

骨リモデリングにおける骨芽細胞膜裏打ち構造の
寄与についての検討

課題番号 10671388

平成10年度～平成11年度

科学研究費補助金(基礎研究C-2)研究成果報告書



平成12年9月

研究代表者

堀越万理子

(東京女子医大 膠原病リウマチ痛風センター整形外科)



(平成10-11年 科学研究費、基礎研究 C-2)

骨リモデリングにおける骨芽細胞膜
裏打ち構造の寄与についての検討
—刺激分泌連関と細胞接着について—

(課題番号10671388)

目次

はしがき

I. 研究組織、経費

II. 研究の背景

III. 研究経過

IV. 研究結果

V. 今後の研究展開

VI. 文献

はしがき

骨は、重力に対してからだを支える硬組織としての役割とカルシウム代謝調節系として常にカルシウムを供給する役割の2つの大きな役割を担っている。

骨組織には、骨組織に埋まる骨細胞と、骨表面に存在する骨芽細胞、破骨細胞の3種類の細胞が存在する。骨は一度できてしまうと形を変えない静的な構造と思われがちだが、実際には、常に骨芽細胞、破骨細胞により骨形成と骨吸収を行い（骨のリモデリング）、そのバランスによって骨の形態を保っている。

最近、整形外科領域では、高齢化に伴う易骨折性や骨変形などの骨のリモデリングの低下によると考えられる疾患（骨粗鬆症など）が増加する傾向にあり、骨のリモデリング機構の解明が増々重要な課題となっている。

我々は、骨のリモデリング機構の解明の一環として、骨芽細胞が自ら分泌した骨基質中に埋め込まれて骨細胞に分化していく過程における細胞間および細胞基質間相互作用について、骨芽細胞膜に注目して研究をすすめている。

I. 研究組織、経費

1. 研究組織

研究代表者 堀越万理子（東京女子医大 講師）

研究分担者 高桑雄一（東京女子医大 教授）

井上和彦（東京女子医大 教授）

2. 研究経費

平成10年度 2400,000円

平成11年度 600,000円

II. 研究の背景

骨リモデリングは、骨芽細胞による骨形成と、破骨細胞による骨吸収のバランスによって行われる。このバランスの不均衡は種々の整形外科領域の疾患に至ると予想される。例えば、人工関節の緩みは、骨吸収の促進、老人性の骨粗鬆症は骨形成の減少によって引き起こされると考えられている。骨細胞は骨芽細胞が自ら分泌した骨基質中に埋め込まれたものであり、由来は骨芽細胞である。破骨細胞の分化・活性化には骨芽細胞系細胞との直接的な細胞間相互作用が必要であることから骨芽細胞が骨のリモデリングに中心的な役割を果たしていると考えられる。従って、骨芽細胞の膜には 1) 種々の細胞間および細胞・基質間接着機構が存在し、また 2) 種々の成長因子を分泌するための分泌機構、3) 骨細胞へ分化するための種々の情報受容機構が存在すると考えられているが、実体は殆ど明らかではない。

本研究では、骨芽細胞の機能を膜を中心に明らかにすることを目的として、1) 膜骨格 membrane skeleton について研究が進んでいる赤血球膜をモデルとして骨芽細胞膜に類似の膜骨格成分が存在するか否か、2) 赤血球膜で明らかにされた膜機能の調節機構が同様に存在するか否か、3) 接着、分泌、情報の受容等とこれら膜骨格の関与について生化学的および細胞生物学的検討を意図した。

まず、本研究の背景となった骨リモデリングと骨芽細胞について述べ、次に赤血球膜骨格 erythrocyte membrane skeleton と赤血球膜骨格の主要蛋白

質である 4.1 蛋白質 protein 4.1 について述べる。

A. 骨リモデリング

骨リモデリングは骨形成に関与する骨芽細胞と、骨吸収に関与する破骨細胞が連結して完成する。成熟した骨の細胞である骨芽細胞、骨細胞は局所の間葉系細胞から分化するが、破骨細胞は骨髄内の前駆細胞から分化する。分化した骨の細胞は、骨基質と共同して骨構造の創造、維持、リモデリングを行う。その結果生じた構造は、体内でその物理的、機械的及び代謝的な活動を骨として行う。ホルモンは骨内外で産生され、骨の細胞をその発育、分化期間を通じて統制し、機械的な刺激とともに、骨の細胞の機能である骨基質の合成、修復、除去を調節する。これが、骨代謝である。骨基質の合成、修復に関与するのが、骨芽細胞であり、除去に関与するのが破骨細胞である。骨芽細胞に分化する間葉系あるいは間質の前駆細胞を同定する方法はまだ解明されていないし、どのホルモンが刺激して骨芽細胞と、破骨細胞の機能の連結に関与しているのかもまだ不明である。

骨形成が必要とされると、骨表面に骨芽細胞前駆細胞が動員されその増殖が開始され、次に骨芽細胞前駆細胞は骨芽細胞の分化形質を獲得し、基質蛋白を活発に合成、分泌することにより骨基質を形成する。さらに、分化が進展し成熟した骨芽細胞により、形成された骨基質の石灰化がおこり骨形成が完了する (1)。この骨芽細胞の分化と機能発現はビタミンDや副甲状腺ホルモンなどの骨カルシウム代謝に関与する全身性因子によって制

御されるとともに、種々の成長因子やサイトカインなどの局所因子による調整も受けている。さらに、細胞外基質蛋白との接着により、細胞の分化や機能が制御されていることが明らかになりつつあり、骨芽細胞においてもその細胞外基質である骨基質との相互作用が、骨芽細胞の分化や機能の調整に重要な役割を果たしているものと考えられる (2)。細胞は細胞表面に発現する特異的な受容体を介して細胞外基質蛋白と接着する。この役割を果たす受容体は共通の構造を持っておりインテグリン integrin とよばれる。骨芽細胞によって作られる骨基質には、1型コラーゲン collagen、オステオカルシン osteocalcin、オステオネクチン osteonectin があるが、I型コラーゲンと $\alpha 2\beta 1$ インテグリンを介した骨芽細胞の接着は骨芽細胞の分化過程に必要であり、特に石灰化能の獲得過程に重要である (3-10)。骨芽細胞系細胞にはインテグリンの他にも多数の接着分子が発現している事が知られており、VCAM-1, ICAM-1, CD44、カドヘリン cadherin などがその代表である。VCAM-1 は、被刺激状態の血管内皮細胞に発現するとともに、骨髄間質細胞では恒常的に発現しており、この骨髄間質細胞から分化誘導された骨芽細胞にも発現が認められるが、骨芽細胞での役割は不明である。ICAM-1 は、Tリンパ球などと骨芽細胞との接着に関与して、骨芽細胞で IL-1, IL-6 などのサイトカインの合成が促進されることが報告されている (11)。CD44 は骨芽細胞系細胞や破骨細胞の基質との接着および機能の制御への関与が注目されている (12)。このように骨芽細胞と細胞外基質間の接着過程に骨芽細胞膜がどのように関与しているかはまだ未知の分野であり興味深い。その他、骨芽細胞によって産生される重要な調節因

子には、アルカリホスファターゼ alkaliphosphatase、コラゲナーゼ collagenase、コラゲナーゼインヒビター collagenase inhibitor、プラスミノージェンインヒビター plasminogen inhibitor、インターロイキン 1 interleukin 1、プロスタグランジン E2 prostaglandin E2 などがあり、これらの因子が複雑に絡み合って骨芽細胞の成長、分化および機能が調整されていると考えられている。

