

実験的骨形成モデルを用いた初期の骨形成に 及ぼすカドミウムの影響

—アルカリフォスファターゼ, カルシウム, 燐,
およびオステオカルシン mRNA の動態—

奈良県立医科大学公衆衛生学教室

勝 田 敏 哉

EFFECT OF CADMIUM ON THE EARLY STAGE OF OSTEOGENESIS BY BONE MARROW CELLS AND DEMINERALIZED BONE MATRIX : BEHAVIOR OF ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY, CALCIUM, PHOSPHORUS, AND OSTEOCALCIN mRNA

TOSHIYA KATSUDA

Department of Public Health, Nara Medical University

Received March 31, 1994

Abstract : To determine the direct effect of cadmium (Cd) on bone formation, the potential of Cd-treated bone marrow cells and demineralized bone matrix (DBM) to form bone and cartilage was assessed using a diffusion chamber (DC) *in vivo*, by measurement of biochemical parameters such as alkaline phosphatase (ALP) activity, total calcium and phosphorus contents, the bone-specific protein, osteocalcin content, and by the gene expression of osteopontin and osteocalcin.

Diffusion chambers were inoculated with DBM and bone marrow cells from either Cd-treated or non-treated rats (control) and were then implanted subcutaneously into syngeneic non-treated rats. Unlikely in control DC, a peak of ALP activity did not occur at 4 weeks postimplantation in DC implants inoculated with Cd-treated bone marrow. ALP activity, and calcium and phosphorus contents in these Cd-treated DC implants were significantly lower than those of the control DCs at the early stage of implantation. The accumulation of osteocalcin in DCs with Cd-treated bone marrow was also significantly lower than that in control DCs.

By gene expression analyses, osteopontin mRNA was intensely expressed in the DC with control and followed with Cd-treated bone marrow DC 5 weeks after implantation. On the contrary, the expression of osteocalcin mRNA in the DCs with Cd-treated bone marrow was much lower than that in control DCs by both Northern blot analysis and also *in situ* hybridization. These results indicate that Cd administration restrains the osteoblastic differentiation pathway in bone marrow through direct effects on these cells.

Index Terms

osteogenesis, osteocalcin, alkaline phosphatase, bone marrow, cadmium, *in situ* hybridization

結 言

カドミウム(Cd)の長期曝露によって、骨や腎臓に障害を引き起こすことは、イタイイタイ病患者や産業現場でのCd曝露作業者を対象とした病理組織学および生化学的研究により知られていた¹⁾²⁾。こうした現象に加えて、Cdによる慢性腎障害の起こる機序は肝臓のCdによる機能障害の結果、肝臓から血液中に流出したCd-チオネインが腎臓に移行して近位尿細管刷子縁膜を傷つけることによって二次的に起る機能障害であるとする新しい説³⁾が報告された。

一方Cdによる骨障害は、腎障害によりビタミンD₃活性化が阻害され⁴⁾、そのため腸管からのCa吸収、腎尿管でのCa再吸収が障害されることによって二次的に起こるとする考え方がある⁵⁾。またクローン化された骨芽細胞やマウス頭蓋冠を用いた *in vitro* の培養実験における生化学的研究からCdは直接骨組織に作用して、骨吸収や骨形成を阻害するとも報告されている⁶⁾⁷⁾。このように骨障害の機序についてはこれまで多くの研究がなされているにもかかわらずいまだ不明な点が多く定説化されていない。

以前より骨髄細胞を異所性部位に移植すると未分化間葉細胞が分化し、軟骨や骨を形成することが知られていた⁸⁾。最近 Ohgushi *et al*⁹⁾はラット骨髄細胞と多孔性セラミック(ハイドロキシアパタイト)をラット皮下に移植すると未分化間葉幹細胞がセラミックの気孔表面で骨芽細胞に分化し骨組織を新生することを証明した。他方 Dohi *et al*¹⁰⁾は、レシビエントの細胞が侵入できない閉鎖性骨形成モデルとしてミリポアメンブレンで囲んだディヒュージョンチャンバー(DC)内にラット骨髄細胞と脱灰骨粉を封入してラット皮下に移植する実験系を確立した。

本研究はCdの初期の骨形成への直接作用を解明する目的で、Cdを曝露したラット骨髄細胞と脱灰骨をDCに封入し、ラット背部皮下に移植する *in vivo* に近い骨形成モデルを応用した。DC内新生骨について骨の形成の指標となるCaやリン(Pi)の沈着量、骨芽細胞膜に存在するアルカリフォスファターゼ(ALP)活性、また非コラーゲン性蛋白質であるオステオカルシン(OC)の合成量を定量分析し、かつDC内の骨形成過程におけるOCや同じく骨基質蛋白質オステオポンチン(OP)の発現に対するCdの影響を、OCおよびOP cDNAプローブを用いたノザンプロット法と、組織切片上で標識RNAをブ

ローブとして組織内に分布するmRNAを検出する方法である *In situ* ハイブリダイゼーション法(ISH法)により検討した。

材料および方法

1. ラット脱灰骨基質(DBM)の調製

ラットDBMはNishimoto *et al*¹¹⁾の方法により調製した。すなわち3カ月齢ラット大腿骨、脛骨を採取し液体窒素中で破砕した骨粉(74-420 μm)を0.5 N HCl中、4℃で1時間ずつ攪拌しながら3回脱灰をおこなったのちpH 6.0になるまで蒸留水で洗浄した。続いて95%エタノールで20分、3回、その後エーテルで洗浄した。脱灰骨粉は室温で16時間風乾し、-20℃で保存した。

2. ラットへのカドミウム(Cd)投与方法と骨髄細胞浮遊液の調製法

生理食塩水に溶かしたCdCl₂(Cdとして200 μg/ml)を12匹の4週齢Wistar系雄ラット(体重65±5g)に750 μg/kg体重で4週間、週に3回皮下投与した(Cd投与群)。対照群のラットには同量の生理食塩水を皮下に投与した。Cd投与群の8週齢雄ラットの大腿骨、脛骨より骨髄を採取し、35 units/mlのヘパリン含有0.01 M phosphate buffer/0.15 M NaCl, pH 7.2(PBS)中でゲージの異なる注射針で繰り返し吸引し骨髄細胞浮遊液(5~6×10⁷ cells/ml)を調製した。Cd投与群および対照群の骨髄有核細胞の生死はトリパンブルー染色法により調べ、生存率90%以上であることを確認して以下の移植実験に供した。

3. ディヒュージョンチャンバー(DC)の移植方法

ディヒュージョンチャンバー(DC, 直径9 mm 厚さ2 mm, 容量130 μl, メンブランフィルターの孔径0.45 μm, Millipore社製, MA, USA)をエチレンオキシドガスで滅菌したのち、ラット骨髄細胞浮遊液(5×10⁶ cells/90 μl)とDBM 10 mgをDCに封入した。8週齢Wistar系雄ラット(190~210 g)の背部皮下に上記のように調製したCd投与群および対照群のラット骨髄細胞とDBMを封入したDCを3個づつそれぞれ別々のラットに移植した。3, 4, 5, 6週後にDCを摘出し、一部を直ちに20 kv, 1 mAの軟X線で撮影した。

