

内軟骨性骨形成における副甲状腺ホルモンの役割

佐竹田 久

Roles of Parathyroid Hormone in Endochondral Bone Formation

Hisashi Satakeda

(平成8年1月11日受付)

緒 言

軟骨細胞は成長板において、増殖期、基質産生期、肥大期を経た後骨に置き換わる。軟骨細胞は増殖期において扁平な増殖軟骨細胞として盛んに分裂した後、基質産生期ではⅡ型コラーゲンやプロテオグリカンなどの細胞外基質を大量に産生する。その後、直径が5倍から10倍もある肥大軟骨細胞へと最終分化し、アルカリホスファターゼ (ALPase)¹⁾、1,25 (OH)₂ ビタミン D₃ 受容体¹⁾、X型コラーゲン²⁾を産生する。次いで、肥大軟骨細胞は石灰化を誘導し、石灰化した軟骨は骨に置換される。基質産生層において産生された細胞外基質は肥大層では著しく減少する。細胞外基質の分解は軟骨基質から骨基質への転換に不可欠である以外に、細胞の肥大化、細胞小柱構造の形成、成長板での軟骨細胞の移動などにも関連している。この基質分解には侵入した血管系の細胞や破軟骨細胞以外に、軟骨細胞自身が産生する中性プロテアーゼであるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) が関与していると考えられている。

現在までに一次構造の異なる13種類の MMP が同定されている。MMP は正常な組織の形成過程で、また、各種の病態において、細胞外基質の分解と改造に関与している。内軟骨性骨化においても、コラーゲナーゼ、ゼラチナーゼ、ストロメライシンなどの MMP が合成される³⁻⁵⁾。コラーゲナーゼはⅠ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ型コラーゲン、ゼラチン、プロテオグリカンなどを分解する。ゼラチナーゼは、ゼラチン、Ⅳ、Ⅴ、Ⅷ型コ

ラーゲン、プロテオグリカン、エラスチンなどを分解する。ストロメライシンは、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ラミニン、Ⅳ型コラーゲンなど様々な基質タンパクを分解する。

一方、副甲状腺ホルモン (PTH) は84個のアミノ酸から構成される分子量9,500の単鎖のポリペプチドで、そのアミノ末端側の [1-34] の領域は血中カルシウム値の恒常性の維持に必要な十分な活性を担っている。多くの組織について行った ¹²⁵I-PTH [1-34] の結合実験で、PTH 受容体は成長板で最も高レベルに発現していた⁶⁾。in situ hybridization 法でも、PTH 受容体は成長板に限局して発現していることが観察されている⁷⁾。PTH は胎生期の軟骨細胞に対して強力な増殖促進作用を示し⁸⁾、また、年齢を問わず軟骨細胞内の cAMP レベルを上昇させ、軟骨型プロテオグリカンの合成を促進する⁹⁾。最近の研究で、ウサギ軟骨細胞培養系において、PTH は細胞の肥大化や石灰化を抑制する他に、ALPase 活性、X型コラーゲン合成、1,25 (OH)₂ ビタミン D₃ 受容体数の増加を抑制することも明らかとなった⁶⁾。なお、PTH によるこれらの抑制作用は可逆的である。

以上のように、内軟骨性骨形成において PTH は重要な役割を演じている。しかしながら、軟骨基質の分解あるいは MMP 合成に対する PTH の作用は未だ明らかではない。MMP の合成と活性は、転写レベル、潜在型から活性型への変換および内因性インヒビターである tissue inhibitor of MMP (TIMP) による MMP 活性の阻害の3段階で制御されている。したがって、本研究ではウサギ軟骨細胞培養系を用いて、各種 MMP の活性、MMP-2 の蛋白と mRNA レベルおよび TIMP レベルに及ぼす PTH の影響を検討した。また、各種の合成 PTH ペプチドを用いて、PTH 分子のどこの領域が MMP-2 合成の亢進に関与しているかを

広島大学歯学部歯科補綴学第一講座 (主任: 赤川安正教授) 本論文の要旨は、平成7年3月の第8回日本軟骨代謝学会、平成7年8月の第13回日本骨代謝学会および平成7年9月の第37回歯科基礎医学会において発表した。

検討した。

材料および方法

I. 試薬

リコンビナント・ヒト PTH [1-84] および合成 PTH [1-34] は中外製薬より供与された。ヒト PTH [35-84], PTH [57-84], PTH [60-84], PTH [71-84], PTH [35-70] および PTH [39-68] はペプチドシンセサイザー (Applied Biosystems 社, モデル 430A) で合成した後, 逆相高速液体クロマトグラフィー (島津社, モデル LC-6A, LC-8A) で精製した。

II. 軟骨細胞培養

ウサギ肋軟骨および膝関節軟骨細胞は生後4週齢の日本白色ウサギ種 (体重約 400 g) (広島実験動物) より, Shimomura ら¹⁰⁾, Kato ら¹¹⁾ の方法に準じて分離した。すなわち, 肋軟骨成長板部および大腿骨遠位膝関節軟骨部を分離し, メスにて軟骨を 0.5×0.5×0.5 mm に細切した後, 0.1% EDTA, 0.1% トリプシン含有 phosphate buffered saline (PBS) 中にて 37°C で1時間インキュベートした。PBS にて3回の洗浄後, 肋軟骨成長板軟骨は0.05%, 大腿骨遠位関節軟骨は0.15%のコラゲナーゼ (Worthington Biochemical 社) を含有するダルベッコ変法イーグル培地 (日水製薬) 中にて, 37°C でそれぞれ3時間, 2時間50分インキュベートした。その後, 緩やかにピペッティングを行い, 120 μm ナイロンメッシュを通過する細胞を回収した。

分離した軟骨細胞は, 12 μg/ml のII型コラーゲン (高研) 含有 0.1 M NaHCO₃ 溶液と 37°C で2時間インキュベートすることによりコラーゲンでコートした 96 well, 24 well あるいは 6 well 組織培養用プレート (Corning 社) に 1 cm² あたり 2.5×10⁴個の細胞を播種し, 10%胎仔ウシ血清 (三菱化成社), 60 μg/ml カナマイシン (明治製薬), 50 μg/ml アスכולピン酸 (和光純薬), 250 ng/ml アンホテリシン B (ICN Biochemical 社), 32単位/ml ペニシリンを含むアルファ変法イーグル培地 (αMEM) (三光純薬) にて, 37°C, 5% CO₂ 気相下で培養した。播種後5日目より2日毎に培地交換を行った。また, アスכולピン酸 (50 μg/ml) は培地交換時に毎回添加した。軟骨細胞培養1, 2, 4週目に細胞層を PBS にて3回洗浄し, 0.2%ウシ血清アルブミン含有の αMEM に交換した。その後, PTH [1-84] あるいは各種の合成 PTH ペプチドを添加し, さらに12~96時間インキュベートした。対照には vehicle を添加した。