破骨細胞は単球やマクロファージへも分化する造血前駆細胞に起源を持ち、表面細胞の間隙や断裂部に誘引される。骨基質への付着部位では独特の波状縁 ruffled border が形成され、骨のミネラルと有機質が吸収されハウシップ窩 Howship lacunas を形成する。破骨細胞のみがこのような皮質骨を吸収する能力を持つ。この破骨細胞の骨吸収過程には骨細胞—破骨細胞の相互作用が必要で骨細胞内に破骨細胞活性抑制因子が存在するらしい (13)。この骨芽細胞の骨形成と破骨細胞の骨吸収の相対的な割合で骨量の不均衡が生じ骨機能障害が生じてくる。

B. 赤血球膜骨格 (図 1) (総説参照: 14 - 17)

ヒト赤血球は、骨髄で赤芽球が成熟し脱核したのち末梢循環に放出される。その形態は中窪円盤形 biconcave disk で、自分の径よりも細い毛細血管をくぐり抜けながら長期間 (120 日) にわたって体内を循環し続ける。その間、赤血球は絶えず伸展や屈曲などの機械的ストレス shear stress を受けるが、ちぎれることもなく (膜安定性 membrane stability)、形を変えて

(変形能 deformability) 狭い血管腔を通過し、大きな血管でストレスが去ると元の形態に戻る(形態の保持)。これらの重要な機能を保つために赤血球膜には堅牢かつ弾性に富む膜骨格構造が備わっている。

膜骨格は赤血球膜内側を裏打ちする網目状の構造で膜骨格蛋白質間相互の横方向のつながりと、これらをアンカー蛋白質を介して脂質二重層に結びつける縦方向のつながりによって機能的に構築されている。

横のつながりを構成するのは、スペクトリン spectrin、アクチン actin、4.1 蛋白質、アデューシン adducin、デマチン dematin (protein 4.9) といった周辺性蛋白質であり、縦方向のつながりにはバンド 3 band 3 やグリコフォリン C glycophorin C などの膜内在性(貫通性)蛋白質とアンキリン ankyrin、4.1 蛋白質などのアンカー蛋白質の他 4.2 蛋白質、p55 などが普遍的に関与する。これらの蛋白質の多くは赤血球以外の細胞にも認められる。また、スペクトリン、アンキリン、バンド 3、4.1 蛋白質等は構造の類似した異なる遺伝子産物である蛋白質とスーパーファミリーを形成しているものもある。

C. 4.1 蛋白質 (総説参照: 18)

赤血球の 4.1 蛋白質の基本的役割は、膜骨格構造の横のつながりではスペクトリンとアクチンの連結を促進すること、縦のつながりではグリコフォリン C との結合を介してスペクトリン-アクチンを膜脂質二重層に寄り添わせること、その際グリコフォリン C、p55 との三者複合体の形成を促進

すること (19) およびバンド 3 に結合してバンド 3 - アンキリン間の結合を調節すること (20) にある。

4.1 蛋白質の膜安定性における本質的な重要性は、この蛋白質を欠損する遺伝性楕円状赤血球症 (21) の赤血球膜安定性が著しく低下していること、そのゴーストに精製した 4.1 蛋白質を封入することにより膜安定性が回復し、機能的に正常な膜構造を再構成できることで実証された (22)。

4.1 蛋白質はキモトリプシン chymotrypsin 切断パターンに基づく 4 つのドメイン構造 (即ち N 末端側から 30kDa、16kDa、10kDa、ならびに 22/24kDa ドメイン) から成る (図 2)。30kDa ドメインは全体としてプラスに荷電しており、膜貫通蛋白質 (グリコフォリン C、バンド 3)、p55、カルモジュリン calmodulin および陰性荷電をもつリン脂質であるフォスファチジルセリン phosphatidylserine (PS) と結合する (23- 28)。10kDa ドメインは、スペクトリン・アクチンとの結合を直接担う部分である。カルモジュリンは 30kDa ドメインに結合し、 Ca^{2+} の結合により 10kDa ドメインを介する横のつながり (29) および 30kDa ドメインを介する縦のつながりの両者を抑制する (30)。一方、4.1 蛋白質のバンド 3 への結合・解離もカルモジュリン / Ca^{2+} によって調節される (30)。即ち、 Ca^{2+} 濃度が低く (10^{-7}M 以下) 維持されている状態ではカルモジュリンは 4.1 蛋白質の 30kDa ドメインに結合 ($\text{KD}=10^{-7}\text{M}$) しているが、なおバンド 3 に結合 ($\text{KD}=10^{-7}\text{M}$) している。しかし、 Ca^{2+} 濃度が上昇すると (10^{-6}M 以上) Ca^{2+} がカルモジュリンに結合し、30kDa ドメインの構造変化を引き起こし、バンド 3 との親和性が低下 ($\text{KD}=10^{-6}\text{M}$) する (31)。従って、 Ca^{2+}

がカルモジュリン - 4.1 蛋白質 - バンド3 を介して、バンド3 - アンキリンの結合を調節していると考えられる。この 4.1 蛋白質 - カルモジュリン / Ca^{2+} による調節は細胞接着分子である CD44 と 4.1 蛋白質の相互作用を介する CD44 - アンキリン間結合の調節にもみられる (31)。

4.1 蛋白質 (赤血球型 4.1R) には 2 種類のアイソフォームがある。成熟赤血球には 1 種類 (正確には C 末部の deamidation により上に示した 78 / 80 kDa の 2 種類) しか存在しないが、赤芽球や赤血球以外の細胞には N 末端部に延長領域をもつ高分子型 4.1R (135 kDa) が存在する (図 3) 他、遺伝子の異なるファミリー蛋白質である 4.1G、4.1B、4.1N も見いだされている。さらに、4.1 蛋白質の構造に類似したスーパーファミリー蛋白質として細胞骨格蛋白質であるエズリン ezrin、ラディキシン radixin、モエシン moesin、タリン talin、シナプシン I α synapsin I α などがある。

III. 研究方法

1 材料

以下の細胞、試薬、器具を購入した。

アフィニティーカラム (Affigel 10、 BIO-RAD)、

マウス骨芽細胞 (MC3T3-E1: 理研ジーンバンク)、正常ヒト骨芽細胞

(Cryo NHOst: 三光純薬)、培養ボトル (Nalge Nunc International)、

チャンバースライド (Lab-Tek Chamber Slide 8 well: Nalge Nunc

Inter-national)、HRP標識抗家兎IgG (Daco 社)、逆転写酵素 (Super

Script II RT: Life Technologies)、ヒトおよびマウス抗 CD44 抗体

(Biongenesis 社)、ビオチン化二次抗体 (ビオチン化抗家兎IgG、

Vector 社)、ABC 試薬 (avidin-biotin-peroxidase complex、 Vector 社)、

DAB 試薬 (diamino-bentigin、 Sigma 社)

2 抗体の作製

4.1 蛋白質に対する抗体は、ヒト赤血球より精製した 4.1 蛋白質を家兎に免疫して得られた抗血清をさらにアフィニティー精製して作成した (22)。

3 細胞培養

マウス骨芽細胞を10%ウシ胎児血清加 DMEM にて培養ボトルを用いて継代培養した。培養細胞は 1) 免疫染色用、 2) RNA 抽出用、 3) 蛋白質分

析用に試料調整を行った。

1) 免疫染色用にはチャンバースライドを使用し、スライド上に細胞培養を施行した。2) RNA 抽出用、3) 蛋白質分析用には継代培養で増殖させた骨芽細胞を用いた。

さらにこの研究では 1999 年より正常ヒト骨芽細胞 Cryo NHOst が使用できるようになったため、ヒト骨芽細胞でも同様の検討を開始した。

4 蛋白質の分析

25 cm²の培養ボトル上の培養細胞を10% TCA で 30 分固定した後、セルスクレーパーで細胞を回収した。細胞をチューブに入れ、さらに10% TCA で洗淨（遠心15000xg, 5 min）した。細胞を 9 M Urea-2% Triton X-100-1% dithiothreitol (DTT) 100 ml に懸濁し、DNA を破壊する目的で超音波処理をおこなった。SDS と DTT を含むサンプル処理液を添加後 100 °C、5 分間加熱し、SDS-PAGE (7.5%) を行い、CBB 染色、一方、PVDF 膜に転写し、イムノブロット Immunoblot 法にて各バンドを同定した。即ち、一次抗体として 4.1 蛋白質、CD44 に対する家兎の IgG を反応させ、二次抗体はビオチン化 IgG を使用して ABC 試薬にて検出した。

