

コレステロール合成阻害剤(スタチン) による骨芽細胞分化制御に関する研究

前田豊信

Study on Regulation of Osteoblastic Differentiation by an Inhibitor of Cholesterol Synthesis (Statin).

Toyonobu MAEDA

The cholesterol-lowering drugs statins, including simvastatin, cerivastatin and atorvastatin, are pro-drug of a potent 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors and inhibit cholesterol synthesis in humans and animals. Simvastatin at 10^{-7} M markedly increased mRNA expression of BMP-2, VEGF, alkaline phosphatase, type I collagen, bone sialoprotein, and osteocalcin (OCN) in MC3T3-E1 cells, and clearly suppressed gene expression of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-13. Extracellular accumulation of proteins such as VEGF, OCN, collagenase-digestive proteins, and noncollagenous proteins, was elevated in MC3T3-E1 cells treated with 10^{-7} M simvastatin, and 10^{-8} M cerivastatin. MC3T3-E1 cells stimulated mineralization by treatment of statins, and pretreating these cells with mevalonate, or geranylgeranyl pyrophosphate, mevalonate metabolite, abolished statin induced mineralization. The results indicated that statins stimulate osteoblast differentiation *in vitro*, and suggest that statins will become useful drugs for the treatment of osteoporosis in the future.

Key words : statins, osteoblast, differentiation, mineralization

緒 言

スタチンは1977年に我が国で開発された、3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA)還元酵素阻害剤であり¹⁾、現在は高脂血症治療薬の第一選択薬として認められている²⁾。スタチンはHMG-CoAからメバロン酸への合成をブロックする。そして、メバロン酸からファルネシルピロリン酸やゲラニルゲラニルピロリン酸(GGPP)等のイソプレノイドの合成を介し

た、一連のメバロン酸カスケードが抑制を受けF³⁾。この抑制により細胞内ステロール含量が減少し、負のフィードバック抑制機構が起こり、低比重リポ蛋白(LDL)受容体やステロール関連遺伝子の発現増加⁴⁾、あるいは転写抑制蛋白である Sterol Regulatory Element Binding Protein : SREBP⁵⁾の発現調節が起こる。その結果、血流からのLDL粒子の異化速度が増加し、血清LDLコレステロール値を強力に降下させる⁶⁾。このため、スタチンは、主にII a、II b型高脂血症⁷⁾や、低

受付：平成15年12月15日，受理：平成16年1月15日
奥羽大学大学院歯学研究科口腔生化学専攻
(指導：堀内 登教授)

Ohu University Graduate School of Dentistry, Oral
Biochemistry Major
(Director : Prof. Noboru HORIUCHI)

HDL血症,あるいはⅢ型高脂血症⁸⁾の治療に用いられている。

現在スタチンは,第一世代(天然型)であるプラバスタチン,シンバスタチン,第二世代(半合成)としてフルバスタチン,第三世代(完全合成)ではアトルバスタチン等が臨床で広く用いられている。さらに現在,臨床試験,あるいは開発中であるピタバスタチン⁹⁾,ロバスタチンがある。これら多様なスタチンが開発されており,最新のスタチンは従来のものに比べ,コレステロール低下作用が強いだけでなく,トリグリセリド低下作用をもつ画期的なものまである¹⁰⁾。

一方,最近の研究ではスタチンが,コレステロール低下作用以外の生物学的効果があることが分かっていた¹¹⁾。これはスタチンのpleiotropic effectといわれ,細胞増殖¹²⁾,細胞周期の制御¹³⁾,腫瘍細胞におけるアポトーシス促進¹⁴⁾,血管内皮機能改善¹⁵⁾,抗酸化作用¹⁶⁾,免疫抑制作用¹⁷⁾,アルツハイマーの予防¹⁸⁾など多岐にわたる。

以前に筆者ら¹⁹⁾は,シンバスタチンに著しい骨形成能があり,さらに,水溶性スタチンであるプラバスタチンには骨形成能がないことを報告した²⁰⁾が,依然として詳細な作用機構については分かっていない。

そこで,本研究では脂溶性スタチンであるシンバスタチンの骨芽細胞分化制御を調べる目的で,マウスの骨芽細胞株であるMC3T3-E1細胞を用い,骨マーカーの変動を詳細に調べた。さらに,この作用がシンバスタチンにおいての特異的な作用でないことを確認するために,セリバスタチン,アトルバスタチンを用いた解析も行った。

