

# 骨基質タンパク質オステオカルシンの分子構造と 骨分化カスケードにおける役割

奈良県立医科大学健康政策医学講座

土 肥 祥 子, 赤 羽 学

独立法人産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門

大 串 始

## MOLECULAR STRUCTURE OF OSTEOCALCIN AND THE ROLE AS AN ESSENTIAL MARKER IN THE OSTEOGENIC DIFFERENTIATION CASCADE

YOSHIKO DOHI and MANABU AKAHANE

*Department of Public Health, Health Management and Policy,*

*Nara Medical University School of Medicine*

HAJIME OHGUSHI

*Research Institute for Cell Engineering,*

*National Institute of Advanced Industrial Science and Technology*

Received June 13, 2008

**Abstract** : オステオカルシン (OC) は Bone Gla Protein (BGP) ともよばれ, ビタミン K 依存性アミノ酸  $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) を含有する骨の非コラーゲン性酸性タンパク質であり, 骨と歯の象牙質に最も豊富に含まれている. 骨塩であるハイドロキシアパタイト (HA) の結晶上のカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) との強い結合能を持つ OC は石灰化を調節しているとされる. 本稿では著者らが明らかにした両生類であるウシガエルの OC の分子構造を脊椎動物間で比較し相同性の保存と機能の関係について述べる. またこの低分子タンパク質は未分化間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化度を評価する重要なマーカーとなる分泌タンパク質であり, 骨基質石灰化にどのように関与しているかを概説する.

**Key words** : secretory osteocalcin, osteogenesis, mineralization, mesenchymal stem cells

### 1. はじめに

骨形成に関与する主要な細胞は骨芽細胞であり, 多分化能をもつ未分化間葉系細胞を起源とする. 生体親和性に優れた多孔性ハイドロキシアパタイト (HA) セラミックのような医用材料に予め増殖させた骨髄由来未分化間葉系幹細胞 (MSC) を浸潤させ培養皿上で骨誘導培地を用いて培養した後, その再生培養骨を皮下に移植すると 1~2 週間で成熟した骨組織が形成される. この 2 段階のティッシュエンジニアリング手法により形成された骨組織は生体骨と類似の微小血管組織や層状の膜性骨そして

その表面に並んでいる立方状の骨芽細胞から構築されている<sup>1,2)</sup>. このことは未分化間葉系幹細胞が骨形成を担う主細胞である骨芽細胞へ分化し, 細胞外基質タンパク質の合成・分泌が活発となり骨基質(類骨)の形成, 最終段階の石灰化という一連の特徴的な骨分化カスケードが培養皿上であるいは HA セラミック気孔表面で進行していることを示している.

本稿では骨芽細胞が合成・分泌する骨特異的低分子タンパク質オステオカルシン (OC) の分子構造と, *in vitro* 再生培養骨モデルを中心に未分化間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化度を評価する唯一のマーカーとして OC が

どのように関与しているかを概説する。

### 2. 骨組織の細胞外基質タンパク質の分布

哺乳類のみならず脊椎動物の骨は主に  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  という化学式で表されるハイドロキシアパタイトからなる無機基質と細胞、細胞外マトリックスからなる有機マトリックスから構成されている。有機マトリックスの約90%は1型コラーゲンである。硬組織基質のうちコラーゲン以外のタンパク質、量的には全タンパク質の10%以下になるこれらのタンパク質は非コラーゲン性タンパク質と呼ばれ、酸性タンパク質が多く、Ca イオンを結合しHAに高い親和性を持つものが多い(図1)。非コラーゲン性タンパク質のうち比較的多いタンパク質とし

てOC、オステオポンチン(OP)がありその他オステオネクチン(ON)、パイグリカン、デコリンなどプロテオグリカン、骨シアロタンパク質(BSP)がある。とくに骨にもっとも豊富に含まれる(骨の全タンパク質の1-2%)OCの分子構造と機能について述べる。

### 3. オステオカルシン前駆体のビタミンK依存性γ-グルタミルカルボキシレーション

オステオカルシンは2人の同時期の発見者によりビタミンK依存性タンパク質, bone Gla protein (BGP)<sup>3)</sup>とオステオカルシン(osteocalcin)<sup>4)</sup>の2つの名があるが、現在ではオステオカルシン(OC)と呼ばれている。OCはビタミンKに依存し翻訳後の修飾によって3つのγ-カル

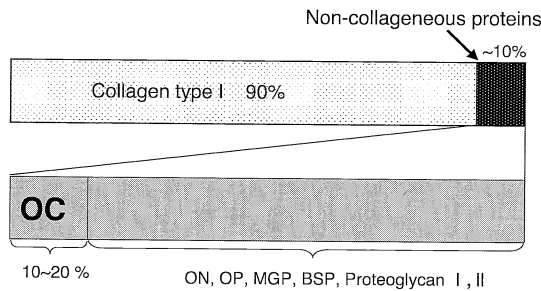


図1. 骨基質タンパク質の分布  
オステオカルシン(OC)は非コラーゲン性タンパク質の10～20%を占める。

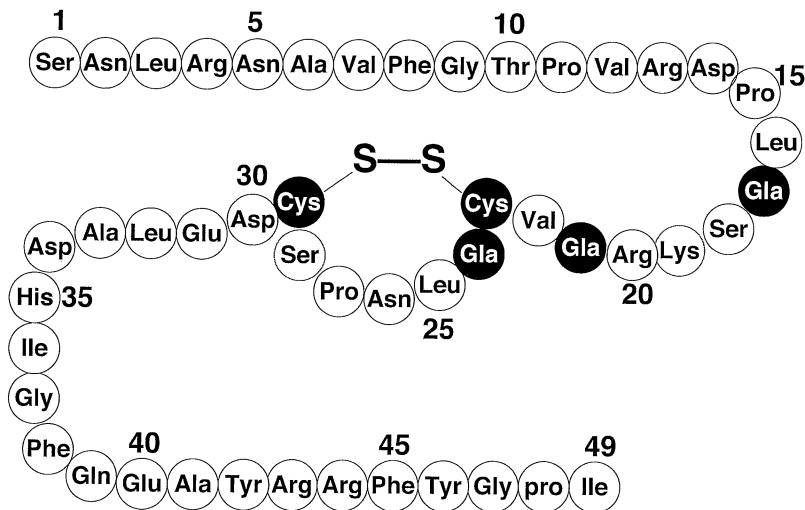


図2. ウシガエル (*Rana catesbeiana*) オステオカルシンのアミノ酸配列  
17, 21, 24位のGla残基と23, 29位のCys残基はほとんどの脊椎動物のオステオカルシンに保存されている。(文献5から改変)

ボキシグルタミン酸 (Gla) 残基をもつ全アミノ酸残基数 49～50 残基の低分子タンパク質である。図 2 は著者らが決定したウシガエル (*Rana catesbeiana*) OC の一次構造<sup>9)</sup>を示すが N-末端より 14 位の Asp から 33 位の Ala までは哺乳類や鳥類の OC に 85% 共通で、特に 17, 21, 24 位の 3 つの Gla と 23 位と 29 位の Cys が S-S 結合を形成している領域はほぼ 100% 相同性が保たれている。

OC 遺伝子は全長 1000 bp 程度で 4 つのエクソンよりなる<sup>9)</sup>。OC はまず約 100 残基よりなるプレプロ OC として合成される。N-末端 23 残基のシグナルペプチド部分は合成と同時に切断される。次の 26 残基のプロペプチドは Gla 化する酵素、 $\gamma$ -カルボキシラーゼ認識部位とプロセシング酵素認識部位を含む。プロペプチドは  $\gamma$ -カルボキシル化された後、プロセシング酵素によって切断されて成熟ペプチド (49 - 50 アミノ酸) として分泌される (図 3)<sup>7)</sup>。

Gla 化に関与する酵素は、 $\gamma$ -カルボキシラーゼとビタミン K のリサイクルに関与する酵素などの複合体であると考えられており、図 3 に示すようにグルタミン酸残基が Gla 化される際、ビタミン K はキノン型→ヒドロキノン型→ビタミン K エポキシダーゼによりエポキシド型、そして再度 VK エポキシドリダクターゼによりヒドロキノン型→キノン型へ戻るというサイクルを繰り返

