

— 総説 —

メカニカルストレスにより誘導される骨芽細胞の分化と骨形成

川 島 博 行

新潟大学歯学部歯科薬理学講座／教授

Mechanical stress-induced osteoblast differentiation and osteogenesis

Hiroyuki Kawashima

Department of Dental Pharmacology
Faculty of Dentistry Niigata University

平成12年11月6日受付 11月6日受理

キーワード：メカニカルストレス，骨芽細胞分化，骨形成，遺伝子発現，BMP-4

1. はじめに

生物は地上にある限り，1Gという重力に曝されている。この重力が効果を最大に発揮するのは，地上で生物が行動する場合であり，水中では約1/6程度に減少する。また，睡眠や休息状態にあるときは，さらに重力の効果は減少し，寝たきり状態やギブスによる固定など，いわゆる，不動化状態が続く場合には，筋肉や骨格など運動にかかわる組織の主要部分に対する重力の効果は実質的にゼロに近くなる。すなわち，無重力に近い状況が作り出されていることになる。このような状態では，筋肉・骨ともに萎縮するが，このことは，volunteerを用いてbed restの状態を強制的に続ける実験によっても確認されている¹⁾。宇宙飛行士の骨量が宇宙滞在中に減少し，帰還一定期間後にはほぼ回復することもよく知られている^{2,3)}。骨量は，骨吸収（骨破壊）と骨形成のバランスにより維持されているが，メカニカルストレスの減少による骨萎縮（骨量減少）の原因は主として骨形成の抑制であることが明らかにされている^{4,5)}。一方，地上においても，メカニカルストレスを負荷すると骨量が増加することが良く知られており^{6,8)}，この場合にも骨形成が刺激されることが確認されている。このように，メカニカルストレスの持続的負荷が一定期間内に繰り返されることが，骨の構造と機能の維持に必要であるが，このメカニズムを説明する仮説としてメカノスタット説（mechanostat theory）⁹⁾なるものが提出されている。これを詳しく述べる余裕はないが，要は，生理的なメカニカルストレスの幅（physiological window）というものがあり，この範囲より低いメカニカルストレスに曝される場合には骨形成が相対的に減少してメカニカルストレスに見合ったところで定常状態に達し，逆に，より高いメカニカルスト

レスに曝された場合には骨形成が増加して高い骨量レベルで定常状態に達する，というふうにメカニカルストレスによる歪みを感じるセンサーが骨に存在するというのである。骨吸収と骨形成はカップルしているので新しい平衡状態に移行し得るわけである。この場合どちらの方向に移行するにもある閾値を越えることが必要である¹⁰⁾。たとえば，運動によって骨形成を刺激するには，一定以上の運動負荷をかけないと無効である，という具合である。メカニカルストレスによる骨形成の刺激は，骨芽細胞の分化および活性化をとともなうが，その機構については不明である。本稿では，メカニカルストレスの受容とその伝達について概観し，その後我々のデータを中心に骨芽細胞分化のメカニズムについて述べてみたい。

2. メカニカルストレスに対する細胞の応答

メカニカルストレスに応答する組織は運動骨格系に限らず生体内に広く分布し，循環器系とくに血管や内皮細胞については多くの研究がある。これらの細胞がメカニカルストレスに応答する機序には普遍性があると考えられるが，どの組織についてもその詳細は想像の域を出ない。表-1はメカニカルストレスの受容から効果が発揮されるまでの過程を大きく3段階に分けて示したものである。その第一はメカニカルストレスの受容である。

表-1 メカニカルストレスの受容とその細胞機能への変換

- | |
|---------------------------------|
| (1) メカニカルストレスの受容： |
| ①細胞外基質-インテグリン-細胞骨格系の変化 |
| ②細胞膜イオンチャネルの開閉 |
| (2) 細胞内シグナルへの変換：シグナル伝達分子（表-2参照） |
| (3) 骨形成細胞へのシグナル伝達 |
| ①骨細胞→骨芽細胞活性化／骨芽細胞のリクルート |
| ②骨芽細胞→自身の活性化／新たな骨芽細胞のリクルート |

2-1. メカニカルストレスの受容機構

メカニカルストレスという物理的刺激を受容するためには、細胞はstrain (ひずみの応力) あるいはshear stress (ずり応力), 音波 (聴覚の場合) 等を感じなければならない。刺激が感知されるためには、細胞自身が感知機構を備えていなければならない。その感知機構を構成するものは細胞の構造であり、構造を維持するのに必要な細胞骨格とこれに密接に相互作用をしている分子であるはずである。実際、細胞は浮遊状態では球形であるが、細胞外基質に結合すると構造が変化する。これは細胞自体が内力を持っているからである。その内力を生み出すのは細胞骨格であり、tensegrityという概念でも説明されている^{11,12)}。細胞の基本骨格を作るactin分子はvinculinやtalin, tensin, α -actinin等の分子を介してintegrinと結合するが¹³⁾、細胞自身の内力により細胞外基質に応力を加えることになる。従って細胞外基質と結合した細胞にメカニカルストレスを感じさせるためには、この応力に抗する力、すなわち、細胞骨格の変化あるいは細胞の変位を惹起するような刺激でなければならない。そのような刺激に対応して細胞膜表面の変化あるいは細胞骨格の変化が最初に起こると考えられる。実際、このような刺激に対しては、アクチン分子の再重合や配列変化が起こることが知られている^{14,15)}。細胞の接着状態により骨芽細胞の分化や活性化状態に違いが生じることも良く知られている¹⁴⁾。一方、細胞膜の変形や電位変化が膜のチャネルの開閉に影響を与え、これがメカニカルストレスの受容機構として作用する可能性もある¹⁶⁾。

2-2. 受容された刺激の化学的シグナルへの変換

受容されたメカニカルストレスが細胞の機能に影響を与えるためには、それが化学的なシグナルに変換されなければならない。この過程にかかわるのが、いわゆるシグナル伝達分子である。メカニカルストレス負荷により骨芽細胞において発現量の変化する分子について表-2にまとめた。これを見ると、メカニカルストレスによって変動するシグナル伝達分子あるいはサイトカインは、いわゆるホルモンやサイトカインに応答する分子と基本的に同じであることが明らかである。

表-2 メカニカルストレスにより骨芽細胞で変動するシグナル伝達分子

In vivo 実験	培養細胞	器官培養
c-fos ^{54,55)} , IGF-I ^{55,56)} , TGF β ⁵⁵⁾ , NO ^{20,21)} , iNOS ^{20,21)} , PGE ₂ ²⁴⁾ , GLAST ⁵⁷⁾	c-AMP ^{27,28)} , c-fos ⁵⁸⁾ , egr-1 ⁵⁹⁾ , NO ^{47, 60)} , iNOS ⁶¹⁾ , PGE ₂ ^{47, 62)} , PGI ₂ ^{62, 63)} , PGF _{2a} ⁶²⁾ , COX-2 ⁶²⁾ , Ca ²⁺ ^{25, 26)} , IP ₃ ^{27, 64)} , SA channel ⁶⁵⁾ , PKC ⁶⁴⁾ , PLA ₂ ²⁸⁾ , PLC γ ⁶⁴⁾ , TGF β ⁶³⁾ , PDGF ⁶⁶⁾ , IGF-II ⁶³⁾ , osteopontin ^{59, 67)}	PGE ₂ ⁶⁸⁾ ,

