

平成21年5月20日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791230  
 研究課題名（和文） NOおよびNO関連物質を応用した骨・軟骨系細胞の効果的誘導、増殖機構の解明  
 研究課題名（英文） Bone and cartilage cell's mechanism of inducement and proliferation using Nitric oxide.  
 研究代表者  
 古敷谷 昇 (KOSHIKIYA NOBORU)  
 城西大学・薬学部・准教授  
 研究者番号：20396724

研究成果の概要：効果的骨誘導技術の確立を最終目標に、一酸化窒素関連物質の骨代謝機構における役割の解明を目指した。一酸化窒素のシグナル伝達機構ではカルシウムイオンが関与している可能性が大きいことに着目した。この結果、細胞内一酸化窒素の増加に伴って細胞内カルシウムイオン濃度が変動する現象を見出した。その経路はほぼ同定され、骨形成作用のシグナル伝達に関連があることから臨床応用の可能性が高いと考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：骨芽細胞、一酸化窒素、カルシウムイオン、骨再生、シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

様々な臓器、組織において一酸化窒素(NO)の作用は検討されている。骨形成機構においてNO及びcGMPは重要な代謝調節因子である。一般的に、NO合成酵素(NOS)のうちiNOSは骨吸収作用があると言われている。マウス由来骨芽細胞の単一培養系にNOSのうち

eNOSが存在し、非炎症条件下ではeNOSが主に働くことが言われている。また産生されたNOは骨芽細胞を分化促進し骨形成に作用することを骨化の指標であるアルカリホースファターゼ活性の上昇とオステオカルシンの発現などで証明されている。それに基づいて低濃度のNOは骨芽細胞増殖の代謝調節

因子として作用するとの報告がされ、eNOS による低濃度の NO は骨におけるエストロゲン活性の代謝調節因子であるとの報告がある。ゆえに、eNOS によって構成的に産生される NO は骨形成作用を持つと考えられる。NO の細胞内シグナル伝達機構については、NO がグアニル酸シクラーゼを活性化し、cGMP が産生され、G キナーゼの活性化を介すという経路が報告されている。また、細胞内カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) は多くの細胞機能の発現に重要な役割を担っている基本的な生体内シグナル伝達物質であり、骨関連細胞においても同じである。以上の点から研究代表者は NO の細胞内シグナル伝達機構においても  $\text{Ca}^{2+}$  が関与している可能性に着目した。

本研究では NO あるいは NO 関連物質の機能解析を行い、更には、その促進、抑制物質の開発を含む骨再生に向けての臨床応用の可能性を検討する。

骨関連細胞においてこのような NO の  $\text{Ca}^{2+}$  を介したシグナル伝達経路を検討し、効果的骨誘導技術の確立への応用を試みるのは本研究が初めてであり、新たな方向性をもたらすものになると考えられる。骨再生研究における医学的な課題は、いかに活性を保った細胞を効果的に増やし骨形成を有利にするかにある。本研究は骨関連細胞でこの課題を新たな視点から解決しようとする提案である。

## 2. 研究の目的

効果的骨誘導技術の確立は、骨再生医療の最終目標であるが、従来のアプローチは研究限界に達している。NO および NO 関連物質はさまざまな作用を持つが、その骨代謝機構における役割はほとんど解明されていない。研究代表者は NO の骨形成作用に関するいくつかの結果を得ており、今回、骨形成作用を細胞レベルで検討し、その機構を明らかにし、

臨床応用の基礎的基盤を確立したい。本研究は、新たな側面からのアプローチを骨関連細胞に対して行う実験的研究である。臨床応用へ向けた基礎的データを蓄積することを目的に以下を行う。

- (1) 骨関連細胞の NO 代謝に関連した特異性を検討し、従来の増殖法の欠点を解明する。
- (2) (1) を基盤に骨関連細胞を効果的に増殖させ、骨細胞へと分化誘導する技術を確立する。
- (3) 骨関連細胞における NO に関連した反応活性発現様式について検討し、反応活性を効果的に賦活する技術を確立する。
- (4) 臨床応用への可能性 (in vivo での最適化など) を検討する。

