

## ブタの成長に伴う骨細胞外マトリックスの変化

中村富美男・森 休広・海津 幸子・浪崎 晋二・福永 重治\*

北海道大学農学部畜産科学科, 札幌市 060-8589

\* サンギ北海道研究所, 小樽市 047-0262

### Age-related changes in bone extracellular matrix during the growth of pig

Fumio NAKAMURA, Yasuhiro MORI, Sachiko KAIZU, Shinji NAMISAKI and Shigeharu FUKUNAGA\*

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589

\* Hokkaido laboratory, SANGI Corp., Otaru 047-0262

キーワード: 骨細胞外マトリックス, カルシウム, コラーゲン, 成長

Key words: bone extracellular matrix, calcium, collagen, growth

#### 要 約

成長期のブタを用い, 加齢に伴う無機成分を含む細胞外マトリックス (ECM) の変化を調べ, 骨の発達に果たす ECM 構成成分の役割を検討した。

骨の発達は, 組成的には水分含量の減少と灰分およびタンパク質含量の増加によって, 形態的にはハヴァース腔の縮小によって特徴づけられた。骨タンパク質の殆どを占める I 型コラーゲン含量は加齢に伴い増加したが, III 型, V 型, VI 型コラーゲン, オステオポンチンおよびオステオネクチン含量は減少した。I 型および III 型コラーゲンは骨全体に存在していたが, 本研究で調べた他の ECM タンパク質成分は管腔周辺部により多く存在していた。骨の発達, 即ち, I 型コラーゲンとカルシウムの蓄積には, ECM の微量成分が密接に関与していることが推測された。

#### 緒 言

動物体を支えなければならない骨には多量の無機質が存在するが, 骨においては無機質も ECM の一員とみなされている (久保木, 1995)。一方, 骨タンパク質の主成分はコラーゲンであり, 約 90% を占めている。コラーゲンの大部分は I 型で少量の III 型および V 型コラーゲンを含み (LINSENMAYER, 1991), この他にプロテオグリカンや骨特有タンパク質と呼ばれる非コラーゲンタンパク質が存在する (FISHER *et al.*, 1987)。非コラーゲン蛋白質の多くはコラーゲンや無機質の主体であるヒドロキシアパタイト或いは両者に対する親和性を有しており (GRYNPAS *et al.*, 1994), 骨の石灰化やリモデリング, 即ち, 発達と維持に関わっている

と思われる。

畜産副生物としての骨は, スープ, セラチン, リン酸カルシウム等の抽出素材として利用されてきたが, 近年, ECM 構成成分は化粧品や細胞培養用試薬としてだけでなく, 医療への利用も計られている。骨に関しては, 老化現象としての骨粗鬆症が注目されているが, 多くの研究は骨に存在する細胞や成長因子に集中しており (杉本ら, 1997), 実質である ECM の骨の発達や退化に伴う詳細な挙動は明らかにされていない。骨の発達は家畜の生産生理にも重要であり, 本研究では, 成長期のブタを用い, 加齢に伴う ECM の変化を調べ, 骨の発達に果たす ECM 成分の役割を検討した。

#### 材料および方法

北海道大学農学部附属農場で飼育したランドレース種雌ブタを 1, 28, 60, 98, 154 および 182 日齢で各 2 頭屠殺し, 採取した中足骨緻密質を以下の実験に供試した。

##### 生化学的分析

凍結粉碎した骨粉を用いて, 水分, 灰分, 脂肪含量を測定すると共に, 6 N 塩酸によって加水分解し, ニンヒドリン法によりタンパク質量を, Hyp 量を指標としてコラーゲン量 (BERGMAN and LOXLEY, 1963) を, 原子吸光法によりカルシウム量を測定した。一定量の骨粉を 0.5 M EDTA または 0.5 N 塩酸と共に透析膜に入れ, 大量の同液に対して 4 °C で 7 日間透析後遠心分離 (10,000 rpm, 10 分) によって得られた上清を脱灰抽出画分とし, 非コラーゲン蛋白質の分析に供した (GERSTENFELD *et al.*, 1994)。脱灰後水洗した骨粉に, SDS-PAGE サンプル処理液 (1% SDS, 1%  $\beta$ -ME, 3.6 M 尿素, 10 mM Tris pH 6.8) を添加し,

