

〔原著〕

株化骨芽細胞様細胞MC3T3-E1細胞の分化・石灰化過程における
デコリンとバイグリカンのmRNA発現泰間 康平¹⁾, 鳥谷奈保子¹⁾, 荒川 俊哉²⁾, 田隈 泰信²⁾, 溝口 到¹⁾¹⁾北海道医療大学歯学部歯科矯正学講座²⁾北海道医療大学歯学部口腔生化学講座Quantitative mRNA analysis of decorin and biglycan during differentiation
and calcification in MC3T3-E1 cellsKohei TAIMA¹⁾, Naoko TORIYA¹⁾, Toshiya ARAKAWA²⁾, Taishin TAKUMA²⁾ and Itaru MIZOGUCHI¹⁾¹⁾Department of Orthodontics, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido²⁾Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Abstract

To analyze the temporal changes in extracellular matrix components during the osteoblastic differentiation and calcification, mRNA expression of bone-related small leucine-rich proteoglycans, decorin and biglycan, was examined in the mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1, by real-time quantitative PCR with hydrolysis (TaqMan) probes. Comparisons were made between cells grown in the presence or absence of β -glycerolphosphate plus ascorbic acid-2-phosphate (calcification and non-calcification groups, respectively) and between the early phase without calcification and the late calcification phase in the calcification group. When calcification was stimulated, the expression of decorin and biglycan mRNA increased rapidly before calcification, reached a peak at 7 days, and then gradually decreased in the late calcification stage (day21 to day28). In non-calcification group, however, the two mRNA levels were continuously increased up to day 28. These results suggest that the temporally differences in mRNA expression of the small leucine-rich proteoglycans reflect biological functions of the two proteoglycans in the processes of osteogenic differentiation and calcification.

キーワード：デコリン, バイグリカン, プロテオグリカン, 骨芽細胞, mRNA発現

緒 言

矯正学的歯の移動では、メカニカルストレスによって惹起される局所的な骨形成と骨吸収に伴う歯槽骨の骨改造を生じる (Roberts, 1994)。前者の骨形成において中心的な働きをするのが、歯根膜あるいは歯槽骨骨膜に存在する骨形成系細胞である。骨形成系細胞のひとつである未分化間葉系細胞は、osteoprogenitor細胞、前骨芽細胞、そして骨芽細胞へと分化していき、最終的には骨細胞、flattening bone cellへの分化、あるいはapoptosisという運命をたどる (Karsdal et al., 2002)。この未分化間葉系細胞から骨芽細胞への分化過程では、高い細胞増殖活

性が認められるが、骨芽細胞に分化した段階では骨芽細胞はその増殖活動を停止し、骨組織に特徴的な様々な細胞外マトリックスの産生、分泌および石灰化を行うようになる (Bianco et al., 1990; Ingram et al., 1993; Wilda et al., 2000; Kamiya et al., 2001)。

骨組織の主要な細胞外マトリックスはコラーゲンと非コラーゲン性タンパクであり、後者にはglycoproteinとproteoglycanが含まれる (Fisher et al., 1987)。Proteoglycanは、core proteinとそれに付着する糖鎖 (glycosaminoglycan; 以下GAGと略す) からなり、core proteinのアミノ酸配列の構造的特徴から大きく2つのタイプ、すなわちmodular proteoglycanとsmall leucine-rich proteoglycan

受付：平成18年3月31日

(以下, SLRPと略す) とに分類される (Iozzo and Murdoch, 1996). 前者のmodular proteoglycanは様々な機能を有するdomainから構成され, 軟骨に特徴的なaggrecan, 線維芽細胞が産生するversican, 脳組織に特異的なneurocanおよびbrevicanがこれに属する (Iozzo and Murdoch, 1996).

一方, 後者のSLRPは, 40kD前後の短いcore proteinを有し, 6から10個の繰り返し構造であるleucine-rich repeatを含む (Iozzo, 1999). SLRPの代表的なproteoglycanであるbiglycanとdecorinに関しては, そのアミノ酸と核酸配列, 糖鎖の構造が明らかにされ (Krusius and Ruoslahti, 1986), 様々な機能解析がなされてきた (Scott et al., 1995; Danielson et al., 1997; Xu et al., 1998; Ameye et al., 2002; Young et al., 2002; Ameye and Young, 2002). Biglycanとdecorinは, 皮膚, 腱, 靭帯, 軟骨, 骨などの様々な結合組織に存在し, biglycanは細胞周囲に局在して主に細胞活性の調節に, decorinは細胞外マトリックスの構築に深く関与していることが示されている (Bianco et al., 1990; Wilda et al., 2000).

本研究では, 骨芽細胞の増殖, 分化, 石灰化過程におけるproteoglycanの発現様相および骨形成との関連性を明らかにするために, 株化骨芽細胞様細胞であるMC3T3-E1の培養系における主要なSLRPであるdecorinとbiglycanのmRNA発現変化をRapid Cycle Real-Time PCR法 (以下Real-Time RT-PCR法と略す) によって検討することを目的とした. なお, 本研究では, proteoglycanのmRNAの定量実験に先立ち, Real-Time RT-PCR法のinternal standardとして用いられるhousekeeping geneの信頼性についても検討を行った.