## 3. 研究の方法

本研究においては正常マウス胎仔頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1)、ヒト骨髄細胞、および primary culture の細胞系 (マウス) を研究対象とした。

まず、各細胞系の増殖性因子および分化培地の条件の違いによる細胞増殖曲線の変動、およびヒト骨髄細胞の骨芽細胞への分化能の評価を行った。

併せて、NO あるいは NO 関連物質、サイトカイン等の様々な生理活性物質に対する反応活性を検討した。

上記により確立された、細胞外環境の至適条件において一貫して研究を継続した。

細胞をスライドガラス付き測定用培養皿に播種し 37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件下で  $\alpha$ -MEM 培地で培養し、各実験に供した。

NO の細胞内シグナル伝達機構においては  $\text{Ca}^{2+}$  が関与している可能性が大きいことに着目し、 $\text{Ca}^{2+}$  反応を二次元画像として記録し、解析を行なった。 $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光試薬の Fura-2AM を  $\alpha$ -MEM 中で負荷し、細胞内カルシウムイオン濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 測定を行った。細胞を、倒立顕微鏡に置き、340nm および 380nm の近紫外光を交互に細胞に照射して励起した蛍光から、ダイクロイックミラーによって 400nm 以上の波長のみを選択して高

速冷却 CCD カメラにて撮影し、340nm および 380nm 励起時のそれぞれの蛍光画像をデジタル化して記録することにより  $[Ca^{2+}]_i$  を測定し、画像解析を行った。本研究では各測定時点での F340/F380 比 (F: Fluorescence intensity) を静止時の F340/F380 比で除算した相対値(Ratio value)を  $[Ca^{2+}]_i$  値の指標として採用した。

$$\text{Ratio value} = \frac{\text{各測定時点でのF340/F380比}}{\text{静止時のF340/F380比}}$$

(F: Fluorescence intensity)

このように、生細胞の状態での反応変化を個々の細胞レベルで測定し、NO の  $Ca^{2+}$  シグナルへの影響を検討した。

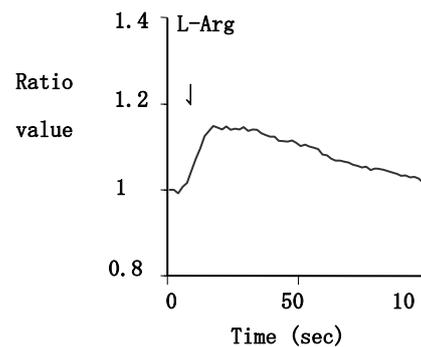
また、mRNA レベルでの反応活性について、骨関連遺伝子の発現を PCR 法で確認し、検討した。

#### 4. 研究成果

反応性を検討した結果、骨芽細胞は増殖性の低下が、一部の生理活性物質に対する反応活性の低下に直結するという他の細胞種と大きく異なる特異性を見出した。その骨芽細胞の特異的な形質を念頭におき、効果的な継代時期を検討し、細胞外環境の至適条件を確立した。

生細胞の状態での反応変化を個々の細胞レベルで測定し、NO および NO 関連物質、その他の生理活性物質の  $Ca^{2+}$  シグナルへの影響を検討した結果、細胞内 NO の増加に伴って細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が変動する現象を見出した。

代表的 NO 関連物質である L-アルギニン (L-Arg) 投与後の反応性を(図)に示す。



(図 L-Arg 投与後の反応)

$Ca^{2+}$  経路について検討の結果、多くの知見を得た。その経路はほぼ同定され、その確認実験を繰り返した。

その経路は骨形成作用に関わるシグナル伝達に関連があることから臨床応用の可能性が高いと考えられた。

また、mRNA レベルでの反応活性について、骨関連遺伝子の発現を PCR 法で確認し、検討し、確認を得た。

今回、骨形成作用を細胞レベルで検討し、臨床応用へ向けた基礎的データを蓄積することを達成した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

古敷谷 昇 (KOSHIKIYA NOBORU)

城西大学・薬学部・准教授  
研究者番号：20396724

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書