4℃で一晩攪拌後加熱処理(98℃, 3分)によって得られた画分をI型コラーゲンの分析に供した。脱灰後0.5N酢酸で洗浄した骨粉を1/50量(W/W)のペプシンを含む同液に懸濁し、25℃で24時間攪拌処理した。遠心分離(10,000rpm, 20分)によって得られた上清の0.7M NaCl塩析画分をIII型コラーゲンの、その上清をV型とVI型コラーゲンの分析に供した。各画分はSDS-PAGE用にサンプル処理後、3.6M尿素を含む5%あるいは10%ゲルによって泳動し、CBB染色した。ウェスタン・ブロッティングは、電気泳動像を転写したニトロセルロース膜をブロッキング処理した後、抗I型、抗III型、抗V型、抗VI型コラーゲン、抗オステオネクチン、抗オステオポンチン抗血清を第一抗体として、PoIgを第二抗体として反応させ、DABによって発色させ、陽性バンドの吸光度をデンシトメーターを用いて測定した。

#### 間接蛍光抗体法

細断した中足骨緻密質を0.5N塩酸に4℃で数週間浸漬し脱灰した後、凍結横断切片を調製した。上記抗体を第一抗体として反応させた切片をFITC標識した第二抗体で可視化し、蛍光顕微鏡下で観察した。対照のためにヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行い、ヒッチェンバーセンテージ法(CHALKLEY, 1943)によりハヴァース腔および骨小腔数を計測した。

## 結 果

ブタ骨の水分含量は、哺乳期である28日齢までは約40%と高かったが、その後は加齢に伴って20%以下まで減少した(図1A)。対照的に灰分とタンパク質含量は加齢に伴って増加し、灰分は骨重量の半分以上を占めるようになった。タンパク質含量は28日齢から98日齢にかけて急速に増加し、その後はほぼ一定となったが、コラーゲン含量は加齢に伴い直線的に増加した(図1B)。カルシウム含量もコラーゲン同様、28日齢以降直線的に増加しており、灰分に占めるカルシウムの割合とタンパク質に占めるコラーゲンの割合は、加齢に伴い増加した。

脱灰後の骨に存在するタンパク質はSDS-PAGE像から明らかのように、I型コラーゲンが大半を占めていた(図2A)。しかし、泳動パターンに加齢に伴う顕著な変化は観察されず、I型コラーゲンの $\alpha$ 鎖 $\beta$ 鎖 $\gamma$ 鎖の比率も加齢変化を示さなかった。一方、脱灰に伴って抽出される非コラーゲンタンパク質は、脱灰法によってSDS-PAGE像が異なり、各々で加齢に伴う変化が観察された(図2B, C)。ウェスタン・ブロッティングの結果、EDTA抽出画分において加齢に伴い減少したバンドはオステオネクチンであり、塩酸抽出画分ではオステオポンチンが減少していた。III型、V型およびVI型コラーゲン含量は何れも加齢に伴い減少した(図2D, E, F)。ウェスタン・ブロッティング像の

デンシトグラムの結果、III型コラーゲンはほぼ直線的に、V型コラーゲンは98日齢以降急速に、VI型コラーゲンは98日齢までに減少していた。

骨横断面で観察されるハヴァース腔の大きさは加齢に伴って縮小し、管腔周辺部のエオジンによる赤染度も低下した(図3A)。単位面積当たりの骨小腔の数は加齢に伴い増加したが、ハヴァース腔の数は変化しなかった(図示せず)。抗I型およびIII型コラーゲン抗体による陽性反応は骨基質全体で観察されたが、I型コラーゲンに対する染色性が加齢に伴って強くなるのに対し(図3B)、III型コラーゲンに対する染色性は弱くなった(図示せず)。V型とVI型コラーゲンに対する免疫染色像は類似しており、1日齢ではハヴァースおよび骨小腔における強い染色以外にも骨基質全体に陽性反応が散在していたのに対し、98日齢ではハヴァースおよび骨小腔とその周辺部だけが強染されていた(図3C)。オステオネクチンおよびオステオポンチンに対する免疫染色像は局在、加齢変化ともV型やVI型コラーゲンの染色像と類似していた(図3D)。

