

乳成分中の骨の成長に関わる成分と軟骨内骨代謝に関する研究

明海大学歯学部口腔解剖第一 教授 久米川 正 好

1. はじめに

乳中のカルシウムが、カルシウム吸収の促進や骨粗鬆症の改善に効果があり、骨形成を高めることは数多く報告されている。しかし、乳中の成分中には、カルシウム以外にも骨代謝に関与する物質が存在することが明らかにされている。例えば、牛乳中の乳清画分には、骨芽細胞を増殖・分化させたり、破骨細胞の活性化を制御する成分が存在することが明らかとなっている。

一方、授乳期の骨は、軟骨内骨化様式によって成長する。この骨の成長にも乳成分は深く関わっていることが考えられる。しかし、乳成分の骨成長への作用については、解明が進んでいない。授乳期における乳幼児の骨の成長は、主として軟骨内骨代謝様式によっておこる。これまでに、我々は、大阪大学の関先生らと共同研究で、軟骨基質から軟骨内骨化に関係している成分を分離してきた。その中にAngiogeninが大量に含まれており、血管新生とともに破骨細胞の形成・活性化に関与することを明らかにした。

本研究では、乳中のAngiogeninを大量に精製し、破骨細胞に対する効果を調べた。

また、精製過程で得られるAngiogeninを多く含む乳清蛋白質 (WP) 画分 (Angiogenin rich WP) を若齢期のラットに投与してその効果を調べた。

2. 方 法

2-1. 牛乳からのAngiogeninの精製

未殺菌の牛乳40lを脱脂し、pH4.6にしてカゼインを沈殿させて除いた。そして、80℃、10分間加熱して5,000rpmで遠心して上清を30l得た。これを濃縮して、10lにした後、凍結乾燥した。凍結乾燥後、4lのイオン交換水で溶解し10,000rpmで遠心して上清を得た。さらに、エタノールで最終濃度が40%となるようにして、4℃で一晩放置した。沈殿を遠心により集め、70%アルコールで洗い、アルコール吸引濾過後風乾により取り除き、1lの蒸留水で溶解した。この粗画分をMono Sクロマトに流速1 ml/minで流し、リン酸Buffer (pH7.0) で洗浄した。洗浄後、1MのNaClを含むリン酸Buffer (pH7.0) で濃度勾配溶出し、Angiogeninを多く含む粗画分を得た。この操作を3回繰り返した。さらにSuperose12により分画後、Mono Qにより分画した。最後にODSの逆相クロマトにより分画して、Angiogeninを得た。この標品のアミノ酸配列は、気相アミノ酸配列分析装置で確認した。

2-2. 全骨細胞を用いた骨吸収評価法

全骨細胞は、13日齢のマウスの大腿骨から調整した。摘出した骨の軟組織を取り除き、MEM中で5分間解剖用ばさみを用いて細かく破碎した。この破碎物をさらにチューブミキサーで30秒間激しく攪拌し、4分間静置することにより大きな破碎物を除いた。生細胞数は、血球計測盤で測定し、破骨細胞と骨芽細胞は、それぞれtartrate-resistant phosphatase (TRAP) と alkaline phosphatase (ALP) の染色を行うことにより識別した。既存の破骨細胞による骨吸収活性は、 3×10^5 個の細胞を含んだ5%FBSを補った200 μ lの α -MEMを96穴プレート中の象牙片上に播種し、2時間培養した後、試験物質を添加した培地に10-8M 1,25(OH)2D3を添加することにより行った。培養終了後96穴プレート中でHandy Engine (吉田精工) にブラシを装着することによって細胞を取り除きacidhematoxylin (Sigma) で3分間染色した。破骨細胞によって形成されたpitの総面積は、画像処理装置 (PIASLA 555) を用いて計測した。

2-3. 動物実験

3週齢のSprague-Dawley系雌ラットを1週間予備飼育した後、1群8匹ずつ2群に分けた。飼育は、12時間ごとの明暗サイクルの環境で行い、飼料およびイオン交換水を自由摂取させた。飼料は、AIN-76を基本組成として、試験群に粗Angiogenin画分0.1%添加した。4週間の飼育後、麻酔下で頸骨を摘出し、ホルマリンで固定した。そして、脱灰後、ミクロトームで薄切して観察した。

3. 結 果

3-1. Angiogeninの牛乳からの精製

牛乳120lから、方法で記述したように行い、Angiogeninを含む粗画分として、14.5gを得た。さらに、純度の高い画分を得るために、さらに3stepで精製して、最終的に約10mgの純度の高いAngiogeninを得た。最終のAngiogenin精製のクロマトチャートをFig. 1に示した。得られた標品を気相アミノ酸配列分析装置で構造を比較した結果、Fig. 2に示すように構造が一致した。

