有意に低下した（図 1D）。下腿部の筋萎縮は顕著に見られるが、OSTN の発現も術後 4 週から有意な低下が認められた。従って、OSTN の発現維持には荷重刺激が必要であることが推測された。

2. OSTN の発現低下は骨量低下に依存しない

しかし、内因性 OSTN は Osterix や Runx2 陽性の骨芽細胞に発現していることから、骨芽細胞数の減少が OSTN の発現低下をもたらした可能性が考えられる。そこで、機械刺激に依存しない骨量低下モデルとして、卵巣摘出術を採用し、OSTN の発現変化を解析した。CT を用いて解析すると、卵巣摘出後 8 週で明らかな骨塩量の低下が認められたが、OSTN の発現は低下せず、むしろ増加する結果となった（図 2A，B）。この時の OSTN の発現部位に変化は認められなかった。以上のことから、OSTN の発現低下の原因が単純に骨量の低下ではなく、機械刺激そのものである可能性が強くなった。一方、OSTN の発現量は卵巣摘出により増加したことから、卵巣摘出により誘導される骨リモデリングの活性化と関係があると考えられた。エストロゲンは破骨細胞のアポトーシスを促進するので、卵巣摘出により骨吸収が促進するが、これに伴って骨形成も促進される。したがって、卵巣摘出時には骨吸収-骨形成のサイクルが速い状態と考えられ、OSTN は骨代謝が促進されると発現が上昇すると考えられるが、今後、さらなる検討が必要である。

3. OSTN 発現制御機構の探索

OSTN の発現制御機構を分子レベルで明らかにするために、骨膜細胞の *in vitro* 培養系を確立して、人工的な機械刺激モデルを適用した。これまで、骨膜にかかる機械刺激の詳細は明らかではないが、OSTN の発現部位が、重力により伸展刺激のかかる部位と一致するために、伸展刺激に着目した［5］。そこで、ハイドロゲル培養を共同研究者の先生に作成して頂き、様々な硬さのゲル上で骨膜細胞を培養し、qPCR により OSTN の発現変化を検討した。OSTN の発現は中程度のゲル（13.8 kPa）上で最大で、その後は硬いゲル（30.1 kPa）、柔らかいゲル（7.5 kPa）上ではほとんど発現を認めなかった。しかし、骨膜細胞の初代培養細胞系が不安定であったために、再現性に乏しく、今後さらに安定した実験系を用いて解析していく予定である。

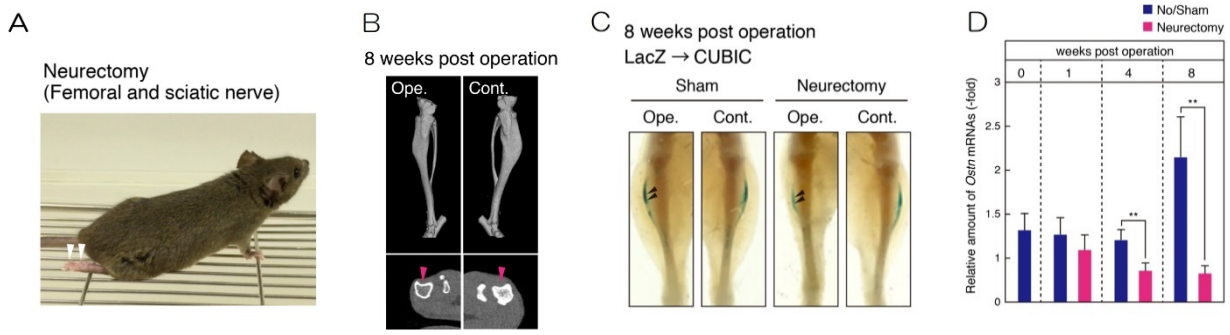


図 1. OSTN の発現は機械ストレスにより制御される

（A）大腿坐骨神経切除後のマウスの脚を示す。片脚にのみ手術を施している。足底が上を向いていることが確認できる。（B）神経切除後 8 週の脛骨の CT 像を示す。海綿骨が顕著に減少している。（C）神経切除後 8 週の脛骨における OSTN の染色像を示す。発現パターンは変化していないが、発現レベルは減少している。（D）神経切除後の OSTN の発現量を示す。4 週から発現低下していることがわかる。検定は student t-test により行った。** $P < 0.01$。