## 考 察

骨組織の発達、光学顕微鏡によって観察されたように、ハヴァース腔における骨基質の蓄積(ハヴァース腔の縮小)と骨細胞(骨小腔)の増加によって特徴づけられた。この形態的な加齢変化は、タンパク質および灰分含量の増加という組成的な加齢変化と対応しており、骨内部も動物の成長に伴い発達することが明らかとなった。

動物の体を支える骨の物理的機能は、同心円状構造を呈する骨単位の集積に依拠しているが、ハヴァース腔において骨単位が形成されるためにはI型コラーゲンとヒドロキシアパタイトが規則的に蓄積する必要がある(KRISTIC, 1978)。V型およびVI型コラーゲンはI型コラーゲンとの結合性を有し、組織特異的なコラーゲンの立体配置に関与していることが知られており(LINSENMAYER, 1991)、オステオネクチンとオステオポンチンはカルシウム結合性を有し、骨におけるヒドロキシアパタイト沈着への関与が知られている(ROACH, 1994)。免疫染色像においてこれらの微量成分は、骨単位形成前のハヴァース腔に局在していたことから、I型コラーゲンとカルシウムの規則的な蓄積には、V型やVI型コラーゲン、オステオネクチン、オステオポンチンなどの微量成分が密接に関与していることが示唆された。

従って、骨の物理的機能を担っているのは骨ECMの主要成分であるI型コラーゲンとカルシウムであるが、骨の発達にとって重要なのは微量成分と考えられた。しかし、骨には構造糖タンパク質やプロテオグリカンも微量ECM成分として存在しており(FISHER *et al.*, 1987)、今後の検討が必要と考えられる。

骨の発達に伴う ECM の変化

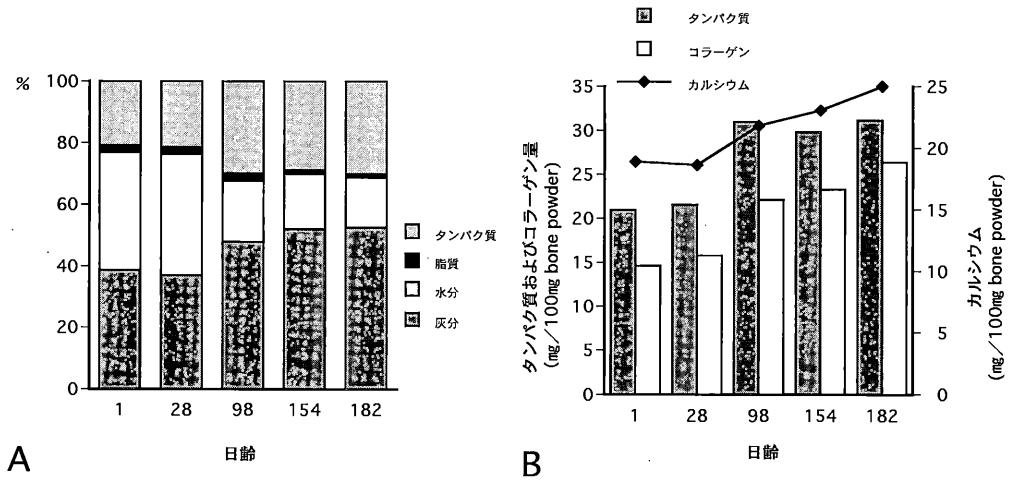


図1 成長に伴う骨組成の変化

骨の一般組成 (%) を(A)に, 骨 100mg 中のタンパク質, コラーゲン, カルシウム含量 (mg) を(B)に示す.