4. カルシウム(Ca), Cdおよびリン(Pi)濃度の測定

CaとCdの定量は原子吸光度計(AA-810 type: Nippon Jarrel-Ash社製, 京都)で行った。Piは試料を濃硫酸と過塩素酸により湿式灰化後、Chen *et al*らの方法¹²⁾で比色定量した。Ca, Piおよびオステオカルシンの

抽出方法は、摘出した DC のメンブランフィルターを除去して、それぞれの新生骨組織の湿重量を秤量したのち DC 内新生骨組織を 20% 蟻酸中でホモジナイズし、4°C 48 時間振盪した。蟻酸抽出物の一部を Pi およびオステオカルシンの測定に供し、他の一部を 1 mg/ml の塩化ストロンチウム溶液で 200 倍に希釈し、Ca 濃度の測定に供した。

Cd 投与ラットの大腿骨、脛骨、肝、腎、骨髄中の Cd 濃度は濃硝酸と濃過塩素酸により各組織を湿式灰化し、脱イオン蒸留水で希釈後原子吸光法で測定した。

5. アルカリフォスファターゼ(ALP)活性の測定

1 mM MgCl₂ を含む水冷した 0.2% Nonidet P-40 0.5 ml 中で DC 内新生骨をマイクロホモジナイザーにより碎片したのち 4°C で 15,000 g 15 分の遠心分離後、その上清について ALP 活性¹³⁾を測定した。すなわち 0.56 M 2-Amino-2-methyl-1, 3-propanediol (AMP buffer pH 9.8)/1.0 mM MgCl₂/10 mM p-Nitrophenylphosphate からなる基質液 1 ml に先の上清を 5 μl 加えて 37°C 30 分インキュベートしたのち、0.2 N NaOH を 2 ml 加えて反応を停止させ、410 nm における吸光度を測定した。ALP 活性は骨組織 1 mg 当たり 30 分間に基質から遊離した p-nitrophenol の μ mole 数で表した。

6. オステオカルシン量の測定

DC 内新生骨を 20% 蟻酸中でホモジナイズして、4°C 48 時間脱灰後、その脱灰抽出物を Sephadex G-25(fine)カラムにより脱塩し、蛋白画分を凍結乾燥してオステオカルシン(OC)の Radioimmunoassay(RIA)に供した。ラット OC 標品は Ohtawara *et al* の方法¹⁴⁾で精製した。すべての試料について抗ラット OC ウサギ血清とラット ¹²⁵I 標識 OC を用いた RIA 法で定量した¹⁵⁾。

7. cDNA プロープの作製とノザンプロッティング法

1) ラットオステオポンチン(OP)cDNA の作製法

ラット OP の cDNA は次のように作製した。ラット OP の DNA 塩基配列¹⁶⁾より Pro⁵⁷ から Glu⁶⁴ に相当する 24-mer の oligonucleotide を 5'側のプライマーとして、また Ser²⁸³ から Leu²⁹⁰ に相当する 24-mer の oligonucleotide を 3'側のプライマーとして DNA 合成機 (Applied Biosystems Japan 社製, Mode 391) で合成した。ラット海綿骨より全 RNA を抽出し、Oligo-dT latex beads (日本ロシユ社製) を用いて mRNA を精製後、逆転写酵素 (Amersham Japan 社製) により cDNA ライブラリーを作製した。この cDNA をテンプレートとして polymerase chain reactions (PCR) 法により 702 bp の OP cDNA を増幅した。増幅した OP cDNA はア

ガロースゲル電気泳動とガラスビーズ (Gene Clean Kit, BIO 101 Inc, CA, USA) により精製し、その塩基配列は DNA sequencer (DSQ-1 NE, 島津理化学器械 K.K.) によりラット OP cDNA であることを確認した。

2) cDNA プロープの ³²P 標識法

ラット OC cDNA (363 bp, Dr. P. A. Price, UCLA より供与)、ラット OP cDNA (702 bp) およびラット β-アクトチン cDNA (207 bp Dr. Y. Dohi より供与) は [α-³²P] dCTP と multi-random primer labeling kit (Ready-To-Go: Pharmacia Biotech 社製) を用いてそれぞれラベルした (比放射能活性: 8 × 10⁸ cpm/μg DNA)。

3) 全 RNA の抽出とノザンプロッティング法

全 RNA は移植 5 週後の 6 個の DC より酸性 guanidine thiocyanate (AGPC) 法¹⁷⁾ で抽出した。全 RNA 5 μg を MOPS (0.04 M 3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid/5 mM Sodium citrate/0.5 mM EDTA, pH 7.2) -ホルムアルデヒド中で 65°C, 15 分間加熱変性させ、1.1% アガロースゲル-ホルムアルデヒド中で電気泳動した。泳動後の RNA をエチジウムブロマイドで染色し 28 S と 18 S のリボゾーム RNA のバンドを確認し、ナイロンメンブランフィルター (Hybond-N⁺; Amersham Japan 社製) に転写した。

³²P でラベルしたそれぞれの cDNA プロープ (1.6 × 10⁷ cpm) を添加した Quick Hyb™ 液 (Stratagene 社製 CA, USA) 中でナイロンメンブランを 68°C, 2 時間ハイブリダイズしたのち常法に従って充分洗浄した。ハイブリダイズしたナイロンメンブランを Kodak XO mat™ フィルムに -80°C 下で 48 時間露光してオートラジオグラムを作製した。

8. *In situ* ハイブリダイゼーション法

1) OC cDNA 挿入プラスミドの作製

プラスミド SP 6/OC cDNA の作製法は SP 6 と T-7 のプロモーター¹⁸⁾ を含むプラスミドベクター (pSP 6/T-7) の Eco RI 切断部位に Eco RI OC cDNA 断片を T 4 DNA ligase を用いて挿入し、大腸菌 HB 101 にトランスフォームした。得られたクローンのプラスミド DNA の Sst I での切断部位より判断してアンチセンス RNA とセンス RNA プロープを合成できる 2 種類の cDNA 挿入プラスミド (pSP 6/T-7/rev OC•DNA および pSP 6/T-7/OC DNA) を得た。pSP 6/T-7/rev OC•DNA あるいは pSP 6/T-7/OC DNA は制限酵素 Bam HI により直鎖状にし、フェノール、クロロホルムで精製した後、ジエチルピロカーボネイト (DEPC) で処理した滅菌蒸留水 (DEPC-DDW) 20 μl を加え -20°C で保存した。

2) ジゴキシゲニン(DIG)標識 OC RNA プロープの作製

ジゴキシゲニン(DIG)標識 OC アンチセンス RNA プロープは DIG-RNA Labeling Kit(Boehringer Mannheim 社製)を用いて以下のとおり作製した。制限酵素 Bam HI により直鎖にした pSP 6/T-7/rev OC・DNA(4 μ g)をテンプレートとして、RNase inhibitor(RNasin)を 20 units, 非標識 ATP, CTP, GTP をそれぞれ 10 nmol, 非標識 UTP 0.5 nmol, DIG-11-UTP 10 nmol を終濃度 1 x 転写用緩衝液(40 mM Tris-HCl pH 7.5/6 mM $MgCl_2$ /2 mM spermidine HCl/5 mM NaCl), 6 mM のジチオスレイトール(DTT)に混合し、最後に SP 6 RNA ポリメラーゼ 45 units を加え全量 30 μ l とした。これを 37°C 2 時間反応させた。ついで DNase I 20 units で DNA テンプレートを分解後終濃度 12.5 mM EDTA を加え反応を停止させた。さらに 5 M LiCl と冷エタノールを加え、合成された DIG-RNA を沈殿させ 15,000 g で遠心分離した。沈殿を 80 % エタノールで洗浄したのち、減圧乾固してホルムアミド 10 μ l と DEPC-DDW 20 μ l を加えて -20°C で保存した。得られた DIG-RNA はアガロースゲル-ホルマリン電気泳動後ノザンプロットによりその RNA サイズを確認した。DIG 標識 OC センス RNA プロープは pSP 6/T-7/OC・DNA をテンプレートとして上記と同様に作製した。