返し何度も補酵素として利用される<sup>8)</sup>。最終的にプロセシング酵素のよって切断された Gla 化成熟 OC が細胞外へ分泌され骨中の HA に含まれる Ca イオンと結合することが知られている<sup>7)</sup>。一部は血中に分泌されるが血清中濃度は骨代謝と密接に関係しており、骨粗鬆症やその他の骨疾患の臨床評価の生物学的マーカーに用いられている<sup>9, 10)</sup>。

#### 4. ウシガエル骨の OC の分子構造と相同性

魚類から哺乳類まで脊椎動物の骨に共通して存在するこの低分子タンパク質オステオカルシンの構造と機能について比較するため、著者らは両生類であるウシガエル (*Rana catesbeiana*) の長管骨より OC を精製し分子構造と Ca 結合能など機能を調べた<sup>5, 11, 12)</sup>。

ウシガエル (*Rana*) 骨より精製した 2 つの OC アイソタイプのうち主成分 P-2 の N-末端 1 - 23 アミノ酸配列よりセンス (N-末端) およびアンチセンス (C-末端) の degenerate オリゴヌクレオチドを合成し、*Rana* 海綿骨の mRNA より逆転写して調製した cDNA ライブラリーを鋳型として 5'-RACE, 3'-RACE-PCR を繰り返し cDNA ライブラリーのスクリーニングにより *Rana* OC の全長をコードする cDNA を単離することができた<sup>5)</sup>。全長 cDNA の塩基配列から推定される *Rana* OC 前駆体の

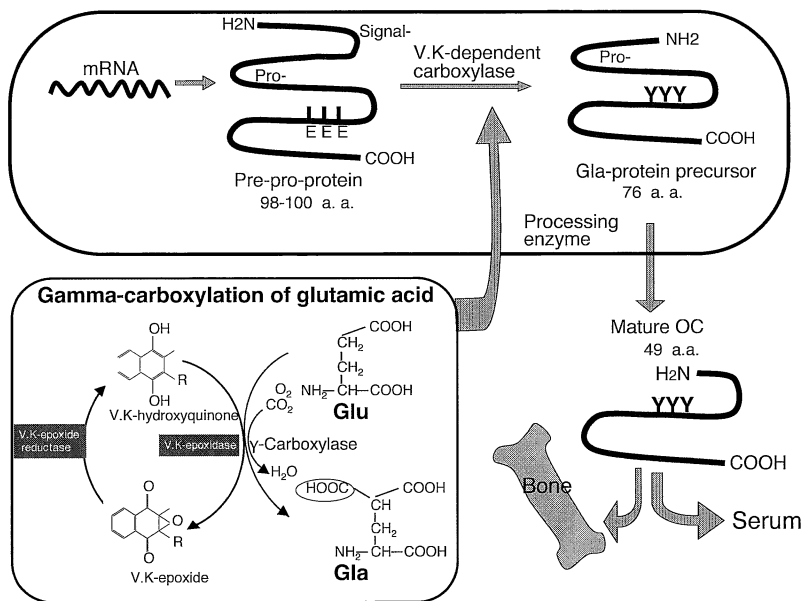


図 3. 骨芽細胞におけるオステオカルシンの合成と分泌  
左下図はビタミン K サイクルと  $\gamma$ -カルボキシル化によるグルタミン酸の修飾

アミノ酸配列を図 4 に示す. 推定されたアミノ酸配列より成熟 OC の N-末端は Ser で 49 アミノ酸からなることが明らかになった. ところが精製した *Rana* OC の主成分 P-2 の N-末端は Asn であり 5-27 位に相当するアミノ酸配列と一致した (図 4). *Rana* OC の 2 つのアイソタイプのマスペクトルから P-1, P-2 の分子量は 5610.24 と 5139.11 と測定された. 完全長の cDNA から推定されたアミノ酸配列より 49 アミノ酸残基の intact OC と N 末端 4 残基の欠損した OC の理論的分子量はそれぞれ表 1 のように 5611.27 と 5140.74 と計算され, P-1 は 49 アミノ酸残基の intact OC, P-2 は N 末端の 4 残基がプロテアーゼによって切断された 45 アミノ酸残基の OC であると同定された (表 1).

哺乳動物 (human, rat)<sup>6)</sup>, 鳥類 (chicken)<sup>13)</sup>, 魚類 (*Sparus aurata*: 鯛の仲間) で一般にはロイヤルスプリームと呼ばれる硬骨魚類<sup>14)</sup>, アフリカツメガエル

(*Xenopus laevis*)<sup>15)</sup> など他の脊椎動物の OC cDNA から推定されるアミノ酸配列と比較すると *Rana* OC のプレペプチド, プロペプチドは相同性が低い<sup>6)</sup>, Glu を含む成熟ペプチドの 14-48 位のアミノ酸配列は 91% の相同性であった (図 5). *Rana* OC のアミノ酸配列は魚類よりむしろ哺乳類に近く, そのうちヒト OC と 67% の相同性であった. しかもシグナルペプチド切断部位 (-31 位の Ala) とプロペプチド切断部位近傍のアミノ酸配列はほとんどの脊椎動物の OC でよく保存されている. 特にプロセシング酵素による認識され限定切断に必要な基質 OC 前駆体の切断部位近傍のアミノ酸配列の規則性は, ほとんど全ての OC 前駆体, および Glu を持つ血液凝固因子, Factor X や prothrombin などの前駆体に存在していることもこの分泌タンパク質の Glu 残基の機能を考えるうえで重要と思われる. その規則性は -1 位の Arg 残基が必須であり, そして -2, -4 位が塩基性アミノ酸

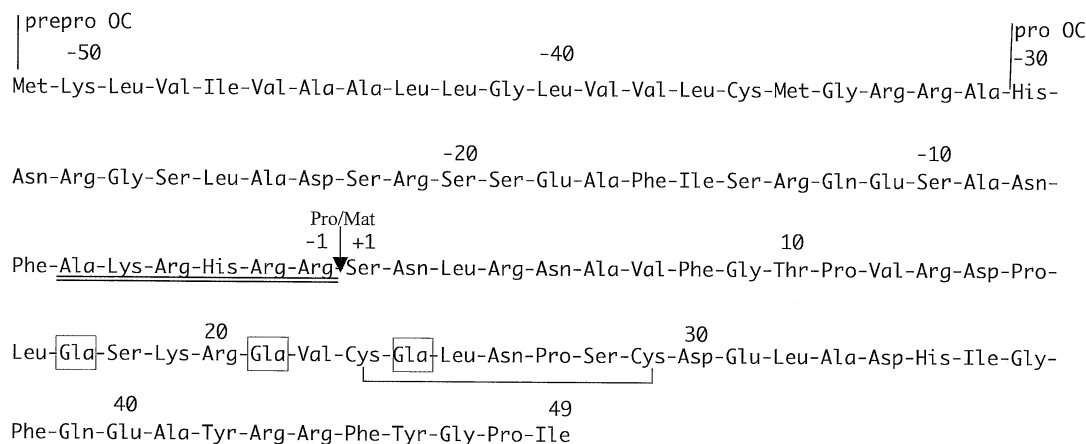


図 4. ウシガエル (*Rana catesbeiana*) オステオカルシン前駆体のアミノ酸配列  
 -16 位の Phe と -17 位の Ala 付近が  $\gamma$ -カルボキシラーゼ認識部位.  
 二重下線はプロセシング酵素認識部位. (文献 5 より改変).

表 1. *Rana* オステオカルシンアイソタイプの MS スペクトロメトリーによる分子量

アイソタイプ	N 末端アミノ酸残基からの位置	ペプチドのアミノ酸配列	理論値 mass (m <sup>+</sup> )	測定値 mass (m <sup>+</sup> )
P-1	1-49	SNLRNAVFGTPVRDPLESKREVCELNPSCEDELADHIGFQEA $\downarrow$ YRRFYGP $\downarrow$ I	5611.27	5610.24
P-2	5-49	NAVFGTPVRDPLESKREVCELNPSCEDELADHIGFQEA $\downarrow$ YRRFYGP $\downarrow$ I	5140.74	5139.11

ペプチドの理論的分子量は cDNA より推定したアミノ酸配列を使って ExPASy-PeptideMass により計算した. 2 つのペプチドのマスペクトルより測定された分子量とよく一致している. (文献 5 より改変). 矢印はトリプシンによる切断部位.