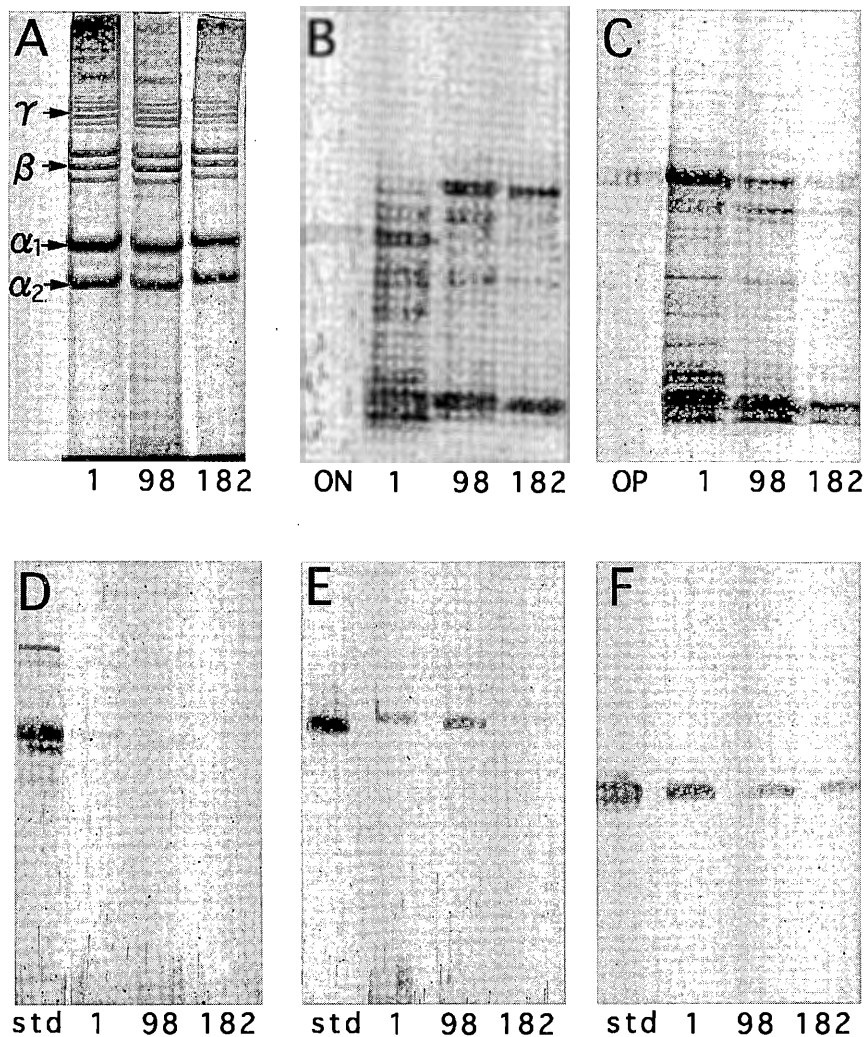


図2 骨タンパク質の SDS-PAGE およびウエスタン・ブロッティング像

A は脱灰後の骨粉に残存するタンパク質, B は EDTA 抽出画分, C は塩酸抽出画分の CBB 染色した電気泳動像を, D, E, F は脱灰後ペプシン処理により得られた画分の各々抗III型, 抗V型, 抗VI型コラーゲン抗血清による免疫染色像を示す. A の  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  は I 型コラーゲンの鎖名を, B のオステオネクチン (ON), C のオステオポンチン (OP) および D, E, F の std は免疫染色に際し用いた標準タンパク質を, 数字は日齢を表す.

