

論文名 : Extracellular Matrix with Low Collagen Cross-links Affects Differentiation of Bone-associate Cells. (コラーゲン・クロスリンクが低下した細胞外マトリックスは骨関連細胞の分化に影響を及ぼす)

新潟大学大学院医歯学総合研究科

氏名 井田 貴子

---

ここから記入

### 【緒言】

コラーゲン・クロスリンクはコラーゲンの翻訳後修飾によって付与される 2 次的な構造であり、コラーゲン分子間を強固に架橋することから、骨の機械的特性に影響を及ぼす因子の一つとしても重要である。さらに近年の研究から、細胞の活性にとってその周囲環境を構成する細胞外マトリックスの構成要素ならびにその 2 次構造が影響を及ぼすことが明らかとなりつつある。そこで、本研究ではコラーゲン・クロスリンクが骨の局所的なリモデリングに及ぼす影響を明らかとする為に、クロスリンクの減少が骨のリモデリングに関わる骨芽細胞、破骨細胞、骨髄由来間質細胞の分化に及ぼす影響を解析した。

### 【方法】

クロスリンク阻害剤である  $\beta$ -aminopropionitrile (BAPN、0 - 2.0 mM) が前骨芽細胞株 (MC: MC3T3-E1) に及ぼす影響を、MTS 法による細胞増殖能および realtime PCR による遺伝子発現解析にて評価した。MC を BAPN 存在下にて 2 週間培養し、クロスリンクの程度が異なるマトリックスを得た。得られたマトリックスのクロスリンク評価は、Picrosirius red 染色、SDS-PAGE、HPLC にて行った。細胞成分を Deoxycholate にて除去したマトリックス上に MC、前破骨細胞株 (RAW264.7)、マウス骨髄由来間質細胞 (BMSCs) を各々播種した。骨芽細胞分化は Alkaline phosphatase (ALP) 活性および遺伝子発現解析にて評価した。RAW264.7 の破骨細胞分化は Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色および遺伝子発現解析にて評価した。BMSCs については、細胞接着能の評価ならびに骨芽細胞分化の評価を行った。

4 週齢の C57BL/6J マウスを BAPN 含有飼料 (0.1%および 0.25%) またはコントロール飼料にて 8 週間飼育し、クロスリンク形成不全マウスを作製した。通常飼料に戻した後、0, 2, 4 週間後に屠殺し、上腕骨は HPLC によるクロスリンク解析、大腿骨はマイクロ CT による骨形態計測、組織解析を行った。

### 【結果】

BAPN 添加により MC の増殖能および Runx2/Cbfa1、Colla2 遺伝子発現量に影響は認めなかったが、Lox 遺伝子発現量は BAPN 濃度依存的に上昇した。BAPN の添加によって得られたマトリックスは 0.5 - 1.0 mM の濃度ではコラーゲンの産生量に影響を及ぼさずにク

ロスリンクの形成を阻害した。特に 1.0 mM ではコントロールで検出されたクロスリンク (Pyridinoline, DHLNL, HLNL) 量は検出限界以下まで抑制された。クロスリンクの低下したマトリックス上に播種した MC では増殖能、Alpl、Colla2、Spp1 遺伝子発現量、ALP 活性の上昇が認められた。RAW264.7 においては、TRAP 陽性細胞数および Ctsk、Nfatc1 遺伝子発現量の上昇が認められた。BMSCs に関しては、初期の細胞接着数の上昇、骨芽細胞分化誘導後の細胞増殖能、ALP 活性、Alpl、Colla2、Spp1 遺伝子発現量においても上昇が認められた。

マウスにおける 8 週間の BAPN 含有飼料の投与により各群間で体重変化は認められず、骨中のコラーゲン量にも影響は認められなかったが、クロスリンク量は有意に減少した。骨形態計測解析においては、BAPN 摂取群で骨組織体積および骨表面積の増加が認められたものの、骨密度や骨量に関わるパラメータに影響は認められなかった。Picrosirius red 染色により 8 週間の BAPN 含有飼料投与は濃度依存的に骨基質成熟度の低下を示した。通常飼料に戻して 4 週間後において BAPN 摂取群における骨芽細胞の活性は有意に上昇したものの破骨細胞の活性に変化は認められなかった。

#### 【考察および結論】

本研究においてクロスリンク阻害剤である BAPN の投与により、コラーゲン産生量に影響を及ぼさずにクロスリンクの形成を阻害することが可能であった。さらにクロスリンクの低下したマトリックスは骨芽細胞、破骨細胞の分化、ならびに骨髓由来間質細胞の骨芽細胞分化を促進した。以上の結果からコラーゲン・クロスリンクは骨の機械的特性を担う構造としてのみならず、骨のリモデリングに関わる細胞の分化に影響を及ぼすことにより、骨代謝に関与する可能性が示唆された。現時点では細胞がコラーゲン・クロスリンクの変化を検出する分子メカニズムについては不明であるが、本研究で我々が見出した細胞外基質の 2 次構造の変化による細胞の分化制御は、局所的な骨代謝の制御メカニズムとしてだけでなく、骨関連疾患の治療標的ならびに細胞担体を用いた幹細胞の指向性分化制御という観点からも有用であると考えられる。