3. 培養鶏胚大腿骨の石灰化におけるビタミン D の作用

菊 永 茂 司 菊 川 忠 裕¹⁾

ノートルダム清心女子大学人間生活学部 食品栄養学, 聖マリアンナ医科大学 生化学¹⁾

Effects of Vitamin D Metabolites on Mineralization of Embryonic Chick Femurs *In Vitro*

Shigeshi KIKUNAGA and Tadahiro KIKUKAWA¹⁾

Faculty of Sciences of Human Life, Notre Dame Seishin University, Department of Laboratory Medicine, School of Medicine, St. Marianna University¹⁾

Summary

We examined the effects of vitamin D metabolites on mineralization of the 10-day embryonic chick femurs in organ culture system. When 5-day cultures kept in the control medium were cultured in the several mediums containing $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ or $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ at concentration of 10^{-11} – 10^{-8} M during an additional 5 days, the mineralization of cultured bones increased in the treatment with $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ at concentration of 10^{-10} – 10^{-8} M, and decreased in the treatment with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ at concentration of 10^{-10} – 10^{-8} M, and was no change in the treatment with $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. The activities of both alkaline phosphatase and acid phosphatase did not change in the cultured bones with vitamin D metabolites. These results suggested that $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ increased bone formation, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimulated bone resorption, and $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ had no effect to bone-remodeling in this organ culture system.

$1\alpha, 25(\text{OH})_2$ ^{1,2)} と Parathroid hormon (PTH)^{3,4)} は、ともに強力な骨吸収因子である。また $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は、骨の石灰化に関与すると考えられている γ -カルボキシルグルタミン酸含有タンパク質 (BGP) の転写レベルに働き、その mRNA を増加させることが知られている⁵⁾。そして、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は、生理的な濃度範囲内で骨型コラーゲンの産生を促進することが MC 3 T 3-E 1⁶⁾ で、骨のコラーゲン合成促進作用を有する IGF-I と IGF-II の産生を増加させることが胎仔マウスの頭蓋骨⁷⁾ で示されている。

Raisz ら⁸⁾ は、4 種類のビタミン D 代謝物の骨吸収とコラーゲンに対する影響を器官培養系で調べた。その結果、骨吸収促進作用とコラーゲン合成抑制作用は $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3 > 1\alpha(\text{OH})\text{D}_3 > 25(\text{OH})\text{D}_3 \geq 24\text{R}, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の順に強かった。骨のリモデリングは破骨細胞と骨芽細胞のカップリングによって行われている。その連鎖は、破骨細胞の活性化期、破骨細胞による骨吸収期、破骨細胞と骨芽細胞の逆転期、骨芽細胞による骨形成期、そして休止期に分けられる⁹⁾。この細

胞連鎖に基づいて Raisz ら⁸⁾ の実験結果を考えると、ビタミン D 代謝物による骨吸収に続いて骨形成が惹起されてよいことになる。

ビタミン D 代謝物はそれらの濃度や添加および投与方法によって、骨吸収と骨形成の全く逆の促進効果を示す。これらの現象は何に起因するのであろうか。骨代謝におけるビタミン D の作用機序を知るために、骨の石灰化におけるビタミン D 代謝物の効果を鶏胚大腿骨を用いた器官培養系で調べた。

実験方法

1. 培養方法

10 日目の鶏胚 (Ross strain) から摘出した大腿骨を、Ham F-12 (mineral free) に BSA 0.1%, インスリン 15 I.U./dl, 各種ミネラル (2 mM Ca, 3 mM P) を含む無血清培地で 5 日間、37°C のインキュベーター (5% CO₂ atmosphere) で培養した。その後、実験内容に示した物質を添加した培地でさらに 5 日間、同様の方法で培養した。尚、培養液は毎日交換した。

2. 実験内容

無血清培地にアルコールで溶解した $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$, $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $24\text{R}, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ をそれぞれ 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8}M を添加した。また、ビタミン D の無添加の対照用培地にはアルコールをビタミン D 添加の場合と同量 (0.1%) を加えた。

3. ミネラルの測定法

脱イオン蒸留水で十分に洗浄した培養骨に濃硝酸 10 ml を加えて高周波分解装置 (MILESTONE) で湿式分解した。これに続いて、さらに濃硝酸 8 ml と過酸化水素 2 ml を加えて再度、高周波分解装置を用いて分解した。分解が終了していない場合には、濃硝酸と過塩素酸の混液 (1:1, v/v) を加えて、さらにホットプレート上でゆるやかに分解した。分解後の灰分は 0.1 M HCl に溶解し、ミネラルの測定溶液とした。Ca と Mg 含量は原子吸光法で、P は Gomori¹⁰⁾ 法で測定した。なお、湿式分解や灰分の溶解に用いた試薬はすべて精密分析用である。また、Ca 測定の際には La を終濃度が 1000 ppm になるように加えた。