5 膜蛋白質遺伝子発現の解析

RT-PCR 法を応用して、培養細胞における 4.1 蛋白質と接着蛋白質 CD44 の発現について検討するために、マウス 4.1 蛋白質の全長135kDa ペプチド

に相当する 209bp に対するプライマー、およびヒト CD44 の全長ペプチドに相当する 461bp に対するプライマーを設計した。

これらを用いて、骨芽細胞より全 mRNA を抽出した後、逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。さらに Taq DNA polymerase を用いて増幅し RT-PCR を施行した。

設計したプライマーを以下に示す。

表1. Primer sequences and polymerase chain reaction conditions for CD44 and protein 4.1

| mRNA species | primer |
|-------------------|---|
| human CD44 | 5'primer 5'-ATGGACAAGTTTTGGTGGCAGCACGCAGCC |
| | 3'primer 5'-GCGGGTGCCATCACGGTTAACAATAGTTATGG |
| human protein 4.1 | 5'primer 5'-GGGCCGAGGACTTCGGTCTGCCGAATCGACAGC |
| | 3'primer 5'-AAAGGATCAATGAGATCTAGAAGAAT |
| mouse protein 4.1 | 5'primer 5'-CAAAACAGACCCATCTTTGGATCTTCATTC |
| | 3'primer 5'-CGACGACTCAGGTGTXGGXTTXAGG |

6 免疫染色

チャンバースライドを用いて培養した骨芽細胞を アセトンで固定し、0.5% Triton X-100 で10分間処理（膜脂質の可溶化）した後、2%ヤギ血清を用いてブロッキングした。一次抗体として前述の 4.1 蛋白質、CD44 に対する家兎 IgG を反応させ、4.1 蛋白質に対しては HRP 標識抗家兎 IgG を用いて 4-クロロ-1ナフトールによる青色に染色し、一方、CD44 に対してはビオチン化抗家兎 IgG を滴下後、ABC 試薬を加え、DAB を用いて茶色に染色した。これらを光学顕微鏡で観察した。即ち、二重染色により両者の共存部は濃い茶色に染色されることになる。

IV. 研究結果

1 膜骨格の存在と膜蛋白質の分析

骨芽細胞に赤血球膜骨格と同様の膜骨格構造が存在するか否かを検討するために培養骨芽細胞を構成する蛋白質の分析を行った。今回は特に、赤血球膜機能の維持に重要な 4.1 蛋白質と接着分子である CD44 に着目し それらの存在と分布を調べた。

SDS-PAGE (図 4) に示すように、赤血球膜にはスペクトリン、アンキリン、バンド 3、4.1 蛋白質、アクチンなどが存在する。4.1 蛋白質はバンド 3 の陽極側に泳動され、78 および 80 kDa に相当する 2 本のバンドとして認められる。抗 4.1 蛋白質抗体を用いたイムノブロット法の結果、マウス骨芽細胞にも抗 4.1 蛋白質抗体に反応するバンドが検出され、その分子量は 135 kDa であった。これは赤芽球などに認められる高分子型 4.1 蛋白質であると考えられた。

2 膜蛋白質遺伝子発現の解析

高分子型 4.1 蛋白質の発現を RT-PCR 法を用いて検討した。

図 5 に示す様にマウス骨芽細胞には 135 kDa の 4.1 蛋白質に相当する 692 bp のバンドが見い出された。同様にして接着分子 CD44 についても検討したところ、501 bp のバンドが出現した。研究当初はヒト骨芽細胞の入手が不可能であったため、マウスを対象に進めていたが、後にヒト骨芽細胞の

培養系が確立されたことから、後半はヒト骨芽細胞の培養系を用いて同様の検討を行った。

ヒト骨芽細胞のRT-PCR解析の結果（図6）、4.1蛋白質に相当する389 bpのバンドおよびCD44に相当する457 bpのバンドが見られた。マウスの場合に比べて両者より短い遺伝子にコードされていた。

3 免疫染色

これらの蛋白質が実際に細胞に存在することを光学顕微鏡を用いた免疫染色法により観察した。マウス骨芽細胞（図7、8）とヒト骨芽細胞（図9、10）の結果を示す。4.1蛋白質は、骨芽細胞の細胞質と細胞膜に広範に分布し（図7、9）、CD44との二重染色の結果から細胞膜部分には両者が共存することが明らかとなった（図8、10）。これらの結果は、マウスとヒトの骨芽細胞に同様に認められた。

V. 考察および今後の展開

細胞膜を裏打ちする膜骨格の構造と機能についての研究は、純粋な細胞膜系（ゴースト）およびその反転膜小胞が得られる赤血球膜を用いて主に進められてきた。図1の主要構成蛋白質（スペクトリン、アンキリン、4.1蛋白質など）はすでに精製方法が確立されており、精製蛋白質を抗原として得られた特異抗体を用いて赤血球以外の細胞における類似蛋白質の検索が行われている。これまでに高桑らは清水ら（北海道大学医学部皮膚科学）との共同研究でイムノブロット法、免疫染色法を用いて皮膚角化細胞にスペクトリン、アンキリン、4.1蛋白質などの類似蛋白質が存在すること（32-34）、正常皮膚組織では細胞膜に沿って分布していること、細胞接着に伴って細胞質から細胞膜に移行すること（35,36）、乾癬においては分子量の小さなアイソフォームが出現すること（37）などを明らかにした。さらに、神田、時光、川島ら（東京女子医科大学皮膚科学）との共同研究で皮膚角化細胞の接着分子CD44と4.1蛋白質が30kDaドメインを介して結合しCD44-アンキリン間の結合を抑制すること、Ca²⁺/カルモデュリンにより4.1蛋白質がCD44から遊離することなどを明らかにし、アンキリン-CD44を介する細胞表面でのCD44-ヒアルロン酸結合の調節の可能性を示唆した（31,38,39）（図11）。また、肥満細胞において、顆粒膜に4.1蛋白質の類似蛋白質を見出し、4.1蛋白質がヒスタミン分泌に伴う顆粒膜と細胞膜の融合を抑制すること、Ca²⁺/カルモデュリンにより4.1蛋白質が顆

粒膜から遊離しヒスタミン分泌を可能にすることを明らかにした（論文作成中）。これらの知見は、細胞接着や分泌を営む骨芽細胞においても膜骨格がこれらの機能調節に重要な役割を果たしている可能性を抱かせる。しかし、これまでにこれらの蛋白質の存在についてすら報告は見られない。

従って、本研究では、まず骨芽細胞における膜骨格の要となる 4.1 蛋白質の存在と分布について検討することとし、ほぼその目的は達した。

4.1 蛋白質には 80kDa と 135kDa（高分子型）がある。マウス骨芽細胞に存在する 4.1 蛋白質は 135kDa を示し、N 末端側に 209 個のアミノ酸からなるペプチドが結合した高分子型であると考えられる。赤血球の 4.1 蛋白質遺伝子には二つの翻訳開始点があり、上流（AUG-1）から翻訳されると高分子型となり、下流（AUG-2）からでは 80kDa となる（図 3）。この翻訳開始点の選択機序、延長部分の機能については不明であり、赤芽球、皮膚角化細胞、骨芽細胞などの両者が発現している細胞を用いた研究から明らかにされるものと思われる。RT-PCR 法による検索ではマウス骨芽細胞には 692 bp の 4.1 蛋白質 mRNA が発現していた。この塩基数は 135kDa 蛋白質に相当する mRNA よりやや少なく、alternative splicing が起きている可能性も考えられた。実際、赤芽球などでは、135kDa、80kDa のいずれにも様々な長さの mRNA が見られる。