材料および方法

1. 細胞培養

MC3T3-E1細胞を10,000個/cm²の割合で播種し, 10% FBS (Hyclone), penicillin (10,000U/mL) - streptomycin (10,000μg/mL) (Gibco) を添加したα-MEM培養液中, 温度37°C, 湿度100%, 5%CO₂, 95%空気下で培養した. 播種後24時間経過した時点を目0日とし, 前述した培養液と同じものを用いて培養した (以下, 石灰化非促進群とする). また, 石灰化促進群にはascorbic acid-2-phosphate (50μg/mL) (Sigma) とβ-glycerolphosphate (50mmol/mL; Acros, Geel, Belgium) (以下, β-GPと略す) を培養液に付加した. 培養液交換は3~4日ごととし, 試料回収を0日, 2日, 4日, 7日, 14日, 21日, 28日, 35日目に行った.

2. 細胞数のカウント

培養終了後, 細胞をPBSで洗浄し, 0.1%trypsin-EDTA (Gibco) を培養条件下で数分間作用させた後, 振盪して細胞をシャーレより剥離した. 細胞数が増加し, 何層にも積層した14日以降の細胞は0.1%trypsin-EDTAだけではシャーレから剥離して細胞を分離することが困難であったため, 0.1%collagenase (Wako) を培養条件下で30分から60分間作用させた後, 0.1%trypsin-EDTA処理を行った. この細胞懸濁液中の細胞数を血球計算盤でカウントした.

3. Alkaline Phosphatase (ALP) 活性

培養終了後, 細胞をPBSで洗浄し, 0.2%NP-40/10mM/L MgCl₂で溶解した. ピペットでホモジナイズし, ウルトラソニケーター (Ohtake Works) にて超音波破碎した. その後, 4°C, 1500gで10分間遠心し, 上澄みを測定に用いた. ALP活性の測定は基質緩衝液にp-nitrophenylphosphateを用いるBessey-Lowly法 (Bessey et al., 1946) に基づいて行った. 試料を100μLずつ96穴プレートに加えたあと, 基質緩衝液を200μL加えて, プレートリーダーETY-300 (Toyo Sokki) を用いて波長410nmで吸光度を測定した. タンパク質の定量はBCAを用いて測定し, ALP活性の測定結果をノーマライズした.

4. Alizarin Red-S (AR-S) 濃度の測定

培養終了後, 細胞をPBSで洗浄し, 氷冷した70%エタノールにて60分間固定した. 蒸留水で洗浄後, 40mM AR-S (pH4.2) で10分間染色し, 蒸留水で5回洗浄後, PBSにて15分間振盪下で洗浄した. その後, 10% cetylpyridinium chloride (CPC) /10mM sodium phosphate (pH7.0) で10分間脱色し, 上澄みの吸光度を562nmで測定した.

5. mRNAの抽出とreverse transcription

培養終了後, 細胞をPBSで洗浄し, RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いてtotal RNAを抽出した. その際, genomic DNAの混入を防ぐためにDNase処理を行った. 抽出したtotal RNA濃度を分光光度計GeneQuant Pro (Amersham Biosciences) で測定し, 1μg/μLに調節した後, Omniscript RT kit (Qiagen) を用いてreverse transcriptionを行った.

6. MC3T3-E1細胞におけるinternal standardの信頼性の比較検討とproteoglycan mRNAの定量

Target mRNAを定量する際のnormalizeに用いるinternal

standardの発現の安定性を確認するために、housekeeping geneであるGAPDH,cyclophilin Aに対するcDNAの 10^8 から 10^1 コピー数の連続希釈系試料を作製し、TaqMan probeを用いたReal Time RT-PCRを行った。各試料における両分子のmRNAを定量し、それぞれのCt値で比較した。同様に2つのproteoglycanについてもmRNAを定量し、GAPDH 10^3 コピー数に対するproteoglycan cDNAのコピー数を算出した。Target geneおよびPCR反応に用いたprimerを表1に示す。

mRNAの定量にはGeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を使用し、denature: 95°C, 15秒, annealing: 60°C, 1分, サイクル数を50回とした。また、反応試薬としてTaqMan universal PCR master mix (Applied Biosystems) を用いた。

結 果

1. MC 3 T 3 -E 1 細胞の細胞増殖

両群とも類似した曲線を示し、0日から14日まで細胞数は増加したが、その後減少傾向がみられた (data not shown)。

2. MC 3 T 3 -E 1 細胞のAlkaline phosphatase (ALP) 活性

両群ともに0日から14日までALP活性は増加し、その後低下したが、石灰化促進群での活性の減少傾向が著し

かった (data not shown)。

3. MC 3 T 3 -E 1 細胞のAlizarin (AR-S) 濃度

石灰化非促進群では0日から35日までほとんど変化が見られなかったが、石灰化促進群では14日以降、AR-S濃度の急激な増加がみられた (data not shown)。肉眼的観察では石灰化促進群の21日でAR-S陽性のnoduleが部分的にみられ、35日ではディッシュ全体に強陽性反応が広がった (図1)。石灰化促進群で見られるAR-S陽性noduleは非促進群では全く認められなかった。