変動する分子の種類は、負荷するメカニカルストレスの種類により異なるが、*in vivo*の実験と*in vitro*の実験ではほぼ対応する結果が得られている。これらの変化がメカニカルストレス負荷後比較的短時間 (数分から数時間以内) で起こるのに対し、*in vivo*において骨芽細胞が分化し細胞外マトリックスを分泌するのは3日~5日後である¹⁷⁻¹⁹⁾。従って、これらの分子はメカニカルストレスの受容後のシグナル伝達にかかわっていると考えられている。NOがメカニカルストレスの骨形成作用に密接にかかわっていることは、NO合成阻害剤を用いた実験で明らかにされている^{20,21)}。一方、iNOSノックアウトマウスでは骨の異常は認められないが²²⁾、eNOSノックアウトマウスでは10%に四肢の末端欠損が認められており²³⁾、これらのマウスにおけるメカニカルストレスの骨形成作用の有無が興味深い。また、メカニカルストレス負荷による*in vivo*の骨形成がインドメタシンにより大幅に抑制される²⁴⁾ことから、プロスタグランジンの関与するシグナル伝達系の役割も否定できない。プロスタグランジンの増加はPLAの活性化の結果であり、PLAの活性化はやはり細胞骨格の変化によりもたらされる。培養細胞を用いた検討では、骨芽細胞に伸展刺激を与えると細胞内カルシウムの著明な上昇が認められる^{25,26)}。このカルシウムの上昇は、SA channelを介した細胞外のカルシウム流入やPLCの活性化により産生されたIP₃が小胞体からのカルシウム放出を活性化する機序が考えられる。前者は細胞膜の変位あるいは電位変化に続いて起こる現象としてとらえることができるし、後者は細胞骨格の変化の結果と考えることができる。また、cAMPの増加がどのように骨形成にかかわるかは不明であるが、メカニカルストレスの負荷により細胞内のcAMPが上昇することが知られており^{27,28)}、また、細胞骨格が破壊されるとcAMPが増加することが知られている^{29,30)}。骨芽細胞においてIGF-IIを増加させる因子としては、従来BMP-2³¹⁾やBMP-7³²⁾が知られていたが、IGF-IIもメカニカルストレスのシグナル伝達にかかわっている可能性が高い³³⁾。一方IGF-Iは、骨芽細胞では誘導されないが、骨細胞ではメカニカルストレス負荷後数時間で誘導される³⁴⁾。この場合、骨表面における細胞外基質の分泌は48時間後に起こるので³⁴⁾、骨細胞で産生されたIGF-Iが何らかの機序で骨芽細胞を刺激した可能性は十分考えられる。しかし、メカニカルストレスに対するこれらの反応は、その殆どが他の組織においても共通に認められる現象であり、決して骨芽細胞に特異的なシグナルではない。従ってこれらは、メカニカルストレスを受容しその信号をシグナル伝達に変換する共通のメカニズムを示していると考えられるべきであろう。

2-3. シグナルから効果への変換

さて細胞内シグナル伝達系に伝わった情報が効果として現れるためには、情報が細胞の機能へと変換されなければならない。骨の場合には骨形成の刺激である。この場合、①メカニカルストレスを受容した受容細胞自身が骨形成に直接かかわるのか、あるいは、②その情報をそのまま伝える、もしくは、転写等により別なシグナルに変換して伝える、ことで骨形成に直接かかわる細胞を活性化し、その結果骨形成が刺激されるのか、という二つの可能性が考えられる。前者は骨芽細胞自身がメカニカルストレスを受容する場合であり、後者は骨細胞が受容する場合である。骨細胞および骨芽細胞の休止型細胞とされるbone lining cellを併せると骨形成系細胞の95%を占めること³⁵⁾、ネットワークを形成する骨細胞がfluid flowによるshear stressを検知するのに適していること³⁶⁾、などの理由から一般的に、メカニカルストレスを受容するのは骨細胞であると信じられているが、メカニカルストレス負荷後、どちらの細胞にも同じようなシグナル分子の変化が起こることが知られており、骨芽細胞自身が受容細胞として働く可能性も十分にある。また、ヒトの骨においては骨表面を覆っている骨芽細胞はわずか5%であり94%はbone lining cell、1%は破骨細胞に覆われている³⁵⁾。従って仮に骨細胞がメカニカルストレスを受容し、シグナルを伝達したとしてもその後の骨形成を説明するためにはさらに多くの骨芽細胞がリクルートされなければならない。その機構のひとつとして、bone lining cellの活性化が報告されているが³⁷⁾、間葉系細胞からの分化も十分に考えられる。

2-5. メカニカルストレスの骨形成作用を左右する生理的条件

内分泌機能その他正常の生理的条件が維持されている限り、メカニカルストレスはもっとも強力な骨形成因子であり得るが、生理的異常があればその効果は減少あるいは消失する。メカニカルストレスの骨形成作用が加齢とともに減少する^{38,39)}のは、その例のひとつである。二つ目の例はエストロジェンである。エストロジェン欠乏によって起こる骨量減少と不動化によって惹起される骨量減少とが、時間経過や形態学的変化についてよく似ていること⁴⁰⁾から、エストロジェンのレベルやエストロジェン受容体の機能がメカニカルストレスの骨形成作用に影響する可能性が提唱されている⁹⁾。実際Chambersのグループは、ラットの尾椎骨に圧迫刺激を加えるin vivoモデルにおいて、骨形成がまだ進行しないうちにエストロジェンを投与するとメカニカルストレスの骨形成作用は抑制されるが、骨形成が進行中にエストロジェンを投与した場合には骨形成が亢進することを

報告している⁴¹⁾。三つ目の例はPTH (副甲状腺ホルモン) である。メカニカルストレスの骨形成作用にかかわるPTHの効果に関する報告はないが、不動化による骨量減少が副甲状腺摘除によって抑制されることが報告されている⁴²⁾。骨細胞やbone lining cellに及ぼすメカニカルストレスおよびPTHの効果の類似性⁴³⁾、また、骨芽細胞のmechanosensitive channelの活性化とそのkineticsにおよぼす両者の類似性なども報告されている^{44,45)}。

これらは非常に興味深い問題であるが、いずれも今後に残された課題である。

3. メカニカルストレスの骨形成作用に関する従来の研究

メカニカルストレスの骨形成作用にかかわる研究は、動物個体を用いる研究、培養細胞を用いる研究、および、器官培養を用いる研究に分けられる (表-3)。個体を用いる研究では、ヒトを含めて、静水圧では骨形成は刺激されず、反復刺激が必要であることが確認されている。しかしながら、モデル実験においては、静水圧を加える方法も含めてどの方法によっても骨形成が促進される、あるいは、骨芽細胞の活性が増加する方向にパラメーターが変化することが知られている。ただ、詳細に比較すると、メカニカルストレスの種類により変化するシグナル分子が異なるようである。たとえば、骨芽細胞によるosteopontin⁴⁶⁾ やNO⁴⁷⁾、PGE₂⁴⁷⁾ の産生に関しては、fluid flowのようなshear stressの方が歪みの応力に比べて、変化が大きい、という報告がある。通常の運動時において、shear stressが重要であるのか、あるいは、変形をとともなう応力が重要であるのか、は不明である。どちらの応力が主に働くにしても、細胞がこれを感じるために