3) 組織切片の作製

移植した DC を滅菌下でラット皮下より採取後、メンブランフィルターを除去し 4 % パラフォルムアルデヒド(PFA)/0.1 M PBS(4°C)で一晩固定した。その後 4°C, 70 %, 90 %, 100 % 各エタノールで順次脱水した後、キシレンに 3 時間、60°C のパラフィンに 3 時間浸漬後パラフィン包埋した。切片はミクروتームにより約 4 μ m の厚さに作製し、滅菌後シラン処理したスライドガラス¹⁹⁾上に載せ、ホットプレート上で数日間乾燥させた。

4) *In situ* ハイブリダイゼーション法

DIG 標識 RNA プロープを用いた野村ら²⁰⁾の方法を一部改変し Fig. 1 に示したプロトコールに従った。

スライドガラスに貼り付けた組織切片をキシレンに 20 分ずつ 3 回浸漬して脱パラフィン完了後、100 % エタノール 3 回、90 %, 70 % エタノールで 15 秒ずつ順次親水し、さらに PBS に 1 分間漬けたのち 4 % PFA/PBS で 4°C, 20 分間再固定した。0.2 N 塩酸に 20 分、PBS に 1 分間漬け内因性 ALP を失活させた。プロテナーゼ K (10 μ g/ml 10 mM Tris-HCl buffer/1 mM EDTA (TE))で 37°C, 17 分反応させた後、PBS に 1 分、0.1 M トリエタノールアミン塩酸(TEA, pH 8.0)に 1 分、0.25

%無水酢酸/TEA に 10 分浸漬し、アセチル化を行ったのち、PBS に 1 分間つけ、70 %, 100 % エタノールで順次脱水したのち風乾した。

ハイブリダイゼーション溶液は、DIG-RNA プロープ (0.6 μ g), tRNA(80 μ g, Bakers Yeast transfer RNA, Sigma 社製), 20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 2.5 mM EDTA(pH 8.0), 1 x Denhart's 液, 0.3 M NaCl, 50 % ホルムアミド, 10 % 硫酸デキストラン(Sigma 社製), DEPC-DDW を加えて全量 1 ml に調製し、90°C, 10 分間加熱した後、氷水中で急冷した。

前処理した切片に DIG-RNA プロープを含む上記ハイブリダイゼーション液を滴下し、パラフィルムで覆い、50 % ホルムアミドを入れたモイスチャーチャンパー内で 50°C 16 時間ハイブリダイズした。過剰の RNA プロープを洗浄するため以下の操作を行った。

50°C の 5 x SSC(0.075 M Sodium citrate/0.75 M NaCl)中でスライドガラスからパラフィルムを除去し、2 x SSC/50 % ホルムアミド中で 50°C 30 分間加熱後、10 mM Tris-HCl buffer pH 8.0/500 mM NaCl/1 mM EDTA(TNE)中で 37°C, 10 分間、ついで 1 μ g/ml の RNase A(Sigma 社)を加えた TNE 中で 37°C, 30 分間インキュベートし、さらに TNE 中で 37°C, 10 分、2 x SSC で 50°C, 20 分、0.2 x SSC で 50°C, 20 分 2 回繰り返し洗浄した。

DIG-RNA-mRNA ハイブリッドの検出は DIG Nucleic acid detection Kit(Boehringer Mannheim 社製)を用いて行った。室温で Dig buffer 1(0.1 M Tris-HCl/0.15 M NaCl, pH 7.2)で 5 分、1.5 % ブロッキング溶液/Dig buffer 1 で 60 分、Dig buffer 1 で 1 分処理したのち、500 倍に希釈した ALP 標識抗ジゴキシゲニン抗体を 30 分間反応させた。0.02 % Tween 20 含有 buffer 1 で 2 回 15 分間洗浄し、buffer 3 (0.1 M Tris-HCl/0.1 M NaCl/0.05 M $MgCl_2$, pH 9.5)に 3 分浸漬した後 ALP の基質である NBT(nitroblue tetrazolium salt)と X-Phosphate(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidinium salt)を混合した溶液を滴下し、モイスチャーチャンパー内で一晩反応させ発色させた。検鏡後 TE で反応を停止し、メチルグリーン染色の後封入し観察した。

結 果

1. Cd 投与ラットの組織中の Cd の蓄積

4 週齢 wistar 系雄ラットに $CdCl_2$ を 750 μ g/kg 体重で 4 週間(総量約 800 μ g/1 匹)投与したのちの血清、骨髄、皮質骨、肝臓、腎臓への Cd の蓄積量を Table 1 に

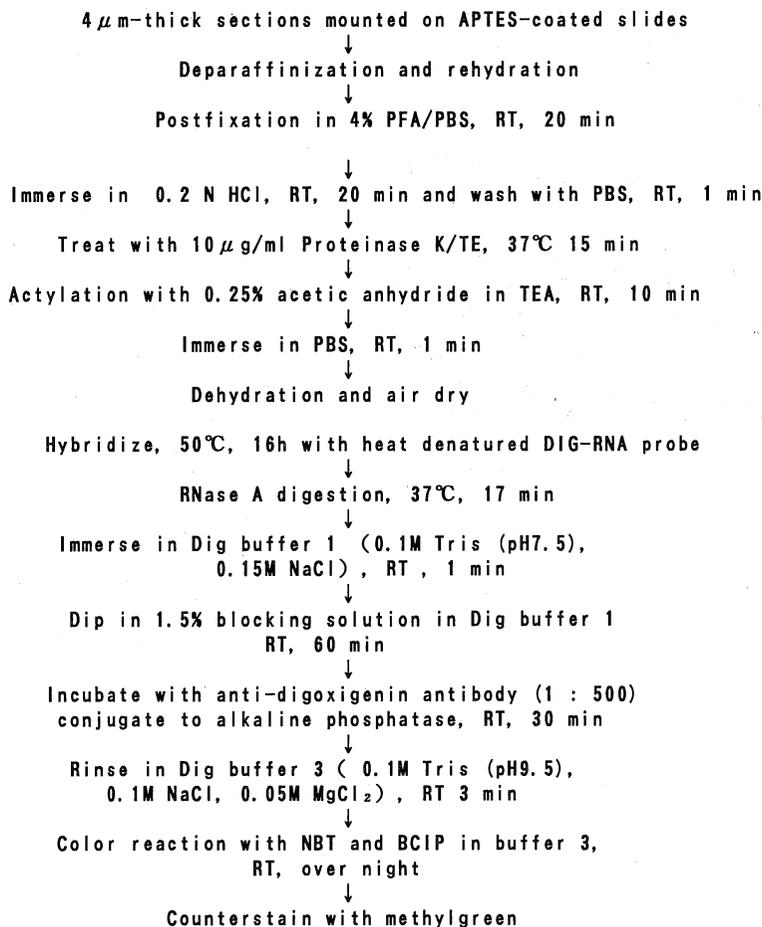


Fig. 1. Procedure of *in situ* hybridization.