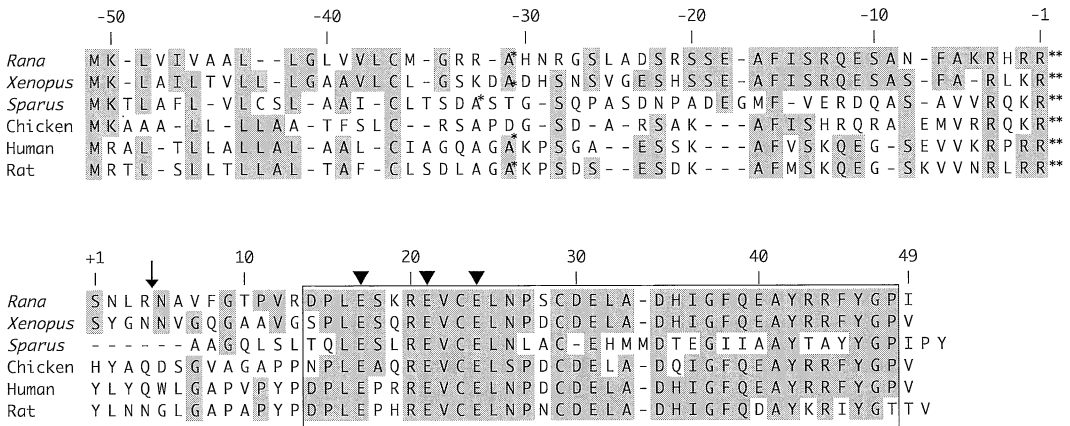


図5. 脊椎動物のプレプロオステオカルシンのアミノ酸配列の比較  
 mature OC の N 末端アミノ酸を 1 とした. ▼はγ-カルボキシグルタミン酸(Gla)残基を示す. ↓の位置で成熟 OC, P-1  
 の切断が起こり P-2 となる.  
 \*は pre-pro の切断部位を, \*\*は pro-mature の切断部位を表わす.  
 最もよく保存されているアミノ酸配列領域を□で囲った.

Rana; *Rana catesbeiana*, Xenopus; *Xenopus laevis* AF055576, Sparus; *Sparus aurata* AF048703, rat; X04141, human; X53698 それぞれの OC mRNA の塩基配列のアクセッション番号. (文献 5 より改変).

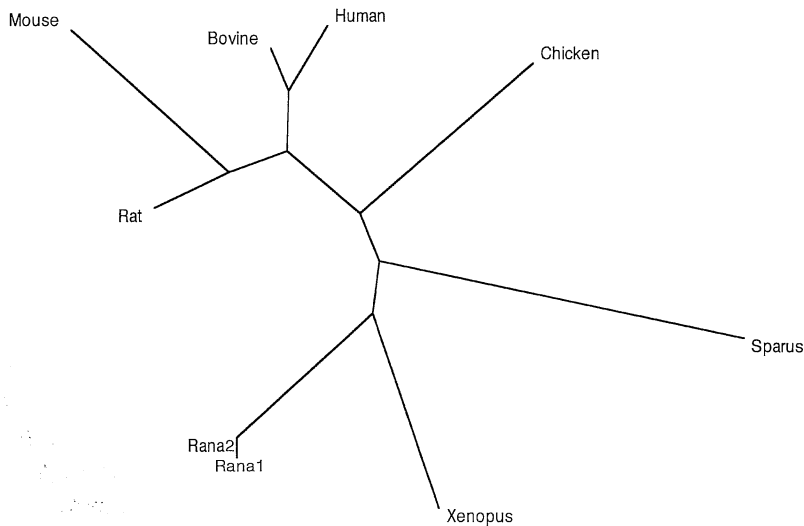


図6. オステオカルシン・ファミリーのアミノ酸配列よりみた系統学的分析  
 脊椎動物の mature OC のアミノ酸配列による CLUSTAL W program を用いて系統図を作成した.  
 Rana 1 と Rana 2 は *Rana* オステオカルシンのアイソタイプそれぞれ P-1 と P-2 を表わす.  
 Sparus: *Sparus aurata*, Xenopus: *Xenopus laevis* (文献 5 より改変)

で, これらの塩基性アミノ酸とプロセシング酵素のサブ  
 サイトに存在する酸性アミノ酸とが相互作用するとされ  
 ている<sup>16)</sup>.

8つの脊椎動物の成熟 OC のアミノ酸配列の相同性か  
 ら進化のうえでの相互関係を解析すると, わずか 50 アミ  
 ノ酸残基からなる OC ファミリーの系統樹が図 6 のよう

に画かれた、*Rana* OC は哺乳類、硬骨魚類、鳥類の OC とも離れ独立した位置にある。両生類間より哺乳類間の相同性の方が高いが、分子サイズが小さいため哺乳類と両生類の間の相同性も、OC 遺伝子クラスターを持つマウス OC を除いて 60% 以上と比較的高い。

骨と歯の象牙質にしか存在しない OC の起源は何であろうか。骨に OC 以外の Gla 含有タンパク質、マトリックス Gla タンパク質 (MGP) が OC より遅れて発見されたが、脊椎動物の軟骨の発生と硬骨の発生後の進化の過程はこの 2 つの Gla 含有タンパク質 MGP と BGP (OC) 分子の出現によって説明されている<sup>17)</sup>。MGP は OC の 1.5 倍の分子量 10 kDa、5 つの Gla 残基を含む。OC と MGP のアミノ酸配列を比較すると Gla と Cys 残基の相対的位置関係は一致するほかは若干の相同性がみられる。硬骨のみに存在する OC と異なり MGP は骨以外にも軟骨や血管平滑筋など多くの組織に発現し、石灰化を抑制する機能を持っている。Laizéら<sup>17)</sup>は 32 種類の脊椎動物の MGP と OC の分子構造を比較解析し、2 つの Gla 含有タンパク質分子の進化と骨格構造の進化について次のような仮説を提唱している。1) 無顎魚類の現れる前の約 5 億年前に MGP 遺伝子が、その後有顎魚類の現れる前の約 4 億年前に OC 遺伝子が 2 つのゲノムの複製により生じた。2) MGP は最初に軟骨の発生と同時に出現し、その後、硬骨への進化とともに OC が出現した。3) OC は MGP と同一の祖先タンパク質由来である。

さらに硬骨の進化の過程では両生類は水から上がって陸を歩くのに適応した骨格構造を持つ最初の脊椎動物であると考えられる<sup>18)</sup>が、重力と酸素分圧の大きさは脊椎動物の骨構造と機能にも大きく影響を与えることは想像に難くない。骨形成が周囲の環境条件に大きく影響を受けることは細胞工学的手法による *in vivo* 骨形成実験にも認められている<sup>19)</sup>。

## 5. OC のカルシウム結合能とそれに伴う構造変化

OC は等電点が 4.0 の酸性タンパク質であり、1 分子当たり 2–3 個の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンを結合するが平衡定数  $K_d=0.2-1 \text{ mM}$  程度の低親和性結合である。細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は  $1 \text{ mM}$  程度であるので細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質としては妥当な値である。OC は native ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) 上では  $\text{Ca}^{2+}$  の有無によって移動度が異なる。すなわち  $\text{Ca}^{2+}$  を  $5 \text{ mM}$  含むバッファー中で泳動すると陰極側へシフトする<sup>5,11)</sup>が、このことは後に述べるようにメタル結合による Gla タンパク質のコンフォメーションの変化、即ちマイナスの荷電の減少を示している。