III. MMP 活性の測定

TIMP 非結合画分の潜在型および活性型 MMP の総量を測定するために培養上清を用いた。培養上清に含まれる MMP は, セリンプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼの阻害剤である 2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) と 5 mM N-ethylmaleimide (NEM) 存在下で, アミノフェニル酢酸水銀 (APMA) により活性化した。37°C で1時間に 1 μg の基質を分解する活性を1ユニット (U) とし, 培養上清 1 ml あたりの活性 (U/ml) として各種 MMP の活性を評価した。

ゼラチナーゼ活性は, 熱処理した [¹⁴C] acetylated type I collagen を基質に用い, 1 mM 4-aminophenylmercuric acetate 存在下で Harris ら¹²⁾ の方法に準じて測定した。コラゲナーゼおよびストロメライシン活性の測定は, 培養上清を 1.5 mM 4-aminophenylmercuric acetate 存在下で 37°C, 20時間プレインキュベートした。次いで, コラゲナーゼは [¹⁴C] acetylated type I collagen を基質に用い, Cawston ら¹³⁾ の方法に準じて活性を測定した。ストロメライシンは [³H] carboxymethylated transferrin を基質として用い, Oka-da ら¹⁴⁾ の方法に準じて活性を測定した。

IV. ゼラチンザイモグラフィ

回収した培養上清を還元剤不含の Laemmli 緩衝液と混合し, 1.0 mg/ml ゼラチン含有のゲルにて SDS-PAGE を行った。泳動後, SDS を除去するため, 2.5% Triton-X100 で30分間洗浄を2回行い, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) で10分間洗浄した。ゲルを 5 mM CaCl₂, 0.2 M NaCl, 0.02% NaN₃ 含有の 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中にて 37°C で24時間インキュベートし, 固定後 Coomassie Brilliant Blue で染色した。酵素活性は非染色のバンドとして出現した。

V. イムノプロット, サンドイッチ ELISA

培養上清中のタンパクは10% 2-melcaptoethanol 存在下あるいは非存在下で SDS-PAGE により分離した。ゲル中のタンパクは Towbin ら¹⁵⁾ の方法に準じて polyvinylidene difluoride 膜 (PVDF 膜) (Millipore 社) に転写した。すなわち, 転写バッファーとして 0.025 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.2 M glycine, 0.05% SDS を用い, BIO-RAD 社製転写装置に氷冷下にて 40 V の定電圧で60分間通電した。非特異的反応をブロックするために, 転写後の PVDF 膜を 4% の脱脂ミルク含有 PBS 中に室温にて90分間浸した。PBS で洗浄後, 抗ヒト MMP-2 モノクローナル抗体あるいは抗ヒト TIMP-2 モノクローナル抗体 (2 μg/ml) を 4°C で12時

間インキュベートした。PBS で洗浄後, $[^{125}\text{I}]$ 抗マウス IgG 抗体 (1/1000希釈) (Amersham 社) と 37°C で 3 時間インキュベートした。その後 0.1% Tween 20 含有 PBS にて洗浄をし, 室温にて風乾した後, オートラジオグラフィを行った。

TIMP-1 のサンドイッチ ELISA には, 2 種類の抗ヒト TIMP-1 モノクローナル抗体を用いた測定用キット (富士薬品工業株式会社) を使用した。

VI. total RNA の回収

各群とも細胞層を 4M guanidine thiocyanate, 0.1M Tris-HCl (pH 7.5), 0.1% 2-mercaptoethanol, 0.5% N-lauroyl sarcosine 溶液中でポリトロン型マイクロホモゲナイザー (日音社) にてホモゲナイズし, ホモゲネート (8 ml) を 3,000 g で遠心した。この上清を比重 1.57 に調整した cesium trifluoroacetate (CsTFA), 1 mM EDTA 溶液 (8 ml) 上に重層し, 200,000 g にて 24 時間遠心した後, 沈殿物を 150 μl の 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA にて溶解し, 100 μl の 6.3 M ammonium acetate および 625 μl の ethanol を加えることで total RNA を沈殿させた。さらに 80% ethanol で脱塩し, total RNA を得た。なお, 35 mm ディッシュ上の培養系 1 枚当たり約 10 μg の total RNA を得た。

VII. ノーザンブロット

ノーザンブロットは RNA 変性剤として formaldehyde を用い, 70°C にて 10 分間インキュベートした total RNA (10 μg) を 0.6 M formaldehyde を含む 1% アガロースゲルにて, 80 V 定電圧で 2 時間 30 分間電気泳動した。ゲル中の RNA は $20\times\text{SSC}$ (3M NaCl, 0.3M sodium citrate) によってナイロンメンブレン (Schleicher & Schuell 社) に転写した。このナイロンメンブレンを室温にて十分風乾した後, 80°C 陰圧下で 2 時間処置して RNA とナイロンメンブレンの架橋固定を行った。非特異的反應を阻害するために, ナイロンメンブレンをハイブリダイゼーション緩衝液 ($6\times\text{SSC}$, 0.5% SDS, 10 mM EDTA, 0.1 mg/ml sonicated DNA) 中で, 68°C にて 2 時間インキュベートした。その後, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP (DuPont 社) にて標識したプローブを含有する新鮮なハイブリダイゼーション溶液に交換し, 68°C にて 16 時間インキュベートした。反応後のナイロンメンブレンは, $0.2\times\text{SSC}$, 0.5% SDS 溶液で, 60°C にて 20 分間洗浄を 4 回行った。対照として, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP 標識した glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) cDNA プローブを使用して, 同一ナイロンメンブレンでのリハイブリダイ

ゼーションを行った。すなわち, ナイロンメンブレンを 50% formamide 含有 $0.2\times\text{SSC}$, 0.5% SDS 溶液で, 70°C にて 10 分間洗浄した後, formamide 非含有 $0.2\times\text{SSC}$, 0.5% SDS 溶液で, 70°C にて 10 分間の洗浄を 3 回行った。その後, 上記のごとくハイブリダイゼーション反応を行った。プローブの標識にはオリゴラベリングキット (Pharmacia Biotec 社) を用い, 放射活性は BAS 2000 Image analyzer (Fujix 社) を用いて測定した。