4. Real-Time RT-PCR法におけるinternal standardの信頼性の比較検討

標準曲線のスロープ値、直線性、Ct値に関する数値を表3に示す。Ct値とはPCR産物の蛍光強度を検出することが可能になった時点のサイクル数である。Internal standardであるGAPDHとcyclophilin Aそれぞれの連続希釈系に対する標準曲線を比較すると、両者とも直線を示したが、スロープの傾斜度はGAPDHの方が理想値に近かった (図2)。また、RNA量でnormalize (1 µg/µL) した0日から35日までの非石灰化群および石灰化群各サンプルについて蛍光強度曲線のCt値を比較すると、GAPDHのばらつきが小さかった (図2,3)。これらの結果からcyclophilin AよりGAPDHの方がinternal standardとして適当と考えられた。

表1 骨組織に関連するproteoglycanの特徴

名 称	分子量 (kDa)	GAG 鎖の種類	GAG 鎖の数
Biglycan	38	DS / CS	2
Decorin	36	DS / CS	1
Fibromodulin	42	KS	4
Lumican	38	KS	2~3
Osteoglycine	12	KS	0 in bone
Versican	350~550	CS	0~22

CS; chondroitin sulphate, DS; dermatan sulphate, KS; keratan sulphate

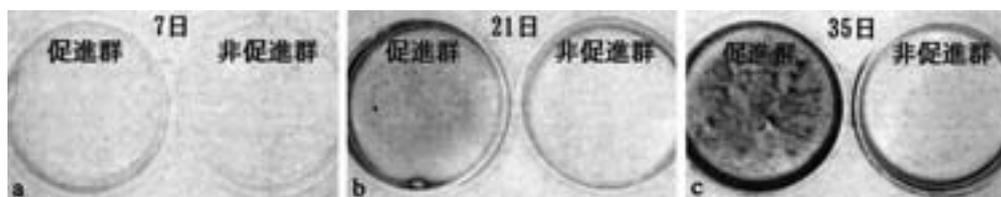


図1 MC 3 T 3 -E 1 細胞のAlizarin Red-S (AR-S) 染色
a培養7日。促進群 (左) と非促進群 (右) にほとんど差は認められない。b培養21日。促進群にはAR-S陽性のnoduleが認められる。c培養35日。促進群のAR-S陽性のnoduleが増加するが、非促進群ではnoduleを認めない。

表2 培養期間中における2種類のinternal standard mRNAのslope値, correlation値, およびCt値の標準偏差 (SD of Ct)

	GAPDH	cyclophilin A
slope	-3.39	-4.03
correlation	-0.99	-0.99
SD of Ct	-0.16	-0.46

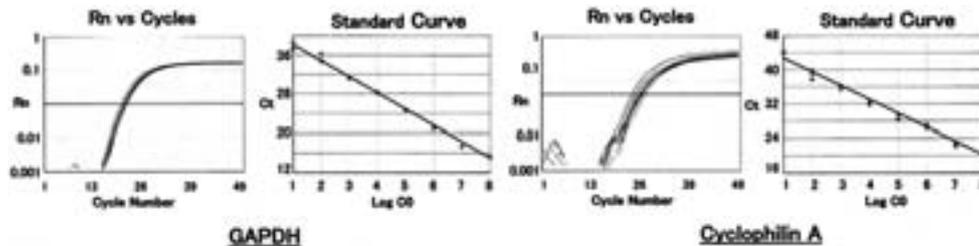


図2 GAPDH,cyclophilin Aに対する連続希釈系を用いて描いた標準曲線MC 3 T 3 -E 1細胞から抽出した試料で描いた蛍光強度曲線
GAPDH (上段), cyclophilin A (下段)ともに標準曲線 (左)は直線を示したが, スロープの傾斜度はGAPDHの方が理想値に近かった. また, mRNA量を1 μg/ulで揃えた0日から35日までの石灰化非促進群, 石灰化群各サンプルのCt値 (右)はGAPDHの方がばらつきが少なかった.

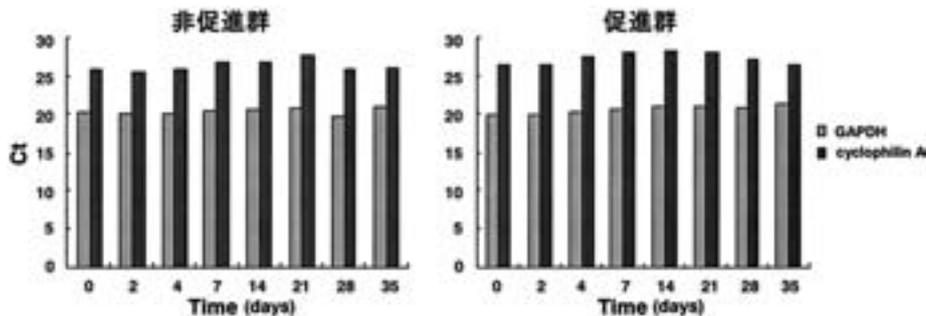


図3 石灰化非促進群, 促進群の培養期間におけるCt値
Total RNA量をnormalizeしたRTで得られた試料を用いて, cyclophilin AとGAPDHについてreal-time RT-PCRを行った. Ct値のばらつきはcyclophilin Aと比較して石灰化非促進群, 促進群ともにGAPDHの方が小さかった.