OC はミネラルの HA には高い親和性 ( $K_d=0.1 \mu\text{M}$ ) で

結合し、骨の石灰化に影響を及ぼしていると考えられてきた<sup>20)</sup>。著者らは精製した *Rana* OC のもつメタル結合能やそれに伴う高次構造の変化について平衡透析法と circular dichroism (CD) 法を使って検討した。図 7A は *Rana* OC (P-2) のアポタンパク質溶液に  $\text{Ca}$  濃度を  $0.12-4.91 \text{ mM}$  まで変化させた時の遠紫外領域 ( $250 \text{ nm}-197 \text{ nm}$ ) での CD スペクトル変化を示したものである。222 nm における負の CD ピークの大きさ (モル楕円率) は  $\alpha$ -ヘリックス含量を表わし、 $\text{Ca}^{2+}$  の結合によってそれは 8% から 25% に増加した。平衡透析法による  $\text{Ca}^{2+}$  結合曲線と CD スペクトル変化量をプロットしたものを図 7B に示したが、このことから  $\text{Ca}^{2+}$  イオンの結合に伴うコンフォメーション変化は *Rana* OC でも証明された。このときの  $\text{Ca}$  結合の  $K_{d1-3}=0.17-0.67 \text{ mM}$  であり既報のとおり細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に見合う低親和性であった。 $\text{Ca}^{2+}$  の最大結合数は Scatchard plot により Gla の数と同じ 3 モルと推定された。OC は  $\text{Ca}^{2+}$  だけでなくイオン半径の近いカドミウム ( $\text{Cd}^{2+}$ ) との結合に伴うコンフォメーション変化を起こし、 $\text{Cd}^{2+}$  に対する親和性は  $\text{Ca}^{2+}$  の 50–100 倍高く  $K_{d1-3}=3.6-10.4 \mu\text{M}$  であった<sup>12)</sup>。イタイイタイ病では  $\text{Cd}^{2+}$  は腎臓だけでなく骨に蓄積することが知られているが、OC のような高親和性のタンパク質の存在も微量重金属の蓄積に何らかの役割を果たしている可能性を示している。

このように溶液中のアポ OC はランダムな構造をとっているが金属イオンを結合すると部分的に  $\alpha$ -ヘリックスを巻くようになる。Haushka ら<sup>21)</sup>は、chicken の OC が  $\text{Ca}^{2+}$ -OC 複合体になるとヘリックス含有量は 8% から 38% に増加しており、予想される  $\alpha$ -ヘリックス領域は N 末端より 18–25 残基および 30–41 残基の 2 か所と仮定した。骨の HA 結晶へどのように OC 分子は結合しているのであろうか。Haushka らは OC が  $\alpha$ -ヘリックスを巻くと 3 つの Gla 残基は同一方向に同一間隔で並ぶ Gla 化 OC と HA 結晶の ab 面の  $\text{Ca}$  の結合モデルを提唱していた<sup>22)</sup>が、その後 2003 年  $2.0 \text{ \AA}$  分解能での X 線結晶解析からブタの Gla 化 OC と HA 結晶との結合様式が解明された。このモデルでは、 $\alpha$ -ヘリックス領域 3 か所のうち 3 つの Gla 残基と近傍の Asp 残基によりタンパク質の表面がマイナスに荷電しており、その表面はハイドロキシアパタイト結晶格子中の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンと相補的空間配置にある 5 つの  $\text{Ca}^{2+}$  イオンを結合すると提唱している<sup>22)</sup> (図 8)。

## 6. OC の機能

OC は骨や歯の HA 結晶格子中の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンと強固に

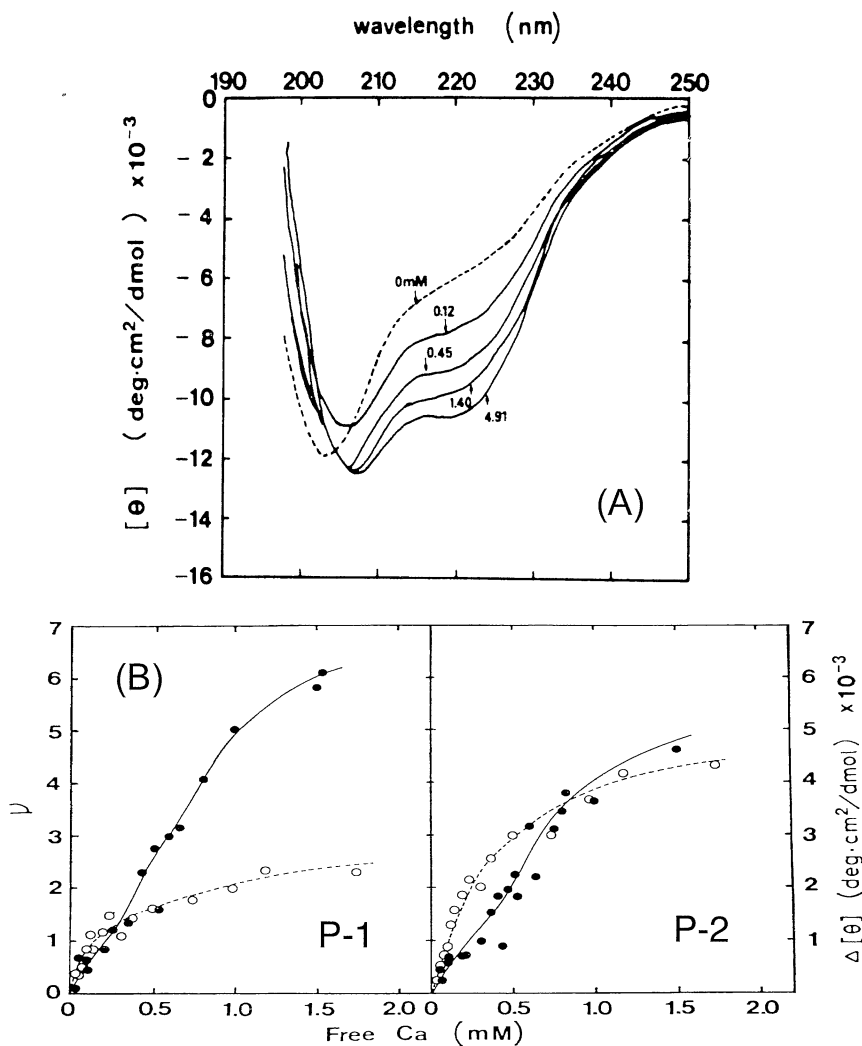


図7. Rana オステオカルシン P-2 の  $\text{Ca}^{2+}$  の結合に伴う遠紫外領域の CD スペクトルの変化と  $\text{Ca}^{2+}$  結合曲線

(A) はアポ OC 溶液に  $\text{CaCl}_2$  を 0.03-5.00 mM 加えた。

(B) P-1, P-2 の  $\text{Ca}$  結合曲線と CD スペクトルの変化

●; 平衡透析法により OC 1 モルに結合した  $\text{Ca}$  のモル数  $\nu$ , ○;  $\text{Ca}$  濃度依存性の  $\alpha$ -ヘリックス含量 (222 nm) における差楕円率  $\Delta[\theta]$  の変化 (文献 12 を改変)

結合していること, また *in vivo* 骨形成中の基質の  $\text{Ca}$  と OC の経時的蓄積量の増加には正の相関が認められたことから OC は石灰化を促進すると推測されていた<sup>23)</sup>. しかし, ビタミン K 拮抗剤ワルファリンを投与した低 OC ラットの骨は, 量的にも石灰化の程度も正常と変わりがなかった<sup>24)</sup>. また Karsenty らは OC 遺伝子のホモのノックアウト (KO) マウスを作製し検討した. OC KO マウスの子どもは正常に生まれ, 骨の微細構造上もマウスの骨

は全く正常であるが, 6 か月齢, 9 か月齢では皮質骨の厚みが野生型よりも 150% 以上厚くなり, 海綿骨の骨量は野生型より大きく, 強度試験の結果も破断強度の増加が見られている. 骨形成速度は海綿骨や皮質骨とも野生型より高く, それは骨芽細胞数よりむしろ骨芽細胞の機能が KO マウスにおいて亢進していると考えられている. 従って OC は骨の石灰化の促進よりむしろ過剰な石灰化を抑制する機能, すなわち骨量を調節する機能を持つ分