4. 酵素活性の測定法

Alkaline phosphatase (ALP) と Acid phosphatase (ACP) 活性測定のための粗酵素液は、培養骨に 0.1% Triton X-100 を加えてホモゲナイズし、Leboy ら¹¹⁾ の方法によって調製した。ALP 活性は 10 mM MgCl_2 を含む 1.5 M Sodium carbonate buffer (pH 9.0) に 5 mM *p*-nitrophenylphosphate を溶解した基質液を用いて 15 分間、また ACP 活性は 5 mM *p*-nitrophenylphosphate を溶解した 1.5 M Sodium acetate buffer (pH 4.0) の基質液を用いて 30 分間、それぞれ反応させた。酵素反応は 0.1 M NaOH で停止し、反応生成物である *p*-nitrophenol を 400 nm で測定した。活性は、培養骨 1 本、反応 1 分間当りの生成物の μM 数 ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{bone}$) で示した。

実験結果

1. 実験 1: ビタミン D 代謝物の影響について

1) $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ の添加効果

ミネラル含量と酵素活性に対する $1\alpha(\text{OH})_2\text{D}_3$ 添加の影響についての結果を Fig. 1 に示した。培養骨中の Ca 含量は、培養 0 日 (0 d) に比べて無添加培養 5 日間

Fig. 1 The effect of $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ at different concentration on the content of minerals and the enzyme activity in cultured femurs. Values are means and standard deviations of 8 cultured femurs. Femurs removed from 10-d chick embryos were cultured during 5 days in the medium described in the first experiment of Method. The cultured femurs for 5 day were cultured in the medium containing $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ at concentration of 10^{-11} – 10^{-8}M during 5 days. Asterisks indicate significant differences at a level of $p > 0.05$ among the control (C-10d) and the additional groups.

(C-5 d), さらに無添加 10 日間 (C-10 d) と培養期間が長くなるにつれて有意な増加を示した。また, C-10 d に比較して $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3 10^{-11} \text{ M}$ では差を認めなかったが, $10^{-10} \sim 10^{-8} \text{ M}$ と添加濃度に依存した有意な増加を示した。P 含量は, Ca 含量と同様に 0 d に比べて C-5 d, C-10 d と培養期間の長さに応じて有意な増加を示した。また, C-10 d に比較して $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ 添加のいずれの濃度においても有意差を認めなかった。Mg 含量は, Ca や P 含量と同様に 0 d に比べて C-5 d, C-10 d と培養期間の長さに応じた有意な増加を示した。また, C-10 d に比較して $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ 添加の各濃度との間に有意差を認めなかった。ALP, ACP 活性とも 0 d に比べて C-10 d では有意な上昇を示した。しかし, 両酵素の活性にはともに $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ 添加による差は認められなかった。

2) $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の添加効果

ミネラル含量と酵素活性に対する $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 添加の影響を Fig. 2 に示した。培養骨中の Ca 含量は, C-10 d に比べて $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3 10^{-11} \text{ M}$ では差を

認めなかったが, $10^{-10} \sim 10^{-8} \text{ M}$ では有意な低下を示し, C-5 d のレベルよりも低かった。P 含量は, C-10 d に比較して $10^{-11} \sim 10^{-9} \text{ M}$ では差は認めなかったが, 10^{-8} M では有意な低下を示した。また, Mg 含量には $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の添加の影響も認められなかった。ALP, ACP 活性ともに $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の添加の影響は認められなかった。

3) $24\text{R}, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の添加効果

ミネラルの含量と酵素活性に対する $24\text{R}, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 添加の影響についての結果を Fig. 3 に示した。Ca, P, Mg の含量いずれにも $24\text{R}, 25(\text{OH})_2\text{D}_3 10^{-11} \sim 10^{-8} \text{ M}$ の濃度範囲での添加の影響は認められなかった。ALP, ACP 活性ともに $24, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 添加の影響は認められなかった。

考 察

$1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ を添加した無血清培地での培養骨中の Ca 含量が $10^{-10} \sim 10^{-8} \text{ M}$ で濃度に依存して対照よりも高くなった (図 1)。この結果は, $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ が培養骨の石灰化を促進する作用を持つことを示すものであ

Fig. 2 The effect of $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ at different concentration on the content of minerals and the enzyme activity in cultured femurs. Values are means and standard deviations of 8 cultured femurs. Femurs removed from 10-d chick embryos were cultured during 5 days in the medium described in the first experiment of Method. The cultured femur for 5 day were cultured in the medium containing $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ at concentration of $10^{-11} \sim 10^{-8} \text{ M}$ during 5 days. Asterisks indicate significant differences at a level of $p > 0.05$ among the control (C-10d) and the additional groups.