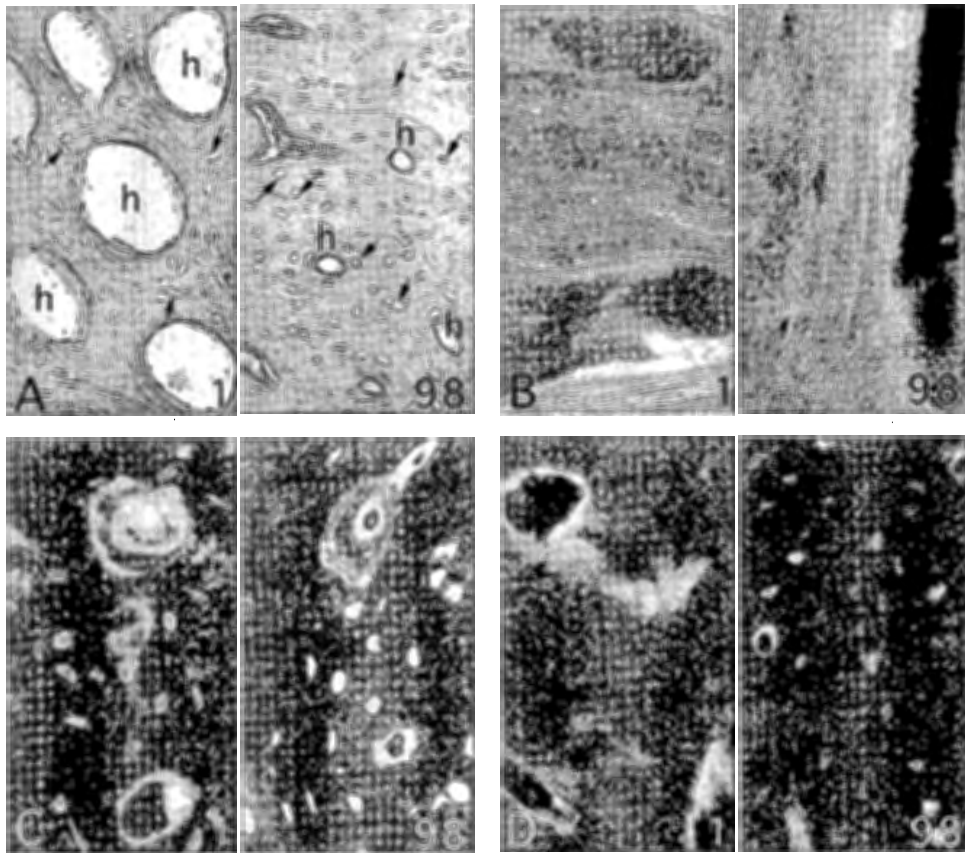


図3 骨横断面のHE および間接蛍光抗体染色像

AはHE染色像を、Bは抗I型コラーゲン、Cは抗VI型コラーゲン、Dは抗オステオネクチン抗血清を第一抗体として用いた免疫染色像を示す。図中のhはハヴァース腔を、矢印は骨小腔を、数字は日齢を表す。倍率は35倍。

## 文 献

- BERGMAN, I. and R. LOXLEY (1963) Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal. Chem.*, **35**: 1961-1965.
- CHALKLEY, H.W. (1943) Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. *JNCI*, **4**: 47-53.
- FISHER, L.W., G.R. HAWKINS, N. TUROSS and J.D. TERMINE (1987) Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, and bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *J. Biol. Chem.*, **262**: 9702-9708.
- GERSTENFELD, L.C., M. FENG, Y. GOTOH and M.J. GLIMCHER (1994) Selective extractability of non-collagenous proteins from chicken bone. *Calcif. Tissue. Int.*, **55**: 230-235.
- GRYNPAS, M.D., J.H. TUPY and J. SODEK (1994) The distribution of soluble, mineral-bound, and matrix-bound proteins in osteoporotic and normal bones. *Bone*, **15**: 505-513.
- LINSENMAYER, T.F. (1991) Collagen. in *Cell Biology of Extracellular Matrix* 2nd ed. (Hay, E.D. ed) 7-44. Plenum Press. New York.
- KRISTIC, R.V. (1978) Die gewebe des menshen und der saugtiere. 214-221. Springer-Verlag. Berlin.
- 久保木芳徳 (1995) 骨形成と細胞外マトリックス. *蛋白質核酸酵素*, **40**: 475-491.
- ROACH, H.I. (1994) Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralization and resorption. *Cell Biolo.Int.*, **18**: 617-628.
- 杉本 到・太田博明・野澤志朗 (1997) 老年性骨粗鬆症のメカニズムの解析. *組織培養工学*, **23**: 431-434.