Table 1. Cadmium concentration in rat tissues after repeated subcutaneous exposure to CdCl₂

Tissue	Cd μg/g wet tissue Cd exposure	Control
Serum	5.13 ± 1.11 ^a (6)	ND(5)
Bone marrow	3.22 ± 0.76 (6)	ND(5)
Bone	0.76 ± 0.28 (12)	ND(5)
Liver	50.95 ± 18.81(12)	<0.1(5)
Kidney	44.91 ± 5.97(17)	<0.1(5)

Every value in mean ± SD. Numeral is parentheses in number of rats. Tissues and blood were taken from the Cd-treated rats 3 days after the last Cd administration. Control is no Cd exposure. ND, not detected.

^ang/ml

示した。Cd 投与群のラット骨髄、肝臓、腎臓への Cd の蓄積量はそれぞれ 3.22 μg/g, 50.95 μg/g, 44.91 μg/g であり、対照群の検出限界以下に比して有意に高かった。

Cd 投与量の約 87% は肝臓と腎臓に蓄積され、血清中の Cd は 5.13 ng/ml と顕著に低濃度であったにもかかわらず、骨髄の Cd 濃度はその約 600 倍であった。

2. DC 内骨形成の組織学的検討

前述したように Cd を蓄積した骨髄細胞(Cd 投与群)と対照群の骨髄細胞とを使って脱灰骨基質(DBM)と共に DC 内に封入してラット背部皮下へ移植した。移植後 3 週目と 6 週目の DC 内新生組織の軟 X 線撮影をおこなった結果、対照群の DC では移植 3 週後、明らかに骨形成を示すデンシティの高い部分が観察され、6 週後には石灰化が進んでいた(Fig. 2)。ところが Cd 投与群の移植 6 週後では DC 内の石灰化も認められたが、対照群に比して低密度を示した。

Cd 投与群および対照群において骨髄細胞による移植 5 週後の DC 内組織切片の HE 染色組織像は、Fig. 3 に示したように、メンブランフィルターに接して骨が形成

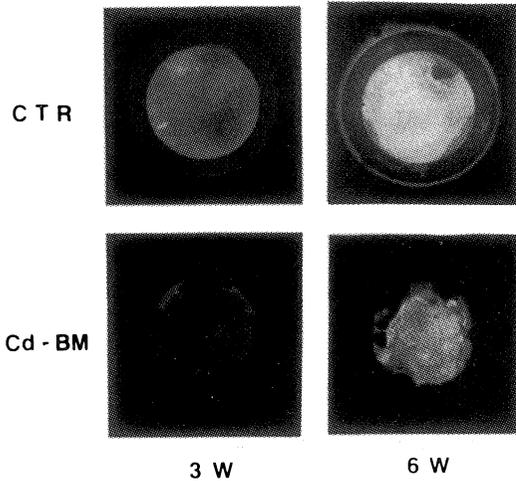


Fig. 2. Soft X-ray radiographs of diffusion chambers inoculated with bone marrow cells and DBM 3 and 6 weeks after subcutaneous implantation. Bone marrow cells were obtained from Cd treated rats (Cd-BM) and control rats (CTR). Radioplaque configurations which indicate mineralized structures are observed in the diffusion chambers 6 weeks after implantation.

され DC の中心に向かって軟骨細胞様細胞が認められた。このように対照群では骨と軟骨の形成が組織学的にも観察されたが、Cd 投与群では軟骨細胞様細胞が多く、骨の部分の面積が少なかった。

3. DC 内骨形成における生化学的パラメーターの経時的变化

ラット骨髓細胞による DC 内骨形成過程を定量的に解析するために生化学的パラメーターとして Ca や Pi の蓄積量、ALP 活性および骨組織に特異的な蛋白質、OC 濃度を経時的に測定した。DC 内新生組織中の骨塩量を示す Ca と Pi の蓄積量は対照群、Cd 投与群ともに 4 週以後経時的に増加したが、Cd 投与群においては、Ca、Pi 共に対照群に比して低値を示した (Fig. 4)。

骨芽細胞膜に局在し骨芽細胞の活性を示すとされる ALP 活性を測定した結果、対照群の DC 内新生組織の酵素活性は 4 週にピークを示した。Cd 投与群の DC 内 ALP 活性は移植後 3～5 週の期間、対照群より有意に低かったが 6 週後には対照群の活性値と近い値を示した (Fig. 5)。

DC 内で新しく合成された OC の量を測定すると、対照群では 5 週以後顕著に増加したが Cd 投与群では OC の合成は著しく抑制された (Fig. 6)。この OC 蛋白質量の経時的变化は特に Pi の蓄積量の経時的变化と並行して

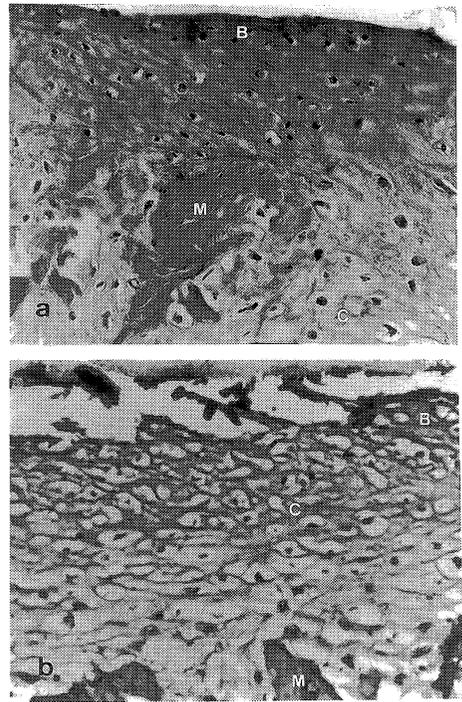


Fig. 3. Light micrographs of cross sections of the diffusion chambers containing control bone marrow (a) and Cd-treated bone marrow (b) with DBM 5 weeks after implantation (hematoxylin and eosin staining, x 100).

At the top of the newly formed bone, the surface is in close contact with the Millipore membrane filter. Bone together with osteocytic lacunae (B) is clearly seen in close proximity to the membrane filter, and cartilage. (C) is found toward the center of the DC.

M, indicates DBM.