一方、ヒト骨芽細胞の RT-PCR の結果からは 80kDa の 4.1 蛋白質に相当する 389 bp のバンドが見られた。今後蛋白質のアミノ酸シーケンス分析などを行う予定である。マウスとヒトの種による発現の違いは翻訳開始の選択のメカニズムの検討の上からも大変興味深い。

骨芽細胞内の 4.1 蛋白質の局在については、マウスもヒトも細胞質と細胞膜の両者に分布していた。細胞質の 4.1 蛋白質は皮膚角化細胞で見られるように、細胞接着などにより細胞膜に移行する可能性もある。今後、細胞接着、ホルモン・サイトカインなどによる刺激に伴う分布の変化について検討する予定である。

CD44 については、RT-PCR の結果、ヒトでは 457 bp、マウスでは 501 bp とほぼ同様の大きさのバンドが認められた。抗 4.1 蛋白質抗体と抗 CD44 抗体を用いた二重免疫染色の結果から細胞膜部分では両者の共存を示す濃い染色部分が認められ、すでに皮膚角化細胞で認められている両者の相互作用を予想させる。即ち、何らかの刺激により細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した場合、 Ca^{2+} /カルモジュリンが 4.1 蛋白質を CD44 から遊離させ、CD44-アンキリン間の結合を引き起こし、その結果細胞表面で CD44-ヒアルロン酸などの細胞-基質間接着を促進する可能性を検討する価値があると思われる。

今回の研究で膜骨格ネットワークの要である 4.1 蛋白質が骨芽細胞に存在し、細胞膜に沿って細胞接着分子である CD44 と共存していることを見出したが、今後は、この 4.1 蛋白質の骨形成に関わる細胞間および細胞基質間接着、刺激分泌連関における寄与について検討したいと考えている。

謝辞

本研究の推進および本報告の作成にあたり、御助言・御協力頂いた東京女子医科大学生化学講座・萬野純恵講師に感謝致します。

VI. 文献

- 1) Stein,G.&Lian,J.B.: Endocr.Rev.,14:424-442,1993
- 2)Takeuchi,Y. et al.: J.Biol.Chem.,271:3938-3944,1996
- 3) Clark, E.A. & Brugger, J.S.: Science, 268: 233-239
- 4) Rouslahti, E.: J.Clin.Invest., 87:1-5,1991
- 5) Young, M.F. et al.: Clin.Orthop., 281:275-294,1992
- 6) Staatz, W.D. et al.: J.Biol.Chem.,266:7365-7367,1991
- 7) Harris,S.E. et al.: J.Bone Miner Res., 9: 855-863,1994
- 8) Franceschi, R. et al.: J.Bone Miner Res.,9:843-854,1994
- 9) Riikonen,T. et al.: J.Biol.Chem.,270:376-382,1995
- 10) Riikonen, T. et al.: J.Biol. Chem., 270:13548-13552,1995
- 11) Tanaka,Y. et al.: J.Bone Miner Res., 10:1462-1469,1995
- 12) Nakamura,H. et al.: Cell Tissue Res., 280:225-233,1995
- 13) Maejima, A. et al.: J.Bone Miner. Res.,10:S222, 1995
- 14) 高桑雄一 : 赤血球 (三輪史朗監、高桑他編)、医学書院、81-92、1998
- 15) 高桑雄一 : 日本臨床、54, 2-5, 1996
- 16) 高桑雄一他 : 日本臨床 : 54, 43-49, 1996
- 17) 高桑雄一 : 血液病学 (三輪史朗他編)、文光堂、147-159、1996.
- 18) Takakuwa,Y.: Int. J. Hematol.,2000 in press
- 19) Nunomura,W.,Takakuwa,Y.: J.Biol. Chem., 275:24540-24546, 2000

- 20) An, X-L., Takakuwa, Y. et al.: *J. Biol. Chem.*, 271:33187-33191, 1996
- 21) 高桑雄一他 : 遺伝子病マニュアル (上) 、中山書店、 360-361, 1995
- 22) Takakuwa, Y. et al.: *J. Clin. Invest.*, 78:80-85, 1986
- 23) Alloisio, N. et al.: *Blood*, 65:46-51, 1985
- 24) Pasternack, GR. et al.: *J. Biol. Chem.*, 260:3676-3683, 1985
- 25) Alloisio, N. et al.: *Blood*, 82:1323-1327, 1993
- 26) Reid, ME., Takakuwa, Y. et al.: *Prog. Clin. Biol. Res.*, 319:553-571, 1989
- 27) Marfatia, SM. et al.: *J. Biol. Chem.*, 270:715-719, 1995
- 28) Takakuwa, Y.: *Biophys. Chem.*, 82:149-155, 1999
- 29) Takakuwa, Y. et al.: *J. Clin. Invest.*, 82:394-400, 1988
- 30) Nunomura, W., Takakuwa, Y. et al.: *J. Biol. Chem.*, 275:6360-6367, 2000
- 31) Nunomura, W., Takakuwa, Y. et al.: *J. Biol. Chem.*, 272:30322-30328, 1997
- 32) Shimizu, T., Takakuwa, Y. et al.: *Arch. Dermatol. Res.*, 282:274-277, 1990
- 33) Shimizu, T., Takakuwa, Y. et al.: *Arch. Dermatol. Res.*, 288:19-23, 1996
- 34) Shimizu, T., Takakuwa, Y. et al.: *Histol Histopathol*, 11:495-501, 1996
- 35) Shimizu, T., Takakuwa, Y. et al.: *Histochemistry*, 95:549-554, 1991
- 36) Shimizu, T., Takakuwa, Y. et al.: *Biol. Cell*, 86:19-26, 1996
- 37) Shimizu, T., Takakuwa, Y. et al.: *Histochem. Cell Biol.*, 103:363-368, 1995
- 38) 神田憲子他 : 日皮会誌、 105:691-697, 1995
- 39) 時光玲子他 : 日皮会誌、 107:437-442, 1997