5. MC 3 T 3 -E 1細胞の石灰化促進群と非促進群におけるproteoglycan mRNAの発現変化

Decorin mRNAは, 培養直後から増加を始め, 石灰化非促進群では14日まで増加したのちプラトーとなった. 一方, 促進群では同様に7日をピークに増加したのち, 35日にかけて減少した (図4). Biglycan mRNAも, 培養直後から増加をはじめ, 石灰化非促進群では28日まで高いレベルを維持し, 35日で急激に低下した. 一方, 促進群では7日をピークとする一過性の上昇であった. (図5).

6. MC 3 T 3 -E 1細胞の石灰化促進群と非促進群におけるdecorin mRNAの発現の比較 (培養28日)

両群の28日目における, 両proteoglycanの発現量を比べてみると, biglycan mRNA発現量は石灰化促進群が非促進群の7.2%, decorinでは19.4%の値を示した (図6).

考 察

1. Real-Time PCRを用いたmRNAの定量

Real-Time RT-PCRには, (1) double strand DNAに結合することによって蛍光を生じるSYBR Green Iという色素を用いる方法, (2) primer間に特異的な配列のTaqMan probe (exonuclease probe)を設計し, その両端に蛍光色素とそのquencher色素を付けたprobeを反応させ, Taq polymeraseの5' - exonuclease活性によってprobeが加水分解され, 両端の色素が離れることによって蛍光を発することを利用する方法, および(3) primer間に特異的な配列をもつ2つのhybridization probeを反応させFRET反応を利用する方法の3つがある (Wittwer, 2001). 本研究において適用したTaqMan probe法では, primer dimerおよび非特異なPCR産物が反応中に形成されても, 目的とするcDNAに特異的なprobeがそれらには結合しないため, 特異的かつ感度の高い手法であるとされている (Wittwer, 2001). 本研究においても

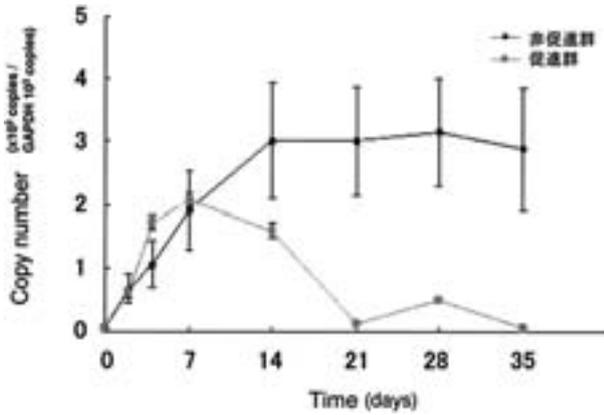


図4 MC3T3-E1細胞におけるdecorin mRNAの発現変化
促進群, 非促進群ともに7日までは同様の変化を示しているが, 14日以降顕著な差が認められた. 非促進群では14日まで増加し, 以降プラトーとなった. 一方, 促進群でのdecorinの発現では7日から減少傾向がみられた. (n = 3 ; mean±SE)

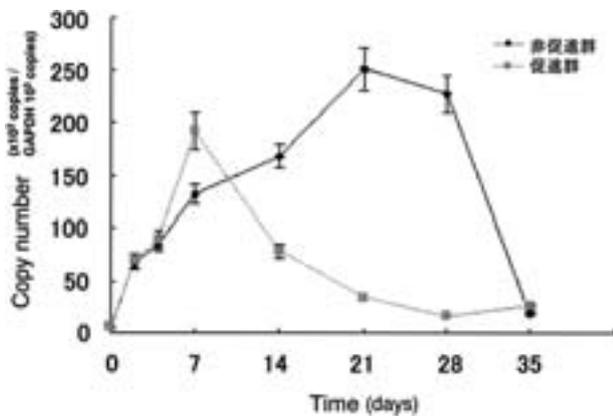


図5 MC3T3-E1細胞におけるbiglycan mRNAの発現変化
促進群では培養直後から急激な増加をはじめ, 7日でピークとなり, その後21日まで減少し, その後はプラトーとなった. 一方, 非促進群では, 21日まで増加を示し, その後は減少を示し, 35日ではほぼ促進群と同じ発現量まで低下した. 両群では, 石灰化期である21日と28日の発現量に顕著な差が認められた. (n = 3 ; mean±SE)

GeneAmp5700を用いてTaqMan probe法を適用した場合には, 少なくとも101コピーまでのcDNAの定量が可能であることが明らかになった (data not shown).

前述したように, Real-Time RT-PCR法はmRNA発現の定量に優れた方法ではあるが, conventional PCRを基本とした従来のすべての方法とも共通する問題点が指摘されている. Real-Time RT-PCR法では, すべての試料におけるGAPDHなどのhousekeeping geneの発現量が一定であるという考えに基づき, target geneの発現量を計算している. しかし近年, 実験条件, あるいは組織, 細胞系の違いによって一般的に用いられているinternal standardが変動を示し, 定量化における絶対的な基準とはなり得ないことが指摘されている (Medhurst et al., 2000 ; Bustin, 2002). この点に関して, Bustinは, in vitroの実験系におけるinternal standardとして2つ以上のhousekeeping geneを選択して, その実験条件における変

