

〔原 著〕

株化骨細胞MLO-Y4-A2におけるPTH受容体遺伝子の メカニカルストレスによる発現

岡山 三紀^{***}, 荒川 俊哉^{**}, 谷村 明彦^{***}, 溝口 到^{*}, 田隈 泰信^{**}^{*}北海道医療大学歯学部歯科矯正学講座^{**}北海道医療大学歯学部口腔生化学講座^{***}北海道医療大学歯学部歯科薬理学講座

Mechanism of PTH receptor induction by fluid shear stress in the osteocyte-like cell line MLO-Y4-A2

Miki OKAYAMA^{***}, Toshiya ARAKAWA^{**}, Akihiko TANIMURA^{***},
Itaru MIZOGUCHI^{*} and Taishin TAKUMA^{**}^{*}Department of Orthodontics, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido^{**}Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido^{***}Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Abstract

Osteocytes are generally accepted to function as sensors for mechanical stress, which are deeply involved in bone homeostasis. However, the signal transduction mechanism of mechanical stresses in osteocytes is still mostly unclear. Here the effect of fluid shear stress on gene expressions of MLO-Y4-A2 cells, a murine osteocyte-like cell line, was investigated. When shear stress was loaded on the MLO-Y4-A2 cells, PTH receptor mRNA increased to 5 to 8 times over the control level. The PTH receptor protein and cAMP levels were also increased by the shear stress. The increase in the PTH receptor mRNA was not inhibited by U-0126 (ERK kinase inhibitor) or indomethacin (COX-2 inhibitor). Luciferase reporter analysis indicated that the P1 promoter region of the PTH receptor gene includes cis-elements for transcription control by shear stress. These results suggest that in osteocytes the mechanical stress induces PTH receptor increases, which in turn amplify the effect of PTH and/or PTHrP on bone remodeling.

緒 言

歯に矯正力を加えると、歯周組織には圧迫側と牽引側という力学的環境の異なる二つの領域

が形成される。力の作用方向に対応する圧迫側では、歯槽骨は吸収され、一方、牽引側では骨形成を生じ、結果として歯は力の作用方向に移動する。このように矯正学的な歯の移動は、機

受付：平成16年4月1日

械的刺激（メカニカルストレス）に対する歯周組織の生物学的な一連の過程である。歯の移動にともなう歯周組織の研究では破骨細胞、骨芽細胞、線維芽細胞などを対象としたものがほとんどであり、歯槽骨内の骨細胞の動態に関しては、いまだ不明な部分が多い。

骨細胞は骨に存在するもっとも多い細胞で、骨芽細胞の10倍以上存在する¹⁾。骨細胞は骨小腔内に存在するが、細く長い細胞突起をのばして隣接する骨細胞同士がお互いに接触するばかりでなく、この細胞突起は骨表面にも達し、骨芽細胞や破骨細胞とも接触している²⁾。このように骨細胞は細胞間にネットワークを張りめぐらし、骨に加わるメカニカルストレスに対するセンサーの役割を担っているのではないかと考えられてきた。実際、メカニカルストレスの一つであるシェアストレスは、骨細胞において、eNOS³⁾、COX-2^{4,6)}、Connexin43^{7,8)}などのmRNAを誘導することが報告されている。また、ニワトリ頭頂骨から分離された骨細胞は、骨芽細胞や破骨細胞に比べメカニカルストレスに対する反応性が高いと報告されている⁹⁻¹²⁾。骨細胞は骨に加わるメカニカルストレス（骨にかかる重力、骨小腔内液の流れ、骨の伸縮やたわみ）を感知し、何らかのシグナルを骨芽細胞や破骨細胞に伝達し、骨のリモデリングに重要な役割を果たしている可能性が推察されている。

骨細胞を用いた過去の研究の多くは、骨組織から調製したプライマリー細胞を使用しているため、分子生物学的解析を加えることは極めて困難であった。最近、テキサス大学のBone-wald博士ら¹³⁾は、オステオカルシンのプロモーターとSimian virus 40(SV40)のlarge T-antigen遺伝子を結合したトランスジェニックマウスを作製し、その長管骨より骨細胞様の株細胞、MLO(Mouse long bone)-Y4、を樹立した。MLO-Y4細胞はオステオカルシンやCD44など骨細胞に特徴的な遺伝子の高い発現が認められ、骨細

胞のin vitro 実験モデルとして期待されている。

本研究では、多様な細胞形態を含むMLO-Y4細胞から、細胞突起を数多く有し、より骨細胞に近い形態をもつ細胞としてクローニングされたMLO-Y4-A2細胞を用い、シェアストレス負荷に応答する遺伝子群の検索を試みた。その結果、シェアストレスに応答して副甲状腺ホルモン(PTH)レセプターの発現が亢進することを見だし、その発現調節機構を分子生物学的手法を用いて解析した。

材料と方法

1. 細胞の培養

MLO-Y4-A2細胞は、2.5% fetal bovine serum (FBS), 2.5% calf serum(CS)含有の α MEM（ペニシリン 1 mg/ml, ストレプトマイシン 1 mg/ml, グルタミン 200 μ M添加）を用い、タイプIコラーゲンをコートした100mmのプラスチック培養皿上で、37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂環境下にて培養した。MC3T3-E1細胞は5%FBS含有の α MEMを用いて、100mmプラスチック培養皿上で培養した。

2. シェアストレスの負荷

60%コンフルエントになるまで静置培養した細胞を、CO₂インキュベーター内に入れた振盪機をもちいて、Ogataの方法¹⁴⁾に従い往復運動（90サイクル/分）により培養液を動かし、シェアストレスを負荷した。

3. RNAおよびDNAの調製

培養液を除いた培養皿にISOGEN 1 ml（和光純薬）を加え、細胞をスクレイパーで剥離回収した後、テフロン・ガラスホモジナイザーでホモジナイズし、マニュアルにしたがって全RNAを精製した。マウスの脳0.2gにDNAzol Reagent 1 ml (GibcoBRL)を加え、ポリトロンホ

モジナイザーにより組織をホモジナイズし、マニュアルに従ってDNAを抽出した。

4. プライマーの設計

骨関連遺伝子の塩基配列はアメリカNIH付属

のNCBIより取得し、Web上のプライマー設計ソフト (Primer Selection) およびGCG Wisconsin Package (Accelrys) を用いて、PCRに使用するプライマーを設計した。設計したプライマーは表1に示した。