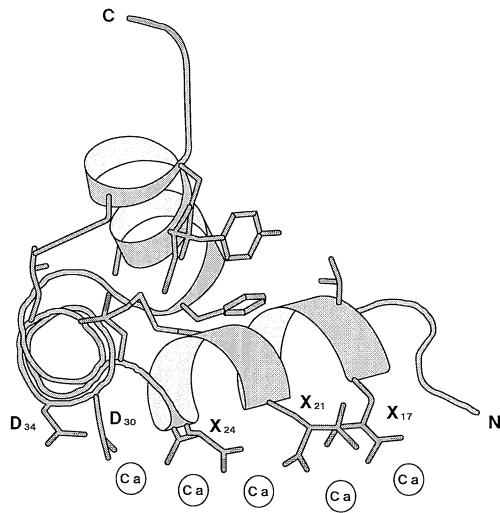


図 8. プタ OC の立体構造  
HA 結晶上の  $\text{Ca}^{2+}$  と相補的空間配置にある 5 つの  $\text{Ca}^{2+}$  が結合 (文献 22 を改変)

子であるとしている<sup>25)</sup>。In vitro での実験では Gla 化 OC は HA の結晶化を阻害する<sup>26)</sup>が、結晶化の完了した HA には高親和性に結合することから、大量に合成分泌された Gla 化 OC は結晶の成長を抑制して間接的に石灰化を調節しているのであろう。

もう一つの OC の機能として OC 分子は骨芽細胞や破骨細胞の前駆細胞である単球に対してケモタキシス活性を持つことであり<sup>27)</sup>、この活性は OC 分子の C 末端の 5 残基にあるとされている<sup>28)</sup>。

また血液中に分泌された微量の OC は、骨形成の動きや骨の代謝回転を反映する指標として用いられている<sup>9, 10)</sup>。

## 7. 骨髄間葉系幹細胞から再生培養骨の形成

これまで述べてきた OC 分子は骨基質の支持組織の一構成成分として機能を発揮しているが、未分化間葉系細胞から骨芽細胞への骨分化カスケードのどのステップで発現し転写されるのであろうか。ラット大腿骨より採取した骨髄細胞から間葉系幹細胞を含む細胞を増殖・調製し、デキサメタゾン (Dex)、アスコルビン酸-2-リン酸、 $\beta$ -グリセロフォスフェイト (以下  $\beta$ -GP と略す) を添加した 15% ウシ胎児血清含有の骨誘導培地で約 2 週間二次培養すると、豊富な細胞外基質に囲まれた立方形状の骨芽細胞様細胞が出現する。その細胞膜上ではアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性が高く、合成分泌され

成長した細胞外基質にはミネラルの沈着が起り、骨芽細胞に特有の機能を獲得して成熟していく。骨芽細胞は最終的に骨基質内に埋め込まれ骨細胞となる<sup>1)</sup>。

Dex による骨芽細胞への分化誘導の 1 つの機序として、グルココルチコイド受容体を介した MAPK phosphatase-1 (MKP-1) の活性化が、骨分化に必須の転写因子 Cbfa1<sup>28)</sup> の N-末端側ドメイン Ser125 上のリン酸化を抑制することによって骨分化のカスケードを活性化していると提唱されている<sup>29)</sup>。

種々の骨基質タンパク質のうち、OC は先に述べたように骨中では HA 結晶面上の Ca 原子に配位して量的にも豊富に存在している<sup>7)</sup>ため、上記の ALP 活性よりも骨分化マーカーとして最も特異性の高いタンパク質分子である。筆者らはラット OC に対する特異的抗体を作製、Radioimmunoassay (RIA) 系を開発し定量することで培養骨の骨芽細胞を同定し、さらに In situ ハイブリダイゼーション法による OC mRNA 検出によりこの培養皿上の細胞が骨芽細胞であること、および X 線回折分析 (XRD)、赤外線スペクトル分析 (FT-IR) などの物理化学的解析により、沈着した石灰化基質のミネラルは正常の骨組織に見られる炭酸イオンを含むハイドロキシアパタイト結晶と同一の組成であることも証明している<sup>30)</sup>。

## 8. 間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化過程

ラット骨髄間葉系幹細胞から骨誘導培地のもと骨芽細胞から骨基質を沈着した培養骨へと分化成熟する過程では、種々の転写因子、サイトカインおよび骨基質タンパク質が経時的に発現される。まずグルココルチコイド依存性に早期に誘導される金属結合タンパク質メタロチオネイン (metallothionein; MT) は亜鉛 (Zn) や Cd に高親和性の低分子タンパク質である。そのアイソタイプのうち細胞中の過酸化処理や Zn 濃度の恒常性に関わっているとされる MT-2 mRNA は二次培養開始後 24 時間でピークとなった<sup>31)</sup>。MT-2 の発現は DNA 合成や Zn-フィンガー構造を持つ転写調節因子などの発現を介して細胞増殖に寄与していると考えられる。

ひきつづいて Dex 依存的に誘導される骨形成因子 bone morphogenetic proteins (BMPs)、なかでも BMP-2 による骨芽細胞への分化の促進には、BMP-2/Smad のシグナルが核内の転写因子 Cbfa1 へと伝達されるカスケードが重要な役割を担っている。これらのサイトカイン/転写因子のシグナル伝達経路を介して Dex によって骨芽細胞への分化の方向が決まると、転写因子 Cbfa1 をはじめ、Cbfa1 の下流で働き前骨芽細胞から骨芽細胞への分化の早期に活性化される転写因子として同定された



C-末側に3つのZnフィンガー構造を持つオステリクス (osterix; *Osx*)が発現される<sup>32)</sup>. 早期にはこのように多くの骨芽細胞の分化に関わる転写因子やサイトカインを分泌することにより主たる骨のタンパク成分であるI型コラーゲンの早期発現を促し、そしてALP, OP, BSP, OCなどが産生され骨基質が構築されていく. この分化・成熟した培養骨では、骨芽細胞が合成・分泌する種々の転写因子やサイトカイン、そして基質タンパク質がさらに骨分化を進展させると考えられている. 例えば*Cbfa1*はI型コラーゲン, OP, BSP, OC遺伝子などのプロモーター領域の特異的エレメントに結合してこれらの骨基質タンパク質の転写を直接調節している<sup>33)</sup>. また骨芽細胞分化の後期に発現し骨細胞にも高発現する新たな骨基質タンパク質Osteoblast/osteocyte factor -45 (OF45)のKOマウスでは骨組織の骨芽細胞数が増加し柱状骨や

海綿骨が過骨化した. このことよりOF45はOCと同様、過剰の骨形成を抑制し骨量の保持を制御していると考えられる<sup>34)</sup>.

### 9. 骨基質の石灰化

骨芽細胞により細胞外基質タンパク質の合成・分泌が活発に進み非石灰化骨基質が形成されると基質タンパク質の合成はしだいに低下し<sup>29, 35)</sup>, 骨芽細胞の分化過程は最終段階の石灰化へと急速に進んでいく. Caは基質中に取り込まれた無機リン酸とイオン結合し初期には非結晶性のリン酸カルシウムを析出するが次第にHAの結晶が形成されていく<sup>36)</sup>. 骨の主たるタンパク成分であるI型コラーゲンの線維上に成長したアパタイト結晶が蓄積し石灰化層が形成されていく過程が共焦点レーザー顕微鏡解析画像で示され、I型コラーゲンが骨分化カスケ