表-3 メカニカルストレスの骨形成作用に関する研究法

(1) in vivo
① Stainless steel pinを骨に挿入しこれに周期的な圧迫刺激を加える方法
(i) 七面鳥の前肢に刺激を加える方法 ³⁶⁾
(ii) ラットの尾椎に刺激を加える方法 ⁶⁹⁾
② Strain gaugeを用いて非侵襲的に圧迫刺激を加える方法 ⁶⁹⁾
③ 4点曲げによりたわみ刺激を加える方法 ⁵⁵⁾
(2) in vitro
① 細胞培養
(i) 静水圧を加える方法 ⁷⁰⁾
(ii) Fluid flow (shear stress) を加える方法 ^{15,46,59,60)}
(iii) 培養基質を伸縮させる方法 ^{27,71)}
(iv) 細胞を直接刺激する方法 ^{55,66)}
② 器官培養
(i) 静水圧を加える方法 ⁶⁸⁾
(ii) 伸展刺激を加える方法 ^{49,72)}

は、細胞の表面や骨格を構成する分子が変形に曝されなければならないはずであり、その場合には、上で述べたように、セカンドメッセンジャーの変化をともなう複数の機構によりメカニカルストレスのシグナルが相互作用しながら伝達される可能性が高い¹⁵⁾。その意味では、細胞自身はどちらの応力についても応答可能であり、従って、メカニカルストレスの負荷方法にはそれほどこだわる必要はないかも知れない。それよりも、それぞれの実験系の特徴を生かしてその過程を詳細に調べ、それぞれの結果を総合して*in vivo*における現象を解析する努力をすべきではなからうか？いずれのシグナル伝達経路も骨形成にいたる途中のある特定の過程以降では共通のものになると考えられる。この過程つまり骨形成に特異的な過程を特定することが、医療への応用面から考えると最も重要である。また、従来の研究においては、*in vitro*において骨芽細胞を活性化するために必要な歪み応力は、*in vivo*のそれに比してきわめて高く、非生理的であるという指摘があった⁴⁸⁾。しかし、生理的範囲の歪み応力を負荷した最近の研究においても骨芽細胞の増殖や分化が確認されている。*In vivo*の実験系に比べて、培養細胞を用いる実験系の最大の問題点は、骨芽細胞あるいは骨細胞いずれを用いる場合でも、骨芽細胞へと分化する細胞が存在しないということである。このことを解決するために我々は、器官培養系を選んだ。

4. マウス頭蓋冠縫合部を用いた研究

器官培養系は表に示したように静水圧をかける方法と伸展刺激をかける方法とがある。前者には、特別な装置が必要である、また、骨形成が刺激されるまでに時間を要する、などの難点があるので、われわれは後者を採用した。このモデルの利点として、48時間以内に石灰化も含めた骨形成を観察することができる、間葉系の多くの細胞も含んでおり骨芽細胞の前駆細胞を決めるのに適している、個体レベルの研究に比べて全身性に作用する物質の関与を除くことができる、顕微鏡による観察が容易なので細胞の形態変化と遺伝子発現の変化とを対応させて細胞分化を観察できる、内軟骨性骨化を含まず膜性骨化のみを見ることができる単純な系である、などが挙げられる。この実験系を用いて我々はこれまでに以下のことを明らかにした。

4-1. 張力負荷による骨芽細胞の分化と骨形成

生後4日令のマウス頭蓋冠縫合部を無菌的に切り出し、歯科矯正用のワイヤーを用いて作成したバネにより張力を連続的に負荷しながら培養した。対照群においてはバネの長さを糸で固定することにより張力をゼロにした(図-1)。張力負荷により頭蓋冠縫合部の細胞

は張力負荷方向に扁平化するとともに細胞数が次第に増加し、縫合部は時間の経過とともに伸張した⁴⁹⁾。伸長とともに、アルカリフォスファターゼ(ALP)陽性の細胞層も縫合部中心に向かって伸び出したが、6時間後においては、これらの細胞はオステオカルシン(OCN)やオステオポンチン(OPN)陰性であることから、前骨芽細胞と考えられた。24時間後には、類骨(osteoid)の形成も認められるようになり、このような一連の変化は縫合部中心に向けて継続的に進行し、48時間後には新しく形成された類骨の一部は石灰化した(図-2)⁴⁹⁾。新しく石灰化した類骨の表面の細胞はALP陽性でOPNやOCNを発現しており、成熟した骨芽細胞と考えられた。72時間後にはこのような変化はさらに顕著になった。石灰化が進行中の部位ではマトリックス小胞が出現し、*in vivo*で認められるものと同様の変化が起こっていることが電顕的に観察された(未発表データ)。従って、本実験モデルにおいては、*in vivo*で通常観察されるものと同様の骨形成が極めて短時間に再現されていると考えられた。

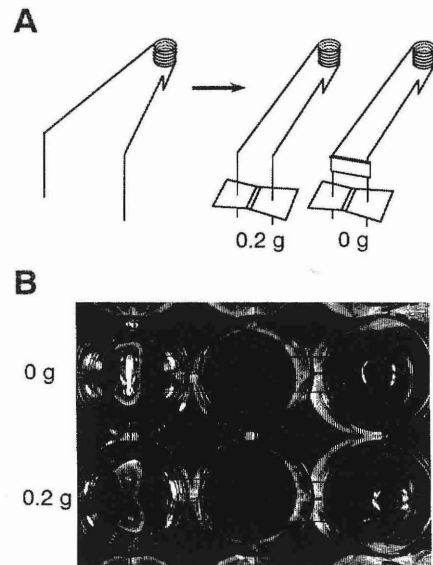


図-1 マウス頭蓋冠縫合部培養系

- A: 歯科矯正用ワイヤーで作成したバネ、および、縫合部への装着の模式図
B: 24穴プレートに装着した状態を上から撮影したもの

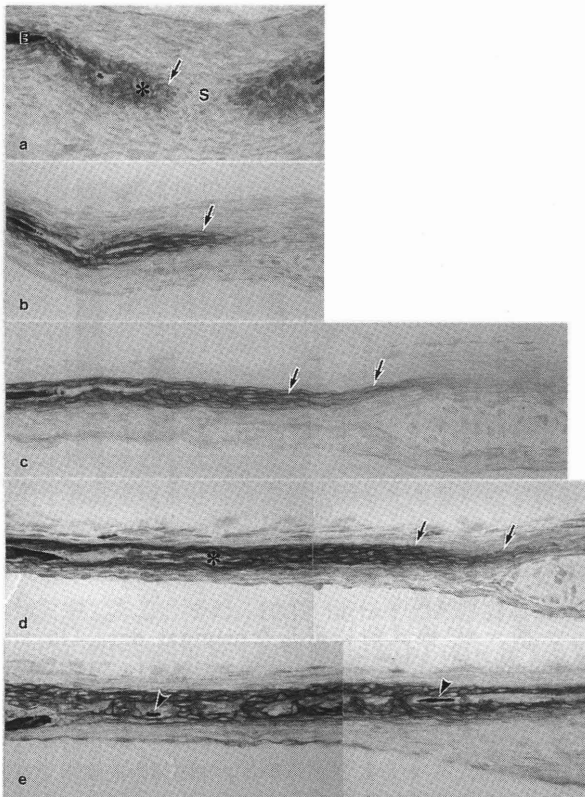


図-2 張力刺激による縫合部の骨形成 (アルカリフォスファターゼおよび von Kossa 染色)

a: 0時間, 立方状でALP陽性の骨芽細胞が骨(B)およびosteoid(*)を覆っている。また, 前骨芽細胞を斜めの矢印で示してある。b: 1時間, 縫合部の細胞はいずれも扁平化し長さを増している。OsteoidならびにALP陽性の前骨芽細胞(斜め矢印)層も縫合部中央(垂直矢印)に向けて伸びだしている。c: 6時間, 扁平化したALP陽性の細胞層(斜め矢印)はさらに縫合部中央に向かって伸長し, osteoidも若干増加している。d: 24時間, osteoidおよび前骨芽細胞(斜め矢印)層はさらに伸長している。e: 48時間, osteoidは長さおよび厚みを増し, 一部には石灰化(矢頭)も認められる。