VIII. cDNA プローブ

ヒト MMP-2 cDNA プローブ (1.5 kbp) は金沢大学癌研究所の清水元治教授より恵与された。ブタ G3PDH cDNA プローブ (613 bp) は reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) によって作製した。まず, PCR プライマーとして, ヒトおよびウサギの G3PDH cDNA から相同性の高い領域を選び, 下流特異的プライマー 3'-GTAGTTCTTCCACCACTTCG-5' および上流特異的プライマー 5'-GTCAAGGCTGAGA ACGGGAA-3' を合成した。次に, ブタ肋軟骨より抽出した total RNA とこれらのプライマーを用い, GeneAmp RNA PCR kit および GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer Cetus Instrument 社) により RT-PCR を行った。逆転写反応は, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM dNTP, 1U ribonuclease inhibitor, 2.5U reverse transcriptase 中に total RNA (1.0 μg) および下流特異的プライマー (0.2 μg) を加え, 42°C で 15 分間行った。続いて, 上流特異的プライマー (0.2 μg) および 2.5U Ampli Taq DNA polymerase を加え, 変性反応は 95°C で 1 分間, アニールおよび伸長反応は 60°C で 1 分間それぞれ行い, これを 1 サイクルとして 25 サイクルの増幅を行って目的とする cDNA を得た。RT-PCR によって得た cDNA 産物は pBluescript SK (-) ベクター (Stratagene 社) の Sma I サイトにサブクローニング後, ジデオキシ法により塩基配列を決定し, G3PDH に対応することを確認した。なお, 塩基配列の決定には Sequenase Ver. 2.0 キット (USB 社) を用いた。

結 果

成長板軟骨細胞培養系において, 培養 1 週目はコンフルエント後 2 日目にあたり, この時期ではまだ DNA 合成が進行して一部の細胞が多細胞層を形成しつつあった。培養 2 週目になると軟骨細胞は大量の細胞外基質を産生し, 肥大型のマーカーである ALPase 活性も上昇し始めていた。培養 4 週目では ALPase 活性は最大となった (データ示さず)。培養上清中の

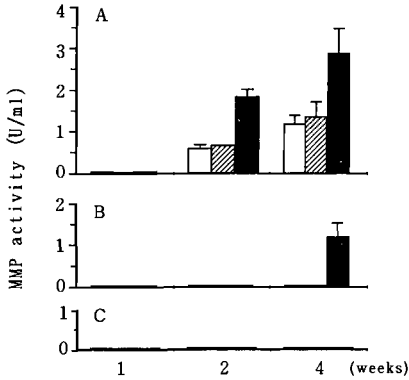


図1 成長板軟骨細胞培養系における培養上清中のMMP活性に対するPTH (10^{-7} M)の影響。

培養1週目, 2週目, 4週目における, ゼラチナーゼ活性(A), ストロメライシン活性(B), コラゲナーゼ活性(C)を測定した。カラムは, 対照(□), PTH[1-34](▨)およびPTH[1-84](■)を示す。

数値は3つの測定値の平均 \pm S.D.を示す。

MMPの活性を測定した結果, 培養1週目ではMMPの活性はいずれも出現しなかった(図1)。培養2週目においてはゼラチナーゼ活性のみが上昇し, PTH[1-84]はゼラチナーゼ活性を促進させた。培養4週目になるとゼラチナーゼ活性はさらに上昇し, PTH[1-84]による促進作用は最も高レベルになった。また, ストロメライシン活性はPTH[1-84]添加群においてのみ出現したが, コラゲナーゼ活性はいずれの群においても全く出現しなかった。なお, 細胞層にはMMP活性はほとんど存在しなかった(データ示さず)。

次に, MMP活性に対する各濃度のPTH[1-84]の影響を検討した(図2)。PTH[1-84]によるゼラチナーゼ活性の上昇は 10^{-9} Mから出現し, その効果は 10^{-7} Mまで濃度依存的に増大した。また, PTH[1-84]によるストロメライシン活性の上昇は 10^{-9} Mから検出され, 10^{-8} Mではほぼ最大となった。一方, 関節軟骨細胞培養系ではPTHの存在, 非存在に関わらずMMP活性は検出されなかった。そこで, 以下の研究では, 成長板軟骨細胞培養系でのゼラチナーゼ活性に対するPTHの作用に焦点をあてた。

まずPTHが誘導するゼラチナーゼ活性の性質を検討するためにゼラチンザイモグラフィーを行った。本実験では, 各群についてそれぞれ3つの培養系から得た培養上清を個別にゼラチンザイモグラフィーで分析した(図3)。PTH[1-84]は72 kDaおよび68 kDaのゼラチナーゼA (MMP-2)の活性を上昇させた。しかし, PTH[1-84]はゼラチナーゼB (MMP-9)に相

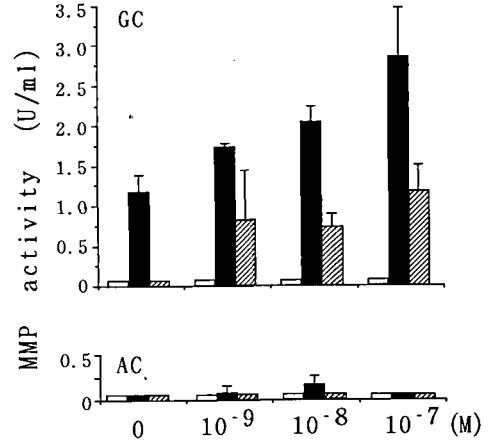


図2 軟骨細胞培養4週目における培養上清中のMMP活性に対するPTH[1-84]の濃度の影響。

成長板軟骨細胞(GC)あるいは関節軟骨細胞(AC)の培養4週目において, 各種濃度のPTH[1-84]を添加した。48時間後に培養上清を回収し, コラゲナーゼ活性(□), ゼラチナーゼ活性(■), ストロメライシン活性(▨)を測定した。

数値は3つの測定値の平均 \pm S.D.を示す。

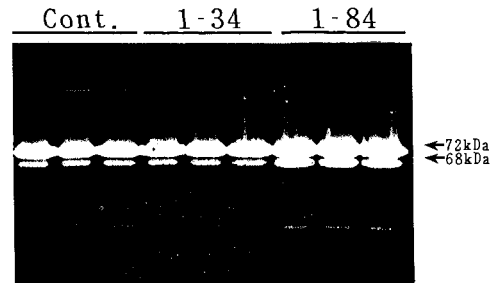


図3 成長板軟骨細胞のゼラチナーゼ産生に対するPTHの影響(ゼラチンザイモグラフィー分析)。

PTH[1-84]あるいはPTH[1-34] (10^{-8} M)を添加し, 48時間後の培養上清を回収した。3つの培養系の培養上清を個別に泳動し, ゼラチンザイモグラフィーを行った。

当する92 kDa付近には活性を誘導しなかった。一方, 本実験では, PTH[1-34]はゼラチンザイモグラフィーのパターンにほとんど影響しなかった。

ザイモグラフィーでは活性の定量性が乏しいので, MMP-2レベルに対するPTHの影響をさらに検討するため, 各群でそれぞれ3つの培養系から得た培養上清を個別にイムノプロット法で分析した(図4)。PTH[1-84]はMMP-2レベルを上昇させた。PTH[1-