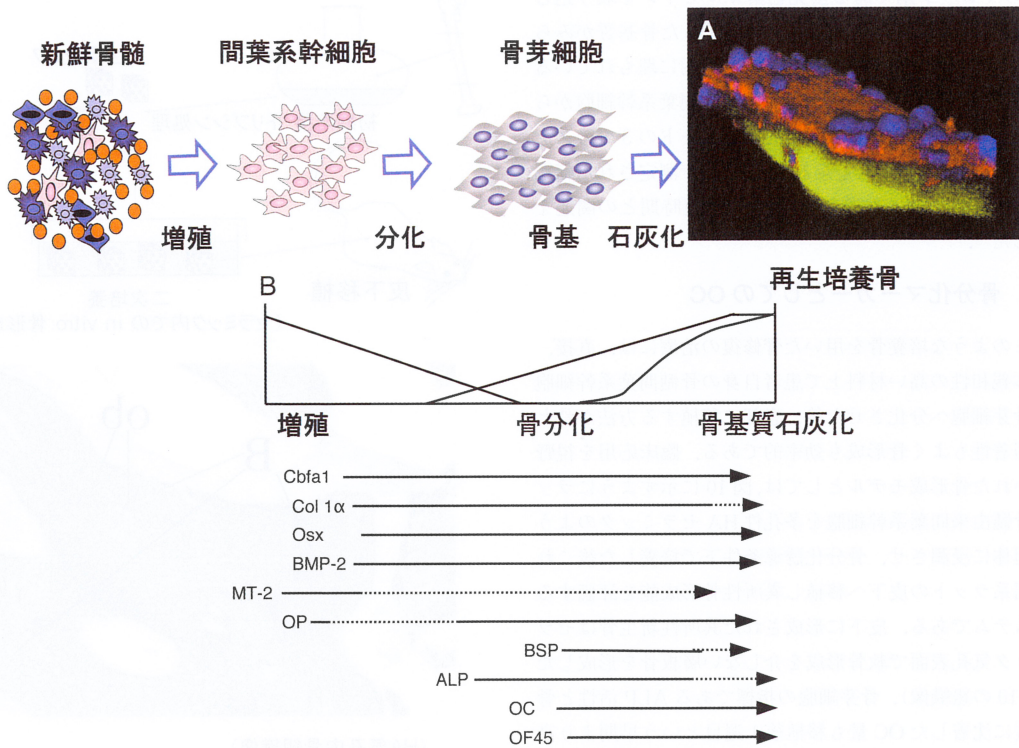


図9. 骨髄間葉系幹細胞からデキサメタゾン存在下の再生培養骨形成と再生培養骨の三次元コンピューターグラフィック像

(A) 石灰化培養骨の傾斜角度から見た三次元コンピューターグラフィック立体像. ノデュール表面にはアクチンファイバーに細胞が結合しており、その下の石灰化骨基質(緑色)中に埋まっている骨細胞が観察される.

二次培養16日後、Caとキレート結合する蛍光色素カルセインの取り込みでCaの沈着(骨化、緑色)を共焦点レーザー走査顕微鏡により連続走査解析をした。細胞表面のアクチン微小フィラメントは赤色の蛍光色素 Texas Red-phalloidinで、核はTOPRO-3(青色)でラベルしている。(文献40を改変)

(B) 間葉系幹細胞による骨分化カスケード

ドを活性化することも示唆された<sup>37)</sup>。

また石灰化過程では、低分子プロテオグリカンであるデコリンの関与も大きい。基質中の HA 結晶の成長・増大により I 型コラーゲン線維の間隙に結合していたデコリンはアパタイトに入れ替わることにより石灰化が開始され、しだいに石灰化層が形成される<sup>38)</sup>。デコリンを過剰発現する骨芽細胞株は石灰化の開始が有意に遅れるが、アンチセンス-デコリン遺伝子を導入した骨芽細胞株では石灰化の顕著な亢進を示している。このように石灰化のタイミングはデコリン合成レベルと逆相関しており、デコリンはコラーゲン線維間隙における石灰化を抑制して基質の石灰化のタイミングを調節していると考えられる<sup>39)</sup>。

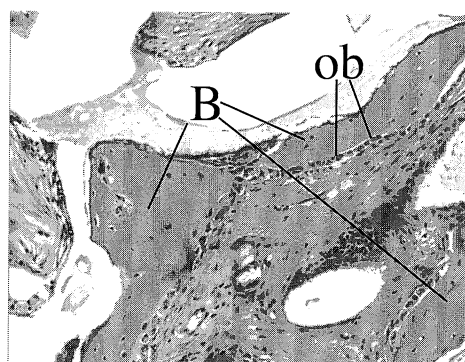
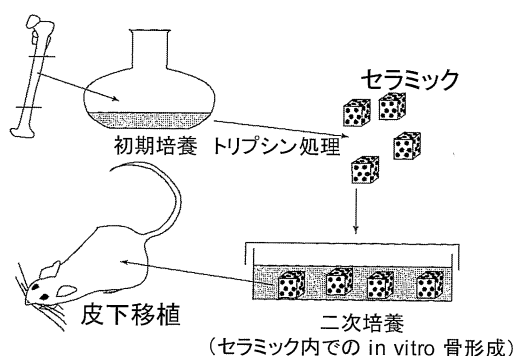
図 9A にこのような最終段階を経て構築された再生培養骨の共焦点レーザー顕微鏡解析画像による 3 次元構造<sup>40)</sup>を示している。培養皿上に形成されたこの骨様組織は、Ca のキレート剤である蛍光色素カルセインを取り込むことによって Ca の沈着 (緑色の蛍光) した骨基質がみられ、表面の骨芽細胞のみならず骨基質内に埋もれている骨細胞様細胞も観察される。図 9B には間葉系幹細胞から石灰化培養骨形成までの骨分化カスケードの 3 つのステージと、リアルタイム定量 PCR 法などで測定された転写因子や基質タンパク質の mRNA の発現時期との関連を示した<sup>39)</sup>。

## 10. 骨分化マーカーとしての OC

このような培養骨を用いた骨修復の治療には、直接、生体親和性の高い材料上で患者自身の骨髄間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化させた後、患部に移植する方法が骨との固着性もよく骨形成も効率的である。臨床応用を視野にいた骨形成モデルとしては、図 10 に示すようにラット骨髄由来間葉系幹細胞を多孔性 HA セラミックのような担体に浸潤させ、骨分化誘導条件下で培養した後これを同系ラットの皮下へ移植し異所性骨形成能を評価するシステムである。皮下に形成された異所性新生骨はセラミック気孔表面で軟骨形成を介しない層板骨を形成した (図 10 の組織像)。骨芽細胞の指標である ALP 活性と骨基質に沈着した OC 量も移植後 1 週目という早期より高いレベルを示し、2 週～ 4 週後には生体内の海绵骨とほぼ同等の骨芽細胞活性を示した<sup>2, 41)</sup>。

再生培養骨を生体の骨欠損部へ移植したあとの骨修復の成否は、in vitro で作製した培養骨を適切なマーカーでモニタリングでき骨形成能の高い骨芽細胞を簡便に精度よく選択できるかどうかにかかっている。非コラーゲン性タンパク質は骨のみならず軟骨、腎臓の基底膜、血

管などにも発現するものが多いが、OC はこれまでの報告では骨と歯の象牙質に限られていること、骨芽細胞が比較的多く分泌すること、HA に高親和性であるなどにより培養骨の骨芽細胞活性を評価する指標として最も有用と考える。しかし、これまで分泌 OC の大部分は石灰化の開始と同時に骨基質への沈着が速やかに起こるとされ、骨分化の証明は骨基質に沈着した Ca 量と OC 量の測定や細胞中の ALP 活性、そしてこれらのタンパク質の mRNA の発現量によりなされてきた。例えば、ディスク状チタン合金上で培養したラット MSC の骨分化によって形成された石灰化基質層の Ca 沈着量をカルセインの蛍光量で、沈着 OC を酸抽出後 ELISA 法でそれぞれリアルタイムモニタリングしたところ、Ca と OC の沈着量には強い正の相関があり石灰化と OC の合成は密接に関



(HA 気孔内骨組織像)

図 10. 多孔性ハイドロキシアパタイト (HA) セラミック内での培養骨作製法とその培養骨移植後 2 週目の組織像

多孔性 HA セラミックを間葉系幹細胞浮遊液に浸し、骨誘導培地で 2 週間培養した培養骨を同系ラットの皮下へ移植した。HA 気孔表面に層状の膜性骨 (B) とその表面に立方状の骨芽細胞 (ob) が並んでいる。(生体の科学, 49 巻:191-195, 1998 より引用改変)