4-2. 骨芽細胞の分化とBMP-4の発現

上述の骨芽細胞分化とそれに続く骨形成にかかわる因子を明らかにするため, 同じ実験系で遺伝子発現を調べた。メカニカルストレスにより発現状況が変動する骨芽細胞特異的遺伝子を見出すための手始めとして, 骨芽細胞の分化マーカーのうち比較的初期に現れる遺伝子の発現状況をRT-PCRで調べた。その結果, BMP-4遺伝子の発現が増加し, 6時間後には有意な変化として検出された(図-3)⁴⁹⁾。これらの変化がどの細胞に起こっているかを明らかにすることができれば, 骨芽細胞へ分化する細胞の起源やメカニズムを明らかにする契機となる可能性がある。そこで, in situ hybridization (ISH) 法によ

り細胞レベルの発現状況を調べた。その結果, 張力負荷開始3hr後には, 前骨芽細胞のBMP-4遺伝子発現が増加し, 新たにALP陽性となった前骨芽細胞および間葉系の線維芽細胞様細胞の一部にBMP-4遺伝子が発現するようになった(図-4)⁴⁹⁾。このような変化が順次縫合部中心に向かって移動するとともに, あらたに分化したと思われるALP陽性の前骨芽細胞は, 骨芽細胞特異的転写因子であるCbfa1遺伝子を発現するようになった(図-4,5)。そして, 典型的な骨芽細胞へと分化すると, 順次type I collagenやosteopontin, osteocalcinなどを分泌してosteoidを形成しながら, 自身のBMP-4遺伝子発現は低下する。時間の経過とともに, 類骨では, matrix vesicleの形成を経て石灰化に至る, という一連のプロセスを観察した(図-6)。これは生体内で見られる骨形成過程と同一のものと考えることができる。このように, BMP-4はautocrine/paracrine factorとして骨芽細胞の分化に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。尚, 本実験系ではBMP-2の変動は認められなかった。

4-3. メカニカルストレスにより変動する遺伝子の網羅的検出

上述のように, マウス頭蓋冠縫合部培養系を用いることにより, 従来の研究では得られなかった, 比較的骨形成に特異的な遺伝子変化が検出された。張力刺激により発現レベルが変動する遺伝子をさらに検出するために, differential display (DD) 法およびRAP-PCRを用いるその変法により検索した結果, いくつかの既知遺伝子および未知遺伝子を同定した⁵⁰⁾。これらの遺伝子の発現が骨芽細胞の分化とともに増加することを確認している

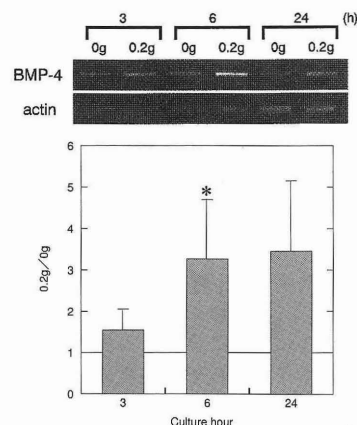


図-3 張力刺激によるBMP-4遺伝子発現の誘導

Total RNAを頭蓋冠縫合部から抽出した後RT-PCRによりBMP-4遺伝子の発現を調べた。上のパネルはそのパターンを, 下のパネルには数値化して結果を示した。*は5%の危険率で対照群との間に有意差があることを示す。

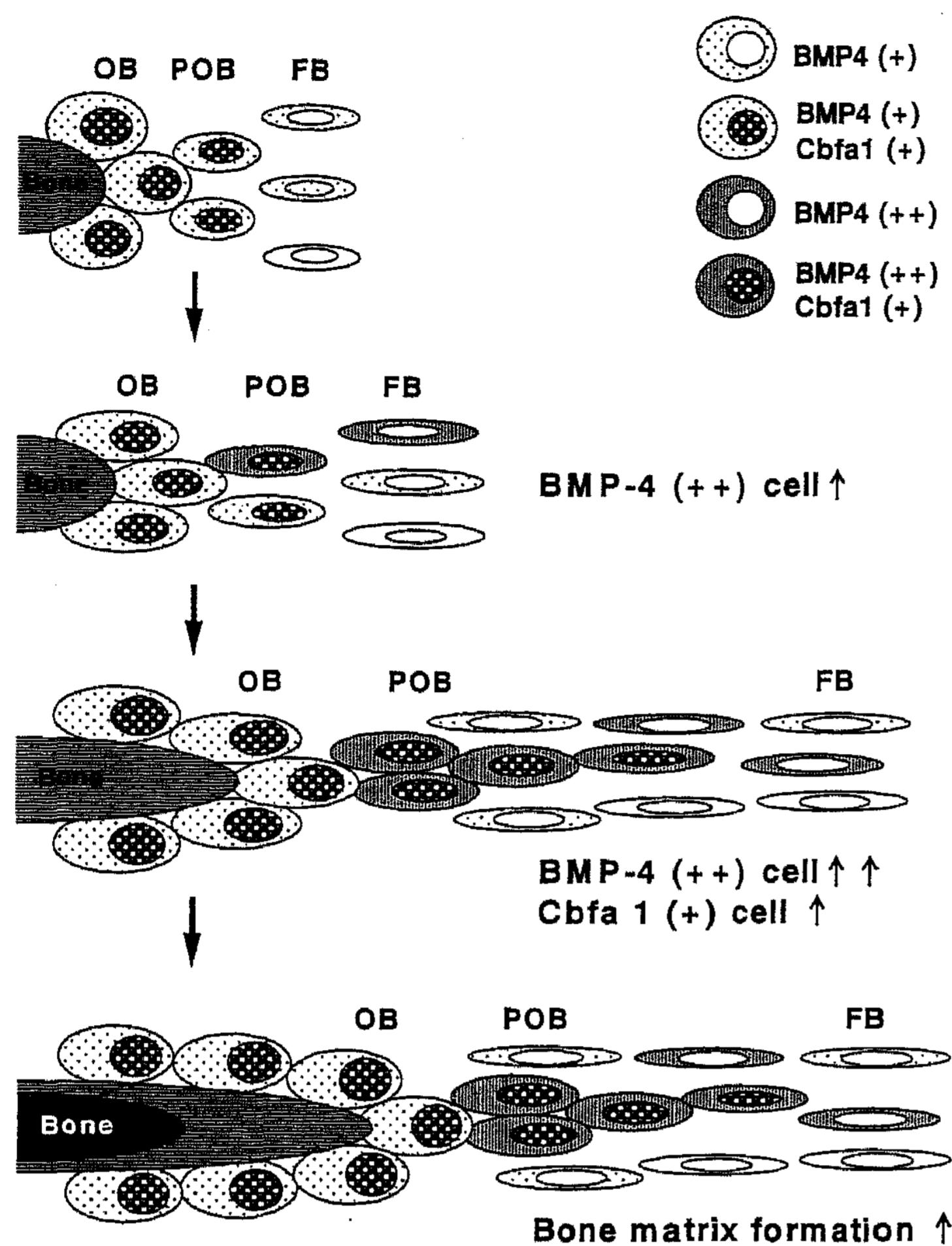


図-4 張力刺激下に培養した頭蓋冠縫合部における骨芽細胞の分化と骨形成 (模式図)