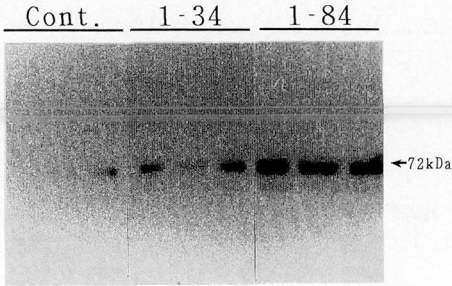


図4 成長板軟骨細胞のMMP-2に対するPTHの影響（イムノブロット分析）。

PTH [1-84] あるいは PTH [1-34] (10^{-8} M) を添加し、48時間後の培養上清を回収した。3つの培養系の培養上清を個別に泳動し、抗ヒトMMP-2モノクローナル抗体および $[^{125}\text{I}]$ 抗マウスIgG抗体を用いてイムノブロットを行った。

34] も PTH [1-84] より低レベルながら MMP-2 レベルを上昇させた。また、PTH [1-84] の効果は 10^{-10} M で出現し、 10^{-8} M で最大となった（図5）。以上の結果から、PTH により増加するゼラチナーゼ活性は MMP-2 であることが判明した。

PTH 添加後の MMP-2 レベルの経時的変化を追跡するため、24時間毎に96時間まで回収した培養上清中の MMP-2 をイムノブロット法で測定した（図6）。対照群では、MMP-2 は最初の24時間でわずかに存在したが、48時間以降では減少した。一方、PTH [1-84] は MMP-2 レベルを24時間後より上昇させ、その効果は48時間でほぼ最大となった。PTH [1-34] も MMP-2 レベルを上昇させたが全培養期間でその作用

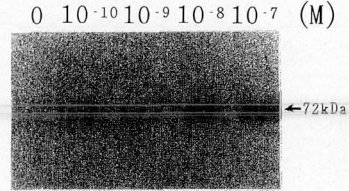


図5 成長板軟骨細胞のMMP-2に対するPTH [1-84]の濃度の影響（イムノブロット分析）。

各種濃度の PTH [1-84] を添加し、48時間後の培養上清を回収した。抗ヒトMMP-2モノクローナル抗体および $[^{125}\text{I}]$ 抗マウスIgG抗体を用いてイムノブロットを行った。

は PTH [1-84] よりも低レベルだった。

PTH [1-34] と PTH [1-84] の作用の相違をさらに追求するためにノーザンブロット法で分析した（図7）。PTH [1-84] 添加群において、ウサギMMP-2 mRNA は 4.0 kb と 3.1 kb の2本のバンドとして検出された。PTH [1-84] は12時間で 4.0 kb と 3.1 kb のMMP-2 mRNA レベルを上昇させ始め、24時間では顕著な誘導を示した。しかし、PTH [1-34] によるMMP-2 mRNA レベルの上昇作用は PTH [1-84] よりも弱く、本実験では検出されなかった。24時間におけるMMP-2 と G3PDH の mRNA の放射活性を測定した結果、PTH [1-84] は MMP-2 mRNA レベルを5倍以上増加させることが判明した。

PTH による培養上清中の MMP 活性の上昇は、MMP 合成の増加、あるいは MMP 活性の抑制因子であるTIMPの減少を示唆している。そこで、TIMPレベルに対するPTHの影響について検討した。24時間毎に回収した培養上清を用い、TIMP-1はサンドイッチ

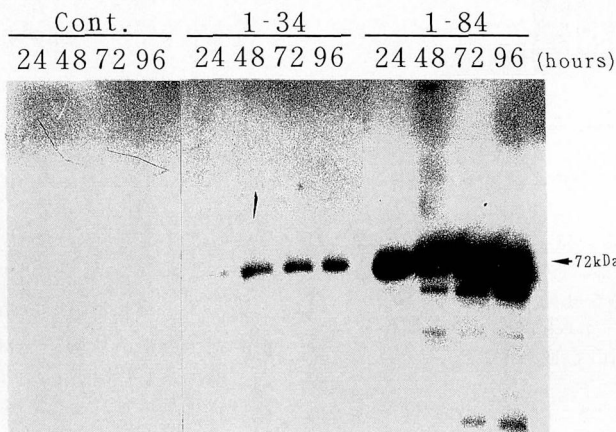


図6 成長板軟骨細胞のMMP-2に対するPTHの影響の経時的変化（イムノブロット分析）。

PTH [1-84] あるいは PTH [1-34] (10^{-8} M) を添加し、24時間毎に96時間まで培養上清を回収した。培養上清を個別に泳動し、抗ヒトMMP-2モノクローナル抗体および $[^{125}\text{I}]$ 抗マウスIgG抗体を用いてイムノブロットを行った。

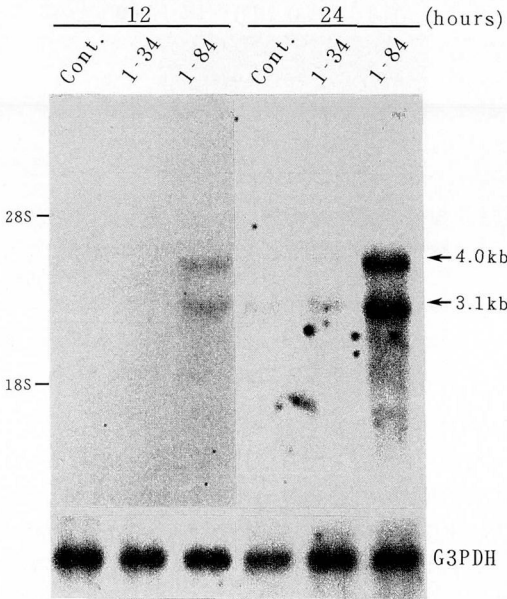


図7 成長板軟骨細胞の MMP-2 に対する PTH の影響 (ノーザンブロット分析).

PTH [1-84] あるいは PTH [1-34] (10^{-8} M) を添加し, 12 および 24 時間後の total RNA を回収した。各レーンに $10 \mu\text{g}$ 泳動し, $[^{32}\text{P}]$ ヒト MMP-2 cDNA をプローブとして用い, ノーザンブロットを行った。対照として G3PDH を用いた。

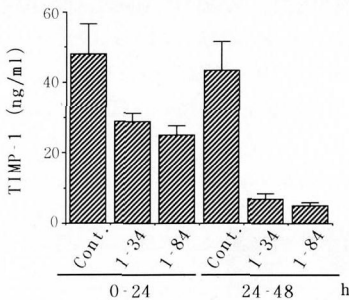


図8 成長板軟骨細胞の TIMP-1 に対する PTH の影響 (ELISA 分析).