表1 本実験で使用したプライマー

	Forward	Reverse
GAPDH	: 5'-ctaccccccaatgtgtccgtctgtg -3'	; 5'-gatggaaattgtgaggggatgc -3'
COX-2	: 5'-gggttgctgggggaagaaatgtg -3'	; 5'-ggtggctgttttgtagctgtg -3'
VtD-R	: 5'-cctctgtgacctggacctg -3'	; 5'-ggctggaaggagagggaacg -3'
PTH-R	: 5'-gtgcaggcagagattaggaagtc -3'	; 5'-tgaatagacagccagccaaactc -3'
Est-R α	: 5'-ttctgatgattggctctctctgg-3'	; 5'-tccgggggtatgtagtagggttg -3'
Est-R β	: 5'-ctggacagggatgaggggaagtg -3'	; 5'-ccctcttttctcttactgtcctc -3'
Osteocalcin	: 5'-ccatgaggacctctctctctctc -3'	; 5'-tttggagctgctgtgacatccat -3'
Connexin 43	: 5'-gtggcctgctgagaacctacatc -3'	; 5'-ttttttggcattttggctgtctc -3'
CD44	: 5'-cccacatgctacaagcacaactcc -3'	; 5'-tttcttgcatcttttagcgcgctc -3'
APLase	: 5'-tcggataacgagatgccaccagag -3'	; 5'-tccttcaccagcaagaagaagcc -3'
Osteopontin	: 5'-agcagacactttcactccaatcg -3'	; 5'-tgtttttgcctctctttagttg -3'
eNOS	: 5'-ttgatgtgctgcccctgttactcc-3'	; 5'-tttccaccgctgcttctcttcc-3'
iNOS	: 5'-cactcagccaagcctcacctac -3'	; 5'-tctctgcatcttctctctgatag -3'
TGF- β 1	: 5'-cgggatcagccccaaacgtcg -3'	; 5'-ggcttgccgaccacgtagtag -3'
TGF- β 2	: 5'-gagcgagcaggagtactacgc -3'	; 5'-gtaggcagcatccaaagcgcg -3'
TGF- β 3	: 5'-ctcttccagatacttcgaccg -3'	; 5'-agtcaatataaagggggcgta -3'
IGF-1	: 5'-gtggatgctcttttagttctgtg -3'	; 5'-tgttatttgtaggtgttctg -3'
IGF-2	: 5'-agtttctctgttctcgaccgc -3'	; 5'-ggtctttgggtggttaacacg -3'

VtD-R: ビタミンDレセプター PTH-R: 副甲状腺ホルモンレセプター

EstR- α : エストロゲンレセプター EstR- β : エストロゲンレセプター

APLase: アルカリフォスファターゼ

5. cDNAの合成, PCRおよびLightCyclerによるmRNAの定量

逆転写酵素 Super Script II (GibcoBRL, 200 units) を用い, oligo (dT) (0.5 μ g) をプライマーとして1 μ gのtotal RNAからcDNAを合成した (全量20 μ l, 42 $^{\circ}$ C, 60分間インキュベーション). 合成されたcDNA 1 μ lを鋳型として, Ampli Taq Gold Kitと各種プライマーを混合し, GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem) を用いてPCR反応を行った. PCR産物は, 1.5%アガロースゲル (1 μ g/mlエチジウムブロマイド含有) を用い, 0.5x TE泳動Buffer中で電気泳動し, ライトキャプチャー (ATTO) で検出・定量した. mRNAをより厳密に定量す

るため, LightCycler (Roche) を用い定量的PCRを行った. SYBR Green assay kit (Roche) を用い, 上記のcDNA 1 μ lを鋳型として, マニュアルに従い反応を行った. 反応結果は付属のソフトを用いて解析した.

6. ウエスタンブロッティング

細胞のペレットにSDS-sample bufferを直接添加し溶解後, 100 $^{\circ}$ Cで5分間変性処理をおこなった. 5-20%のグラジエントゲルを用いSDS-PAGE後, タンパクをPVDF膜に転写した. 転写膜をブロックエースにて4 $^{\circ}$ Cで一晩, または, 室温で2時間ブロッキングした後, 適宜希釈したそれぞれの一次抗体と4 $^{\circ}$ Cで一晩, また

は、室温で1時間インキュベート後、0.05% Tween 20を含むPBS (PBST)で10分づつ3回洗った。引き続き2次抗体 (HRP標識抗マウスIgG抗体およびHRP標識抗ウサギIgG抗体)で処理し、抗原のタンパク・バンドをECL plusおよびライトキャプチャー (ATTO)を用いて検出した。検出されたバンドの定量はライトキャプチャーに付属のデンスシトメトリーソフトを用いて行った。

7. タンパク量の定量

タンパクの定量はBradford Protein Assay Kit (Bio-Rad)を用い、牛血清アルブミン (BSA)をスタンダードとして行った。

8. cAMPおよびカルシウム濃度の測定

PTH刺激の30分前に1 mMのIBMXで前処理した細胞を、10 μ 200nMのPTHで2分間刺激した。cAMPは1-Propanolにて、4 $^{\circ}$ C、24時間抽出し、125I cAMP測定キット (ヤマサ)を用いて測定した。Fura-2を取り込ませた細胞を10 μ 200nMのPTHで刺激し、細胞内Ca²⁺濃度の変化をCa²⁺画像解析システム (ARGUS HiSCA, 浜松フォトンクス)を用いてモニターした。

9. プロモーターLuciferase Vectorの構築

マウスの脳より調製したDNA100ngを鋳型として、FastStart Taq DNA Polymerase Kit (Roche)を用いて、マウスPTHレセプターのプロモーターエンハンサー領域 (P1; 670 bp, P2 a; 1080 bp, P2b; 464 bp)をPCR法により増幅した。用いたプライマーはP1 (5'-aactgctgagctgtctctcg-3', 5'-tccacaggccttcaaacgg-3'), P2 a (5'-gaagatctttcaggtcaccacgcttaaa-3', 5'-cccaagcttcggccgctgctccgag acgc-3'), P2b (5'-tgag tcagctctcaaccg -3', 5'-actaggactctcccgtatc -3')である。増幅したそれぞれのプロモーター領域をpGL3-Basic Lu-

ciferase Vector (Promega)のマルチクローニングサイトにRapid DNA Ligation Kit (Roche)を用いて導入し、プロモーター活性測定用Luciferase Vectorを構築した。