材料と方法

1. 細胞培養

MC3T3-E1細胞を60mm dish (Becton Dickinson, USA)あるいは,24wellプレート (Becton Dickinson)を用いて10%ウシ胎児血清(FBS)を含むAlpha Modification of Eagle's Medium (α -MEM)培地(ICN, USA)で培養した。コンフルエントに達した後に10%FBSを含む α -MEM培地に50 μ g/mlのアスコルビン酸(Wako, Japan)と10mMの β -グリセロリン酸(Wako)を添加した

分化培地に変えた。さらにスタチンとして,シンバスタチン(Calbiochem, CA),セリバスタチン(Takeda, Japan),アトルバスタチン(Yamanouchi, Japan),あるいはメバロン酸の代謝産物である1mMのメバロン酸(Sigma, USA)や20 μ MのGGPP(Sigma)を加え²¹⁾,48時間おきに培地交換をし,ハーベストした。

2. 石灰化の測定

24wellプレートで1~24日間培養したMC3T3-E1細胞は培養液を捨て,Dulbecco'sリン酸バッファー(PBS)で一度洗浄し,冷えた70%エタノールを入れ,1時間固定後,滅菌水で3回洗浄を行った。そして40mM アリザリンレッド-S(pH4.2)で染色し,滅菌水で3回,PBSで2回洗い乾燥させた。これにより赤く染色された所を,石灰化部位とした。これを10%セチルピリジニウムクロライド(CPC),10mM リン酸緩衝液(pH7.0)に溶出させ,波長562nmで吸光度を測定することにより定量した¹⁹⁾。

3. ノーザンブロット法によるmRNAの定量

1) ノーザンブロット・サザンブロットのためのcDNAのクローニング

MC3T3-E1細胞,あるいはBL/6Jマウスの骨からtotal RNAを抽出し,それをテンプレートとして,RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)をGeneAmp RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems, USA)により行った。この際の,PCRプライマーは<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>のnucleotideデータベースをもとに,GENETYX-MAC Ver.10.1(GENETYX, Japan)を用いてPCRプライマー検索を行い,配列を決定した。オリゴヌクレオチドプライマーは(PROLIGO, Japan)に作成を依頼した(表1)。RT-PCR反応の生成物を1.2% SeaKem GTGアガロースゲル(Takara, Japan)で電気泳動し,目的の断片を切り出して,GENCLEAN(BIO 101, USA)で精製した。これをマルチクローニングサイトをもつ,pGEM-T Easy Vector(Promega, USA)にライゲーション反応し,これを用いて,E. coli JM109株のコンピテントセル(Takara)を形質転換を行い,LB(Luria-Bertani)寒天培地上で37 $^{\circ}$ Cで18時間培養した。培地上

表1 RT-PCRのための特異的ヌクレオチドプライマーの塩基配列

		sequence 5'→3'	増幅断片長
BMP-2	sens antisens	CCAAGACACAGTTCCTACA CACGGCTTCTAGTTGATGGA	562bp
BMP-4	sens antisens	AGTTTGATACCTGAGACCGG ATTTCTGCTGGGGGCTTCAT	600bp
Cbfa-1	sens antisens	GGTGGTCCGCGATGATCTC GAGGGCACAAAGTTCTATCTGGA	941bp
TGF- β	sens antisens	TCGACATGGAGCTGGTGA CCAAGGTAACGCCAGGAATT	443bp
VEGF	sens antisens	CGAGACCCTGGGTGGACATCT CACCGCCTCGGCTTGTCAC	409bp
ALP	sens antisens	GGCTGGAGATGGACAAATTC AAGGGTCAGTCAGGTTGTTTC	666bp
Col-1	sens antisens	AAAGGTGCTGATGGTTCTCC AGCCTCTTCTCCTCTCTGA	645bp
MMP-1	sens antisens	TTGGTGGCTGTCATGAGTT TATTGCCCGGAAGAAGTAG	598bp
MMP-13	sens antisens	ACTTTCAGATGTATGGGGTGGG TACCAGTGTGCATAGCCTTGAG	626bp
BSP	sens antisens	CTGTAGCACCATTCCACACT ATGGCCTGTGCTTTCTCGAT	1055bp
OCN	sens antisens	AAGCAGGAGGGCAATAAGGT TGACATCCATACTGCAGGG	284bp
OPN	sens antisens	CAGCCAAGGACTAACTACGA TAGCTTGTCTTGTGGCTGT	799bp
Cyclophilin	sens antisens	GTTCCATCGTGCATCAAGG TTGTGACTGGCTACCTTCGT	460bp