連していることが証明されている<sup>42)</sup>。しかし、著者らはラット OC に特異性の高いモノクローナル抗体を用いた ELISA システムを開発し、未分化間葉系幹細胞からの骨芽細胞分化の過程で培養上清への OC 分泌量を経時的に測定した結果、OC は石灰化以前に盛んに合成・分泌されていることが明らかとなった。従来の骨誘導培地には Dex, アスコルビン酸-2-リン酸および  $\beta$ -GP の 3 種が含まれているが、 $\beta$ -GP を除いた 2 種の骨誘導剤を含む培地で 14 日間培養すると石灰化が起こらないにもかかわらず、培地中へ分泌される OC 量は従来の骨誘導培地で培養したときの分泌量に匹敵するかむしろ高レベルであった<sup>43)</sup> (図 11)。このことから早期に合成・分泌された OC 量のモニタリングは、骨芽細胞活性の高い細胞を選択する有効な手段となる。特に移植を目的として、間葉系幹細胞を搭載した種々の担体を培養する場合、骨

芽細胞のバイアビリティを保持したまま培養液中の分泌 OC を測定することによって高い骨形成能をもつ培養骨の評価ができ、そのまま直接患部への移植が可能となる。

### 11. おわりに

骨や軟骨の細胞外マトリックスは硬くて扱いにくいこともあって分子生物学的な研究対象としては長い間注目されなかった。しかし 1975 年骨の基質タンパク質の一つとしてビタミン K 依存性アミノ酸  $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) を分子内に 3 つ含む Bone Gla protein<sup>3, 4)</sup> が発見され、骨形成因子 (BMP ファミリ) の存在を Urist<sup>44)</sup> が発表して以来、非コラーゲン性骨基質タンパク質が分子生物学的な手法で明らかにされ骨分化や骨代謝における骨基質タンパク質の研究は飛躍的に発展した。間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化そして石灰化へと成熟する骨分化カスケードでは、細胞自身が合成・分泌するサイトカインや細胞外基質タンパク質によるオートクライン機構で骨分化を制御していることは明らかである。ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を利用した骨分化の指標としての OC はラットに比べ、分泌量や OC mRNA の発現量は非常に低い。血清中 OC レベルもラットに比し 1/10 ~ 1/5 と低く<sup>46)</sup>、しかも 17 位の Gla が脱炭酸化されていることが多いことなど考慮すると OC 分子の機能自体ラットとは異なる可能性がある。骨髄由来間葉系細胞を用いた *in vitro* での培養後期に活性型 1, 25 (OH)<sub>2</sub> ビタミン D<sub>3</sub> を培地に添加すると OC 発現のスイッチがオンになり OC 分泌量は増加することが知られている<sup>47)</sup>。しかしこの活性型ビタミン D<sub>3</sub> は化学的に非常に不安定でありしかも高価である。免疫学的にはヒト OC はウシ OC とよく類似しているので培地中のヒト OC 濃度の定量は困難である。今後の再生培養骨を用いた骨修復の治療効果を評価するためにも、感度のよいヒト OC の分泌量測定法の開発が急がれる。今年になって、非カルボキシ OC 分子が糖代謝や脂肪量を制御するホルモン作用をもつという全く新たな機能について示された<sup>48)</sup>。骨芽細胞に特異的なこの低分子分泌タンパク質の意外な機能は非常に興味深いところである。

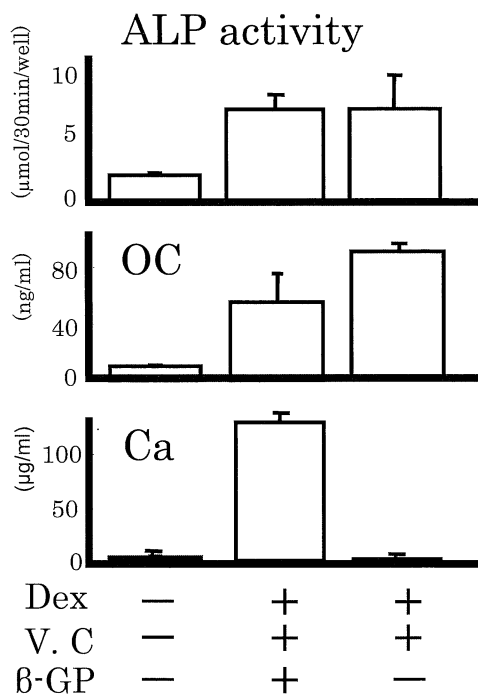


図 11. ラット間葉系幹細胞による非石灰化骨誘導条件下での骨芽細胞への分化  
初期培養で増殖させたラット間葉系幹細胞を 15% FBS 含有標準培地に Dex 10 nM、Ascorbic acid-phosphate (V.C) 82  $\mu\text{g}/\text{ml}$  および  $\beta$ -GP 10 mM を添加した完全骨誘導培地と  $\beta$ -GP のみを削除した非石灰化骨誘導培地で 14 日間培養したときの ALP 活性値、培地中の分泌 OC 濃度および細胞外基質に沈着した Ca 量の比較。(文献 43 を改変)

### 謝 辞

本稿を終えるにあたり、ご助言いただきました奈良県立医科大学健康政策医学の今村知明教授、整形外科学高倉義典教授に深謝いたします。また実験の補助および作図にご協力いただいた健康政策医学講座の吉村満美子さん、薮ノ内真子さんに深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Ohgushi, H. and Caplan, A. I. : Stem cell technology and bioceramics : from cell to gene engineering. *J. Biomed. Mater. Res.* **48**: 913-927, 1999.
- 2) Okamoto, M., Dohi, Y., Ohgushi, H., Shimaoka, H., Ikeuchi, M., Matsushima, A., Yonemasu K. and Hosoi, H. : Influence of the porosity of hydroxyapatite ceramics on in vitro and in vivo bone formation by cultured rat bone marrow stromal cells. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **17** : 327-337, 2006.
- 3) Price, P. A., Ohtsuka, A. S., Poser, J. W., Kristaponis, J. and Raman, N : Characterization of a  $\gamma$ -carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73** : 1447-1451, 1976.
- 4) Hauschka, P. V., Lian, J. B. and Gallop, P. M. : Direct identification of the calcium-binding amino acid,  $\gamma$ -carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72** : 3925-3929, 1975.
- 5) Dohi, Y., Tabata, S., Yamaguchi, M., Ohgushi, H. and Yonemasu, K.: Characterization of the cDNA encoding bullfrog, *Rana catesbeiana*, osteocalcin and two forms of the protein isolated from bone. *Biochimie* **86** : 471-480, 2004.
- 6) Celeste, A. J., Rosen, V., Buecker, J. L., Kriz, R., Wang, E. A. and Wozney, J. M. : Isolation of the human gene for bone gla protein utilizing mouse and rat cDNA clones. *EMBO. J.* **5** : 1185-1189, 1986.
- 7) Price, P. A.: Vitamin K-dependent formation of bone Gla proteins (osteocalcin) and its function. *Vitam. Horm.* **42** : 65-108, 1985.
- 8) Wallin, R. and Hutson, S. M. : Warfarin and vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. *Trends Mol. Med.* **10** : 299-302, 2004.
- 9) Calvo, M. S., Eyre, D. R. and Gundberg, C. H. : Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr. Rev.* **17** : 333-368, 1996.
- 10) Iki, M., Morita, A., Ikeda, Y., Sato, Y., Akiba, T., Matsumoto, T., Nishino, H., Kagamimori, S., Kagawa, Y. and Yoneshima, H. : JPOS Study Group.: Biochemical markers of bone turnover predict bone loss in perimenopausal women but not in postmenopausal women—the Japanese Population-based Osteoporosis (JPOS) Cohort Study. *Osteoporos. Int.* **17** : 1086-1095, 2006.
- 11) Dohi, Y., Iwami, K., Yonemasu, K. and Moriyama, T.: Two proteins with gamma-carboxyglutamic acid of frog bone: isolation and comparative characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* **915** : 378-384, 1987.
- 12) Iwami, K., Dohi, Y., Moriyama, T. and Hamaguchi, K.: Metal binding and metal-induced conformational change of gamma-carboxyglutamic acid-containing protein. *J. Biochem.* **102** : 75-82, 1987.
- 13) Neugebauer, B. M., Moore, M. A., Broess, M., Gerstenfeld, L. C. and Hauschka, P. V.: Characterization of structural sequences in the chicken osteocalcin gene: expression of osteocalcin by maturing osteoblasts and by hypertrophic chondrocytes in vitro. *J. Bone Miner. Res.* **10** : 157-163, 1995.
- 14) Pinto, J. P., Ohresser, M. C. and Cancela, M. L.: Cloning of the bone Gla protein gene from the teleost fish *Sparus aurata*. Evidence for overall conservation in gene organization and bone-specific expression from fish to man. *Gene* **270** : 77-91, 2001.
- 15) Viegas, C. S. B., Pinto, J. P., Conceicao, N., Simes, D. C. and Cancela, M. L.: Cloning and characterization of the cDNA and gene encoding *Xenopus laevis* osteocalcin. *Gene* **289** : 97-107, 2002.
- 16) Watanabe, T., Murakami, K. and Nakayama, K. : Positional and additive effects of basic amino acids on processing of precursor proteins within the constitutive secretory pathway. *FEBS. Lett.* **320** : 215-218, 1993.
- 17) Laizé V., Martel, P., Viegas, C. S., Price, P. A. and Cancela, M. L. : Evolution of matrix and bone gamma-carboxyglutamic acid proteins in vertebrates. *J. Biol. Chem.* **280** : 26659-26668, 2005.
- 18) Strickberger, M. W. Evolution, third edn, Jones

and Bartlett Publishers, USA, 2000.