10. プラスミドDNAの調製と細胞への導入

構築したLuciferase Vectorで形質転換した大腸菌を200mlのLB培地で一晚培養後、Qiagen tip-500plasmid kit (Qiagen)にてプラスミドを精製した。プロモーター領域を含むLuciferase Vector (1 μ g)と遺伝子導入効率を補正するためのpRL-TK Luciferase Vector (インターナルコントロール) (0.05 μ g)をEffectene Transfection Reagent Kit (Qiagen)を用いてMLO-Y4-A2細胞に導入した。

11. Luciferase活性の測定

プラスミドを導入した細胞にシェアストレスを負荷した後、PBS(-)で洗浄後、スクレイパーで細胞を剥離回収した。Dual-Luciferase Reporter Assay System Kit (Promega)を用い、MiniLumat LB9506 (PerkinElmer)でluciferase活性を測定した。シェアストレスを負荷していない細胞のluciferase活性を測定し、コントロールとした。

12. 共焦点レーザー顕微鏡観察

細胞を1%パラホルムアミドで30~60分固定後0.1%Triton X-100に1時間浸漬し、PBSで5分間3回洗浄した。アクチン線維を蛍光検出するため、PBSで最終濃度0.7 μ g/mlに希釈したAlexa-Phalloidinで4 $^{\circ}$ C、2日間処理後、PBSで5分間3回洗浄した。さらに核を染色するため、PBSで最終濃度1 μ g/mlに希釈したDAPIで室温、1時間処理した。染色処理を行った細胞は共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-SP, Lica)を用いて観察し、蛍光画像をTCS-NT4で取り込み、コンピュータ処理を行った。

結果

1. MLO-Y4-A2細胞の特性とMC3T3-E1細胞との比較

MLO-Y4-A2細胞は図1に示すように、骨細胞の形態的特徴である多数の樹状突起を持ち、Phalloidin染色ではそれらの突起を介して隣接する細胞と互いに接触していることが確認された。次に、骨由来細胞で発現が確認されている遺伝子について、表1に示したプライマーを用い、RT-PCR法によってその発現を検討し、株化骨芽細胞MC3T3-E1と比較した。図2-(a)に示すように、MLO-Y4-A2細胞では、オステオカルシン (OCN)、CD44、アルカリフォスファ

ターゼ (ALPase)、オステオポンチン (OPN)、Connexin-43のmRNAが発現していた。一方、MC3T3-E1細胞では、OCN、ALPase、OPN、Connexin-43は発現していたが、CD44遺伝子の発現は確認されなかった。さらに、ホルモン・レセプターやサイトカインの発現について同様に比較検討した。MC3T3-E1細胞では、ビタミンDレセプター (VitD-R)、PTHレセプター (PTH-R)、エストロゲンレセプター α (EstR α)、エストロゲンレセプター β (EstR β)、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3の発現が見られた。一方、MLO-Y4-A2細胞では、MC3T3-E1細胞で発現していたPTH-R、EstR β 、EstR β 、TGF- β 1、TGF- β 3の発現が認められなかった (図2-(b))。こ

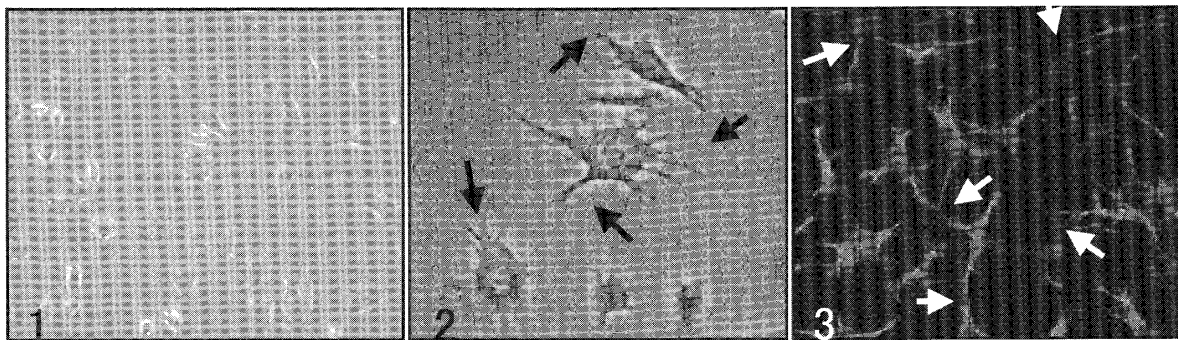


図1 株化骨細胞MLO-Y4-A2の顕微鏡像。1,2:位相差顕微鏡像;放射状に拡がった多くの突起(黒い矢印)が確認される。2は1の強拡大。3:DAPIとPhalloidinで二重染色した細胞の共焦点レーザー顕微鏡像;細胞が突起を介して接している(白い矢印)のが確認される。赤:DAPIによる核染色 緑:Phalloidin染色。

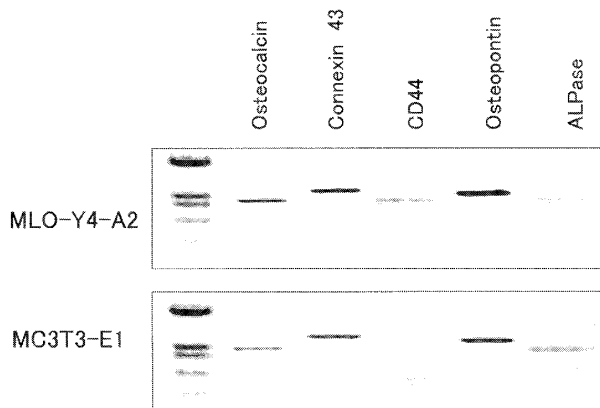


図2-(a) RT-PCRによる株化骨細胞MLO-Y4-A2と株化骨芽細胞MC3T3-E1の遺伝子発現の比較。骨芽細胞や骨細胞での発現が報告されているOsteocalcin(423bp)、Connexin43(592bp)、CD44(484bp)、Osteopontin(512bp)、Alkase(414bp)の定常状態の発現量を比較した。