に形成されたコロニーをLB培地でさらに培養した。培養液の一部を用いてMarligen High Plasmid Miniprep System (Invitrogen, USA)によりプラスミドを精製した。プラスミド精製産物をテンプレートとしてBigDye Terminator Cycle Sequencing, FS (Applied Biosystems) を用いPCR反応を行った。反応は-21M13 ユニバーサルプライマー 3.2pmol, テンプレートDNA 200ng, Premix 8 μ l, 滅菌水で合計20 μ lとして, DNA Thermal Cycler Model 480 でStep1 (Melting Step) 96°C 30秒, Step2 (Primer Annealing Step) 50°C 15秒, Step3 (Primer Extension Step) 60°C 4分を1cycleとして25 cyclesの反応を行った。PCR反応終了生成物に2 μ lの3M酢酸ナトリウム (pH5.2) を加え, エタノール沈殿・エタノールリンス後, 沈殿物を減圧下で乾燥させ, Template Suppression Reagent (TSR) 20 μ lに溶解さ

せて, 95°C 2分間反応させた後, 急冷した。これをPRISM 310 (Applied Biosystems) を用い, シークエンスを行いvectorのマルチクローニングサイトに相当するcDNA配列が挿入されている事を確認した。プラスミド精製産物1 μ g当たり0.50Uの*Eco RI* (TOYOBO, Japan)を加え, 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM MgCl₂, 100mM NaCl, 1mM Dithiothreitolを含む溶液中で, 37°Cで16時間インキュベーションした。その後, 1.2% SeaKem GTGアガロースゲルで電気泳動し, 目的の断片を切り出して, QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany)で精製し, それをノーザンブロット用あるいはサザンブロット用のcDNAとした²²⁾。

2) Total RNAの抽出

MC3T3-E1細胞を培養し, 4日目を培養初期, 12日目を培養中期, 20日目を培養後期としてハーベストした細胞からacid guanidinium-phenol-chloroform (AGPC)法を用いてtotal RNAを抽出した。Total RNA量は260nmにおける吸光度から定量した²³⁾。

3) ノーザンブロット

transforming growth factor beta (TGF- β), vascular endothelial growth factor (VEGF), alkaline phosphatase (ALP), matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-13, Osteocalcin (OCN), Osteopontin (OPN), cyclophilinのmRNA量の測定には, 20 μ gのtotal RNAを, I型コラーゲンのmRNA量の測定には, 2 μ gのtotal RNAを用いてノーザンブロットを行った。そこに1.97倍量のホルムアミド, 0.64倍量のホルムアルデヒド (37% V/V) 溶液0.39倍量の10 \times MOPS buffer[0.2M 3-(N-モリホリノ)プロパンスルホン酸, 0.05M 酢酸ナトリウム (pH7.0), 0.01M EDTA]を加え65°Cで15分インキュベーションした。そこに等量の20 \times SSC (3M NaCl, 0.3M クエン酸ナトリウム)を加えたものを, ドットブロッキング装置を用いて, ナイロンメンブレンである, Hybond-XL (Amersham, UK)にブロッキングした。このメンブレンを0.05Mの水酸化ナトリウムに20分間浸して固定し, 2 \times SSCの中で1分間振とうした。このメンブレンを,

Megaprime DNA labeling kit (Amersham) を用いて, [α - 32 P]deoxy-CTP (110 TBq/mmol; ICN, USA) で標識し, cDNA をプローブとして, ULTRA hyb (Ambion, USA) 中で42°Cで24時間ハイブリダイゼーションを行った。後に, 42°Cの2×SSC -0.1%ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)中で5分間で2回, 0.1×SSC -0.1% SDS中で15分間で2回, 浸透させながら洗い, オートラジオグラフィを行った。それをMolecular Imager FX (BIORAD, CA)で解析し, 各々のmRNA量の測定値は, cyclophilinの測定値で補正した²⁴⁾。