3-2. Angiogeninの破骨細胞に対する作用

Angiogeninの破骨細胞に対する作用を調べるために、マウスの破骨細胞を含む骨細胞を用いて検討した。既存の破骨細胞に対する効果の結果をFig. 3に示した。既存の破骨細胞にたいして、Angiogeninは、濃度依存的に骨吸収を促進した。破骨細胞の形成による作用の結果をFig. 4に示した。その結果、破骨細胞の新たな形成とその活性においても、Angiogeninは、濃度依存的に骨吸収を促進した。

3-3. Angiogenin粗画分 (Angiogenin rich WP) の幼若動物への投与

Angiogeninの軟骨組織への効果を把握するために、幼若ラットにAngiogenin粗画分を投与した。

4週齢から7週齢まで飼育して、その頸骨の骨端成長板について観察した。その結果、Fig. 5に示したように、Angiogenin rich WP群で軟骨の骨端成長板が伸長されていることがわかった。さらに、その長さを測定したところ、明らかに骨端成長板が長くなっていることが確認された。さらに、骨端成長板の成長軟骨層の下に存在する破軟骨細胞が増加していた。

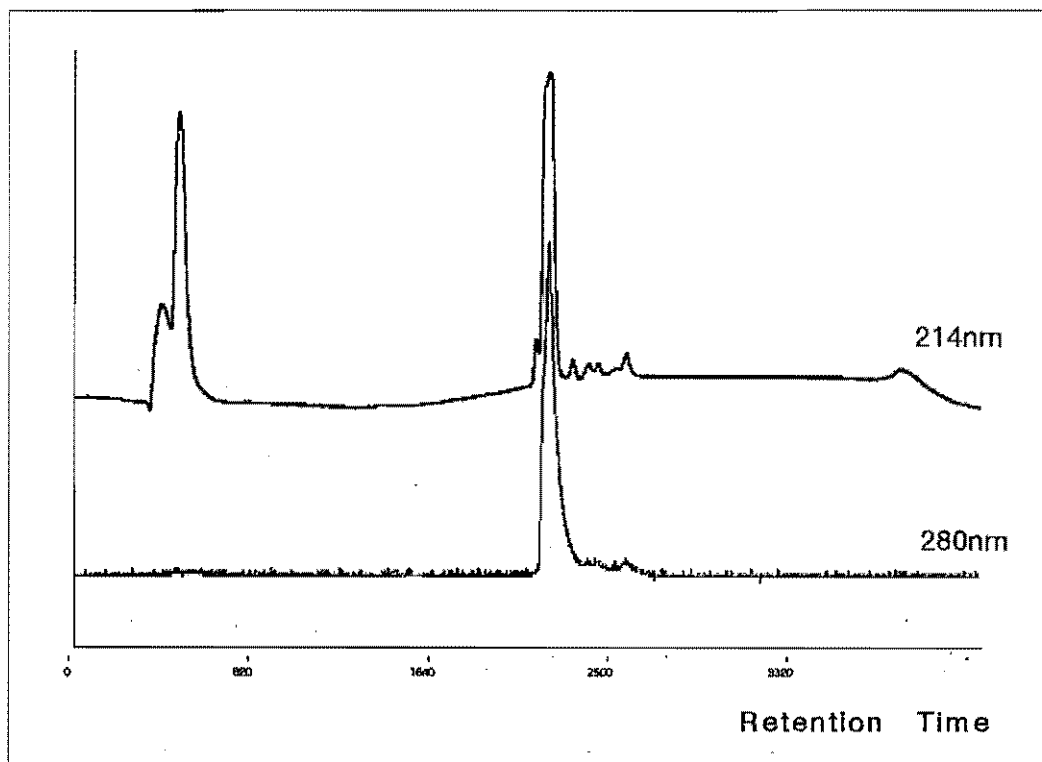


Fig. 1 Reversed phase column chromatography of angiogenin fraction from milk.

| | |
|-------------------|------------------------------------|
| sample | AQDDYRYIHFLTQH YDAKPKGRNDE |
| bovine angiogenin | AQDDYRYIHFLTQH YDAKPKGRNDE |

Fig. 2 Comparison of amino acid sequence between purified protein and its homologous sequence. Amino acid sequence are described with the standard single-letter notation for amino acid residues.