- 19) **Ikeuchi, M., Dohi, Y., Horiuchi, H., Ohgushi, H., Noshi, T., Yoshikawa, T., Yamamoto, K. and Sugimura, M.** : Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes osteogenesis within atelopeptide type I collagen solution by combination with rat cultured marrow cells. *J. Biomed. Mater. Res.* **60** : 61-69, 2002.
- 20) **Hauschka, P. V. and Wians, F. H. Jr.** : Osteocalcin-hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone. *Anat. Rec.* **224** : 180-188, 1989.
- 21) **Hauschka, P. V. and Carr, S. A.** : Calcium dependent  $\alpha$ -helical structure in osteocalcin. *Biochemistry* **21** : 2538-2547, 1982.
- 22) **Hoang, Q. Q., Sicheri, F., Howard, A. J. and Yang D. S. C.** : Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature* **425** : 977-980, 2003.
- 23) **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.
- 24) **Haffa, A., Krueger, D., Bruner, J., Engelke, J., Gundberg, C., Akhter, M. and Binkley, N.** : Diet- or warfarin-induced vitamin K insufficiency elevates circulating under carboxylated osteocalcin without altering skeletal status in growing female rats. *J. Bone Miner. Res.* **15** : 872-878, 2000.
- 25) **Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J., Goldstan, S., Gundberg, C., Bradley, A. and Karsenty, G.** : Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* **382** : 448-452, 1996.
- 26) **Hunter, G. K., Hauschka, P. V., Poole, A. R., Rosenberg, L. C. and Goldberg, H. A.** : Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem. J.* **317** : 59-64, 1996.
- 27) **Chenu, C., Colucci, S., Grano, M., Zigrino, P., Barattolo, R., Zambonin, G., Baldini, N., Vergnaud, P., Delmas, P. D. and Zallone, A. Z.** : Osteocalcin induces chemotaxis, secretions of matrix proteins, and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoblast-like cells. *J. Cell. Biol.* **127** : 1149-1158, 1994.
- 28) **Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S. and Kishimoto, T.** : Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **89** : 755-764, 1997.
- 29) **Phillips, J. E., Gersbach, C. A., Wojtowicz, A. M. and Garcia, A. J.** : Glucocorticoid-induced osteogenesis is negatively regulated by *Runx2/Cbfa1* serine phosphorylation. *J. Cell. Sci.* **119** : 581-591, 2006.
- 30) **Ohgushi, H., Dohi, Y., Katsuda, T., Tamai, S., Tabata, S. and Suwa, Y.** : In vitro bone formation by rat marrow cell culture. *J. Biomed. Mater. Res.* **32** : 333-340, 1996.
- 31) **Dohi, Y., Shimaoka, H., Ikeuchi, M., Ohgushi, H., Yonemasu, K. and Minami, T.** : Role of metallothionein isoforms in bone formation processes in rat marrow mesenchymal stem cells in culture. *Biol. Trace Elem. Res.* **104** : 57-69, 2005.
- 32) **Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Bohringer, R. R. and de Crombrughe, B.** : The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* **108** : 17-29, 2002.
- 33) **Ducy, P., Starbuck, M., Priemel, M., Shen, J., Pinero, G., Goffroy, V., Amlimcng, M. and Karsenty, G.** : A *Cbfa1*-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev.* **13** : 1025-1036, 1999.
- 34) **Gowen, L. C., Petersen, D. N., Mansolf, A. M., Oi, H., Stock, J. L., Tkalcevic, G. T., Simmons, H. A., Crawford, D. T., Chidsey-Frink, K. L., Ke, H. Z., McNeish, J. D. and Brown, T. A.** : Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (*OF45*) results in increased bone

- formation and bone mass. *J. Biol. Chem.* **278** : 1998-2007, 2003.
- 35) **Dohi, Y., Nakajima, H., Ohgushi, H. and Yonemasu, K.** : Quantification of matrix protein mRNAs expression during mineralized tissue formation in rat marrow cell culture by a real time quantitative PCR method. In: *Key Engineering Materials*, Trans Tech Publications Ltd, Switzerland, 2001, Vols. 192-195, pp.367-372.
- 36) **Anderson, H. C.**: Matrix vesicles and calcification. *Curr. Rheumatol. Rep.* **5** : 222-226, 2003.
- 37) **Kihara, T., Hirose, M., Ohshima, A. and Ohgushi, H.** : Exogenous type I collagen facilitates osteogenic differentiation and acts as a substrate for mineralization of rat marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341** : 1029-1035, 2006.
- 38) **Hoshi, K., Kemmotsu, S., Takeuchi, Y., Amizuka, N. and Ozawa, H.** : The primary calcification in bones follows removal of decorin and fusion of collagen fibrils. *J. Bone Miner. Res.* **14** : 273-280, 1999.
- 39) **Mochida, Y., Duarte, W. R., Tanzawa, H., Paschalis, E. P. and Yamauchi, M.** : Decorin modulates matrix mineralization in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305** : 6-9, 2003.
- 40) **Kihara, T., Ohshima, A., Hirose, M. and Ohgushi, H.** : Three-dimensional visualization analysis of in vitro cultured bone fabricated by rat marrow mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316** : 943-948, 2004.
- 41) **Yoshikawa, T., Ohgushi, H. and Tamai, S.** : Immediate bone forming capacity of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.* **32** : 481-492, 1996.
- 42) **Maeda, M., Hirose, M., Ohgushi, H. and Kihara, T.** : In vitro mineralization by mesenchymal stem cells cultured on titanium scaffolds. *J. Biochem.* **141** : 729-736, 2007.
- 43) **Akahane, M., Nakamura, A., Ohgushi, H., Shigematsu, H., Dohi, Y. and Takakura, Y.** : Osteogenic matrix sheet -cell transplantation using osteoblastic cell sheet resulted in bone formation without scaffold at ectopic site-. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2** : 196-201, 2008.
- 44) **Urist, M. R., Huo, Y. K., Brownell, A. G., Hohl, W. M., Buyske, J., Lietze, A., Tempst, P., Humkapillar, M. and DeLange, R. J.** : Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **81** : 371-375, 1984.
- 45) **Urist, M. R.** : Bone morphogenetic protein: the molecularization of skeletal system development. *J. Bone Miner. Res.* **12** : 343-361, 1997.
- 46) **Hosoda, K., Kanzaki, S., Eguchi, H., Kiyoki, M., Yamaji, T., Koshihara, Y., Shiraki, M. and Seino, Y.** : Secretion of osteocalcin and its propeptide from human osteoblastic cells: differentiation of the secretory patterns of osteocalcin and its propeptide. *J. Bone Miner. Res.* **8** : 553-565, 1993.
- 47) **Theofan, G. and Price, P. A.** : Bone Gla proteins messenger ribonucleic acid is regulated by both 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate in rat osteosarcoma cells. *Mol. Endocrinol.* **3** : 36-43, 1989.
- 48) **Ferron, M., Hinol, E., Karsenty, G. and Ducy, P.** : Osteocalcin differentially regulates beta cells and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **105** : 5266-5270, 2008.