4. サザンブロット法によるmRNAの定量

1) RT-PCRによるmRNAの増幅

RT-PCRの反応のうち, 逆転写反応は, 反応液20 μ l 中に, 0.5 μ g total RNA, 50units MuLV Reverse Transcriptase, 50nmol Random Hexamersを添加して行った。PCR反応は, 逆転写反応液に15pmolの特異的な上流・下流プライマー(表1), AmpliTaq DNA polymeraseを2.5unitsを加えて, 合計で100 μ lとして, Step1 93°C 1分, Step2 57°C 1分, Step3 72°C 2分を1cycleとしてDNA Thermal Cycler Model 480 (Applied Biosystems)で, bone morphogenetic protein (BMP)-2は22 cycles, BMP-4は22 cycles, core binding factor alpha subunit 1 (Cbfa-1)は24 cycles, bone sialoprotein (BSP)は22 cycles, cyclophilin は16 cyclesのPCR反応を行った²¹⁾。

2) サザンドットブロット

RT-PCR反応生成物5 μ lを用いて95°Cで5分インキュベーションし, 急冷後に等量の20×SSCを入れHybond-XLにブロッティングした。このメンブレンを変性液(1.5M NaCl, 0.5N NaOH)を含ませた濾紙上で5分間静置し, 中和溶液[1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl (pH7.2), 1mM EDTA]の中で1分浸透した。0.4Mの水酸化ナトリウムに20分間浸して固定し, 5×SSCの中で1分間振とうした。このメンブレンを, Megaprime DNA labeling kit (Amersham) を用いて, [α - 32 P]deoxy-CTP (110 TBq/mmol; ICN, USA) で標識し, cDNA をプローブとして, ULTRA hyb (Ambion, USA) 中で42°Cで24時間ハイブリダイゼーションを行った。後に, 42°Cの2

×SSC -0.1%ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)中で5分間で2回, 0.1×SSC -0.1% SDS中で15分間で2回, 浸透させながら洗い, オートラジオグラフィを行った。それをMolecular Imager FX (BIORAD, CA)で解析し, 各々のmRNA量の測定値は, cyclophilinの測定値で補正した。

5. VEGFの測定

24wellプレート内で, 24時間あたりの培地中へのVEGF分泌量は, Quantikine M mouse VEGF immunoassay Kit (R&D, USA) 用いてELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) で定量した²¹⁾。

6. アルカリフォスファターゼ(ALP)活性の測定

細胞をハーベスト後に遠心(15,000×g 4°C 5分)を行い, 0.1M Tris-buffer (pH7.2)-0.1% TritonX-100を加えて超音波処理して細胞を溶解させた。溶液中のALP活性はALP-B test kit (Wako, Japan)を用いてBessey-Lowry法にて測定し, さらにProtein Assay (BioRad) を用いてBradford法で総タンパク質量を測定し, 補正した¹⁹⁾。

7. コラーゲンおよび非コラーゲン性タンパク質の合成量の測定

ハーベスト前に4時間[2, 3, 4, 5- 3 H]でラベルしたL-proline (370mMBq/ml; MORAVEK, USA)の入った培地でインキュベートし, 細胞をハーベストしPBSを入れ100°Cで5分インキュベーション後に氷冷して, 遠心(15,000×g 4°C 5分)を行い, 細胞質を分離した。この細胞質に40mM水酸化ナトリウムを加え, 超音波処理して細胞を溶解させた。HEPES [2-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic Acid] 緩衝液(pH 7.2), N-エチルマレイミド緩衝液(pH 7.2), 塩化カルシウム, Tris-HCl (pH7.2), Type II Collagenase (Sigma) 0.28U/mlを加え, 37°Cで3時間浸透し, インキュベーションした。これに, Bovine Serum Albumin (BSA)とトリクロル酢酸(6.7%)を加えて氷温で30分放置後, 遠心(15,000×g 4°C 15分)を行い上清と沈殿を分けて, コラーゲン量を上清の放射活性, 非コラーゲン性タンパク質量を

沈殿の放射活性をとして測定した²⁵⁾。

8. OCN量の測定

OCN量は培養最後の24時間インキュベーションした培地を用いて、その中に放出された、OCN量をMouse Osteocalcin IRMA Kit (Immunotopics, CA)を用いてImmunoradiometric Assayにより測定した。