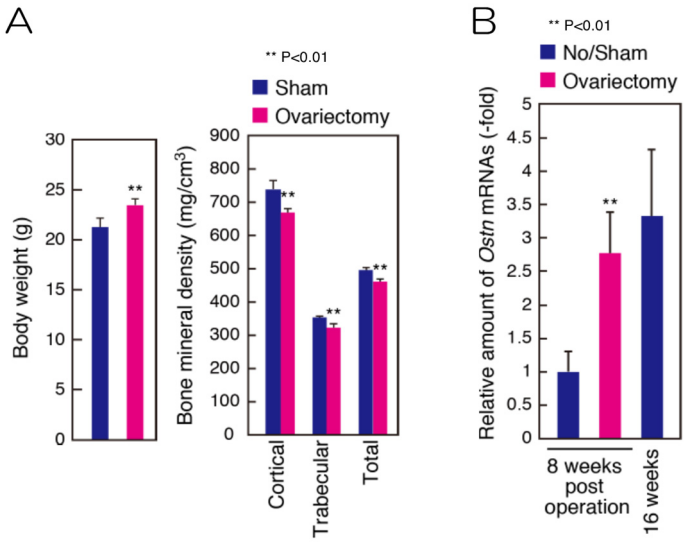


図 2. OSTN の発現低下は骨量低下に依存しない

(A) 卵巣摘出後のマウスの体重と骨塩量を示す。卵巣摘出によって体重増加と骨塩量の有意な低下が認められる。

(B) 16 週齢マウスに卵巣摘出を行い、8 週間後の OSTN の発現量を示す。検定は student t-test により行った。** P < 0.01。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行にあたり、骨膜細胞培養用のアクリルアミドゲルを提供して下さった、名戸ヶ谷病院名戸ヶ谷研究所原田伊知郎先生に深く感謝を申し上げます。また実験遂行にあたり、国立循環器病研究センター研究所細胞生物学部、望月直樹部長をはじめ、研究室の多くの皆様方にご協力頂きました。

文　献

1) Rauch F. Bone growth in length and width: the Yin and Yang of bone stability. J. Musculoskelet. Neuronal. Interact. 2005 Jul-Sep, 5(3), 194-201. PMID:16172510.

2) Miyazaki T, Otani K, Chiba A, Nishimura H, Tokudome T, Takano-Watanabe H, Matsuo A, Ishikawa H, Shimamoto K, Fukui H, Kanai Y, Yasoda A, Ogata S, Nishimura K, Minamino N, Mochizuki N. A New Secretory Peptide of Natriuretic Peptide Family, Osteocrin, Suppresses the Progression of Congestive Heart Failure After Myocardial Infarction. Circ Res. 2018 Mar 2;122(5):742-751. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.312624. Epub 2018 Jan 11.

3) Kanai Y, Yasoda A, Mori KP, Watanabe-Takano H, Nagai-Okatani C, Yamashita Y, Hirota K, Ueda Y, Yamauchi I, Kondo E, Yamanaka S, Sakane Y, Nakao K, Fujii T, Yokoi H, Minamino N, Mukoyama M, Mochizuki N, Inagaki N. Circulating osteocrin stimulates bone growth by limiting C-type natriuretic peptide clearance. J Clin Invest. 2017 Nov 1;127(11):4136-4147. doi: 10.1172/JCI94912. Epub 2017 Oct 9.

4) Chiba A, Watanabe-Takano H, Terai K, Fukui H, Miyazaki T, Uemura M, Hashimoto H, Hibi M, Fukuhara S, Mochizuki N. A New Secretory Peptide of Natriuretic Peptide Family, Osteocrin, Suppresses the Progression of Congestive Heart Failure After Myocardial Infarction.Development. 2017 Jan 15;144(2):334-344. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.312624. Epub 2018 Jan 11.

5) Sugiyama T1, Meakin LB, Browne WJ, Galea GL, Price JS, Lanyon LE.Bones' adaptive response to mechanical loading is essentially linear between the low strains associated with disuse and the high strains associated with the lamellar/woven bone transition. J Bone Miner Res. 2012 Aug;27(8):1784-93. doi: 10.1002/jbmr.1599.