Fig 1. Erythroid membrane skeleton

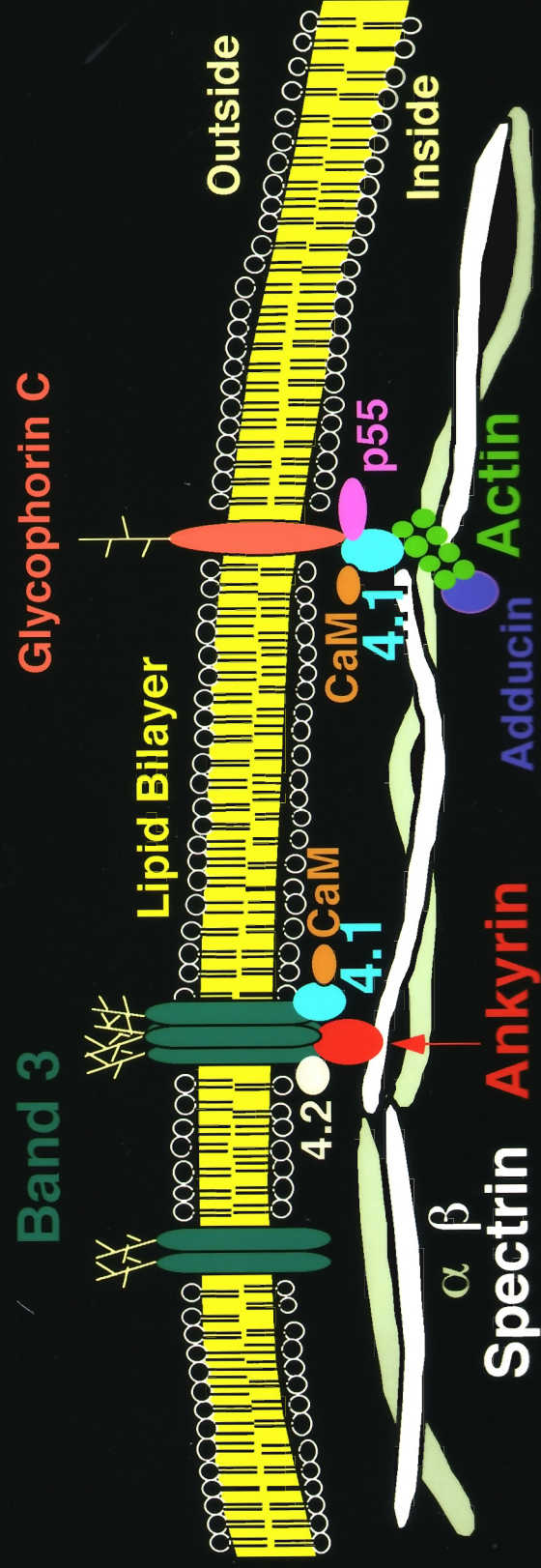


Fig 2. Erythroid membrane protein 4.1

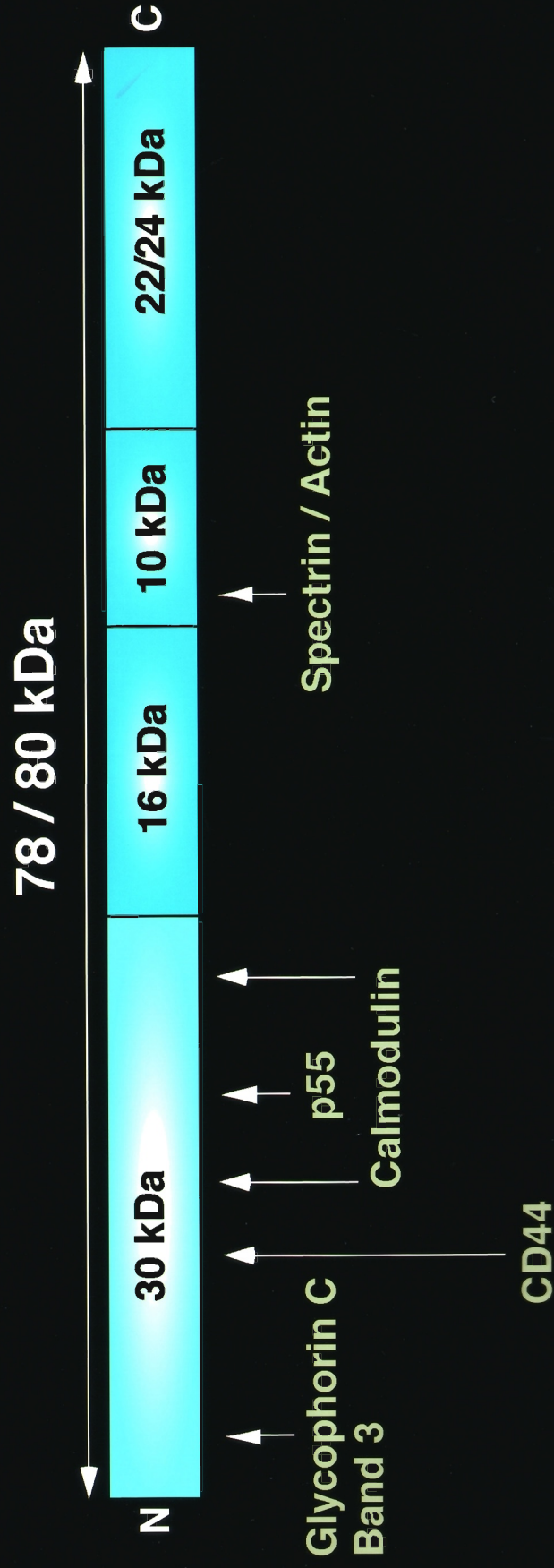
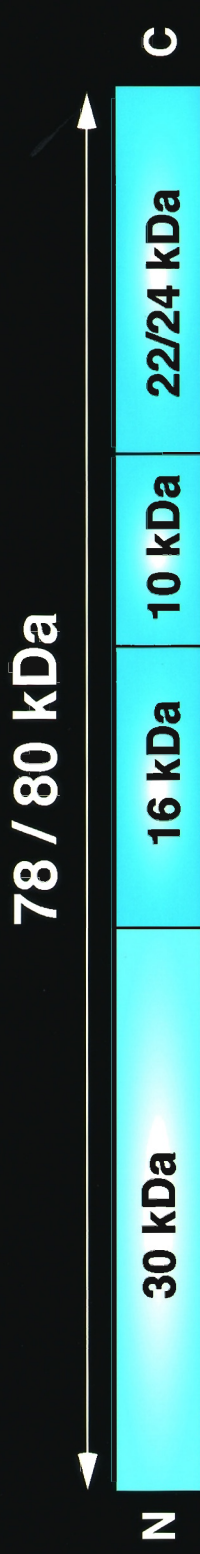


Fig 3. Two types of protein 4.1

Mature erythrocyte



Erythroblast / osteoblast ?



Fig 4. SDS-PAGE & Immunoblot

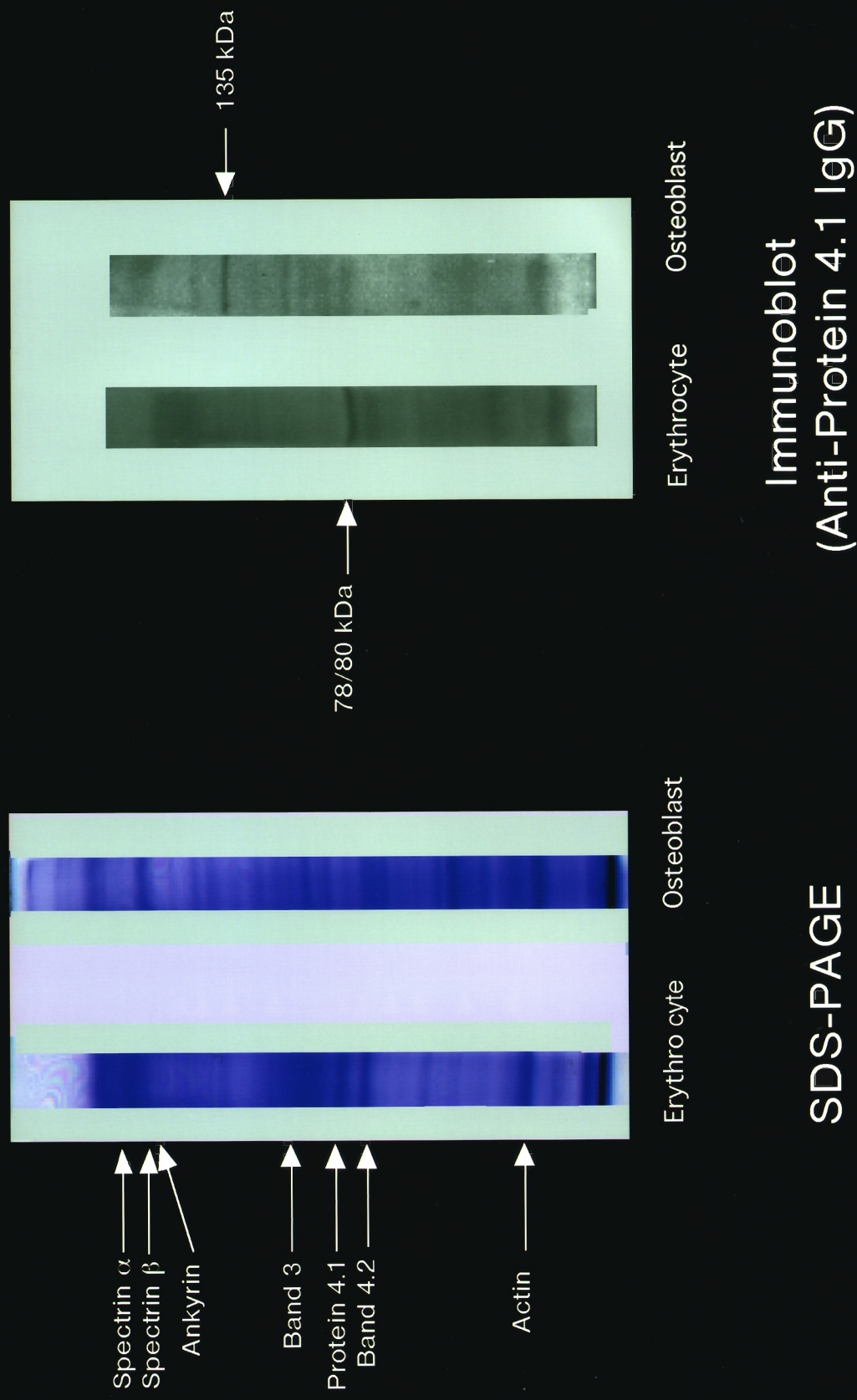


Fig 5. RT-PCR (mouse)