図はin situ hybridization法により検出した遺伝子発現の変化を模式的に示したものである。上から順に、張力刺激開始後0時間、3時間、6時間、24~48時間における変化を示す。0時間では、osteoid (類骨、図ではBoneと示してある) に接している球形の骨芽細胞 (OB) とこれに隣接する前骨芽細胞 (POB) がBMP-4およびCbfa1陽性で、間葉系の線維芽細胞様細胞 (FB) の中にもBMP-4弱陽性のものが散見される。3時間以降では、張力負荷方向に沿って細胞が扁平となるとともに、細胞数の増加、osteoidの伸長、そしてosteoidの一部の石灰化 (骨化) という順で骨形成が起こっていることがわかる。3時間後ではOBおよび一部のFBにおいてBMP-4遺伝子発現が増加する。6時間後になると、これらの変化はさらに増加し、3時間後でBMP-4陽性となったFBはCbfa1陽性となってPOBへと分化し、さらに新しくBMP-4陽性のFBが出現する。一方で新しく分化したOBは細胞外基質を分泌してosteoidの伸長に寄与する。24時間以降になると、伸長したosteoidの一部は石灰化し骨化する (図では白抜き文字でBoneと示してある部分) が、間葉系のFBがPOBついでOBに分化する先端部ではこれまでと同様の変化が繰り返されて骨形成が進行する。図では明確に示されていないが、骨化した部分の表面に接するOBのBMP-4発現は次第に消失する。また、図には示していないが、osteoid表面に接するOBはbone sialoprotein陽性またその一部はosteopontin陽性、骨化した部分の表面に存在するOBはosteopontinおよびosteocalcin陽性になることも確認している。(データの詳細は文献49を参照)。

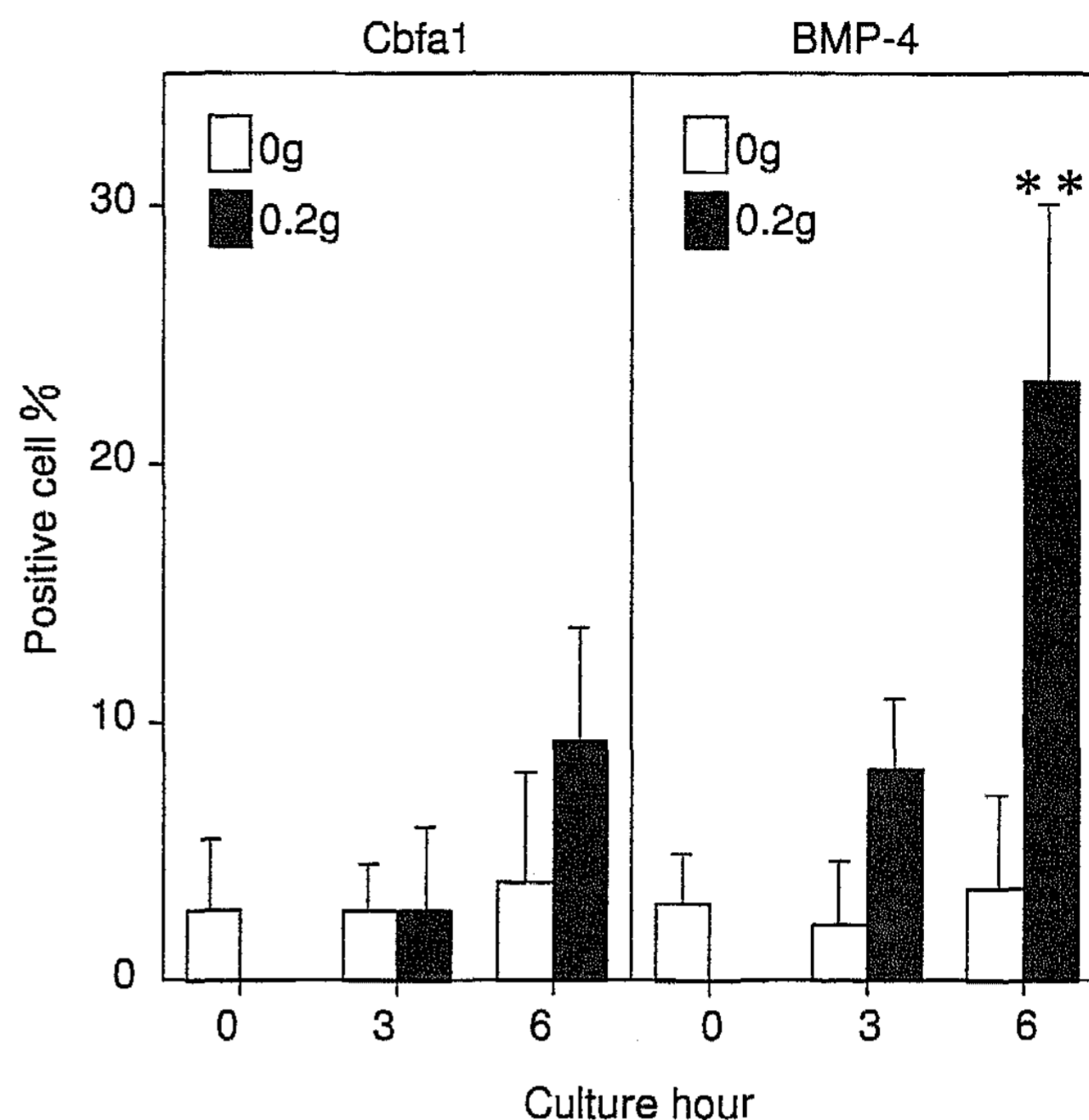


図-5 張力刺激によるBMP-4およびCbfa1遺伝子発現細胞数の経時変化

図-4に模式的に示したoriginal data (in situ hybridization) をcomputer画面上で解析し、BMP-4陽性およびCbfa1陽性の細胞数を計測した。図4の説明と一致してBMP-4陽性細胞がまず増加し、ついでCbfa1陽性細胞が増加していることがわかる。*は5%の危険率で対照群との間に有意差があることを示す。