いた。

4. DC 内新生骨中の骨基質蛋白質の mRNA の発現

Cd 投与群のラット骨髓細胞による DC 内骨形成は対照群に比して抑制されていることが組織学的、生化学的に明らかになったのでさらに DC 内の骨形成過程における骨基質蛋白質の遺伝子発現に対する Cd の影響を検討した。

移植後 5 週間を経た両群の DC 内組織から抽出した全 RNA 5 μ g をアガロースゲル電気泳動後、 32 P でラベルしたラット OC および OP cDNA をプローブとしてノザンプロット法で分析した後のオートラジオグラムを Fig. 7 に示した。

1.5 kb の位置に OP mRNA のバンドとして 32 P の集

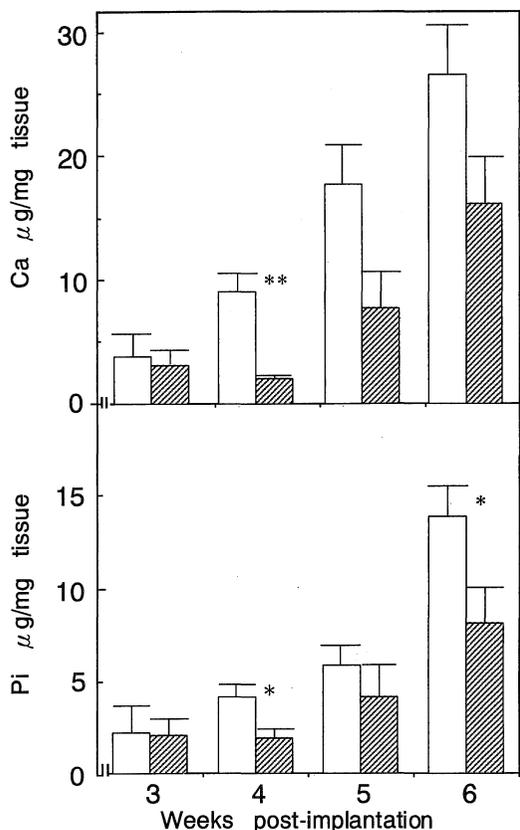


Fig. 4. Calcium and phosphorus concentration in diffusion chambers explanted 3 to 6 weeks after implantation. Results are expressed as mean \pm SEM from 8 or 9 DCs implanted with control (open bars) or Cd-treated (hatched bars) bone marrow cells and DBM. Astarisks indicate significant differences between control and Cd-treated bone marrow. (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$)

積が認められ、Cd 投与群の発現量は対照群に比べてやや低いながらもシグナル強度は強かった。ところがCd 投与群 DC 内の OC mRNA の発現量を示すシグナル強度は対照群に比べて著しく弱かった。Cd 投与群と対照群における OC mRNA の発現量の相違は OC 蛋白量の相違に反映されていた。なお、図示していないが移植する前の対照群の骨髄のみでは OP および OC の mRNA の発現は認められず内部標準として用いた β -アクトン mRNA のみが発現していた。

5. *In situ* ハイブリダイゼーション

移植 5 週後の DC 内組織切片に、DIG 標識 RNA プローブを用いて *In situ* ハイブリダイゼーション法 (ISH 法) を行った。対照群に比し Cd に曝露した骨髄細胞を使

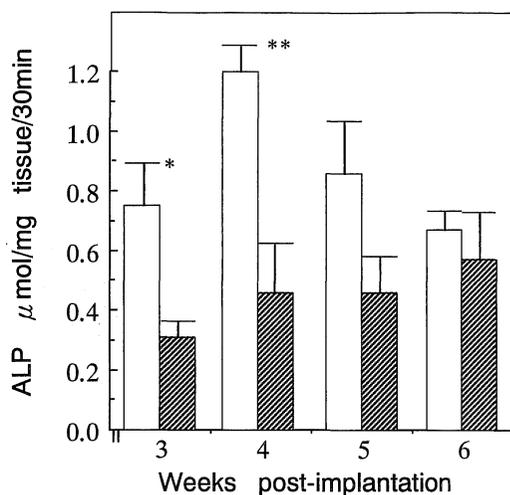


Fig. 5. Alkaline phosphatase activity within diffusion chamber implants.

Results are expressed as mean \pm SEM from 8 or 9 DC implants for the control (open bars) or Cd-treated (hatched bars) bone marrow cells and DBM.

Astarisks indicate significant difference between the two groups (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

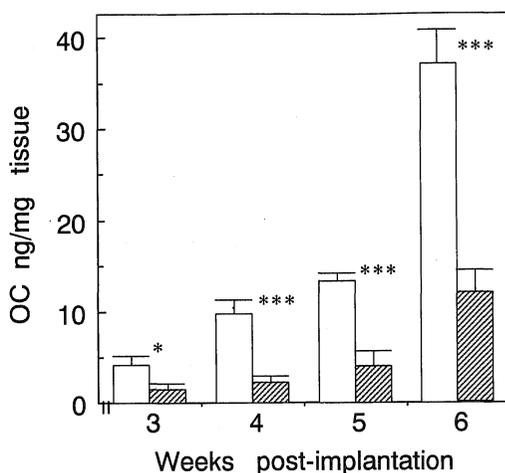


Fig. 6. Osteocalcin concentration in diffusion chamber implants.

Each data represents the mean and SEM of duplicate RIAs from 8 or 9 implants for the control (open bars) or Cd-treated (hatched bars) bone marrow cells and DBM.

Astarisks indicate significant difference between the two groups. (***) $p < 0.001$; * $p < 0.05$)

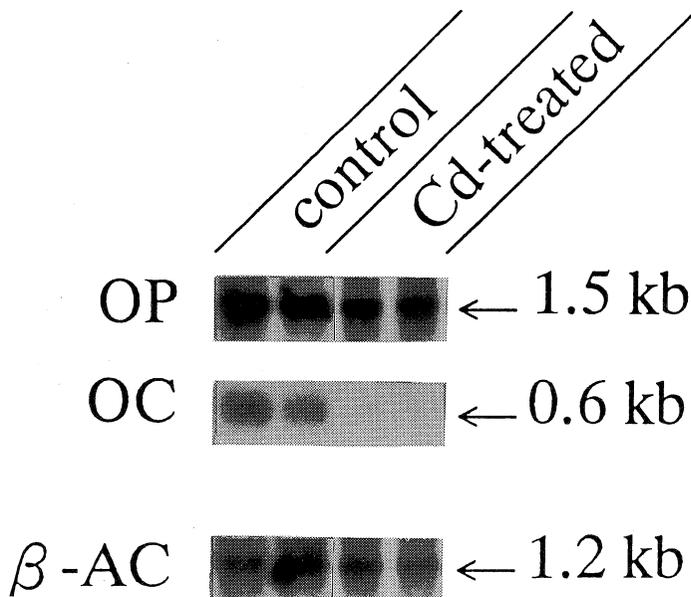


Fig. 7. Northern blot analysis of osteocalcin and osteopontin mRNA in DC at 5 weeks after implantation. Total RNA ($5\mu\text{g}$) was loaded on each lane. RNA transferred to a nylon filter was hybridized with ^{32}P -labeled 0.36 and 0.70 kbp cDNA for rat osteocalcin and osteopontin, respectively, and the duration of autoradiographic exposure was 48h. The mRNA levels of rat β -actin was shown to normalize the amount of RNA.

用した Cd 投与群では OC mRNA のシグナル(紫色)が弱かった(Fig. 8). ネガティブコントロールとしてセンス RNA プローブを使用した ISH 像ではシグナルは検出されなかったことを確認した(写真は不掲載). OC mRNA のシグナルはメンブレンに接する骨部分には弱く, その下部の骨軟骨細胞部分に検出された. 移植 6 週間後になると対照群の DC 内新生骨切片の ISH 像において, OC mRNA のシグナルが骨細胞に強く認められた(Fig. 8c).