PTH [1-84] あるいは PTH [1-34] (10^{-8} M) を添加し, 24 時間毎に 48 時間まで培養上清を回収した。培養上清を泳動し, 2 種類の抗ヒト TIMP-1 モノクローナル抗体および $[^{125}\text{I}]$ 抗マウス IgG 抗体を用いて ELISA を行った。

チ ELISA 法で (図 8), TIMP-2 はイムノブロット法でそれぞれ測定した (図 9)。その結果, PTH [1-84] および PTH [1-34] は TIMP-2 レベルにはほとんど影響しないものの TIMP-1 レベルを低下させることが判

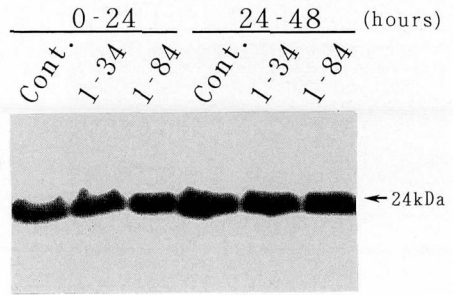


図9 成長板軟骨細胞の TIMP-2 に対する PTH の影響 (イムノブロット分析).

PTH [1-84] あるいは PTH [1-34] (10^{-8} M) を添加し, 24 時間毎に 48 時間まで培養上清を回収した。培養上清を泳動し, 2 種類の抗ヒト TIMP-2 モノクローナル抗体および $[^{125}\text{I}]$ 抗マウス IgG 抗体を用いてイムノブロットを行った。

明した。

図 6 および 図 7 に示したように, MMP-2 合成に対する促進作用は PTH [1-34] よりも PTH [1-84] の方が明らかに強力だった。この知見は MMP-2 の誘導には PTH の C 端領域が関与していることを示唆している。そこで次に, 各種 PTH C 端ペプチドの MMP-2 レベルに対する影響を検討した。

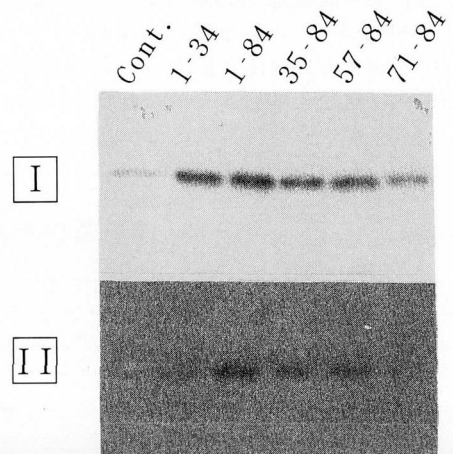


図10 成長板軟骨細胞の MMP-2 に対する各種 PTH 断片の影響 (イムノブロット分析).

2 回の独立した培養系 (I, II) において, 各種 PTH 断片 (10^{-8} M) を添加し 48 時間後の培養上清を回収した。培養上清を泳動し, 抗ヒト MMP-2 モノクローナル抗体および $[^{125}\text{I}]$ 抗マウス IgG 抗体を用いてイムノブロットを行った。

2回の独立した実験において、PTH[35-84] および PTH[57-84] は MMP-2 レベルを上昇させた (図10)。なお、PTH [35-84] および PTH [57-84] による MMP-2 レベルの上昇は 10^{-9} M より出現し、 10^{-8} M ではほぼ最大となった (データ示さず)。また、全長 PTH [1-84] は N 端あるいは C 端フラグメント単独よりも強力な促進作用を示した。さらに、PTH [35-84] 添加後の MMP-2 レベルの変化をイムノプロットと

ノーザンプロット分析で追跡したところ、MMP-2 のタンパクおよび mRNA レベルは24時間後に上昇した (図11, 12)。

考 察

肥大軟骨細胞と異なり、関節軟骨細胞培養系ではゼラチナーゼ活性は全く出現しなかったことは、関節軟骨細胞が MMP を全く産生しない、あるいは、TIMP が大量に存在する可能性を示唆している。ゼラチンザイモグラフィおよびイムノプロット分析は関節軟骨細胞も MMP-2 を合成することを示し、また、関節軟骨細胞の TIMP-1 レベルは成長板軟骨細胞よりも5~10倍高かった (データ示さず)。したがって、関節軟骨細胞では、TIMP-1 が大量に存在するため MMP-2 によるゼラチナーゼ活性が見かけ上検出されなかったと考えられる。関節軟骨は石灰化しない部位であり、機能的な理由からも軟骨基質の分解から保護される必要がある。これに対して、成長板では大量に存在する軟骨基質が骨への転換の前に急速に分解される必要があり、TIMP-1 レベルが減少すると考えられる。

本研究において、PTH, bFGF, IL-1 β , TGF- β , PDGF, T₃ など数種類の成長因子を検討した結果、成長板軟骨細胞のゼラチナーゼ合成を促進するものは PTH と IL-1 β のみであり、bFGF, TGF- β , PDGF, T₃ などは影響しなかった (データ示さず)。さらに、この両者の効果を比較した場合、ゼラチナーゼ活性に対しては、PTH も IL-1 β も同等に非常に高レベルまで上昇させた。一方、ストロメライシン活性に対しては、IL-1 β は PTH よりも10倍近い高レベルまで上昇させた。コラーゲナーゼ活性については、IL-1 β は誘導したのに対して PTH は全く影響しなかった。これらの結果は、PTH が各種の MMP の中で特にゼラチナーゼ合成を選択的に促進することを示唆している。

精製した各種 MMP の基質分解活性を調べた Murphy ら¹⁶⁾ の報告によると、同モルあたりの MMP-2 と MMP-9 について比較した場合、MMP-9 のⅣ型コラーゲン分解能は約2倍高く、逆に MMP-2 のエラスチン分解能およびプロテオグリカン分解能はそれぞれ3倍および2倍も高かった。一方、中性領域 (pH 7.5) における MMP-2 と MMP-3 のプロテオグリカン分解能は同等であった。

成長板において PTH は MMP-2 を誘導したのに対して、IL-1 β は MMP-2 にはほとんど影響せず、MMP-9 を誘導した (データ示さず)。この知見は PTH と IL-1 β が軟骨基質分解の過程で異なる役割を果たしていることを示唆している。MMP-9 は炎症のある軟骨にのみ存在するのに対して、MMP-2 は正常

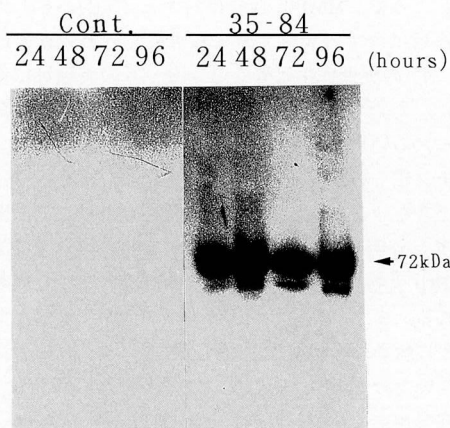


図11 成長板軟骨細胞の MMP-2 に対する PTH [35-84] の影響 (イムノプロット分析)。

PTH-(35-84) (10^{-8} M) を添加し、24時間毎に96時間まで培養上清を回収した。培養上清を泳動し、抗ヒト MMP-2 モノクローナル抗体および [¹²⁵I] 抗マウス IgG 抗体を用いてイムノプロットを行った。