Tensile stress-induced osteoblast differentiation and osteogenesis

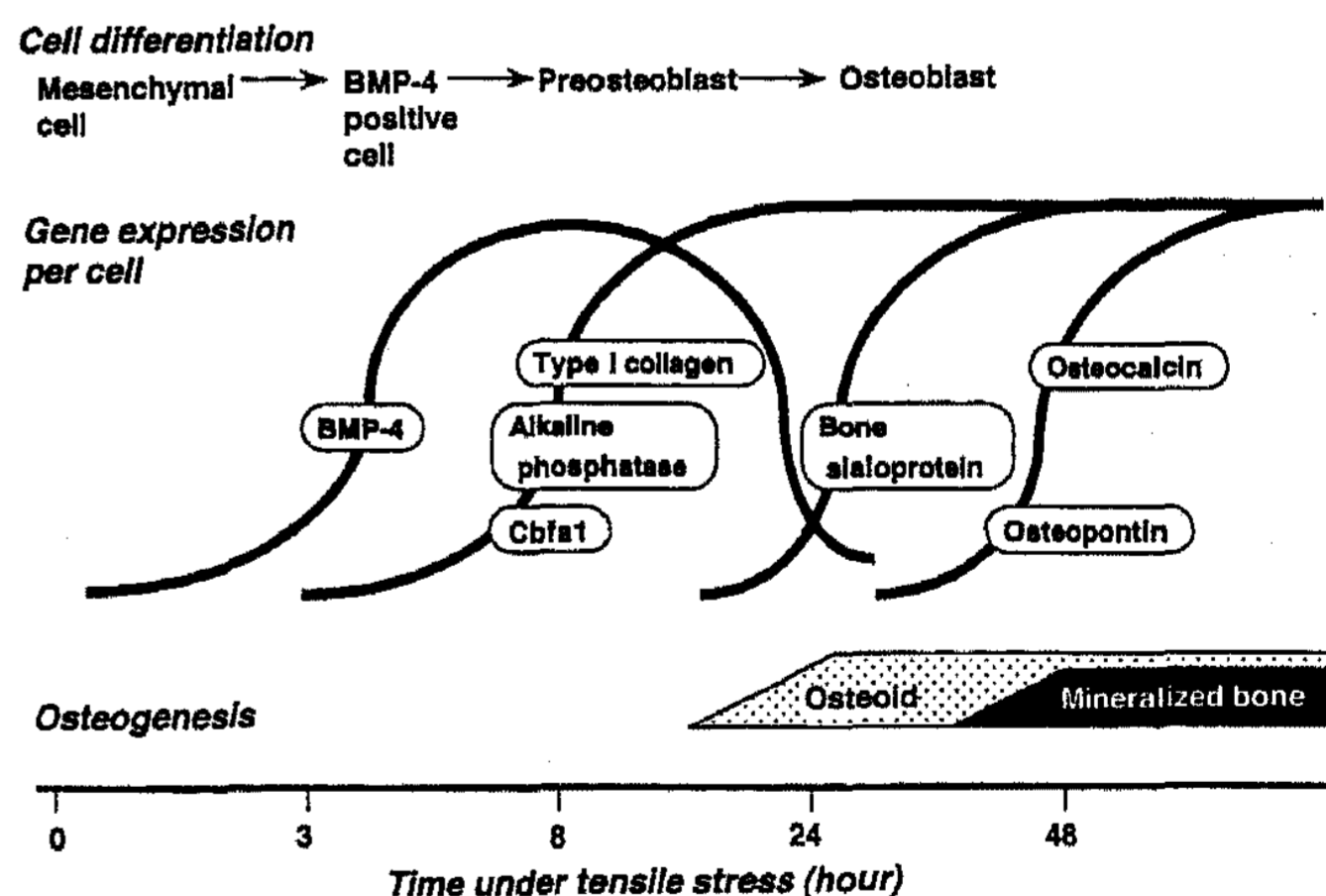


図-6 張力刺激によって惹起される骨芽細胞の分化と骨形成 (模式図)

骨芽細胞の分化、細胞当りの遺伝子発現量、および、骨形成をそれぞれ経時的に示した。BMP-4遺伝子の発現状況と骨芽細胞の分化に関するデータは我々の研究が最初のものであるが、骨芽細胞に分化し骨基質を分泌し終わるとその発現が低下することが注目される (図-4の説明参照)。これらのデータからBMP-4はautocrine/paracrine factorとして骨芽細胞の分化にかかわる可能性が示唆される。図に示したその他の因子の発現については、発現の順序、発現量とも従来の報告とほぼ一致する。

が、より詳細な機能を解析中である。しかしながら、容易に予想されるように、DD法は遺伝子の網羅的検出に適しているとは言い難い。張力刺激により変動する遺伝子をさらに網羅的に検索し、メカニカルストレスの骨形成作用のキーとなる遺伝子を特定するため、張力刺激負荷組織および非負荷組織からRNAを抽出し、マイクロアレイ (GeneChipシステム) により検討している。

4-4. 今後の検討事項

BMP-4遺伝子をはじめ、特定された遺伝子が骨形成に必須であるか否かを決定するためには、張力負荷組織において当該遺伝子の発現を阻止して骨芽細胞の分化や骨形成が抑制されること、また、張力非負荷組織に当該遺伝子を過剰発現させて骨芽細胞の分化や骨形成が刺激されること、等を確認しなければならない。これを実現するため、アデノウイルスベクターを用いる発現系を構築し検討中である。また、BMP-4遺伝子の転写調節領域にはshear stressに応答する部位 (SSRE) が存在する⁵¹⁾。この領域に結合する因子はまだ同定されていないが、張力刺激により誘導される骨形成にこの部位がかかわっている可能性もあり、この因子の同定が重要になるかも知れない。これらの点についても現在検討中である。

おわりに

以上のように、我々の用いている頭蓋冠縫合部の培養系には、短時間で骨形成に至り、しかも骨芽細胞の分化をも調べることが可能である、という特徴がある。本実験系で用いているメカニカルストレスは、大きな一方向の張力刺激を組織に連続的に加えるという、非生理的な刺激であるが、これと良く似たdistraction osteogenesisという治療法がある。長管骨を長軸と垂直方向に切断した後長軸方向に連続的に張力を負荷しながら骨形成を促し、結果的に骨を伸長させる (1日あたり1ミクロン程度の伸長) 方法である。最終的に10cm程度までなら伸長可能であるという。ラットを用いた同様のモデル実験で張力刺激によりBMP-2やBMP-4の遺伝子発現が著明に増加することが最近報告された⁵²⁾。この場合、骨折治癒過程で認められるBMP-4発現の増加に比べて、その発現量かはるかに高値である^{52,53)} 点が、我々の上記の結果と併せて注目される。我々の実験系で得られる情報がそのまま *in vivo* の骨形成過程を正確に表しているとは考えていないが、このような非生理的条件が通常 *in vivo* の実験系では検出できないような小さな変化を検出可能にしているのではないかと考えている。

いずれにしても最終的には *in vivo* の系に持ち込んで結論を出すことが必要なのであり、最初の段階でこのような極端な条件を選ぶのも strategy として十分成り立つと考えている。