考 察

これまで, *in vitro* の骨形成実験における Cd の直接作用について検討が重ねられてきた. それらの報告をまとめると Cd はコラーゲン合成に関する酵素であるプロリンの水酸化酵素²¹⁾やリジルオキシダーゼを阻害し²²⁾, ALP 活性の低下を引き起こす²³⁾ことから, Cd は骨芽細胞に直接作用して骨障害を引き起こすとしている. しかし, 既報の *in vitro* の培養系では骨芽細胞がすでに存在しているため, 骨芽細胞への分化過程における Cd の作用機序の解明は困難であった. 骨髄細胞中には, 脱灰骨基質(DBM)に含まれる骨誘導因子などにより骨形成能

を有する細胞に分化しうる未分化間葉系細胞の存在が知られていた²⁴⁾. 最近 Dohi *et al* もラット骨髄細胞と DBM を封入したディヒュージョンチャンパー(DC)内で骨髄細胞が骨芽細胞へ分化して骨組織が新生することを OC mRNA の発現により証明した¹⁰⁾.

本研究はこの *in vivo* に近い細胞レベルでの骨形成モデルを応用して, Cd 曝露骨髄細胞の骨芽細胞への分化過程について組織学的, 生化学的, および骨基質蛋白質の遺伝子発現の観点から検討を行ったものである.

Cd 投与量については Sugihira *et al*²⁵⁾ の Cd の連続投与実験に準じて, $750\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重の投与量で 4 週間連続投与したが, 腎臓に組織学的異常を全く認めず, 既存の報告²⁵⁾と一致していた. このように, 腎障害の出現しない低濃度の Cd 投与量であったが, 骨髄には平均 $3.2\mu\text{g}/\text{g}$ の Cd の蓄積が認められ, これは, 血清中での $5\text{ng}/\text{ml}$ の約 600 倍の濃度であった.

Cd が体内に取り込まれると肝臓や腎臓で重金属の解毒蛋白質としてメタロチオネイン(MT)が誘導され Cd-チオネインとして蓄積されることが知られている²⁶⁾. Cd-チオネインの形で肝臓から血流中へ流出し, おそらく骨髄へも同じ化学形態で輸送され蓄積されると考えられて

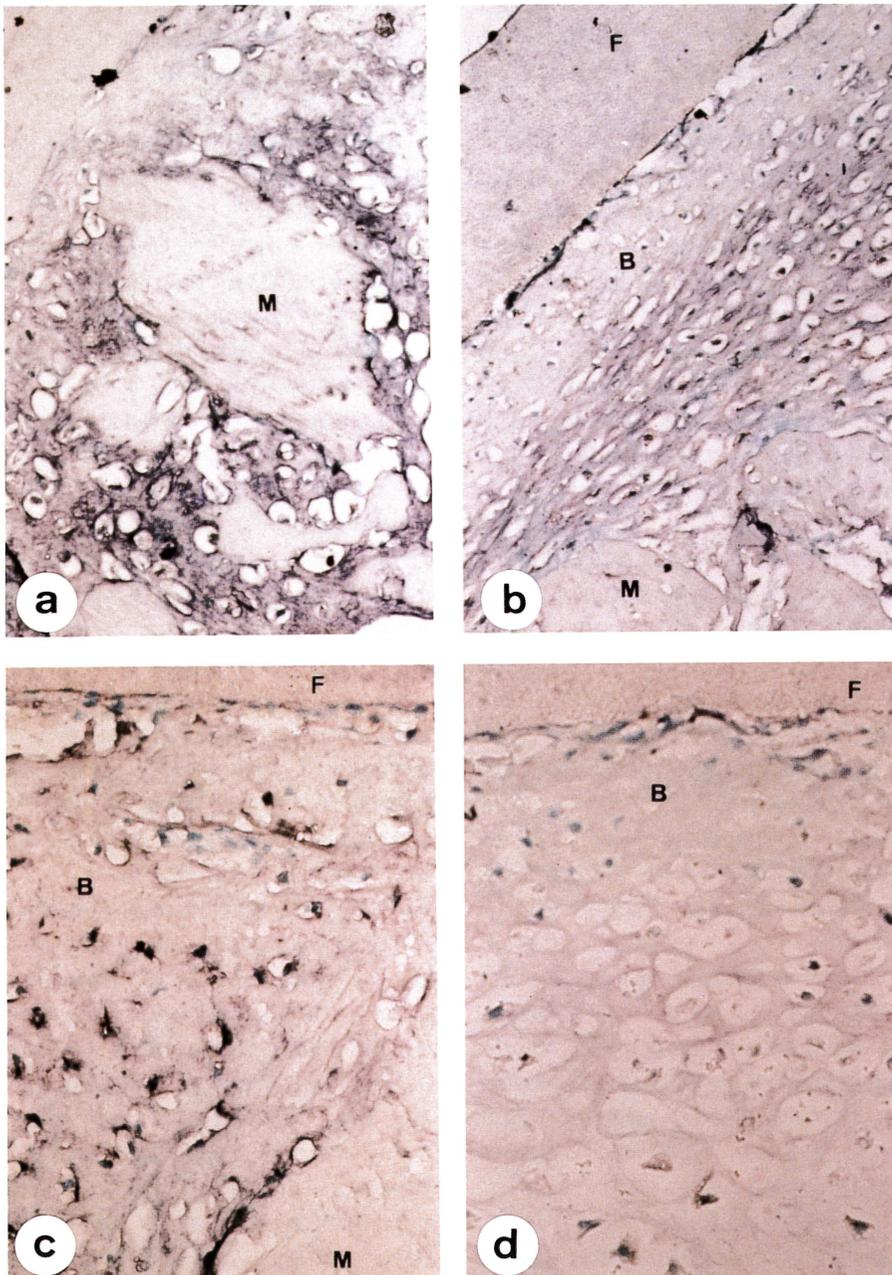


Fig. 8. *In situ* hybridization for osteocalcin mRNA in DC implants 5(a, b) and 6(c, d) weeks after implantation. Sections were incubated with DIG-UTP-labelled antisense (positive) RNA transcripts. Binding of AP-conjugated anti-DIG-antibody followed by reaction with AP substrate solution generated a purple coloration in positively expressing cells.

Control sections, (a, c) :
 Cd-treated sections, (b, d).
 B, bone ; M, DBM ; F, membrane filter.
 Original magnification (x 200).

きた。しかし、著者らの研究ではMT mRNAが肝臓や腎臓だけでなく骨髄にも発現しており²⁷⁾、骨髄におけるCdの濃縮はMTの誘導に起因していることが推察される。

このようなCd蓄積骨髄細胞を封入したDCにおいて骨芽細胞の機能の生化学的な指標であるCa、Piの蓄積量、ALP活性、骨に特異的な蛋白質OCの合成量を測定することによって初期の骨形成過程を分析した。CaとPの沈着量は移植期間中、対照群のそれに比して30%~60%であった。骨のミネラル構成成分の大部分はハイドロキシアパタイト(HA)の結晶であり、Ca/Pモル比は1.67である。DC内のCaとPiの大部分を骨塩とみなした場合、Ca/Pモル比は0.4~1.2となり相対的にCaは低濃度の状態にあった。対照群のCa/Pモル比は1.6~2.3と高く、これは骨塩であるHAのモル比1.67に匹敵するものであった。