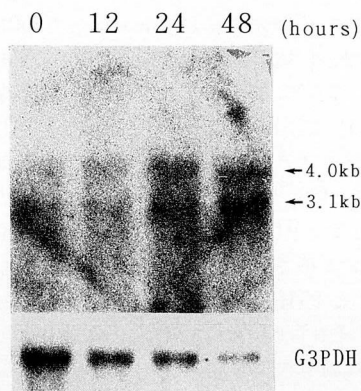


図12 成長板軟骨細胞の MMP-2 に対する PTH [35-84] の影響 (ノーザンプロット分析)。

PTH-[35-84] (10^{-8} M) を添加し、12, 24, 48時間後の total RNA を回収した。各レーンに $10 \mu\text{g}$ 泳動し、ヒト MMP-2 cDNA をプローブとして用いてノーザンプロットを行った。

軟骨に定常的に存在している。したがって、PTH は正常な軟骨分化過程での基質分解に関与し、IL-1 β は炎症過程での基質分解により主要な役割を果たしていると考えられる。

PTH の cDNA のクローニングは1979年に行われ¹⁷⁾、1983年に遺伝子の構造が明らかになった¹⁸⁾。また、悪性腫瘍に伴って高頻度に発症する高カルシウム血症の原因物質のひとつである副甲状腺ホルモン関連ペプチド (PTHrp) の cDNA のクローニングは1987年に行われた¹⁹⁾。PTH と PTHrp は一次構造上そのアミノ末端 [1-34] 領域で高い相同性を示し、¹²⁵I 標識リガンドを用いた結合実験により、PTH および PTHrp の [1-34] フラグメントは細胞膜上の共通の受容体に結合して同一の生物作用を示すことが判明した。この共通の受容体 (PTH/PTHrp 受容体) の cDNA のクローニングは1991年に行われ、7個の膜貫通領域を持つ G 蛋白結合型受容体であることが判明した²⁰⁾。PTHrp 遺伝子のノックアウトマウスでは、成長板での軟骨細胞の増殖が低下すると共に成長板と静止軟骨での肥大化と石灰化が異常に亢進し、出生後これらのマウスは肋軟骨の石灰化による呼吸困難のため100%死亡した²¹⁾。短肢症を伴う小人症を起こす Jansen 型骨端軟骨形成不全症患者では、PTH/PTHrp 受容体遺伝子の第一細胞内ループの233位のアミノ酸であるヒスチジンがアルギニンに変異しており、その結果、細胞内 cAMP の自発的な上昇が起こることで四肢の発育が障害されていた²²⁾。これらの結果は、PTH および PTHrp の [1-34] 領域が軟骨において重要な役割を果たしていることを強く示唆している。

軟骨細胞培養系においても、DNA 合成、プロテオグリカン合成、cAMP 合成、石灰化、最終分化などに対する PTH [1-84] と PTH [1-34] の作用は同等であった⁶⁾。一方、PTH [3-34]、PTH [7-34]、PTH [13-34] などの N 末端の短い PTH ペプチドや、PTH [35-84]、PTH [57-84] の C 端ペプチド、PTH [39-68]、PTH [35-70] の中間ペプチドは、いずれも上記の作用を示さなかった⁶⁾。また、PTH/PTHrp 受容体の数は軟骨の分化の過程において変動することが知られ、増殖期には低レベルだが、基質産生期に最も高レベルになり、肥大型にはその1/10まで減少する⁶⁾。この間、受容体の親和性は全く変化しなかった⁶⁾。さらに、in vivo でも同様な受容体の数の変化が観察されている⁶⁾。すなわち、従来の研究において、軟骨細胞培養系で観察された PTH のすべての作用は N 端領域を認識する受容体により仲介され、その受容体はこれらの作用の標的となる細胞の分化段階に一致して高レベルに発現した。また、受容体の数の変化と PTH の生理

作用とが調和していたことからよく頷ける。しかし、本研究において、軟骨細胞の MMP-2 合成に対する PTH の作用は PTH [1-34] よりも PTH [1-84] の方が著しく強いことが判明し、さらに、PTH [1-84] の作用は PTH/PTHrp 受容体が減少する肥大型で最大となることも判明した。これらの結果は、従来の N 端領域 [1-34] を認識する PTH/PTHrp 受容体以外にも PTH の C 端領域と反応して別の生理作用を発現する新たな受容体が存在する可能性を示唆している。

ところで、MMP-2 合成に対する PTH [1-84] の促進作用は全ての実験で常に顕著に見られたが、PTH [1-34] の促進作用は異なるシリーズの実験毎に変動した。ただし、この PTH [1-34] の促進作用は全シリーズのいずれの実験でも PTH [1-84] より弱く、ゼラチンザイモグラフィやイムノブロット分析では検出できないこともしばしば見受けられた。この原因は必ずしも明らかではないが、肥大型における PTH/PTHrp 受容体の数が培養条件で変動することが考えられる。また、N 端フラグメントの血中半減期が短いように軟骨細胞培養系における N 端ペプチドの半減期が早いこと作用が一定しないことが考えられるが、本研究で用いた PTH [1-84] と PTH [1-34] の各ロットはプロテオグリカン合成と ALPase 活性抑制に対して同等の作用を示した。

PTH の C 端領域の生物学的作用に関して、Murray ら²³⁾ は、ROS 17/2.8 (rat osteoblastic osteosarcoma cells) において PTH [1-84] および PTH [1-34] は ALPase 活性を同等に抑制するが、逆に PTH [53-84] は 1.3 倍増加させることを報告している。また、SaOS-2 (human osteosarcoma cell line) において PTH [53-84] は ALPase および osteocalcin の mRNA レベルを 2.0 倍、1.4 倍それぞれ上昇させることも知られている²⁴⁾。さらに、Kaji ら²⁵⁾ によって、骨芽細胞非存在下において、PTH [35-84] や PTH [57-84] などの PTH-C 端ペプチドが造血幹細胞からの破骨細胞様細胞の形成を促進することが示されている。以上のように、最近では PTH の C 端領域が単独で生理活性を持つ見解が支持され始めている。本研究でも、PTH [35-84] と PTH [53-84] は MMP-2 合成を促進した。しかも、それらの作用は非常に強力であった。

PTH は副甲状腺細胞から PTH [1-84] あるいは N 端と C 端フラグメントとして血中に分泌される。また、血中の PTH [1-84] は肝臓と腎臓で N 端と C 端フラグメントに切断される。Fujita ら²⁶⁾ は PTH [1-84] はまず PTH [1-34] と PTH [35-84] に切断され、さらに PTH [35-70] と PTH [71-84] に切断されることを報告している。また、肝臓においては主として