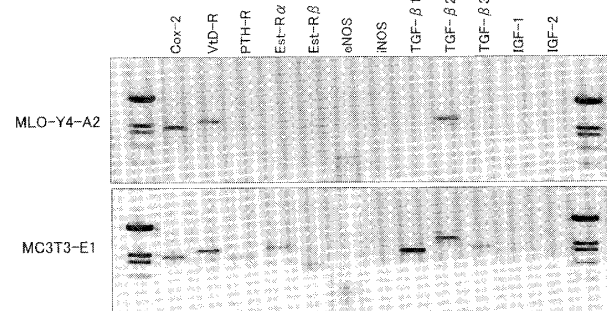


図2-(b) RT-PCRによる骨関連遺伝子発現の比較。Cox-2(478bp)、VtD-R(583bp)、PTH-R(464bp)、EstR- α (604bp)、EstR- β (485bp)、eNOS(347bp)、iNOS(627bp)、TGF- β 1(410bp)、TGF- β 2(645bp)、TGF- β 3(426bp)、IGF-1(382bp)、IGF-2(371bp)の遺伝子発現をMLO-Y4-A2細胞とMC3T3-E1細胞で比較した。

これらの結果は、骨芽細胞から骨細胞へ分化する過程で発現が亢進する遺伝子と、逆に、発現が低下または失われる遺伝子が存在することを示唆している。

2. シェアストレスにตอบสนองする遺伝子

MLO-Y4-A2細胞をコラーゲンコートした培養皿上で培養し、Ogataの方法¹⁴⁾に従い、振盪機を用いて毎分90サイクルの往復運動によってシェアストレスを負荷した。これらの細胞より全RNAを抽出し、図2-(a)および(b)で同定された骨関連遺伝子についてそれぞれの発現量の変化をRT-PCR法によって検討した。その結果、図3に示すように、PTH-R、Est-R α 、シクロオキシゲナーゼ2 (COX-2) の発現量が、シェアストレスの負荷によって増加した。

3. シェアストレス負荷によるPTHレセプター mRNA誘導

これまで、PTHを添加してメカニカルストレスを負荷すると、メカニカルストレスによるタンパクやmRNAの誘導がさらに増強されるという報告がいくつか存在する¹⁵⁻¹⁸⁾。そこで、図3で同定したシェアストレスにตอบสนองする遺伝子の中からPTHレセプターに注目し、シェアストレス負荷によるmRNAの発現について詳細に検討した。図4に示すように、シェアストレス負荷によるPTHレセプターmRNAの発現量は1時間後から徐々に増加し、7時間後にピークを迎え、24時間後ではシェアストレス負荷前のレベルまで低下した。mRNA発現量の経時変化をコンピューターソフト (ATTO) によるデンストメトリーで定量化した。恒常的に発現していると考えられるGAPDHのmRNA発現量を内部コントロールとしてノーマライズすると、PTHレセプターmRNAの発現量は、ピークの7時間後では対照と比べて約5.2倍に増加し、24時間後では、対照と同じレベルまで減少していた。同様

の処理をおこなったサンプルをLightCyclerを用いた定量的RT-PCR法によって分析した結果、0時間と発現ピークの5~7時間ではPCRのサイクル数で約2~3サイクルの差があった。これはPCRの理論上の増幅率では、4~8倍の差に相当し、図4で示した結果を支持した。

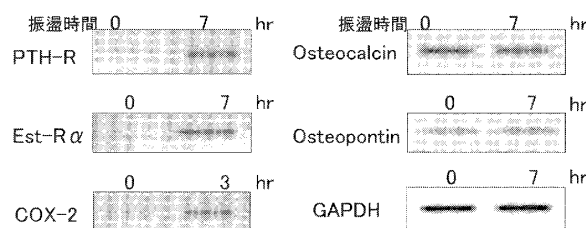


図3 シェアストレス負荷による遺伝子発現の変化。シェアストレス負荷によりPTH-R、EstR- α 、COX-2のmRNAに発現増強が見られた。

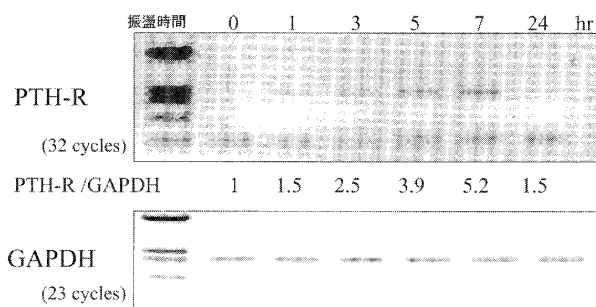


図4 シェアストレスを負荷した MLO-Y4-A2細胞におけるPTH-R mRNAの経時変化。PTH-R mRNAの発現量はGAPDHで補正後、0時間の発現量を1とする相対値で示した。

4. ERKリン酸化とPTHレセプターの誘導

MC3T3-E1細胞にシェアストレスを負荷すると、MAP Kinaseの一つであるERK-1がリン酸化され、COX-2が誘導されることが報告されている¹⁹⁾。MLO-Y4-A2細胞においても、COX-2がシェアストレスの負荷によって誘導されることから(図2-(a))、ERKのリン酸化がPTHレセプターの誘導と関連しているかどうか検討した。MLO-Y4-A2細胞にシェアストレスを負荷すると、ERK-1は15分をピークにリン酸化された(図5)。ERK-1のリン酸化は負荷前を1と

すると、ピーク時には約3倍に増加していた。また、ERK-2はERK-1とは逆にシェアストレス負荷前の状態ではリン酸化されていたが、シェアストレスの負荷で脱リン酸化された。ERK kinaseの阻害剤U-0126 (20 μ M)を添加し同様の実験を行った結果、ERK-1のリン酸化は阻害され、ERK-2は完全に脱リン酸化された。ERKリン酸化のPTHレセプターmRNA発現に及ぼす影響を評価するため、U-0126添加後シェアストレスを負荷し、経時的にPTHレセプターmRNAの変化を定量した。その結果、PTHレセプター発現に対するU-0126添加の阻害効果は見られず(図6)、シェアストレス負荷によるPTHレセプターの誘導はERKのリン酸化とは無関係であることが明らかとなった。

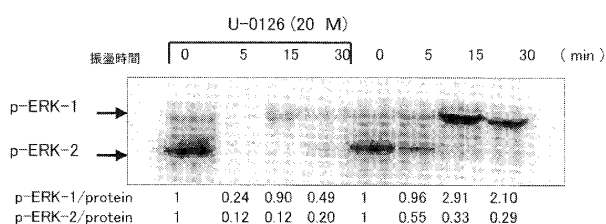


図5 シェアストレス負荷によるERKリン酸化とERKキナーゼ阻害剤(U-0126)の影響。ERK1/2のリン酸化は抗リン酸化抗体を用いたウエスタンブロット法で定量した。