文 献

- 1) Lebranc AD, Schneider VS, Evans HJ, Engelbreston DA and Krebs JM: J Bone Miner Res 5: 843-850, 1990.
- 2) Mack PB and Vogt FB: Roentgenographic bone density changes during representative Apollo space flight. Am J Roentgenol 113: 621-623, 1971
- 3) Vose GP: Review of roentgenographic bone demineralization studies of the Gemini space flight. Amer J Roent 121: 1-5, 1974
- 4) Morey ER and Baylink DJ: Inhibition of bone formation during space flight. Science 201: 1138-1141, 1978
- 5) Yagodovsky VS, Trifaranidi LA and Goroklova GP: Space flight effects on skeletal bones of rats. Aviat Space Environ Med 47: 734-738, 1984
- 6) Bassej EJ and Ramsdale SJ: Increase in femoral bone density in young women following high-impact exercise. Osteoporosis Int 4: 72-75, 1994
- 7) Smith EL, Gilligan C: Exercise and bone mass. In: Deluca HF, Mazess R (eds) Osteoporosis: Physiological Basis, Assessment and Treatment. Elsevier Science, New York pp285-293, 1990
- 8) Eisman JA, Kelly PJ, Sambrook PN et al: Physical activity and bone mass. In: Deluca HF, Mazess R (eds) Osteoporosis: Physiological Basis, Assessment and Treatment. Elsevier Science, New York pp277-283, 1990
- 9) Frost HM: Bone "mass" and the "mechanostat" a proposal. Anat Rec 219: 1-9, 1987
- 10) Turner CH, Forwood MR, Rho J and Yoshikawa T: Mechanical loading thresholds for lamellar and woven bone formation. J Bone Miner Res 9: 87-97, 1994
- 11) Ingber DE: Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. J Cell Sci 104: 613-627, 1993.
- 12) Wang N and Ingber DE: Probing transmembrane mechanical coupling and cytomechanics using magnetic twisting cytometry. Biochem Cell Biol 73: 327-335, 1995
- 13) Pavalko FM, Otey CA, Simon KO and Burridge K: α -Actinin: a direct link between actin and integrins. Biochem Soc Trans 19: 1065-1069, 1991
- 14) MJ, Banes AJ, Levin LG, Sumpio BE, Sato M, Jordan R, Gilbert J, Link GW and Tran Son Tay

- R: Osteoblasts increase their rate of division and align in response to cyclic, mechanical tension. *Bone Miner* 4: 225-236, 1988
- 15) Pavalko FM, Chen NX, Turner CH, Burr DB, Atkinson S, Hsieh Y-F, Qie J and Duncan RL: Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton-integrin interactions. *Am J Physiol* 275: C1591-C1601, 1998
 - 16) Chakkalakal DA: Mechanoelectric transduction in bone. *J Mater Res* 4: 1034-1046, 1989
 - 17) Pead MJ, Suswillo R, Skerry TM, VEDI S and Lanyon LE: Increased ³H-uridine levels in osteocytes following a single short period of dynamic bone loading in vivo. *Calcif Tissue Int* 43: 92-96, 1988
 - 18) Dodds RA, Ali N, Pead MJ and Lanyon LE: Early loading-related changes in the activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase and alkaline phosphatase in osteocytes and periosteal osteoblasts in rat fibulae in vivo. *J Bone Miner Res* 8: 261-267, 1993
 - 19) Goodship AE, Lanyon LE and McFie H: Functional adaptation of bone to increased stress. *J Bone Joint Surg* 61A: 539-546, 1979
 - 20) Turner CH, Takano Y, Owan I and Murrell GAC: Nitric oxide inhibitor L-NAME suppresses mechanically induced bone formation in rats. *Am J Physiol* 270: E634-E639, 1996
 - 21) Fox SW, Chambers TJ and Chow JWM: Nitric oxide is an early mediator of the increase in bone formation by mechanical stimulation. *Am J Physiol* 270: E955-E960, 1996
 - 22) Mashimo H and Goyal RK: Lessons from genetically engineered animal models IV. Nitric oxide synthase gene knockout mice. *Am J Physiol* 277: G745-G750, 1999
 - 23) Gregg AR, Schauer A and Shi O: Limb reduction defects in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol* 275: H2319-H2324, 1998
 - 24) Chow JWM and Chambers TJ: Indomethacin has distinct early and late actions on bone formation induced by mechanical stimulation. *Am J Physiol* 267:E287-E292, 1994
 - 25) Xia SL and Ferrier J: Propagation of a calcium pulse between osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 186: 1212-1219, 1992
 - 26) McDonald F, Somasundaram B, McCann TJ, Mason WT and Meikle MC: Calcium waves in fluid flow stimulated osteoblasts are G protein mediated. *Arch Biochem Biophys* 326: 31-38, 1996
 - 27) Sandy JR, Meghji S, Farndale RW and Meikle MC: Dual evaluation of cyclic AMP and inositol phosphates in response to mechanical deformation of murine osteoblasts. *Biochim Biophys Acta* 1010: 265-269, 1989
 - 28) Binderman I, Zor U, Kaye AM, Shimshoni Z, Harell A and Somjen D: The transduction of mechanical force into biochemical events in bone cells may involve activation of phospholipase A₂. *Calcif Tissue Int* 42: 261-266, 1988.
 - 29) Kennedy MS and Insel PA: Inhibitors of microtubule assembly enhance beta-adrenergic and prostaglandin E₁-stimulated cAMP accumulation in S49 lymphoma cells. *Mol. Pharmacol.* 16: 215-223, 1979.
 - 30) Insel PA and Koachman AM: Cytochalasin B enhances hormone and cholera toxin-induced cyclic AMP accumulation in S49 lymphoma cells. *J Biol Chem* 257: 9717-9723, 1982.
 - 31) Canalis E and Gabbitas B: Bone morphogenetic protein 2 increases insulin-like growth factor I and II transcripts and polypeptide levels in bone cell culture. *J Bone Miner Res* 9: 1999-2005, 1994
 - 32) Knutsen R, Honda Y, Strong DD, Sampath TK, Baylink DJ and Mohan S: Regulation of insulin-like growth factor system components by osteogenic protein-1 in human bone cells. *Endocrinology* 136: 857-865, 1995
 - 33) Chen MZ, Zaman G and Rawlinson SC: Mechanical strain stimulates ROS cell proliferation through IGF-II and estrogen through IGF-I. *J Bone Miner Res* 14: 1742-1750, 1999
 - 34) Lean JM, Jagger CJ and Chambers TJ: Increased insulin-like growth factor I mRNA expression in rat osteocytes in response to mechanical stimulation. *Am J Physiol* 268: E318-E327, 1995
 - 35) Parfitt AM: The Physiologic and clinical significance of bone histomorphometric data. In: Recker RR (ed) *Bone Histomorphometry, techniques*