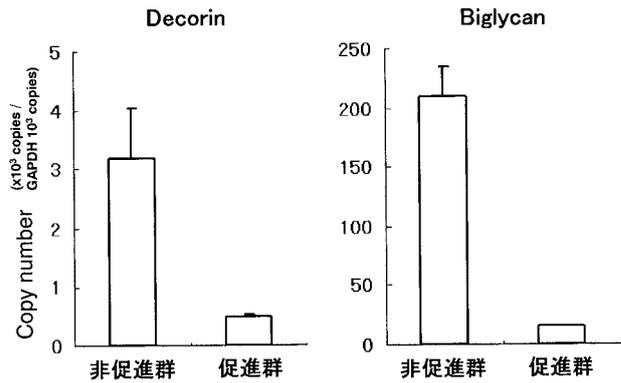


図6 培養28日における石灰化非促進群と促進群におけるproteoglycan mRNAの発現の比較
SLRPであるbiglycan (n = 3) mRNA発現量は石灰化促進群が非促進群の7.2%, decorin (n = 3) では19.4%と低い値を示していた. (n = 3 ; mean±SE)

動を検討し, normalizeを行うことを推奨している.

本研究では, 骨系培養細胞のPCR法でよく用いられているhousekeeping geneであるGAPDHとcyclophilin Aについてその変動を検討した. その結果, 前者のGAPDHにおいて培養期間を通じての発現量 (cDNAのコピー数) の変動が少なく, またPCR効率を表すslope値も理想である-3.3 (Medhurst et al., 2000) に近い値を示したことから, 本研究ではGAPDHをinternal standardとして用いた.

2. 骨芽細胞用細胞MC3T3-E1の分化・石灰化について

MC3T3-E1細胞は, 出生直後のマウス頭蓋冠からクローニングされた8つの細胞系の一つである (Kodama et al., 1981). この細胞系の特徴は, 高いalkaline phosphatase活性を伴う骨芽細胞への分化能と石灰化能 (Sudo et al., 1983), および高いコラーゲン合成能 (Chung et al., 1992) を有することであり, in vitroの実験系における石灰化過程の研究に最も多く利用されている細胞系の一つである.

MC3T3-E1細胞は, ascorbic acidとβ-GPを含む条件下で, 骨芽細胞の表現形をより高度に発現し, 石灰化した細胞外マトリックスを産生することが知られている (Marsh et al., 1995). この細胞系での石灰化過程には細胞周囲におけるコラーゲン基質の蓄積とその成熟が必要であり, ascorbic acidが欠如した条件下ではコラーゲン基質の蓄積が低下し, 生理的な石灰化ではなく細胞間あるいは培養液中における異所性の石灰化が出現する (Marsh et al., 1995). また, 本研究においても同様の結果が得られているが, 2つの添加試薬が無い状態では, ALPase活性の上昇はみられるが, 培養30日においても石灰化物の形成は認められないことを報告している

(Marsh et al., 1995). そこで本研究では, 培養液中への ascorbic acid と β -GP を付加の有無により, 石灰化促進群と石灰化非促進群に分け, 両群の各成長・成熟段階における decorin と biglycan の mRNA 発現の変化様相を比較検討した.

Ascorbic acid と β -GP の存在下では, MC3T3-E1 細胞は石灰化骨基質の形成に到る3つの相に分けられる成熟過程を経る (Quarles et al., 1992; Choi et al., 1996; Raouf and Seth, 2002). この成熟過程の第一相は, 培養9日から10日まで続き, 前骨芽細胞様細胞の活発な増殖を示す. この時期には, MC3T3-E1 細胞は *c-fos*, *c-myc*, *Est-1* などの細胞周期に関連する遺伝子を発現する (Choi et al., 1996; Raouf and Seth, 2002). 次の第二相は11日から25日の培養期間であり, 細胞は confluent 後, I型コラーゲン, fibronectin, osteonectin などの基質関連遺伝子を発現する (Quarles et al., 1992; Choi et al., 1996; Raouf and Seth, 2002). 第三相は, 25日以降であり, 石灰化に関連する osteocalcin, bone sialoprotein の発現が認められるようになる. 本研究での細胞数, ALP 活性および AR-S 反応の推移をみると, 第一相 (増殖期) は培養後7日間での間, 第二相 (基質形成期) は8日から20日, 第三相 (石灰化期) は21日から35日に対応していた. したがって, 本研究の石灰化促進群における MC3T3-E1 細胞の成長・成熟・石灰化過程は先の研究のものとはほぼ一致していた. 本研究の石灰化非促進群についてみると, 培養35日目で AR-S 反応がほとんど培養初期と同じ値を示したことから, 非促進群での第三相, すなわち石灰化相は無いものと判断できた.

3. Decorin と biglycan の骨形成との関わり

Decorin は I 型, II 型, III 型コラーゲン, fibronectin など, 他の細胞外マトリックスとの結合能を有し, マトリックス形成, 細胞接着, 細胞増殖などに関与していることが知られている (Scott and Haigh, 1985; Scott et al., 1995; Kuc and Scott, 1997). Vogel and Trotter (1987) は, 牛腱から抽出した decorin の存在下ではコラーゲン原線維の形成速度が抑制され, また形成されたコラーゲン原線維の直径も減少することを報告した. 一方, Kuc and Scott (1997) は, 牛関節円板あるいは皮膚から抽出した decorin を用いた同様の研究から, decorin はコラーゲン原線維の直径を増加させることを示した. このように, decorin のコラーゲン原線維形成に及ぼす影響に関しては統一された見解が得られずにいたが, 最近の decorin の knockout mouse を微細構造学的に検討した研究から, decorin が欠如した状態では, コラーゲン原線維の

直径には大きな影響がないものの, 原線維の太さが不均一になることが明らかにされた (Danielson et al., 1997). 一方, biglycan の機能については不明の点が多いが, *in vitro* の研究では, biglycan 分子が I 型コラーゲン原線維の表面上に集結し, その直径を増加させることが示された (Scott et al., 1995).