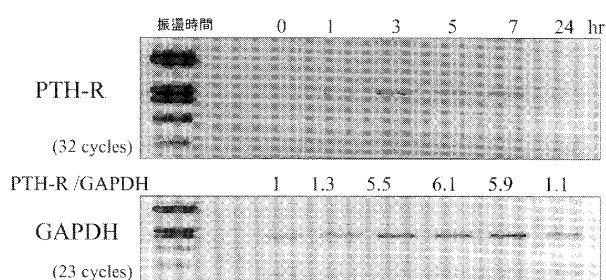


図6 ERKキナーゼ阻害剤U-0126の効果。U-0126 (20 mM)添加後、シェアストレスを負荷しPTH-R mRNAの発現量をRT-PCRで定量した。

5. COX-2シグナル伝達経路の関与

Prostaglandin E2 (PGE2)が骨芽細胞の増殖と分化を促進することが報告されている^{12,20-22)}。また、シェアストレスはCOX-2のmRNAを誘導し、その結果PGE2が合成され

る。そこでシェアストレスによるPTHレセプターmRNAの誘導が、COX-2/PGE2シグナル経路の下流に位置するかどうかを、COX阻害剤及びPGE2を用いて検討した。COX阻害剤であるインドメタシン (20 μ M)を培養液に添加し、シェアストレスによるPTHレセプターmRNAの誘導に対する影響を調べたが、インドメタシンの阻害効果は認められなかった(図7)。さらに、PGE2 (1mM)添加の効果を検討したが、PTHレセプターmRNAの誘導効果は認められなかった(データは示さない)。これらの結果は、シェアストレスによるPTHレセプターmRNAの発現誘導がCOX-2のシグナル経路とは別経路で調節されていることを示唆している。

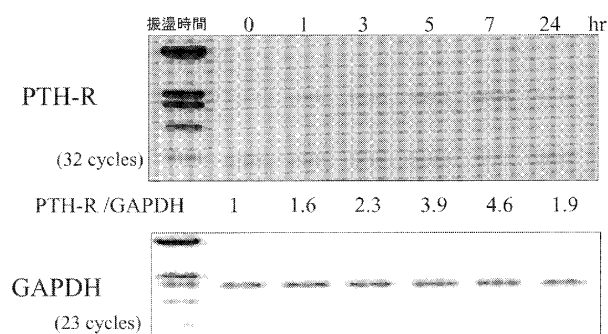


図6 ERKキナーゼ阻害剤U-0126の効果。U-0126 (20 mM)添加後、シェアストレスを負荷しPTH-R mRNAの発現量をRT-PCRで定量した。

6. PTHレセプターのタンパク・レベルでの発現

シェアストレスの負荷によるPTHレセプターの発現をタンパクレベルで検討した(図8)。MLO-Y4-A2細胞にシェアストレスを負荷し、PTHレセプターのタンパク発現量を抗マウスPTHレセプター抗体を用いたウエスタンブロット法によって経時的に測定した。PTHレセプタータンパクは7時間から増加をはじめ、15時間後にピークとなり、ストレス負荷24時間後ではピーク時の半分以下に減少した。eBERUを、ピーク時(15時間)でのPTHレセプタータンパク

の発現量は、コンピューターソフトによるデンストメトリーで定量的に比較すると、シェアストレス負荷前の約7.4倍であった。

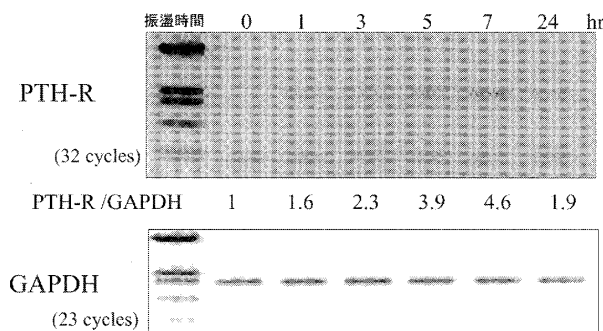


図7 COX阻害剤インドメタシンの効果. インドメタシン (20mM) 添加後, シェアストレスを負荷し, PTH-R mRNAの発現量をRT-PCRで定量した.

7. PTHレセプターの細胞内情報伝達

PTHレセプターはGsとGqの2種類のGタンパク質と共役する可能性が報告されている. GsとGqのαサブユニットはそれぞれcAMP合成酵素とホスホリパーゼC (PLC) を活性化し, 細胞内cAMPおよびCa²⁺濃度を上昇させる. そこで, シェアストレスの負荷によって誘導されたPTHレセプターがどちらのGタンパク質と共役しているかを明らかにするため, cAMPとCa²⁺の濃度変化を測定した. その結果, cAMP量はシェアストレスを負荷していない細胞に比べ, 約2倍に増加した. しかしCa²⁺濃度に変化は認められなかった (データは示さない). また, 骨芽細胞株MC3T3-E1細胞で同様にcAMP濃度の変化を測定した結果, シェアストレス負荷による変化は見られなかった. これらの結果か

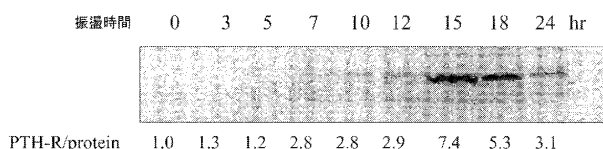


図8 シェアストレスを負荷したMLO-Y4-A2細胞におけるPTH-Rタンパクの経時的变化. ウェスタンブロット法を用いてPTH-Rタンパクの発現量を定量した.

ら, MLO-Y4-A2細胞ではPTHレセプターは主にGsと共役していることが明らかとなった.

8. シェアストレスにตอบสนองするプロモーター・エンハンサー

PTHレセプター遺伝子には2カ所 (TS1, TS2) の転写開始部位が同定されている. 骨の細胞ではより下流側にある転写開始部位 (TS2) から転写が開始されることが報告されている. そこで, 転写調節に関わる領域を同定するため, ルシフェラーゼベクターを構築し, ルシフェラーゼアッセイを行った. 図9に示すように, 3つのルシフェラーゼベクター (i; P2a領域のみを組み込んだベクター, ii; P1-P2a領域を組み込んだベクター, iii; P2b-P2a領域を組み込んだベクター) を構築した. MLO-Y4-A2細胞に遺伝子導入し, シェアストレス負荷の前後でルシフェラーゼ活性を比較した. その結果, P1-P2a領域を含むベクターを導入した細胞では, シェアストレス負荷により4倍以上のルシフェラーゼ活性の上昇が見られた. 他方, P2a領域のみ, あるいはP2b-P2a領域には同様の効果は認められなかった. これらの結果は, P1領域にシェアストレスにตอบสนองする転写調節部位が存在することを示している.