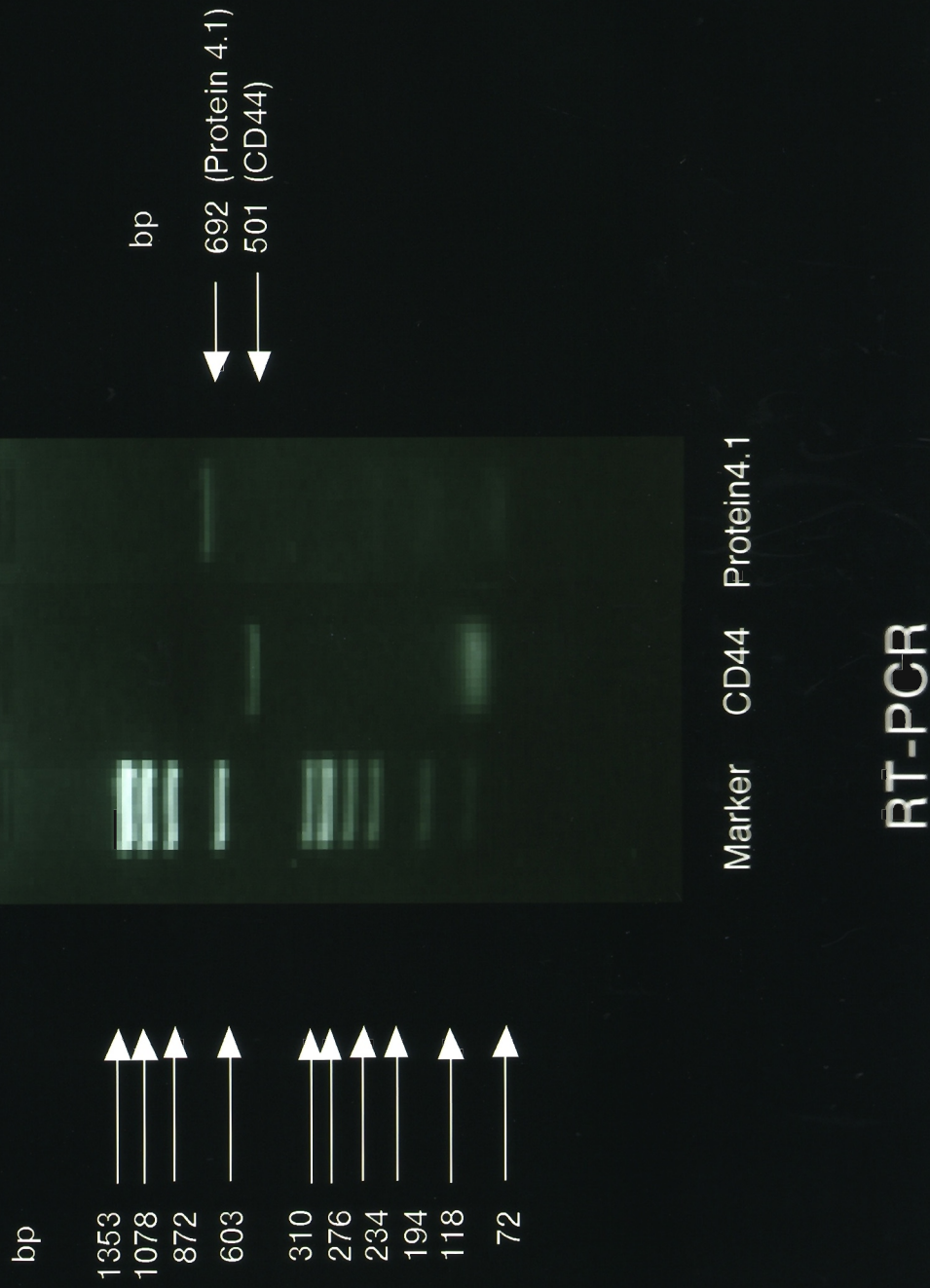
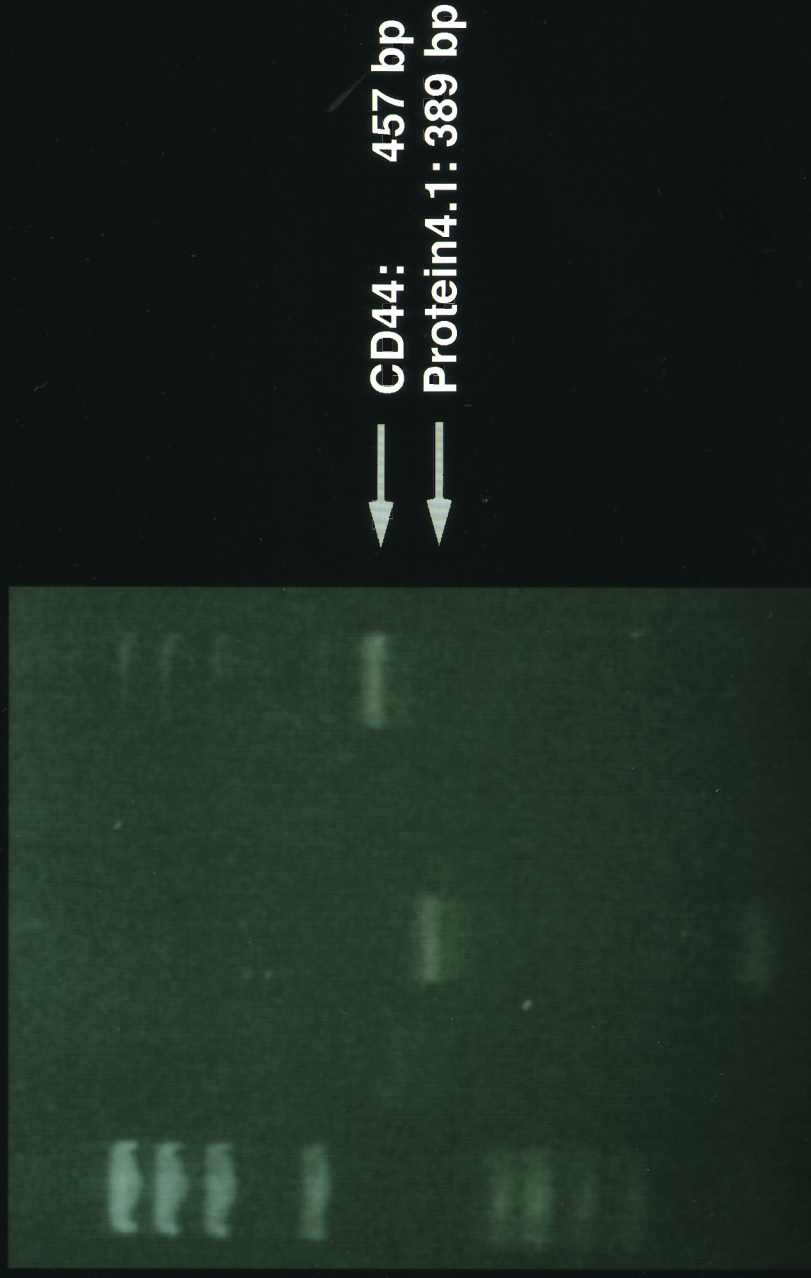
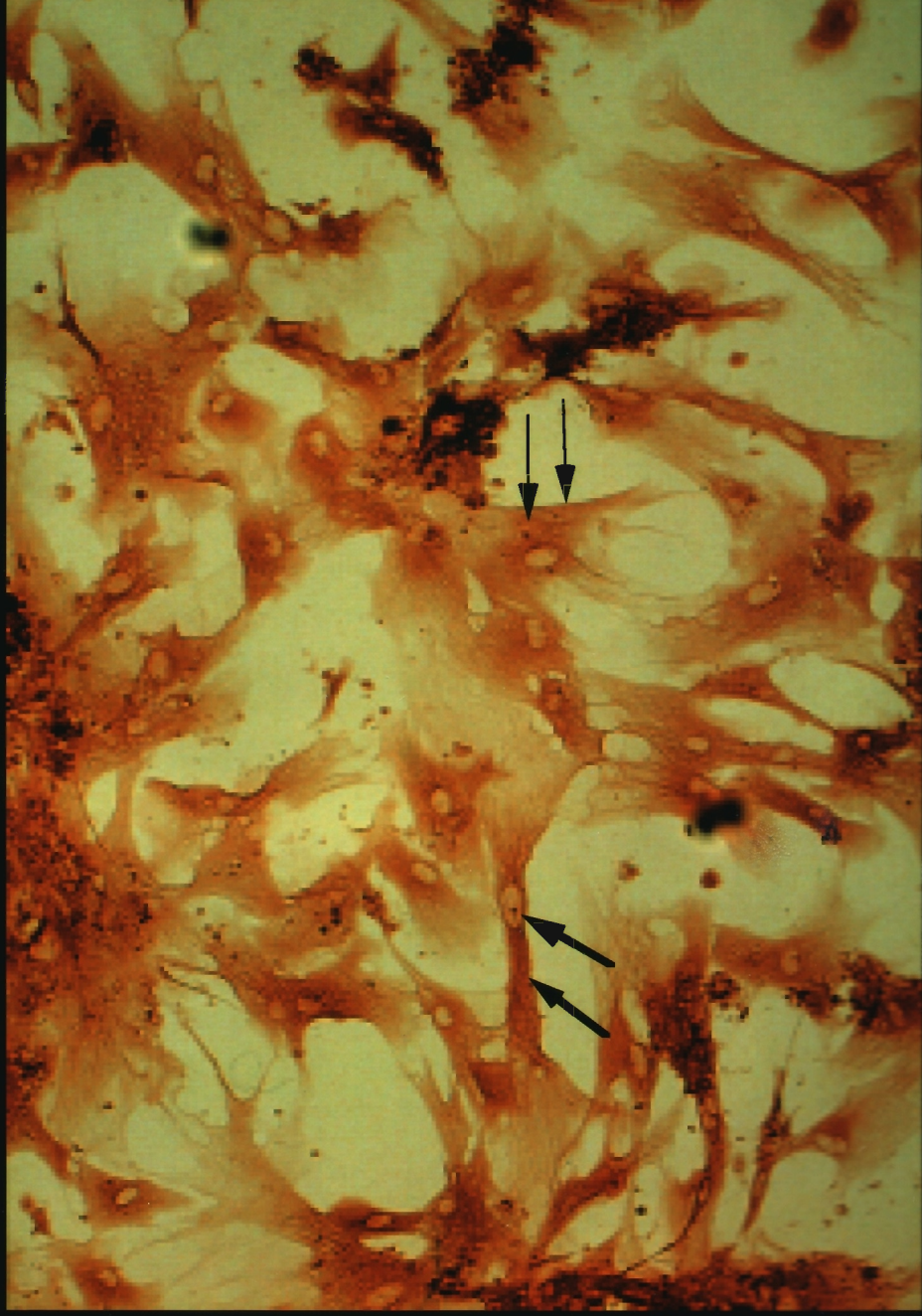