本研究での MC3T3-E1 細胞の石灰化促進群において decorin と biglycan の発現が高かったのは, 培養7日までであり, コラーゲン産生が盛んなマトリックス形成期 (Quarles et al., 1992; Choi et al., 1996; Raouf and Seth, 2002) にはそれらの発現が低い傾向を示した. したがって, 骨組織のコラーゲンを中心としたマトリックス形成期においては, 両 proteoglycan のコラーゲン原線維形成への関与は低いものと考えられる. しかし, decorin とコラーゲン原線維の形成との関係を *in vivo* の実験系で詳細にみた研究では, intact decorin (GAG鎖の結合した decorin) によるコラーゲン形成速度の減少および chondroitinase ABC 処理後の core protein だけによる同様の抑制効果が認められた (Kuc and Scott, 1997). したがって, 増殖期に一過性に増産される decorin が, あるいは biglycan も含まれる可能性もあるが, 増殖期におけるコラーゲン線維の形成を抑制している可能性が指摘できる.

ヒトあるいは牛骨由来の小型 proteoglycan のアミノ酸および核酸配列の解析から, 骨には decorin と biglycan の高い発現があり, その GAG 側鎖である chondroitin-6-sulphate とわずかな chondroitin-4-sulphate が存在することが明らかにされている (Fisher et al., 1987; Waddington and Embery, 2001). 免疫組織化学的研究から, 成人ヒトの骨では, decorin は骨小腔や骨細管の周囲, 静止期ハーバース管に局限していたのに対し, biglycan は皮質骨や骨梁に広く分布していることが報告されている (Ingram et al., 1993). 他の免疫組織化学的研究においても, 2つの proteoglycan は骨芽細胞および類骨に存在することが確認されている (Bianco et al., 1990; Kamiya et al., 2001). また, *in situ hybridization* を利用した研究では, decorin は骨膜全層にわたって比較的均一な発現を示すのに対し, biglycan は骨形成系の細胞が存在する骨膜内層に局限することから, decorin は full-time で関与するマトリックス構成要素であるのに対し, biglycan はマトリックス形成以外の細胞活性に関与することを指摘している (Bianco et al., 1990).

このように decorin と biglycan は, 骨芽細胞を含む骨系細胞の産生する主要な非コラーゲン性タンパク質であり, 骨組織の石灰化過程への影響に関して, 従来からい

くつかの研究が行われてきた。Scott and Haigh (1985) は、腱や皮膚などの軟組織結合組織に存在するのは dermatan sulphate proteoglycan であるのに対し、骨や象牙質などの石灰化組織では chondroitin sulphate proteoglycan をもつことから、dermatan sulphate を有する decorin あるいは biglycan に石灰化抑制作用があることを提唱した。但し、この時点では、decorin と biglycan のアミノ酸配列の断片的な情報しかなく、chondroitin sulphate と dermatan sulphate が 2 つの proteoglycan の GAG 鎖であることは明らかになっていなかった。その後、骨組織の石灰化過程に果たす機能に関して、in vitro の実験系を中心として研究が行われた。

Mochida ら (2003) は、decorin が石灰化を抑制することを報告している。これに対し、Fisher ら (2004) は、decorin が動脈平滑筋細胞における異所性の石灰化を促進することを報告しているが、これはあくまでも非生理的な石灰化過程での結果であり、このことを直接 in vivo の石灰化過程での現象としてみなすことはできない。

一方、in vivo の実験系に目を向けてみると、Young ら (2002) の decorin の knockout mouse を用いた骨形成に関する研究では、コラーゲン原線維の形態には異常を来すものの、骨形成、石灰化への影響はなかったとしている。また、先天的な骨の脆弱を主徴とする osteogenesis imperfecta (OI) の症例の非コラーゲン性タンパク質の特徴を正常者と比較した研究では、decorin の発現量に差は認められなかったとしている (Vetter et al., 1991)。一方、biglycan の knockout mouse では、生直後は骨格系に異常な所見は認められないものの、加齢に伴い骨粗鬆症や早発関節炎に類似した表現型を示す骨減少症、腱の異所性石灰化の進行が認められた (Xu et al., 1998; Ameye et al., 2002; Ameye and Young, 2002)。また、biglycan-knockout mouse 由来の骨芽細胞は、BMP-4 との結合能を消失し、BMP-4 の刺激に対する sensitivity が減少している。その結果、骨芽細胞の分化を誘導する転写因子である Cbfa 1 の発現の低下による骨芽細胞の分化が抑制されることを示した (Chen et al., 2004)。これらの knockout mouse を用いた研究は、biglycan が主に骨芽細胞の分化過程に対して促進的に作用していることを示しているが、knockout mouse では他の proteoglycan の補償的、代償的な発現の亢進も生じることから (Corsi et al., 2002; Ameye and Young, 2002)、decorin と biglycan が直接的に石灰化過程へ抑制的に作用しているかは不明である。