- and interpretation. CRC Press, Boca Raton, FL, pp143-223, 1983
- 36) Sun Y-Q, McLeod KJ and Rubin CT: Mechanically induced periosteal bone formation is paralleled by the upregulation of collagen type one mRNA in osteocytes as measured by in situ reverse transcript-polymerase chain reaction. *Calcif. Tissue Int* 57: 456-462, 1995
 - 37) Chow JW, Wilson AJ and Chambers TJ: Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cell in 13-week-old rats. *J Bone Miner Res* 13: 1760-1767, 1998
 - 38) Turner CH, Takano Y and Owan I: Aging changes mechanical loading thresholds for bone formation in rats. *J Bone Miner Res* 10: 1544-1549, 1995
 - 39) Rubin CT, Bain SD, McLeod KJ: Suppression of the osteogenic response in the aging skeleton. *Calcif Tissue Int* 50: 306-313, 1992.
 - 40) Turner CH: Homeostatic control of bone structure: an application of feedback theory. *Bone* 12: 203-217, 1991.
 - 41) Jagger CJ, Chow JWM, Chambers TJ: Estrogen suppresses activation but enhances formation phase of osteogenic response to mechanical stimulation in rat bone. *J Clin Invest* 98: 2351-2357, 1996.
 - 42) Burkhart JM, Jowsey J: Parathyroid and thyroid hormones in the development of immobilization osteoporosis. *Endocrinology* 81: 1053-1062, 1967.
 - 43) EL Haj AJ, Minter SL, Rawlinson SCF, Suswillo R, Lanyon LE: Cellular responses to mechanical loading in vitro. *J Bone Miner Res* 5: 923-932, 1990.
 - 44) Duncan RL, Hruska KA: Chronic, intermittent loading alters mechanosensitive channel characteristics in osteoblast-like cells. *Am J Physiol* 267: F909-F916, 1994.
 - 45) Duncan RL, Hruska KA, Mislis S: Parathyroid hormone activation of stretch-activated cation channels in osteosarcoma cells (UMR-106.01) *FEBS Lett* 307: 219-223, 1992.
 - 46) Owan I, Burr DB, Turner CH, Qiu J, Tu Y, Onyia JE and Duncan RL: Mechanotransduction in bone: osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain. *Am J Physiol* 273: C810-C815, 1997.
 - 47) Smalt R, Mitchell FT, Howard RL and Chambers TJ: Induction of NO and prostaglandin E₂ in osteoblasts by wall-shear stress but not mechanical strain. *Am J Physiol* 273: E751-E758, 1997
 - 48) Duncan RL and Turner CH: Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif. Tissue Int* 57: 344-358, 1995
 - 49) Ikegame M, Ishibashi O, Yoshizawa T, Shimomura J, Komori T, Ozawa H and Kawashima H: Tensile stress induces bone morphogenetic protein 4 in preosteoblastic and fibroblastic cells, which later differentiate into osteoblasts leading to osteogenesis in the mouse calvariae in organ culture. *J Bone Miner Res* 16: 24-32, 2001
 - 50) Shimomura J, Ishibashi O, Ikegame M, Noda T and Kawashima H: Tensile stress markedly increased tetranectin gene expression in cranial sutures of mouse calvariae. *J Bone Miner Res* 14 (suppl 1): S194, 1999
 - 51) Feng JQ, Chen D, Cooney AJ, Tsai MJ, Harris MA, Tsai SY, Feng M, Mundy GR and Harris SE: The mouse bone morphogenetic protein-4 gene. Analysis of promotor utilization in fetal rat calvarial osteoblasts and regulation by COUP-TFI orphan receptor. *J Biol Chem* 270: 28364-28373, 1995
 - 52) Sato M, Ochi T, Nakase T, Hirota S, Kitamura Y, Nomura S and Yasui N: Mechanical tension-stress induces expression of bone morphogenetic protein (BMP)-2 and BMP-4, but not BMP-6, BMP-7, and GDF-5 mRNA, during distraction osteogenesis. *J Bone Miner Res* 14: 1084-1095, 1999
 - 53) Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, Hashimoto J, Hirota S, Kitamura Y, Oikawa S, Ono K and Takaoka K: Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res* 9: 651-659, 1994
 - 54) Lean JM, Mackay AG, Chow JW and Chambers TJ: Osteocytic expression of mRNA for c-fos and IGF-I: an immediate early gene response to an osteogenic stimulus. *Am J Physiol* 270: E-937-E945, 1996
 - 55) Raab-Cullen DM, Thiede MA, Petersen DN, Kimmel DB and Recker RR: Mechanical loading stimulates rapid changes in periosteal gene

- expression. *Calcif. Tissue Int* 55: 344-358, 1995
- 56) Ochoa JA, Sanders AP, Heck DA and Hillberry BM: Stiffening of the femoral head due to intertrabecular fluid and intraosseous pressure. *J. Biomech Eng* 113: 259-262, 1991
- 57) Mason DJ, Suva LJ and Rubin CT: Mechanically regulated expression of a neural glutamate transporter in bone: a role for excitatory amino acids as osteotropic agents? *Bone* 20: 199-205, 1996
- 58) Glanstching H, Varga F, Rumpler M and Klaushofer K: Prostacyclin (PGI₂): A potential mediator of c-fos expression induced by hydrostatic pressure in osteoblastic cells. *Eur J Clin Invest* 26: 544-548, 1996
- 59) Ogata T: Fluid flow induces enhancement of the egr-1 mRNA level in osteoblast-like cells: involvement of tyrosine kinase and serum. *J Cell Physiol* 170: 27-34, 1997
- 60) Johnson DL, McAllister TN and Frangos JA: Fluid flow stimulates rapid and continuous release of nitric oxide in osteoblasts. *Am J Physiol* 271: E205-E208, 1996
- 61) Pitsillides AA, Rawlinson SCF, Suswillo RFL, Bourrin S, Zaman G and Lanyon LE: Mechanical strain-induced NO production by bone cells: a possible role in adaptive bone (re) modeling? *FASEB J* 9: 1614-1622, 1995
- 62) Klein-Nulend J, Burger EH, Semein CM, Raisz LG and Pilbeam CC: Pulsating fluid flow stimulates prostaglandin release and inducible prostaglandin G/H synthase mRNA expression in primary mouse bone cells. *J Bone Miner Res* 12: 45-51, 1997
- 63) Neidlinger-Wilke C, Stalla I, Claes L, Brand R, Hollen I, Rubenacker S, Adam M and Kinzl L: Human osteoblasts from younger normal and osteoporotic donors show differences in proliferation and TGF beta-release in response to cyclic strain. *J Biomech* 28: 1411-1418, 1995
- 64) Jones DB, Nolte H, Scholubbers J-G, Turner E and Veltel D: Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells. *Biomaterials* 12: 101-110, 1991
- 65) Duncan RL, Kizer N, Barry EL, Friedman PA and Hruska KA: Antisense oligo-deoxynucleotide inhibition of a swelling-activated cation channel in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1864-1869, 1996
- 66) Wang W, Zhuang H, Levitz CL, Fan H, Seldes RM, Tahernia AD and Brighton CT: The increased level of PDGF-A contributes to the increased proliferation induced by mechanical stimulation in osteoblastic cells. *Biochem Mol Biol Int* 43: 339-346, 1997
- 67) Klein-Nulend J, Roflofsen J, Semeins CM, Bronckers ALJJ and Burger EH: Mechanical stimulation of osteopontin mRNA expression and synthesis in bone cell culture. *J Cell Physiol* 170: 174-181, 1997
- 68) Rawlinson SCF, El-Haj AJ, Minter SL, Tavares IA, Bennett A and Lanyon LE: Loading-related increases in prostaglandin production in cores of adult canine cancellous bone in vitro: a role for prostacyclin in adaptive bone remodeling. *J Bone Miner Res* 6: 1345-1351, 1991
- 69) Chow JWM, Jagger CJ and Chambers TJ: Characterization of osteogenic response to mechanical stimulation in cancellous bone of rat caudal vertebrae. *Am J Physiol* 265: E340-E347, 1993
- 70) Guignandon A, Usson Y, Laroche N, Lafage-Proust M-H, Sabido O, Alexandre C and Vico L: Effects of intermittent or continuous gravitational stresses on cell-matrix adhesion: quantitative analysis of focal contacts in osteoblastic ROS 17/2.8 cells. *Exp Cell Res* 236: 66-75, 1997
- 71) Brighton CT, Sennet BJ, Farmer JC, Iannotti JP, Hansen CA, Williams JL and Williamson J: The inositol phosphate pathway as a mediator in the proliferative response of rat calvarial bone cells to cyclical biaxial mechanical strain. *J Orthop Res* 10: 385-393, 1992
- 72) Hickory WB and Nanda R: Effect of tensile force magnitude on release of cranial suture cells in S phase. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 91: 328-334, 1987