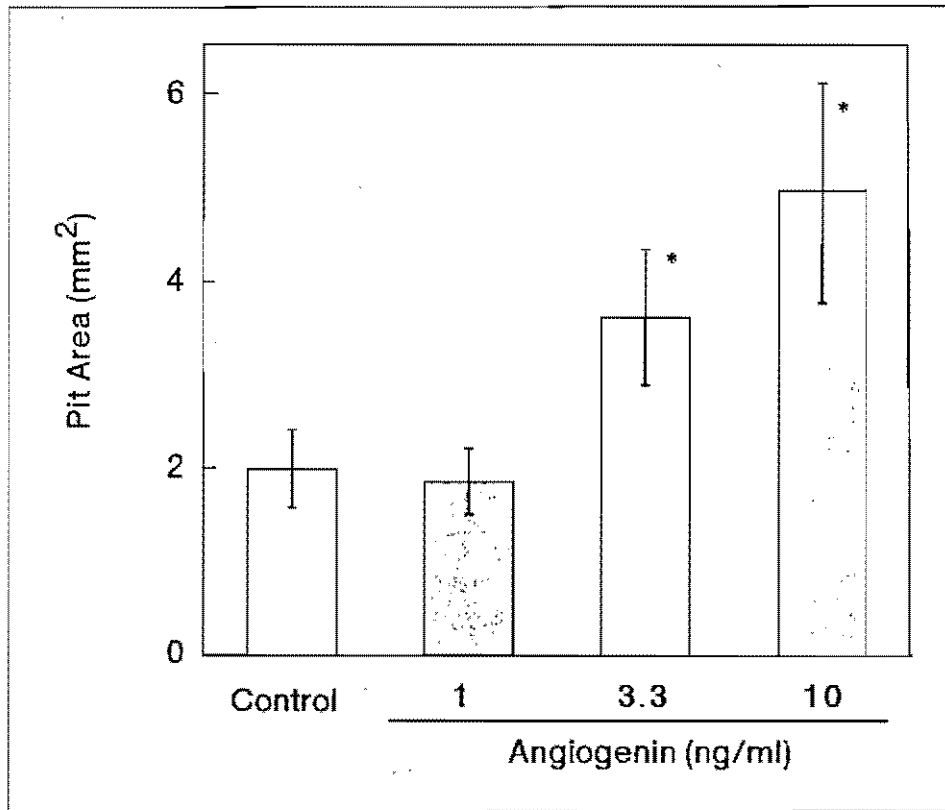


Fig. 3 Effect of angiogenin on pre-existed osteoclast bone resorption using unfractionated bone cells. Results are expressed as mean \pm SD. *significant different from the control group ($p < 0.05$).

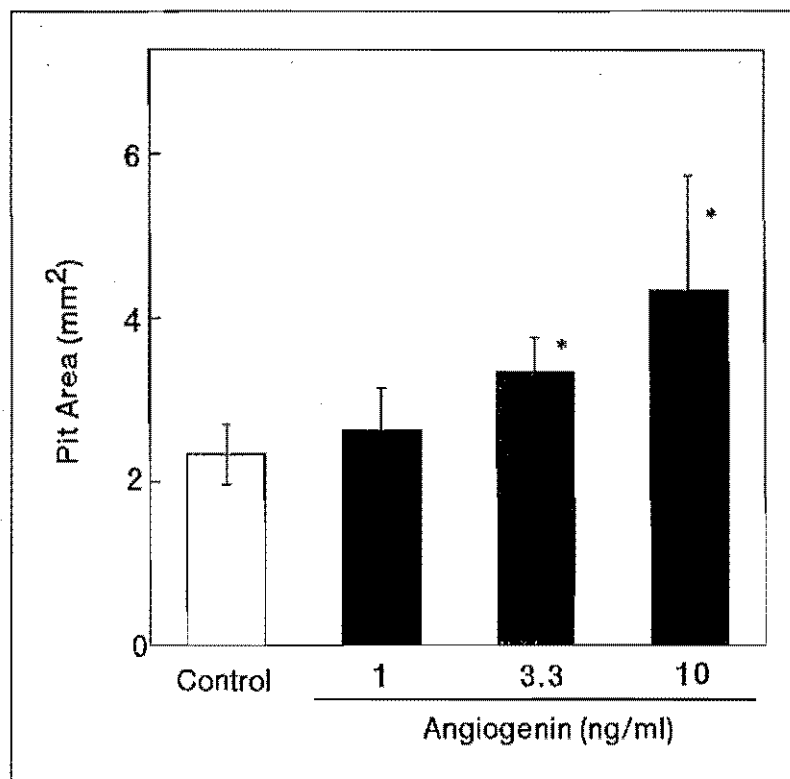


Fig. 4 Effect of angiogenin on newly-formed osteoclast bone resorption using unfractionated bone cells. Results are expressed as mean \pm SD. *significant different from the control group ($p < 0.05$).