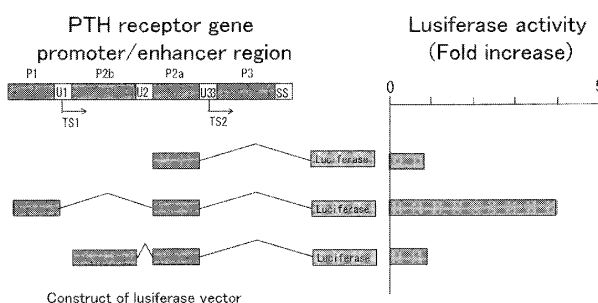


図9 シェアストレスにตอบสนองするPTH-R遺伝子のプロモーター/エンハンサー領域の決定. 各領域の転写調節能をシェアストレス負荷前後のルシフェラーゼ活性の増加率で比較した.

考察

1. メカニカルストレスにตอบสนองする遺伝子

これまで骨細胞や骨芽細胞では、メカニカルストレスに応答して誘導される遺伝子群として、eNOS/NO⁵⁾、COX-2^{5,6)}、Connexin 43^{7,8)}、Insulin-like growth factor (IGF)²³⁾、などが報告されている。NOとプロスタグランジンはそれぞれ気体と脂質であり、拡散によって比較的速く骨組織を透過し、標的細胞に到達することが可能と思われる。IGFは細胞表面から組織液に分泌後、メカニカルストレスによって起こされる組織液の流れに乗って近傍の標的細胞に到達し作用すると考えられる。Connexin43は細胞突起間のギャップジャンクションを介した物質の移動を調節し、細胞間のコミュニケーションを制御すると考えられる。本研究の結果、シェアストレスはMLO-Y4-A2細胞のPTHレセプターを発現誘導することが明らかとなった。しかし、シェアストレスで誘導されたPTHレセプターがどのようなメカニズムで骨代謝に関わっているのかは現在のところ不明である。

2. PTHレセプターと共役する細胞内シグナル

PTH受容体は7回膜貫通型のレセプターであり、type-1～type-3の3つのアイソフォーム(PTH-R1～3)が存在する。PTH-R1は主に骨と腎臓に分布し、そのcDNAは1991年Juppnerらによってフクロネズミからクローニングされた²⁴⁾。PTH-R2は脳や脊髄に多く分布し、この他、膵臓、心臓、消化管にも発現が認められている²⁵⁾。PTH-R3はゼブラフィッシュで同定されているが哺乳動物での報告はまだない²⁶⁾。PTH-R1にはPTHとPTHrPがいずれも結合し、Gsと共役することが知られている²⁷⁾。他方、PTHレセプターはGqとも共役し細胞内Ca²⁺濃度を上昇させ、プロテインキナーゼC (PKC)を活性化する可能性が指摘されている²⁸⁾。しかし、これまでの研究から、PTH-R1はGqを介してPLCを活性化することは可能であるが、その活性化能は低く、Gsを介するcAMP合成酵素の

活性化がPTH-R1の主要なシグナル伝達経路であると考えられている²⁹⁾。シェアストレスの負荷によって誘導されたPTHレセプターがどちらのGタンパク質と共役しているかを明らかにするため、PTH (1-34)を添加してcAMPとCa²⁺の濃度変化を測定した。その結果、cAMP量はシェアストレスを負荷しない細胞に比べ、約2倍に増加したが、Ca²⁺濃度に変化は認められなかった。これらの結果は、PTHレセプターがMLO-Y4-A2細胞でも主にGsと共役していることを示しており、これまでの多くの報告と一致した。

3. 骨細胞のメカノセンサーとその細胞内シグナル

骨細胞は、骨芽細胞や破骨細胞に比べ、メカニカルストレスに対する感受性が高くメカノセンサーとして働いているのではないかと考えられている^{4,5,10)}。これまでの報告によるとメカニカルストレスを感知する受容器としてはVolume sensitive calcium channel (VSCC)、インテグリン、CD44などが候補となっている。今回我々はMLO-Y4-A2細胞にCD44が発現していることを確認したが、シェアストレスに反応してCD44の発現が増加する現象は見られなかった(データは示していない)。また、VSCCの選択的インヒビターと考えられているガドリニウムはシェアストレスによるIGFの誘導を阻害することから、VSCCを介した細胞内カルシウム濃度の上昇がシェアストレスの情報伝達系に関わっているさせることが示唆されている¹⁸⁾。しかしながら、今回我々はPTHレセプターmRNAの誘導に対するガドリニウムの影響を検討したが、明確な結論には到らなかった。今後はこれらを中心にメカニカルストレスのセンサーに関する解析を進めたいと考えている。

細胞膜上に存在すると想像されるメカノセンサーが感知した情報は、細胞内情報伝達系を経

て核に到達し、核で特異的な遺伝子の転写を調節すると考えられているが、その詳細は不明である。シェアストレスによるCOX-2の発現には、MAP kinaseの一種ERKのリン酸化が関与し、そのリン酸化を阻害するU-0126はCOX-2の発現を阻害することが知られている¹⁹⁾。しかしながら、本研究では、U-0126はERKのリン酸化は阻害した(図5)が、シェアストレスによるPTH受容体mRNAの発現を抑制しなかった(図6)。同様に、COX阻害剤であるインドメタシンもシェアストレスによるPTHレセプターmRNAの発現を抑制せず(図7)、また、プロスタグランジン(PGE2)単独ではPTHレセプターmRNAの発現を誘導しなかった。これらの結果は、シェアストレスによるPTHレセプターの発現誘導機構と、COX-2の発現に関わる情報伝達系は別経路であることを示している。