本研究での biglycan と decorin の mRNA の発現をみると、両者は類似した変化様相を示し、mRNA は増殖期に

増加、増殖期末期 (培養 7 日目) にピークを示し、その後の基質形成期 (8 日から 20 日) と石灰化期 (21 日から 35 日) では経時的に減少していくパターンを示した。また、石灰化促進群と非促進群の培養 28 日目における発現を比較すると、石灰化促進群の biglycan は非促進群に対し 7.2%、decorin は 19.4% の低い発現を示していた。したがって、MC 3 T 3 - E 1 細胞の mRNA の発現様相から判断すると、biglycan、decorin とともに、骨の石灰化には不要であり、石灰化期には発現が抑制されることが考えられる。このことは、いくつかの in vitro (Chen and Boskey, 1985; Severson et al., 1995; Mochida et al., 2003) および in vivo (Hoshi et al., 1999) の研究での所見とも一致している。

ラット骨由来の骨芽細胞 1 次培養系を用いて biglycan と decorin の mRNA 発現を conventional RT-PCR で半定量的に解析した研究 (Waddington et al., 2003) では、本研究で得られた結果と異なるパターンを示している。この研究によると、decorin が増殖期から石灰化初期にかけて経時的に増加を示したのに対し、biglycan は増殖期初期に比較的高い発現を示し、マトリックス形成期に発現がほとんどなくなり、その後の石灰化期で高い発現を維持しており、両 proteoglycan の石灰化期における高い mRNA 発現を報告している (Kimoto et al., 1994; Waddington et al., 2003)。本研究との違いに関しては正確なことはわからないが、培養細胞と培養条件の違いが関与している可能性が考えられる。彼らの実験では、培養液に dexamethasone が附加されており、また用いた細胞は細胞の population が不均一である骨組織由来の一次培養系 (Kimoto et al., 1994) である。Dexamethasone は、主に 1 次培養系に付加される薬剤であり、骨髄由来の osteoprogenitor 細胞の分化と石灰化を促進し、decorin の発現には促進的、biglycan には抑制的に作用する (Kimoto et al., 1994)。

結 論

骨芽細胞様細胞 MC 3 T 3 - E 1 の増殖、分化および石灰化過程において、増殖期に比べて decorin、biglycan は石灰化期で著しく低い発現を示した。Decorin と biglycan は、初期の細胞増殖を促進し、逆に石灰化に対しては抑制作用を有していることが示唆された。

文 献

- Ameye L and Young MF. Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. Glyco-