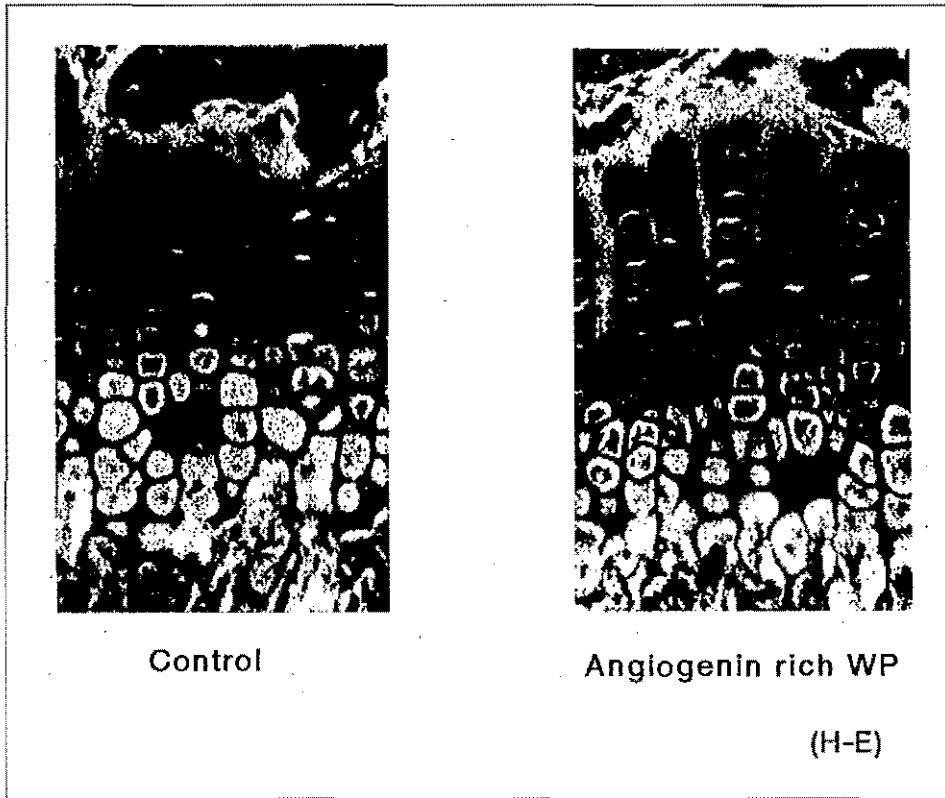


Fig. 5 Effect of angiogenin rich WP on epiphyseal cartilage growth plate.