4. PTHレセプターの転写調節

マウスのPTH-R1の遺伝子は2つのグループによって1994年にそれぞれクローニングされた^{30,31)}。このPTHレセプター遺伝子からは2つの転写物(1.5kbおよび2.3kb)が転写されることが報告されている³²⁾。すなわち、図8に示すように、転写開始部位TS1および転写開始部位TS2が同定されており、それぞれにプロモーター領域が存在する。TS1のプロモーター領域P1は、G+Cに富む領域やTATA Boxを含まず、代わりにCCAAT Boxが存在した³³⁾。また、我々が、アクセルリ社のGCG Wisconsin Packageプログラムを使いP1領域の転写因子結合部位を検索した結果、転写因子NFκB, AP1, SP1に対するコンセンサス配列が存在した。他方、TS2のプロモーター・エンハンサー領域P2は、典型的なTATA Boxを欠くが、G+Cに富み、多くのSP1結合配列を含んでいる。ルシフェラーゼアッセイの結果、MLO-Y4-A2細胞のシェアストレスに応答するプロモーター・エンハンサー領

域はP1に存在することが明らかとなった。これまでP1領域は腎臓と肝臓のみで転写される2.3kbの転写物のプロモーター・エンハンサー領域と考えられてきた。しかし、本研究の結果から、P1領域は腎臓や肝臓特異的に働く領域ではなく、骨を含む他の臓器においても転写調節領域として機能している可能性が示唆された。

5. 骨粗鬆症治療薬とメカニカルストレス

骨粗鬆症の治療薬として、現在、エストロゲン誘導体やビスホスホネートが閉経後の女性に広く使用され、骨折防止効果が認められている²⁹⁾。骨粗鬆症における骨量減少では、骨吸収の亢進と骨形成の低下が同時に起きているものと考えられる。PTHは連続的に投与すると骨吸収が亢進するが、間歇的に投与すると海面骨などの骨量が増加することが知られている³⁴⁾。しかし、この骨量増加効果は坐骨神経を切除した不活化ラットにおいては減弱した³⁵⁾。このことは、PTHがその効果を発揮するにはメカニカルストレスの負荷が重要であることを示唆している。今回我々はシェアストレスによってPTHレセプターが誘導されることを見いだした。PTHの作用はPTHレセプターへの結合によってなされることから、PTHレセプターの増加はPTHの効果を増大させる可能性がある。これまで、PTHを添加してメカニカルストレスを負荷すると、メカニカルストレスによるタンパクやmRNAの誘導がさらに増強されるという報告がいくつか存在する¹⁵⁻¹⁸⁾。本研究の結果より、PTHの投与とメカニカルストレスの負荷を平行して行うことで、骨粗鬆症の治療効果が高まる可能性が示唆された。

6. 矯正歯科治療とメカニカルストレス

矯正力を歯に負荷すると、力の作用方向に対応する歯槽骨表層には圧迫力が、作用方向と逆

の歯槽骨表層には牽引力が負荷され、歯槽骨の弾性変形が初期反応として生じる。どのような種類のメカニカルストレスが歯槽骨内の骨細胞に加わっているかは不明であるが、歯槽骨内の骨細胞が歯の移動時になんらかのメカニカルストレスを受けているものと考えられる。また、矯正学的歯の移動における骨のリモデリングは、歯根に対応した歯槽骨表層部に限局して見られるものではなく、歯槽骨全体に認められ、骨の吸収と形成が同時平行的に進行することで、歯槽骨の骨量を一定に保つように働く。このような歯槽骨全体に及ぶリモデリングには、本研究で認められたPTH受容体の発現を含む分子メカニズムが関与している可能性が考えられる。今後、この可能性も含めて歯の移動時における骨のリモデリングの分子メカニズムを解明していきたいと考えている。

結 論

株化骨細胞MLO-Y4-A2を用い、メカニカルストレスの一つであるシェアストレスに対する応答を分子生物学的手法を用いて解析し、以下の結果を得た。

1. MLO-Y4-A2細胞は、シェアストレス負荷に反応し、PTHレセプターをmRNAレベルおよびタンパク・レベルで誘導した。
2. シェアストレス負荷によるPTHレセプターの誘導はERK, COX-2, PGE2を介するシグナル伝達系とは別経路であった。
3. 誘導されたPTHレセプターはPTHに反応し、細胞内cAMP濃度の上昇を引き起こしたが、細胞内カルシウム濃度には影響しなかった。
4. PTHレセプター遺伝子のP1領域に、シェアストレスに反応し、転写を正に調節するプロモーター・エンハンサーが存在した。

株化骨細胞MLO-Y4-A2を用いた以上の研究

結果より、骨細胞は骨に加わるメカニカルストレスに反応し、PTHレセプター遺伝子の発現を誘導することで骨代謝を調節している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、MLO-Y4-A2細胞の分与ならびに細胞特性について種々ご指導して頂きましたテキサス大学Bonewald博士、旭化成株式会社、加藤洋一先生、また、骨代謝の研究を基礎からご指導して頂きました明海大学歯学部、羽毛田慈之教授、久米川正好名誉教授に心より感謝申し上げます。また、本研究を進める上でご協力を頂きました北海道医療大学歯学部歯科矯正学講座の大石洋平先生、泰間康平先生に深謝致します。最後に懇篤なるご指導ならびにご校閲を賜りました東城庸介教授（北海道医療大学歯学部歯科薬理学講座）に深甚なる謝意を表します。

文 献

1. Parfitt A M : The cellular basis of bone turnover and bone loss : a rebuttal of the osteocytic resorption--bone flow theory. *Clin Orthop* **127** : 236-47, 1977.
2. Favus with Sylvia Christakos : Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. Lippincott Williams and Wilkins : 80-86, 1999.
3. Klein-Nulend J, Helfrich M H, Sterck J G H, MacPherson H, Joldersma M, Ralston S H, Semeins C M, and Burger E H : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **250** : 108-114, 1998.
4. Klein-Nulend J, Burger E H, Semeins C M, Raisz L G, and Pilbeam C C : 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.
5. Westbroek I, Ajubi N E, Alablas M J, Semeins C M, Klein-Nulend J, Burger E H, and Nijweide P J : Differential stimulation of prostaglandin G/H synthase-2 in os-