る。このことを裏付ける結果が、閉経後の骨粗鬆症患者¹²⁾とラット¹³⁾で得られている。しかし、ラットで $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ の単独投与の効果は認められないとする報告¹⁴⁾もある。しかしながら、 $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ は必要な条件下で骨の石灰化を促進する作用を有するものと考えられる。

$1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 添加 $10^{-10}\sim 10^{-8}\text{ M}$ で培養骨中の Ca 含量が低下し、また P 含量も 10^{-8} M で低値を示した(図2)。この結果は、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が培養骨の骨吸収を促進させたことを示している。 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は強力な骨吸収作用を示すことが示されている^{1,15)}。一方、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は骨の同化作用を促進する^{16~18)}ことも知られている。 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の骨に対する作用には二相性があり、その作用発現の違いはどのような条件(環境)によって分かれるのか、またどのような物質によって仲介されるのか、極めて興味深いことである。

$24\text{R}, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ $10^{-11}\sim 10^{-8}\text{ M}$ では、この実験系では、添加効果を認めなかった(図3)。しかし、ビタミンDの十分なラットに $24\text{R}, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を多量に投

与すると、ラットの骨密度が著しく増加することが示されている¹⁹⁾。同様の結果がトリでも得られている²⁰⁾。その骨形成促進作用は、PTH や $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による破骨細胞の形成と活性化を $24\text{R}, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が阻害することによって発揮されることが Matumoto ら²¹⁾ によって *in vitro* で示された。これらの結果から推測すると、 10^{-8} M よりも高濃度の $24\text{R}, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を添加したときの骨形成についての検討が必要である。

この研究で得られた結果から総合的に考えると、 $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ は骨形成を促進するが、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は骨吸収を促進することが明らかとなった。この研究に用いた鶏胚大腿骨の培養系は、骨粗鬆症の研究に関する実験モデルとなり得るものと考えられる。

この研究に用いたビタミンDの代謝物は中外製薬株式会社から提供されたものである。それに対して謝意を表する。

Fig. 3 The effect of $24\text{R}, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ at different concentration on the content of minerals and the enzyme activity in cultured femurs. Values are means and standard deviations of 8 cultured femurs. Femures removed from 10-d chick embryos were cultured during 5 days in the medium described in the first experiment of Method. The cultured femurs for 5 day were cultured in the medium containing $24\text{R}, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ at concentration of $10^{-11}\sim 10^{-8}\text{ M}$ during 5 days. Asterisks indicate significant differences at a level of $p > 0.05$ among the control (C-10d) and the additional groups.

文 献

- 1) Raisz, L.G., Trummel, C.N., Holick, M.F. and Deluca, H.F. : *Science*, **175**, 768 (1972)
- 2) Stern, P.H., Maneras, T., Trummell, C.L., Schnoes, H.K. and De Luca, H.F. : *Mol. Pharmacol.*, **12**, 879 (1976)
- 3) Raisz, L.G. and Niemann, I. : *Nature.*, **214**, 486 (1967)
- 4) Miller, A. : *J. Cell Biol.*, **76**, 615 (1978)
- 5) Pan, L.C., and Price, P.A. : *J. Biol. Chem.*, **259**, 5844 (1984)
- 6) Kurihara, N., Ishizuka, S., Kiyoki, M., Hakeda, Y., Ikeda, K. and Kumegawa, M. : *Endocrinology*, **118**, 940 (1986)
- 7) Thomas, A.L. and Maria, J.K. : *Endocrinology*, **128**, 1511 (1991)
- 8) Raisz, L.G., Kream, B.F., Smith, M.D. and Simmons, H.A. : *Calcif. Tissue Int.*, **32**, 135 (1980)
- 9) 遠藤直人, 高橋栄明 : 医学のあゆみ, **152**, 303 (1990)
- 10) Gomori, G. : *J. Lab. Clin. Med.*, **27**, 955 (1942)
- 11) Leboy, P.S., Vaia, L., Vschmann, B., Golub, E., Adams, S.L., and Pacifici, M. : *J. Biol. Chem.*, **264**, 17281 (1989)
- 12) Orimo, H., Shiraki, M., Hayashi, Y., Hoshina, T., Onaga, T., Miyazaki, S., Kurosawa, H., Nakamura, T. and Ogawa, N. : *Calcif. Tissue Int.*, **54**, 370 (1994)
- 13) Okamura, H., Yamamoto, T., Kasai, R., Hayashi, T., Tada, K. and Nishii, Y. : *Bone*, **8**, 351 (1998)
- 14) Notoya, K., Yoshida, K., Tsukuda, R., Takeuchi, S. and Tsuda, M. : *Calcif. Tissue Int.*, **58**, 88 (1996)
- 15) Raisz, L.G., Kream, B.E., Smith, M.D. and Simmons, H.A. : *Calcific. Tissue Int.*, **32**, 135 (1980)
- 16) Marie, P.J. and Travers, R. : *Calcif. Tissue Int.*, **35**, 418 (1983)
- 17) Lasso, S.E., Lorentzon, R. and Boquist, L. : *Clin. Orthop. Rel. Res.*, **127**, 228 (1977)
- 18) Malluche, H.H., Matthews, C. Faugere, M-C., Fanti, P., Wndres, D.B. and Friedler, R.M. : *Endocrinology*, **119**, 1298 (1986)
- 19) Nakamura, T., Kurokawa, T. and Orimo, H. : *Calcif. Tissue Int.*, **43**, 235 (1988)
- 20) Ornoy, A., Goodwin, D., Noff, D. and Edelstein, S. : *Nature*, **276**, 517 (1978)
- 21) Matumoto, T., Yamamoto, H., Okazaki, R., Kumegawa, M. and Ogata, E. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **200**, 161 (1992)