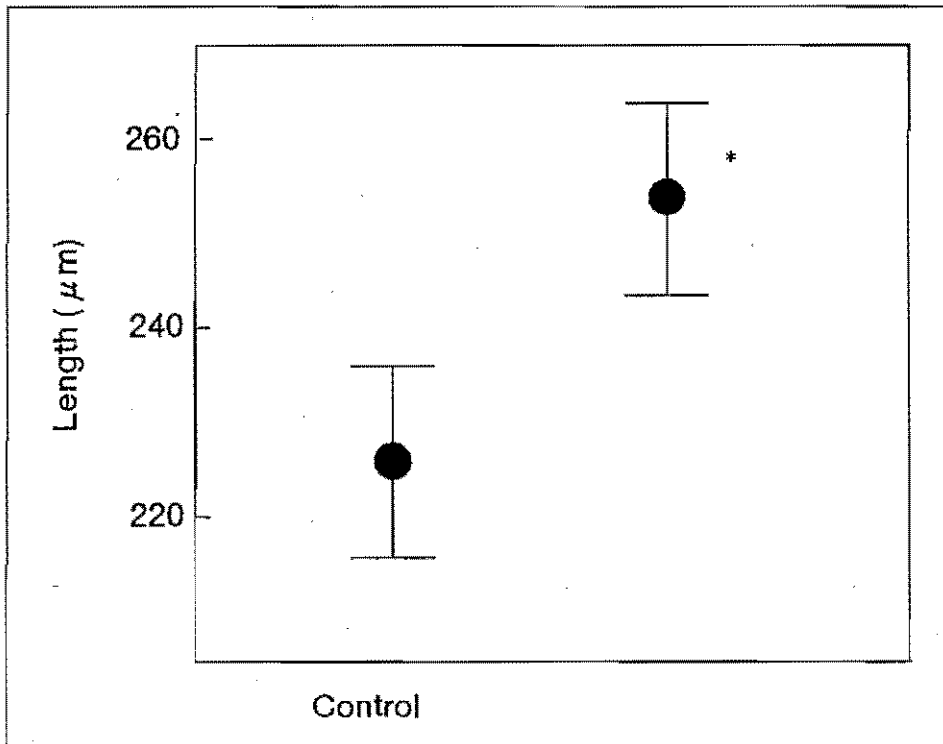


Fig. 6 Effect of angiogenin rich WP on length of epiphyseal cartilage plate. Results are expressed as mean \pm SD. *significant from the control group ($p < 0.05$).

4. 考 察

授乳期の骨は、軟骨内骨化様式によって成長する。胎児期では軟骨モデルが主体で、出産後急激に成長する。軟骨細胞の増殖・分化そして軟骨基質の石灰化を繰り返して骨は長くなる。次いで、石灰化した軟骨基質を血管の新生と破骨細胞によって吸収して、骨髄をつくるとともに、2次海綿骨を造って骨へと変化する。このような骨の形成によって身体を支え運動の起点となる骨格が形成される。この骨の成長に乳成分は深く関わっていることが考えられる。授乳期における乳幼児の骨の成長は、主として軟骨内骨代謝様式によっておこる。骨の軟骨内骨化の過程に乳成分がどう関わっているのかを明らかにすることは、たいへん重要であると考えている。これまでの我々の検討において、軟骨基質から多く見いだされたAngiogeninが骨の成長に寄与することが考えられた。

そこで乳中のAngiogeninに注目して、その作用を調べることにした。まず、乳からAngiogeninを精製することとした。牛乳120lからAngiogeninを含む粗画分として14.5gを得た。さらに、純度の高い画分を得るために、さらに3stepで精製して、最終的に約10mgの純度の高いAngiogeninを得た。

Angiogeninの破骨細胞に対する作用を調べるために、マウスの破骨細胞を含む骨細胞を用いて検討した。この評価系は、ストローマ細胞などの破骨細胞以外の細胞も含むため、より生体に近い形で調べることができる。そして、分離直後に含まれている破骨細胞に対する効果と新たに形成される破骨細胞の活性を分けて評価することが可能である。既存の破骨細胞に対して、Angiogeninは、濃度依存的に骨吸収を促進した。このことは、Angiogeninが骨吸収を促進することを示している。さらに、破骨細胞の新たな形成とその活性においても、Angiogeninは、濃度依存的に骨吸収を促進した。このことからAngiogeninが破骨細胞の誘導もすることがわかった。Angiogeninは、なぜ破骨細胞の骨吸収を高めるかについて興味深いことと思われる。牛乳は骨粗鬆症にとって優れているとされているが、骨吸収が高まる成分が存在することはかえって悪いことのように考えられる。この課題の解決は、牛乳の骨に対する作用をみる上で重要である。この作用がどのように働くかを実際の動物で確かめることとした。

Angiogeninの軟骨組織への効果を把握するために、幼若ラットにAngiogenin粗画分を投与した。4週齢から7週齢まで飼育して、その頸骨の骨端成長板について観察した。その結果、Fig. 5に示したように、Angiogenin rich WP群で軟骨の骨端成長板が伸長されていることがわかった。さらに、その長さを測定したところ、明らかに骨端成長板が長くなっていることが確認された。このことは、このAngiogenin粗画分を加えた群で軟骨内骨化が活性化された可能性があり、骨の形成が高まったと考えられる。そして、骨端成長板の成長軟骨層の下に存在する破軟骨細胞が増加しておりin vitroの結果と一致した。このことから、Angiogeninが軟骨から骨への形成になんらかの効果を及ぼすことが推定された。次年度以降に再度動物実験を行い、破軟骨細胞と骨芽細胞との関係を明らかにしていきたい。

課題としては、なぜAngiogeninが軟骨で多く見いだされ、軟骨性骨化にどのようなメカニズムで働くかを詳しく解明する必要がある。そして、Angiogeninがなぜ牛乳に多く存在するかである。現在、

純度の高いAngiogeninを大量に精製できたことから、まず始めに軟骨細胞に対する作用、骨芽細胞に対する作用について調べていきたい。そして、純度の高いAngiogeninを幼若なラットに投与することを計画している。牛乳の骨に対する機能をさぐる上でもさらなる検討が必要である。