- teocytes and other osteogenic cells by pulsating fluid flow. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268** : 414-419, 2000.
6. Joldersma M, Burger E H, Semeins C M , and Klein-Nulend J : Mechanical stress induces COX-2 mRNA expression in bone cells from elderly women. *J. Biomech.* **33** : 53-61, 2000.
 7. Yellowley C E, Li Z , Zhou Z, Jacobs C R , and Donahue H J : Functional gap junctions between osteocytic and osteoblastic cells. *J. Bone Miner. Res.* **15** : 209-217, 2000.
 8. Cheng B, Zhao S, Luo J, Sprague E, Bonewald L F, and Jiang : Expression of functional gap junctions and regulation by fluid flow in osteocyte-like MLO-Y4 cells. *J. Bone Miner. Res.* **16** : 249-259, 2001.
 9. Klein-Nulend J, Semeins C M, Ajubi N E, Nijweide P J, and Burger E H : Pulsating fluid flow increases nitric oxide (NO) synthesis by osteocytes but not periosteal fibroblasts-correlation with prostaglandin upregulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217** : 640-648, 1995a.
 10. Klein-Nulend J, Van der Plas A, Semeins C M, Ajubi N E, Frangos J A, Nij weide P J , and Burger E H : Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. : *FASEB J.* **9** 441-445, 1995b.
 11. Ajubi N E, Klein-Nulend J , Nijweide P J, Vrijheid-Lammers T, Alblas M J, and Burger E H : Pulsating fluid flow increases prostaglandin production by cultured chicken osteocytes-a cytoskeleton-dependent process. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225** : 62-68, 1996.
 12. Woodiel F N, Fall P M, and Raisz L G : Anabolic effects of prostaglandins in cultured fetal rat calvariae : Structure-activity relations and signal transduction pathway. : *J. Bone Miner. Res.* **11**, 1249-1255, 1996.
 13. Kato Y, Windle J J, Koop B A , Mundy G R , and Bonewald L F : Establishment of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. *J. Bone Miner. Res.* **12** : 2014-2023, 1997.
 14. 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.
 15. Chow J W M , Fox S , Jagger C J, and Chambers T J : Role for parathyroid hormone in mechanical responsiveness of rat bone. *Am J Physiol* **274** : E146-154, 1998.
 16. Sekiya H, Mikuni-Takaaki Y, Kondoh T, and Seto K : Synergistic effect of PTH on the mechanical responses of human alveolar osteocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264** : 719-723, 1999.
 17. Ryder KD and Duncan RL : Parathyroid hormone modulates the response of osteoblast-like cells to mechanical stimulation. *Calcif. Tissue Int.* **67** : 241-246, 2000.
 18. Miyauchi A, Notoya K, Mikuni-Takagaki Y, Takagi Y, Goto M, Miki Y, Takano-Yamamoto T, Jinnai K, Takahashi K, Kumegawa M, Chihara K, and Fujita : Parathyroid hormone-activated volume-sensitive calcium influx pathways in mechanically loaded osteocytes. *J. Biol. Chem.* **275** : 3335-3342, 2000.
 19. Wadhwa S, Godwin S L, Peterson D R, Epsten M, Raisz L G, and Pilbeam C C : Fluid flow induction of cyclooxygenase 2 gene expression in osteoblasts is dependent on an extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *J. Bone Miner. Res.* **17** : 266-274, 2002.
 20. Flanagan A M, and Chambers T J : Stimulation of bone nodule formation in vitro by prostaglandin E1 and E2. *Endocrinology* **130** : 443-448, 1992.
 21. Scutt A, and Bertram P : Bone marrow cells are targets for the anabolic action of prostaglandin E2 one bone : Induction of transition from nonadherent to adherent osteoblast precursors. *J. Bone. Miner. Res.* **10** : 474-487, 1995.
 22. Weinreb M, Saponitzky I, and Keila S : Systemic administration of an anabolic dose of PGE2 in young rats increases the osteogenic capacity of bone marrow. *Bone* **20** : 521-526, 1997.
 23. Sakai A, Sakata T, Ikeda S, Uchida S, Okazaki R, Norimura T, Hori M, Nakamura T : Intermittent administration of human parathyroid hormone (1-34) prevents immobilization-related bone loss by regulating bone marrow cell capacity for bone cells in ddY mice. *J. Bone Miner. Res.* **14** : 1691-1699, 1999.
 24. Juppner H, Abou-Samra AB, Freeman M, Kong XF, Schipani E, Richards J, Kolakowski LF Jr, Hock J, Potts JT Jr, Kronenberg HM : A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* **254** : 1024-1026, 1991.
 25. Usdin T B , Gruber C, and Bonner T I : Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, PTH2 receptor. *J. Biol. Chem.* **270** : 15455-15458, 1995.
 26. Rubin D A , Hellman P, Zon L I , Lobb C J ,

- Bergwitz C, and Juppner H : A G protein-coupled receptor from zebrafish is activated by human parathyroid hormone and not by human or teleost parathyroid hormone-related peptide : Implications for the evolutionary conservation of calcium-regulating peptide hormones. *J. Biol. Chem.* **274** : 23035-23042, 1999.
27. Iiri T, Farfel Z, Boume H R : G-protein diseases furnish a model for the turn-on switch. *Nature* **394** : 35-38, 1998.
28. Abou-Samra AB, Juppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF, Schipani E, Urena P, Richards J, Bonventre JV, Potts JT Jr : Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells : a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol triphosphates and increases intracellular free calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** : 2732-2736, 1992.
29. 尾形悦郎, 池田恭治, 福本誠二 : PTH/PTHrPの基礎と臨床, 2002.
30. McCuaing K A, Clarke J C, and White J H : Molecular cloning of the gene encoding the mouse parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** : 5051-5055, 1994.
31. Kong X F, Schipani E, Lanske B, Joun H, Karperien M, Defize L H K, Juppner H, Potts J T, Segre G V, Kronenberg H M, and Abou-Samra A B : The rat, mouse and human genes encoding the receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide are highly homologous. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200** : 1290-1299, 1994.
32. Urena P, Kong X F, Abou-Samra A B, Juppner H, Kronenberg H M, Potts J T Jr and Segre G V : Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide (PTHrP) receptor mRNA are widely distributed in rat tissues. *Endocrinology* **133** : 617-623, 1993.
33. McCuaing K A, Lee H, Clarke J C, Assar H, Horsford J, and White J H : Parathyroid hormone/parathyroid hormone related peptide receptor gene transcripts are expressed from tissue-specific and ubiquitous promoters. *Nucleic Acids Res.* **23** : 1948-1955, 1995.
34. Kalu DN, Doyle FH, Pennock J, Foster GV : Parathyroid hormone and experimental osteosclerosis. *Lancet.* **1** : 1363-1366, 1970.
35. Sakai K, Mohtai M, and Iwamoto Y : Fluid shear stress increases transforming growth factor beta 1 expression in human osteoblast-like cells : modulation by cation channel blockades. *Calcif Tissue Int.* **63** : 515-20, 1998.