- biology 12 : 107–116, 2002.
- Ameye L, Aria D, Jepsen K, Oldberg A, Xu T and Young MF. Abnormal collagen fibrils in tendons of biglycan/fibromodulin-deficient mice lead to gait impairment, ectopic ossification, and osteoarthritis. *FASEB J* 16 : 673–680, 2002.
- Bessy O, Lowly O and Brock M. Method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* 164 : 321–329, 1946.
- Bianco P, Fisher LW and Young MF. Termine JD and Robey PG. Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J Histochem Cytochem* 38 : 1549–1563, 1990.
- Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR) : trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29 : 23–39, 2002.
- Chen CC and Boskey AL. Mechanisms of proteoglycan inhibition of hydroxyapatite growth. *Calcif Tissue Int* 37 : 395–400, 1985.
- Chen XD, Fisher LW, Robey PG and Young MF. The small leucine-rich proteoglycan biglycan modulates BMP-4-induced osteoblast differentiation. *FASEB J* 18 : 948–958, 2004.
- Choi JY, Lee BH, Song KB, Park RW, Kim IS, Sohn KY, Jo JS and Ryoo HM. Expression patterns of bone-related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem* 61 : 609–618, 1996.
- Chung CH, Golub EE, Forbes E, Tokuoka T and Shapiro IM. Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif Tissue Int* 51 : 305–311, 1992.
- Corsi A, Xu T, Chen XD, Boyde A, Liang J, Mankani M, Sommer B, Iozzo RV, Eichstetter I, Robey PG, Bianco P and Young MF. Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. *J Bone Miner Res* 17 : 1180–1189, 2002.
- Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE and Iozzo RV. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol* 136 : 729–743, 1997.
- Fisher LW, Hawkins GR, Tuross N and Termine JD. Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *J Biol Chem* 262 : 9702–9708, 1987.
- Fischer JW, Steiz S, Johnson P, Burke A, Kolodgie F, Virmani R, Giachelli C, and Wight TN. Decorin promotes aortic smooth muscle cell calcification and colocalizes to calcified regions in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 : 2391–2396, 2004.
- Hoshi K, Kemmotsu S, Takeuchi Y, Amizuka N and Ozawa H. The primary calcification in bones follows removal of decorin and fusion of collagen fibrils. *J Bone Miner Res* 14 : 273–280, 1999.
- Ibaraki K, Termine JD, Whitson SW and Young MF. Bone matrix mRNA expression in differentiating fetal bovine osteoblasts. *J Bone Miner Res* 7 : 743–754, 1992.
- Ingram RT, Clarke BL, Fisher LW and Fitzpatrick LA. Distribution of noncollagenous proteins in the matrix of adult human bone : evidence of anatomic and functional heterogeneity. *J Bone Miner Res* 8 : 1019–1029, 1993.
- Iozzo RV and Murdoch AD. Proteoglycans of the extracellular environment : clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J* 10 : 598–614, 1996.
- Iozzo RV. Minireview. The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive protein. *J Biol Chem* 274 : 18843–18846, 1999.
- Johnstone B, Markopoulos M, Neame P and Caterson B. Identification and characterization of glycanated and non-glycanated forms of biglycan and decorin in the human intervertebral disc. *Biochem J* 292 : 661–666, 1993.
- Kamiya N, Shigemasa K and Takagi M. Gene expression and immunohistochemical localization of decorin and biglycan in association with early bone formation in the developing mandible. *J Oral Sci* 43 : 179–188, 2001.
- Karsdal MA, Larsen L, Engsig MT, Lou H, Ferreras M, Lochter A, Delaisse JM and Foged NT. Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *J Biol Chem* 277 : 44061–44067, 2002.
- Kimoto S, Cheng SL, Zhang SF and Avioli LV. The effect of glucocorticoid on the synthesis of biglycan and decorin in human osteoblasts and bone marrow stromal cells. *Endocrinology* 135 : 2423–2431, 1994.
- Kodama H, Amagai Y, Sudo H, Kasai S and Yamamoto S. Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Jpn J Oral Biol* 23 : 899–901, 1981.
- Krusius T and Ruoslahti E. Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 7683–7687, 1986.
- Kuc IM and Scott PG. Increased diameters of collagen fibrils precipitated in vitro in the presence of decorin from various connective tissues. *Connect Tissue Res* 36 : 287–296, 1997.
- Marsh ME, Munne AM, Vogel JJ, Cui Y and Franceschi RT. Mineralization of bone-like extracellular matrix in the absence of functional osteoblasts. *J Bone Miner Res* 10 : 1635–1643, 1995.
- Medhurst AD, Harrison DC, Read SJ, Campbell CA, Robbins MJ and Pangalos MN. The use of TaqMan RT-PCR assays for semiquantitative analysis of gene expression in CNS tissues and disease models. *J Neurosci Methods* 98 : 9–20, 2000.
- Mochida Y, Duarte WR, Tanzawa H, Paschalis EP and Yamauchi M. Decorin modulates matrix mineralization in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 305 : 6–9, 2003.
- Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R and Wenstrup RJ. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture : an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res* 7 : 683–692, 1992.
- Raouf A and Seth A. Discovery of osteoblast-associated genes using cDNA microarrays. *Bone* 30 : 463–471, 2002.
- Roberts WE. Bone physiology, metabolism, and biomechanics in orthodontic practice. In : Graber TM, editor. *Orthodontics—Current Principles and Techniques*. Philadelphia : Mosby, 1994, pp193–234.
- Roughley PJ, White RJ, Magny MC, Liu J, Pearce RH and Mort JS. Non-proteoglycan forms of biglycan increase with age in human articular cartilage. *Biochem J* 295 : 421–426, 1993.
- Scott JE and Haigh M. Proteoglycan-type I collagen fibril interactions in bone and non-calcifying connective tissues. *Biosci Rep* 5 : 71–81, 1985.
- Scott PG, Nakano T and Dodd CM. Small proteoglycans from differ-

- ent regions of the fibrocartilaginous temporomandibular joint disc. *Biochim Biophys Acta* 1244 : 121–128, 1995.
- Severson AR, Ingram RT and Fitzpatrick LA. Matrix proteins associated with bone calcification are present in human vascular smooth muscle cells grown in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31 : 853–857, 1995.
- Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S and Kasai S. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 96 : 191–198 ; 1983.
- Vetter U, Fisher LW, Mintz KP, Kopp JB, Tuross N, Termine JD and Robey PG. Osteogenesis imperfecta : changes in noncollagenous proteins in bone. *J Bone Miner Res* 6 : 501–505, 1991.
- Vogel KG and Trotter JA. The effect of proteoglycans on the morphology of collagen fibrils formed in vitro. *Coll Relat Res* 7 : 105–114, 1987.
- Waddington RJ and Embery G. Proteoglycans and orthodontic tooth movement. *J Orthod* 28 : 281–290, 2001.
- Waddington RJ, Roberts HC, Sugars RV and Schonherr E. Differential roles for small leucine-rich proteoglycans in bone formation. *Eur Cell Mater* 6 : 12–21, 2003.
- Wilda M, Bachner D, Just W, Geerkens C, Kraus P, Vogel W and Hameister H. A comparison of the expression pattern of five genes of the family of small leucine-rich proteoglycans during mouse development. *J Bone Miner Res* 15 : 2187–96, 2000.
- Wittwer C. Rapid cycle real-time PCR : methods and application. In : *Rapid Cycle Real-Time PCR*. In : Meure S, Wittwer C and Nakagawara K editors. *Quantification on the LightCycler*. Berlin : Springer-Verlag, 2001, pp1–8.
- Xu T, Bianco P, Fisher LW, Longenecker G, Smith E, Goldstein S, Bonadio J, Boskey A, Heegaard AM, Sommer B, Satomura K, Dominguez P, Zhao C, Kulkarni AB, Robey PG and Young MF. Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nat Genet* 20 : 78–82, 1998.
- Young MF, Bi Y, Ameye L and Chen XD. Biglycan knockout mice : new models for musculoskeletal diseases. *Glycoconj J* 19 : 257–262, 2002.