骨芽細胞における無機Piの供給はALP活性に依存するところが大きい。Cd投与群DCのALP活性は移植期間中低値を示し、その結果Piの蓄積量も低くCaの蓄積もそれともななって低かった。CaとPの沈着量は血清中のCa²⁺とPO₄²⁻のイオン積 $1.25 \times 10^{-6} M^2$ をはるかに越えて増加しているにもかかわらずCa/Pモル比が小さいのでHAの結晶化には至らず異常な石灰化を引き起こしている可能性がある。

オステオカルシン(OC)は、骨の非コラーゲン性蛋白質の15%を占める分子量5800のビタミンK依存性蛋白質であり²⁸⁾、骨芽細胞で合成されて骨基質中に分必されたのち、ハイドロキシアパタイト(HA)と強固に結合して存在している²⁹⁾³⁰⁾。骨形成過程においてOCの出現は石灰化の引き金になるのか、逆に石灰化がOC発現の引き金になるのか不明であるが、DC内骨形成においてもCa、Pの蓄積の経時的な増加と並行してOCも増加した(対照群)。しかしCd投与群のOC合成量は対照群に比して著しく低く、蛋白レベルでは明らかにCd曝露が骨髄細胞の骨形成能を抑制していることを示している。

非コラーゲン性骨基質蛋白質オステオポンチン(OP)はOCと同様骨芽細胞で合成される分子量約44,000のシアル酸含有リン酸糖蛋白質であり、Arg-Gly-Aspのアミノ酸配列を有することより、細胞の接着機能を持ちHAと強固に結合している³¹⁾³²⁾。これら二つの骨基質蛋白質は骨形成での重要な指標となり、それらの遺伝子発現に対するCdの影響を検討することによって、骨髄細胞から骨芽細胞への分化過程におけるCdの作用機序が明らかになると考えられた。

ノザンプロテイング分析の結果、DC内新生骨のOP

mRNAの発現はCd投与群でやや低いが対照群と大きな差はなく、両群とも強く発現していた。ところがOC mRNAはCd投与群ではほとんど発現していなかった(Fig. 7)。

ラット胎仔の頭蓋冠や骨芽細胞の培養系において増殖期直後からI型コラーゲンのmRNAが、そしてALP mRNAが発現されついで数日遅れてOP、最後にOCが発現されてくると言う³²⁾³³⁾。Owen *et al*はこのように骨形成過程での表現形質の発現は同時ではなく分化の進展に対応するよう制御されていると推察している³³⁾。OPがOCより少し早い時期に発現すること、軟骨細胞でも発現し、組織特異性が低いことを考慮すると、本実験における移植5週後のOPの発現量は対照群とCd投与群であまり差がなく発現量も多かったのであろう。そして、分化の進んだ成熟骨芽細胞で発現されるOCのmRNAはCd投与群DCではほとんど発現が認められなかった。この結果からOC蛋白質が非常に少なかったのはCdによる蛋白合成の阻害ではなく、転写活性の抑制によると考えられる。またOPとOCの二つの表現形質は互いに独立して発現していると考えられる。

特定の塩基配列の局在部位を明らかにする手法である*in situ*ハイブリダイゼーション(ISH)法は、既知の核酸をプローブとしてスライドガラスに固着させた組織や細胞試料上でハイブリッドを形成させ、特に個々の細胞における特定遺伝子の転写活性の検出に広く応用されている¹⁹⁾。ISH法は、原理的にはサザンプロテイング法、ノザンプロテイング法と同様に核酸のハイブリッド形成を利用した検索法であるが、特異的核酸の局在を個々の細胞レベルで明らかにできるという利点を有する。ディギキニン(DIG)は植物から分離された有機化合物で、最近DIGで標識したDNA、RNAプローブを用いた抗DIG抗体で検出する非放射線標識ISH法が開発された²⁰⁾。著者はこのDIG RNAプローブを作製した。RNAプローブは取り扱い上RNase混入による分解に注意を要するが、ハイブリダイゼーション後RNase処理により非特異的吸着を減弱でき、ハイブリッド(RNA・RNA)形成の強さがDNA・RNAハイブリッドより強く、厳しい条件での洗浄が可能となり非特異反応の除去ができた。本実験ではセンスRNAプローブも用いているので信頼性の高い陰性コントロールが得られた。

今回の実験ではISH法によるDC内OC mRNAの発現はノザンプロテイング分析の結果と同様、微量のCd曝露により抑制された。

以上の結果、Cdは初期の骨形成において骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化を抑制し特に石灰化以降の高度な分

化を抑制していることを示唆している。本研究は微量の Cd が初期の骨形成において骨髄細胞からの骨芽細胞への分化を抑制していることを分子レベルで始めて明らかにしたものである。

結 論

Cd による骨障害の機序を明らかにするため、*in vivo* 実験的骨形成モデル、ディヒュージョンチャンバー(DC)移植法を応用して、Cd 曝露ラット骨髄細胞から骨芽細胞への分化を、Ca, Pi の蓄積量、ALP 活性、骨基質蛋白質オステオカルシン(OC)量等生化学的マーカーの推移や、OC の遺伝子発現から検討し、以下の結論が得られた。

1. Cd 投与ラット骨髄細胞を封入した DC では、移植 6 週後でも対照群に比べて X 線学的にも組織学的にも骨軟骨形成量が少なかった。

2. Cd 曝露骨髄細胞の DC では骨塩の形成を示す Ca や P の蓄積量は低く、ALP 活性値も移植期間中そのピークを示すことなく、低レベルであり、移植 6 週後に上昇して対照群 DC の活性値に近づいた。また骨に特異的な蛋白質である OC の合成量は有意に低く、その推移は Ca や P の蓄積量の経時的変化と並行していた。

3. ノザンプロット分析によれば移植 5 週後の DC 内骨形成において、骨基質蛋白質オステオポンチン(OP)の mRNA の発現は Cd 投与群の DC でやや弱いものの、Cd 投与群、対照群ともシグナル強度は強かった。一方成熟した骨芽細胞で発現される OC mRNA の発現量は Cd 投与群で、顕著に低下した。

In situ ハイブリダイゼーション法の検討でも、Cd 投与群の DC で骨軟骨部における OC mRNA の発現量の低下が認められた。

以上のことから Cd 曝露骨髄細胞による *in vivo* の DC 内骨形成の低下は骨髄細胞の未分化間葉細胞の骨芽細胞への分化の抑制に起因しており、特に骨芽細胞の成熟期に発現するとされる OC 遺伝子の転写活性の低下が骨形成を抑制していることが明らかになった。

(本研究の要旨は、1993 年第 63 回日本衛生学会総会において発表した。)

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました米増國雄教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、御校閲、御助言を賜りました生化学講座神谷知彌教授ならびに口腔外科学講座杉村正仁教授に深謝いたします。さらに直

接、御指導、御教示いただきました土肥祥子助教授に深く感謝致します。また、本研究を行うにあたり多大な御助言を頂きました森山忠重名誉教授、化学科講座田端司郎教授、整形外科講座大串 始博士、公衆衛生学教室諸兄らに感謝の意を表します。