PTH[1-33]とPTH[34-84],あるいはPTH[1-36]とPTH[37-84]に切断される²⁷⁾。PTH断片の血中における半減期は大きく異なり,PTH[1-84]では2~4分と極めて短いに対して,C端フラグメントでは15分程度と比較的長い²⁸⁾。免疫反応で測定される血中のPTHは,PTH[1-84]が5~30%,PTH[35-84]などの各種C端フラグメントが70~95%を占めている²⁹⁾。PTH[1-34]などのN端フラグメントはさらに小さく分解され,断片のサイズが一定していないため測定可能だが非常に低レベルである。この知見は,PTHのN端フラグメントだけでなく,半減期の長いC端フラグメントも同様に重要な生理的役割を担っている可能性を示している。PTHのC端ペプチドは軟骨細胞のadenylate cyclaseを活性化しない⁶⁾ので,PTHのC端ペプチドに対する受容体が活性化されるとN端ペプチドを認識するPTH/PTHrp受容体とは別のシグナル経路でMMP-2合成を促進すると考えられる。実際にInomataらはROS 17/2.8ヤラット副甲状腺細胞においてC端領域に特異的な受容体として,30 kDaと80 kDaのタンパクを見出ししている(未発表)。しかしながら,その構造やシグナル伝達系などは不明である。あるいは,FGF^{30,31)},EGF³²⁾,NGF³²⁾,PDGF³²⁾,IL-1³³⁾,PTHrp³⁴⁾などの作用機序として示唆されているように,PTHのC端ペプチドが細胞内に取り込まれ,直接核内にまで移行してその作用を発現している可能性もある。

PTHは血中カルシウム濃度が低下した際に副甲状腺から分泌され,主として骨組織において破骨細胞の骨吸収作用を賦活化させることでカルシウムを動員する。現在,PTHの骨吸収作用発現の機序としては,まずN端領域が骨芽細胞に作用し,何らかの因子を仲介することで,間接的に破骨細胞へと作用すると考えられている³⁵⁾。一方,C端フラグメントの血中レベルはN端フラグメントほど厳密にはカルシウムレベルと連動していない。むしろ高カルシウム血中レベル時にその割合が増加する³⁶⁾。したがって,PTHのC端領域を介するMMPの誘導は,カルシウムのホメオスタシスを維持するPTHの従来作用とは独立していると考えられる。

結 論

1. 成長板軟骨細胞の肥大期において,PTHはゼラチナーゼ活性を上昇させた。この活性はゼラチナーゼA(MMP-2)によるものであった。

2. 成長板軟骨細胞培養系において,PTHはMMP-2のタンパクレベルを上昇させ,TIMP-1レベルを低下することでゼラチナーゼ活性を上昇させた。

3. PTHはpretranslational levelでMMP-2合成を促進した。

4. PTH[1-34],PTH[35-84]とも独立にMMP-2合成を促進し得るが,両者の領域を含むPTH[1-84]は最も高レベルにMMP-2合成を促進した。

謝 辞

稿を終えるにあたり終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました本学歯科補綴学第一講座赤川安正教授ならびに前本学歯科補綴学第一講座教授津留宏道名誉教授に深甚なる感謝の意を表します。また,本研究に際し,終始御懇切なる御指導ならびに御助言を頂いた本学口腔生化学講座加藤幸夫教授に衷心より感謝の意を表します。さらに,本論文作成上,御助言ならびに御校閲を賜りました本学歯科薬理学講座土肥敏博教授に深謝致します。

本研究遂行上および本論文作成上終始御懇切なる御指導,御助言を頂いた本学口腔生化学講座能城光秀助教授,河本健博士,Yan Weiqun博士,大宅芳枝博士に深謝致します。また,本論文作成上終始御懇切なる御指導,御助言を頂いた本学歯科細菌学講座菅井基行助教授,本学予防歯科学講座島津篤博士,大阪大学歯学部口腔生化学講座中島和久博士に深謝致します。さらに,本研究に際し終始御懇切なる御指導,御助言を頂いた金沢大学医学部癌研究所岡田保典教授ならびに愛知学院大学歯学部生化学講座早川太郎教授,山下京子博士に深謝致します。

最後に,本研究を進めるに際し多大なる御支援を頂いた本学歯科補綴学第一講座ならびに口腔生化学講座の関係各位に感謝致します。

文 献

- 1) Iwamoto, M., Sato, K., Nakashima, K., Shimazu, A. and Kato, Y.: Hypertrophy and calcification of rabbit permanent chondrocytes in pelleted cultures: synthesis of alkaline phosphatase and 1,25-dihydroxycholecalciferol receptor. *Dev. Biol.* 136, 500-507, 1989.
- 2) Schmid, T.M. and Conrad, H.E.: Metabolism of low molecular weight collagen by chondrocytes obtained from histologically distinct zones of the chick embryo tibiotarsus. *J. Biol. Chem.* 257, 12451-12457, 1982.
- 3) Dean, D.D., Muniz, O.E., Berman, I., Pita, J.C., Carreno, M.R., Woessner, J.F., Jr. and Howell, D.S.: Localization of collagenase in the growth plate of rachitic rats. *J. Clin. Invest.* 76, 716-722, 1985.
- 4) Dean, D.D., Muniz, O.E. and Howell, D.S.:

- Association of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) with hypertrophic cell enlargement in the growth plate. *Matrix* 9, 366–375, 1989.
- 5) Brown, C.C., Hembry, R.M. and Reynolds, J.J.: Immunolocalization of metalloproteinases and their inhibitor in the rabbit growth plate. *J. Bone Joint Surg. Am.* 71, 580–593, 1989.
 - 6) Iwamoto, M., Jikko, A., Murakami, H., Shimazu, A., Nakashima, K., Iwamoto, M., Takigawa, M., Baba, H., Suzuki, F. and Kato, Y.: Changes in parathyroid hormone receptors during chondrocyte cytodifferentiation. *J. Biol. Chem.* 269, 17245–17251, 1994.
 - 7) Lee, K., Deeds, J.D., Chiba, S., Un-No, M., Bond, A.T. and Segre, G.V.: Parathyroid hormone induces sequential c-fos expression in bone cells in vivo: in situ localization of its receptor and c-fos messenger ribonucleic acids. *Endocrinology* 134, 441–450, 1994.
 - 8) Koike, T., Iwamoto, M., Shimazu, A., Nakashima, K., Suzuki, F. and Kato, Y.: Potent mitogenic effects of parathyroid hormone (PTH) on embryonic chick and rabbit chondrocytes. Differential effects of age on growth, proteoglycan, and cyclic AMP responses of chondrocytes to PTH. *J. Clin. Invest.* 85, 626–631, 1990.
 - 9) Kato, Y., Koike, T., Iwamoto, M., Kinoshita, M., Sato, K., Hiraki, Y. and Suzuki, F.: Effects of limited exposure of rabbit chondrocyte cultures to parathyroid hormone and dibutyl adenosine 3',5'-monophosphate on cartilage-characteristic proteoglycan synthesis. *Endocrinology* 122, 1991–1997, 1988.
 - 10) Shimomura, Y., Yoneda, T. and Suzuki, F.: Osteogenesis by chondrocytes from growth cartilage of rat rib. *Calcif. Tiss. Res.* 19, 179–187, 1975.
 - 11) Kato, Y. and Gospodarowicz, D.: Effect of exogenous extracellular matrices on proteoglycan synthesis by cultured rabbit costal chondrocytes. *J. Cell. Biol.* 100, 486–495, 1988.
 - 12) Harris, E.D., Jr. and Krane, S.M.: An endopeptidase from rheumatoid synovial tissue culture. *Biochim. Biophys. Acta* 258, 566–576, 1972.
 - 13) Cawston, T.E. and Barrett, A.J.: A rapid and reproducible assay for collagenase using [^{14}C] acetylated collagen. *Anal. Biochem.* 99, 340–345, 1979.
 - 14) Okada, Y., Nagase, H. and Harris, E.D., Jr.: A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 261, 14245–14255, 1986.
 - 15) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350–4354, 1979.
 - 16) Murphy, G., Cockett, M.I., Ward, R.V. and Docherty, A.J.P.: Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan: A quantitative comparison of the activities of 95 kDa and 72 kDa gelatinase, stromelysin-1 and -2 and punctuated metalloproteinase (PUMP). *Biochem. J.* 277, 277–279, 1991.
 - 17) Kronenberg, H.M., McDevitt, B.E., Majzoub, J.A., Nathans, J., Sharp, P.A., Potts, J.T., Jr. and Rich, A.: Cloning and nucleotide sequence of DNA coding for bovine preproparathyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4981–4985, 1979.
 - 18) Vasicek, T.J., McDevitt, B.E., Freeman, M.W., Fennick, B.J., Hendy, G.N., Potts, J.T., Jr., Rich, A. and Kronenberg, H.M.: Nucleotide sequence of the human parathyroid hormone gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2127–2131, 1983.
 - 19) Suva, L.J., Winslow, G.A., Wettenhall, R.E., Hammonds, R.G., Moseley, J.M., Diefenbach-Jagger, H., Rodda, C.P., Kemp, B.E., Rodriguez, H. and Chen, E.Y.: A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression. *Science* 237, 893–896, 1987.
 - 20) Jüppner, H., Abou-Samra, A.B., Freeman, M., Kong, X.F., Schipani, E., Richards, J., Kolakowski, L.F., Jr., Hock, J., Potts, J.T., Jr., Kronenberg, H.M. and Segre, G.V.: A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* 254, 1024–1026, 1991.
 - 21) Karaplis, A.C., Luz, A., Glowacki, J., Bronson, R.T., Tybulewicz, V.L., Kronenberg, H.M. and Mulligan, R.C.: Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev.* 8, 277–289, 1994.
 - 22) Schipani, E., Kruse, K. and Jüppner, H.: A constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia. *Science* 268, 98–100, 1995.
 - 23) Murray, T.M., Rao, L.G. and Muzaffar, S.A.: Dexamethasone-treated ROS 17/2.8 rat osteosarcoma cells are responsive to human carboxyterminal parathyroid hormone peptide hPTH (53–84): stimulation of alkaline phosphatase. *Calcif. Tissue Int.* 49, 120–123, 1991.
 - 24) Rao, L.G., Wylie, J.N., Sutherland, M.S. and Murray, T.M.: 17 beta-estradiol and parathyroid hormone potentiate each other's stimulatory

- effects on alkaline phosphatase activity in SaOS-2 cells in a differentiation-dependent manner. *Endocrinology* 134, 614-620, 1994.
- 25) Kaji, H., Sugimoto, T., Kanatani, M., Fukase, M. and Chihara, K.: Carboxyl-terminal peptides from parathyroid hormone-related protein stimulate osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* 136, 842-848, 1995.
 - 26) Fujita, T., Fukase, M., Baba, H., Yamaguchi, T., Takata, S., Fujimi, T., Nishikawa, M. and Nakamoto, C.: New actions of parathyroid hormone through its degradation. *J. Endocrinol. Invest.* 15, 121-127, 1992.
 - 27) Segre, G.V., Niall, H.D., Sauer, R.T. and Potts, J.T., Jr.: Edman degradation of radioiodinated parathyroid hormone : application to sequence analysis and hormone metabolism in vivo. *Biochemistry* 16, 2417-2427, 1977.
 - 28) Berson, S.A., Yalow, R.S., Aurbach, G.D. and Potts, J.T., Jr.: Immunoassay of bovine and human parathyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 49, 613-617, 1963.
 - 29) Goltzman, D., Henderson, B. and Loveridge, N.: Cytochemical bioassay of parathyroid hormone : characteristics of the assay and analysis of circulating hormonal forms. *J. Clin. Invest.* 65, 1309-1317, 1980.
 - 30) Yamamoto, N., Matsutani, S., Yoshitake, Y. and Nishikawa, K.: Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in A431 human epidermoid carcinoma cells. *Histochemistry* 96, 479-485, 1991.
 - 31) Kardami, E. and Fandrich, R.R.: Basic fibroblast growth factor in atria and ventricles of the vertebrate heart. *J. Cell. Biol.* 109, 1865-1875, 1989.
 - 32) Rakowicz-Szulczynska, E.M., Rodeck, U., Herlyn, M. and Koprowski, H.: Chromatin binding of epidermal growth factor, nerve growth factor, and platelet-derived growth factor in cells bearing the appropriate surface receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3728-3732, 1986.
 - 33) Curtis, B.M., Widmer, M.B., deRoos, P. and Qwarnstrom, E.E.: IL-1 and its receptor are translocated to the nucleus. *J. Immunol.* 144, 1295-1303, 1990.
 - 34) Henderson, J.E., Amizuka, N., Warshawsky, H., Biasotto, D., Lanske, B.M., Goltzman, D. and Karaplis, A.C.: Nucleolar localization of parathyroid hormone-related peptide enhances survival of chondrocytes under conditions that promote apoptotic cell death. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4064-4075, 1995.
 - 35) McSheehy, P.M. and Chambers, T.J.: Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinology* 118, 824-828, 1986.
 - 36) Mayer, G.P., Keaton, J.A., Hurst, J. G. and Habener, J.F.: Effects of plasma calcium concentration on the relative proportion of hormone and carboxyl fragments in parathyroid venous blood. *Endocrinology* 104, 1778-1784, 1979.