Fig 6. RT-PCR (human)

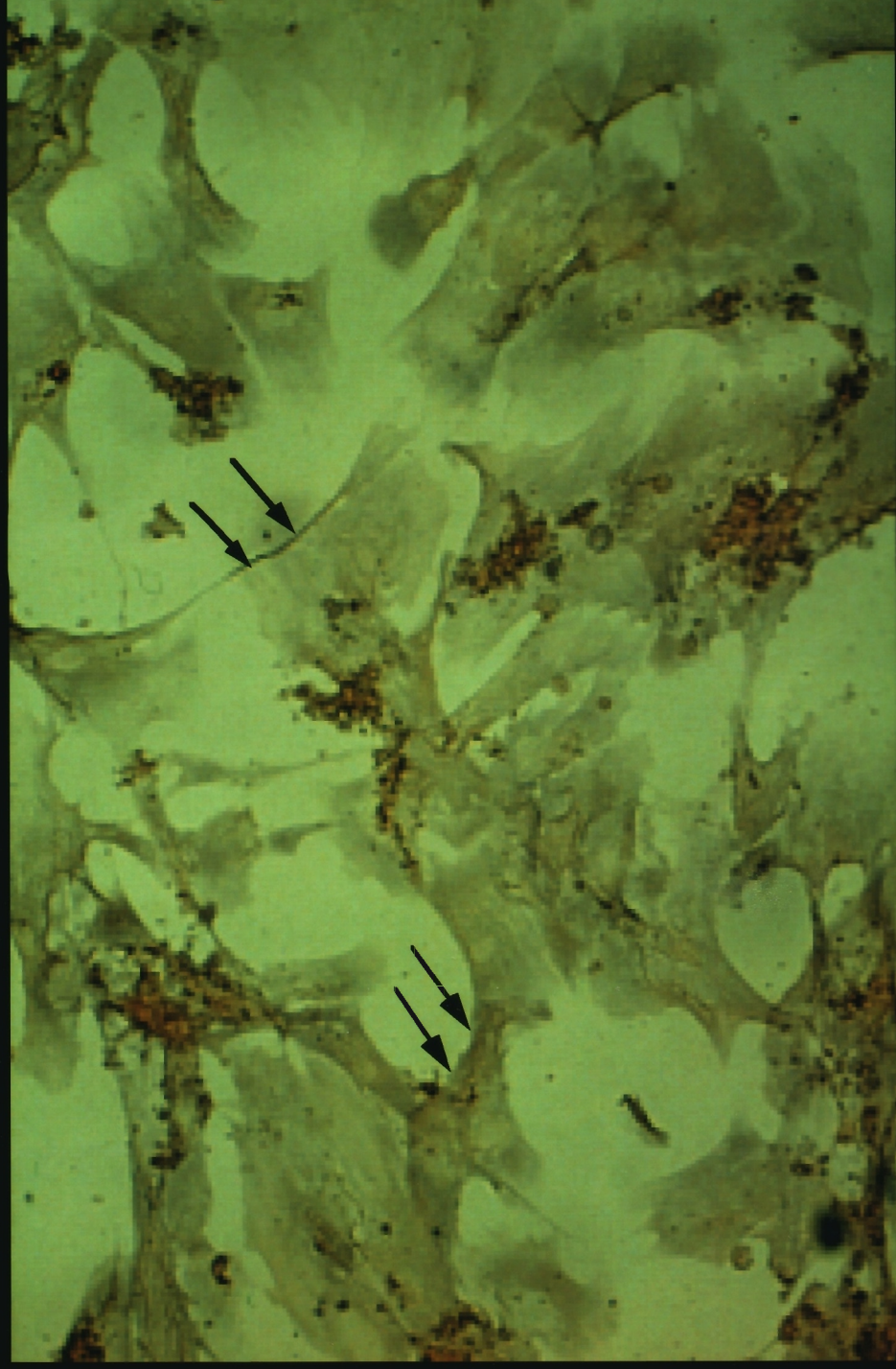


**Fig 7. Immunostain of protein 4.1
(mouse osteoblast)**



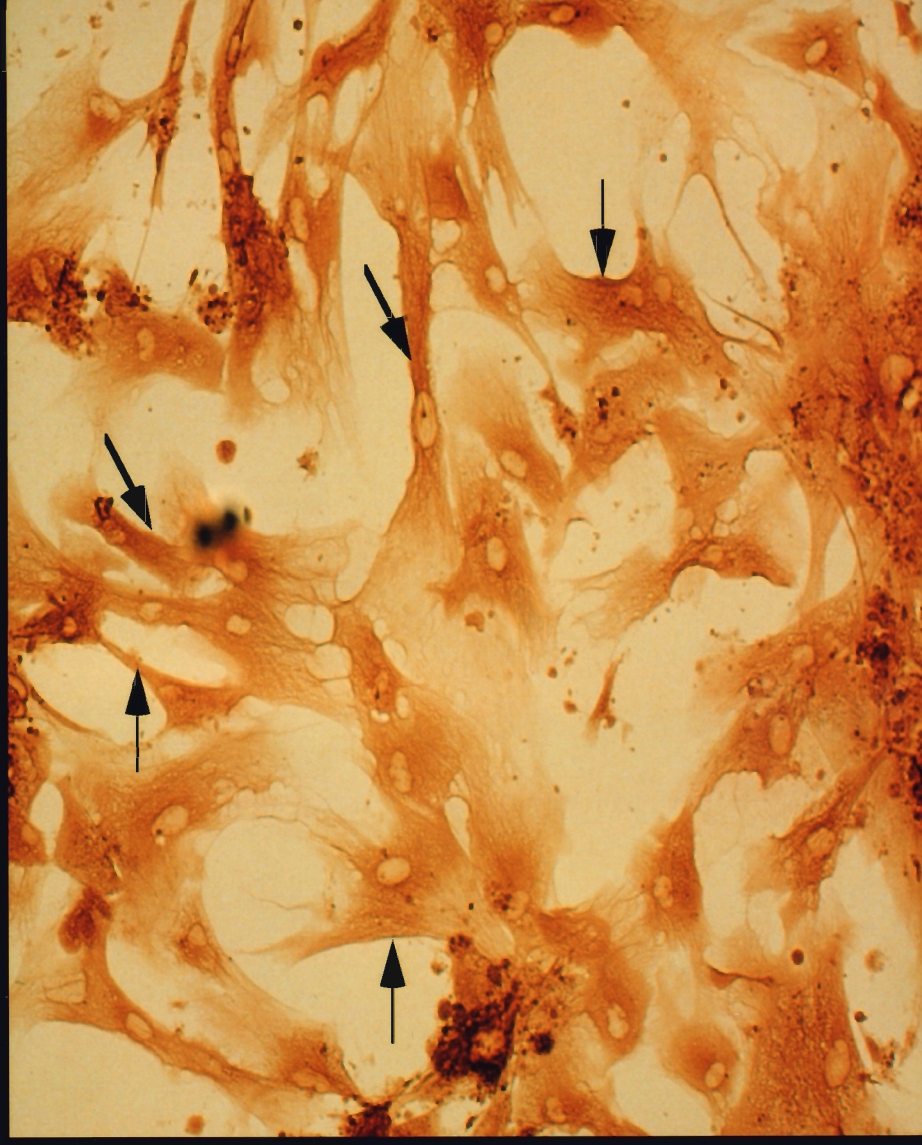
single stain

**Fig 8. Double immunostain of protein 4.1 & CD44
(mouse osteoblast)**



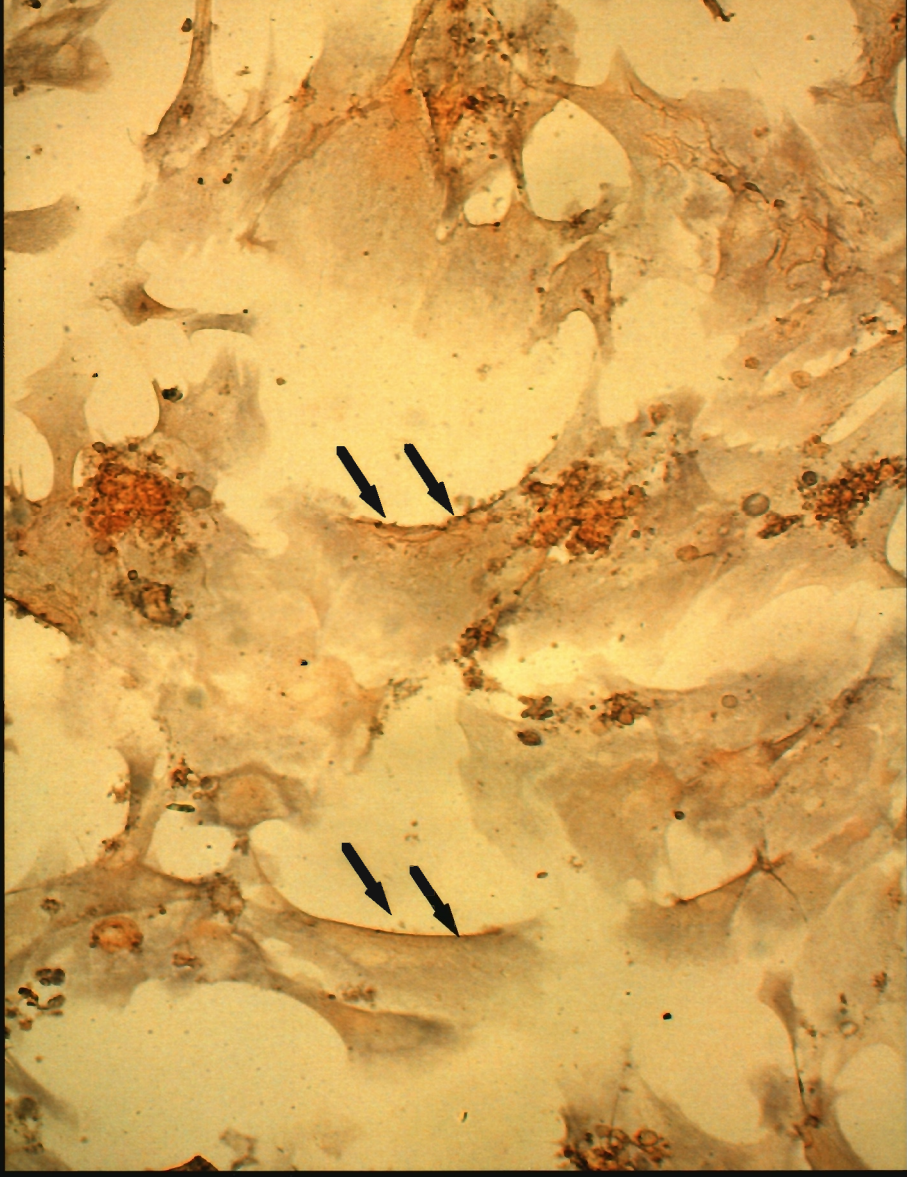
double stain

**Fig 9. Immunostain of protein 4.1
(human osteoblast)**



Protein 4.1 single stain

**Fig 10. Double immunostain of protein 4.1 & CD44
(human osteoblast)**



Protein 4.1 & CD44 double stain

Fig 11. Translation of hyaluronic acid in keratinocyte