文 献

- 1) **Nogawa, K.** : Itai-itai disease and follow-up studies. *in* Cadmium in the Environment (Nriagu, J. O., ed.). Part 2, Jhon Wiley and Sons, New York, p1-38, 1981.
- 2) **Adams, R. G., Harriss, J. F. and Scott, P.** : The development of cadmium induced proteinuria, impaired renal function, and osteomalacia in alkaline battery workers. *Q. J. Med.* **38** : 425-443, 1969.
- 3) **Nomiyama, K. and Nomiyama, H.** : Cadmium induced renal dysfunction ; epidemiology, treatment and medical prevention. *DMW Japan* **16** : in press, 1994.
- 4) **Feldman, S. L. and Cousins, R. J.** : Influence of cadmium on the metabolism of 25-hydroxy-cholecalciferol in chicks. *Nutr. Rep. Int.* **8** : 251-260, 1973.
- 5) **Yuhas, E. M., Miya, T. S. and Schnell, R. C.** : Influence of cadmium on calcium absorption from the rat intestine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **43** : 23-31, 1978.
- 6) **Yoshiki, S., Yanagisawa, T., Kimura, M., Otaki, N., Suzuki, M. and Suda, T.** : Bone and kidney lesions in experimental cadmium intoxication. *Arch. Environ. Health* **30** : 559-562, 1975.
- 7) **Miyahara, T., Miakoshi, M., Saito, Y. and Kozuka, H.** : Influence of poisonous metals on bone metabolism, III. The effect of cadmium on bone resorption in tissue culture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **55** : 477-483, 1980.
- 8) **Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I. and Frolova, G. P.** : Heterotopic transplants of bone marrow. *Transplantation* **6** : 230-247, 1968.
- 9) **Ohgushi, H., Okumura, M., Tamai, S., Hiors, E. C. and Caplan, A. I.** : Marrow cell induced osteogenesis in porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate. *J. Biomed. Mater. Res.* **24** : 1563

- 1570, 1990.
- 10) **Dohi, Y., Ohgushi, H., Tabata, S., Yoshikawa, T., Dohi, K. and Moriyama, T.** : Osteogenesis associated with bone Gla protein gene expression in diffusion chambers by bone marrow cells with demineralized bone matrix. *J. Bone Miner. Res.* **7** : 1173-1180, 1992.
 - 11) **Nishimoto, S, K., Chang, C. H., Gendler, E., Stryker, W. F. and Nimni, M. E.** : The effect of aging on bone formation in rats : Biochemical and histological evidence for decreased bone formation capacity. *Calcif. Tissue Int.* **37** : 617-624, 1985.
 - 12) **Chen, P. S., Toribara, T. Y. Jr. and Warner, H.** : Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* **28** : 1756-1758, 1956.
 - 13) **Haneji, T., Kurihara, N., Ikeda, K. and Kumegawa, M.** : 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ and analogues of vitamin D₃ induce alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells derived from newborn mouse calvaria. *J. Biochem.* **94** : 1127-1132, 1983.
 - 14) **Otawara, Y., Hosoya, N., Kasai, H., Okuyama, N. and Moriuchi, S.** : Purification and characterization of calcium binding protein containing γ -carboxyglutamic acid from rat bone. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **26** : 209-219, 1980.
 - 15) **Sugimoto, K., Dohi, Y., Dohi, K., Yonemasu, K., Fujimoto, J., Kanauchi, M., Yamanaka, F., Moriyama, T. and Ishikawa, H.** : Serum levels of bone gla-protein in normal humans and in patients with chronic renal failure. *Mineral. Electrolyte. Metab.* **13** : 152-157, 1987.
 - 16) **Oldberg, A., Franzén, A. and Heingord, D.** : Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83** : 8819-8823, 1986.
 - 17) **Piotr, C. and Nicoletta, S.** : Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162** : 156-159, 1987.
 - 18) **Melton, D. A., Krieg, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K. and Green, M. R.** : Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.* **12** : 7035-7056, 1984.
 - 19) **Haffen, E. M., Levine, M., Garber, R. L. and Gehring, W. J.** : An improved *in situ* hybridization method for the detection of cellular RNAs in *Drosophila* tissue sections and its application for localizing transcripts of the homeotic Antennapedia gene complex. *J. Eur. Mol. Biol. Organ* **2** : 617-623, 1983.
 - 20) **廣田誠一, 森井英一, 伊藤彰彦, 野村晋太郎** : RNAプローブを用いた *in situ* hybridization. *病理と臨床* **10** : 451-456, 1992.
 - 21) **Miyahara, T., Tsukada, M., Mori, M. and Kozuka, H.** : The effect of cadmium on the collagen solubility of embryonic chick bone in tissue culture. *Toxicol. Lett.* **22** : 89-92, 1984.
 - 22) **Iguchi, H. and Sano, S.** : Effect of cadmium on bone collagen metabolism of rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **62** : 126-136, 1982.
 - 23) **Iwami, K., Dohi, Y. and Moriyama, T.** : Effect of cadmium on the bone formation in cultured fetal rat calvaria. *Toxicol. Environ. Chem.* **27** : 105-111, 1990.
 - 24) **Harada, K., Oida, S. and Sasaki, S.** : Chondrogenesis and osteogenesis of bone marrow-derived cells by bone-inductive factor. *Bone* **9** : 177-183, 1988.
 - 25) **Sugihira, N., Toyama, C., Murakami, M. and Saito, H.** : Significance of increase in urinary metallothionein of rats repeatedly exposed to cadmium. *Toxicology* **41** : 1-9, 1986.
 - 26) **Kagi, J. H. R., Himmelcoch, S. R., Whanger, P. D., Bethune, J. L. and Valee, B. L.** : Equine hepatic and renal metallothioneins : purification, molecular weight, amino acid composition and metal content. *J. Biol. Chem.* **249** : 3537-3542, 1974.
 - 27) **Dohi, Y., Sugimoto, K., Yoshikawa, T., Ohgushi, H., Katsuda, T., Tabata, S. and Moriyama, T.** : Effect of cadmium on osteogenesis within diffusion chambers by bone marrow cells : Biochemical evidence of decreased bone formation capacity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **120** : 274-280, 1993.

- 28) **Price, P. A., Otska, A. S., Poser, J. W., Kristaponis, J. and Raman, N.** : Characterization of a γ -carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73** : 1447-1451, 1976.
- 29) **Hauschka, P. V. and Reid, M. R.** : Vitamin K dependence of a calcium-binding protein containing γ -carboxyglutamic acid in chicken bone. *J. Biol. Chem.* **253** : 9063-9068, 1978.
- 30) **Price, P. A., Lothringer, J. W., Baukol, S. A. and Reddi, A. H.** : Developmental appearance of the vitamin K-dependent protein of bone during calcification : analysis of mineralizing tissues in human, calf, and rat. *J. Biol. Chem.* **256** : 3781-3784, 1981.
- 31) **Somerman, M. J., Price, P. A., Sauk, J. J., Foster, R. A. and Butler, W. T.** : Mechanism of fibroblast attachment to bone extracellular matrix : role of a 44 kilodalton bone phosphoprotein. *J. Bone Miner. Res.* **2** : 259-265, 1987.
- 32) **Yoon, K., Buenaga, R. and Rodan, G. A.** : Tissue specificity and developmental expression of rat osteopontin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **148** : 1129-1136, 1987.
- 33) **Owen, T. A., Bortell, R., Yocum, S. A. and Smock, S. L.** : Coordinate occupancy of AP-1 sites in the vitamin D-responsive and CCAAT box elements by Fos-Jun in the osteocalcin gene : Model for phenotype suppression of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87** : 9990-9994, 1990.