9. 統計解析

データは平均値±標準誤差で表記した。多群の検定はScheffe's F procedure Statistical analysisによる分散分析により、2群の検定はStudent's t-testを用いて検定した。p値が5%未満のとき統計的に有意差があると見なした。統計処理にはStatView 4.02 (Abacus Concepts社)を用いた。

結 果

1. 骨マーカーの遺伝子発現におけるシンバスタチンの影響

MC3T3-E1細胞はコンフルエント後に分化培地に変えて培養し、アリザリンレッドで染色すると、培養16日目からは肉眼的にも明らかな石灰化

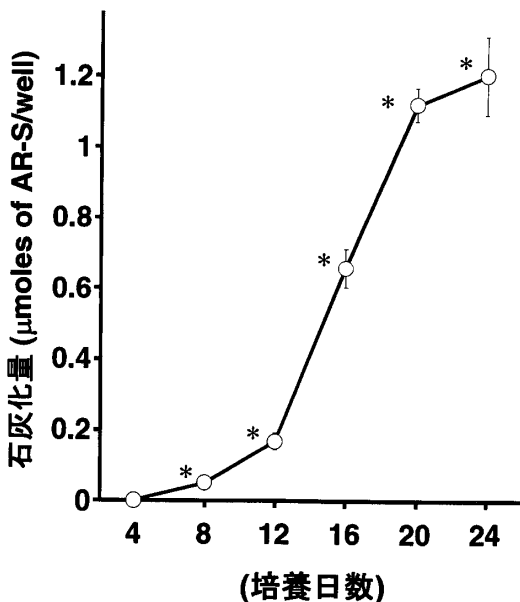


図1 MC3T3-E1細胞の石灰化量の定量

MC3T3-E1細胞を分化培地で培養し、アリザリンレッド-Sで染色されたものをCPCで溶出し、波長562nmで吸光度を測定し定量化した。*(p < 0.001)は培養4日目との差が有意であることを示す。

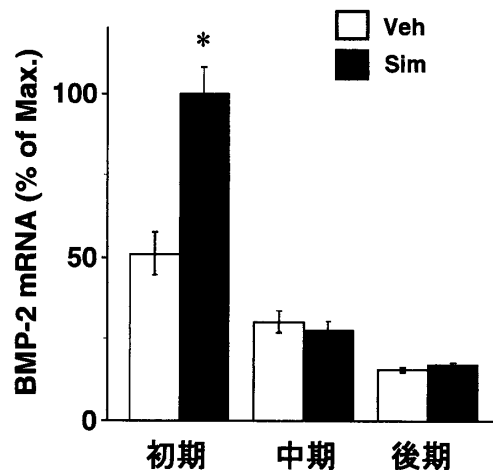


図2 スタチン添加におけるBMP-2遺伝子発現に対する影響

MC3T3-E1細胞に、シンバスタチン 10⁻⁷ M (Sim),あるいは溶媒 (Veh)を添加して、培養の初期(4日目),中期(12日目),後期(20日目)で、BMP-2のmRNA量を定量した。PCR cycleは22 cyclesでRT-PCRを行い、サザンドットブロードにて測定を行った。結果はサザンドットブロードにて測定を行ったcyclophilinのmRNA量で補正した。*(p < 0.001)は溶媒のみを加えたものとの差が有意であることを示す。

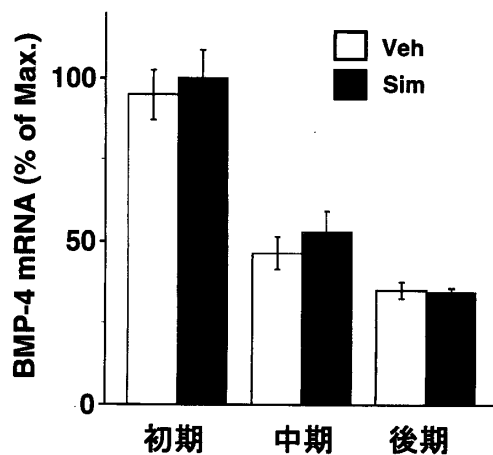


図3 スタチン添加におけるBMP-4遺伝子発現に対する影響

MC3T3-E1細胞に、シンバスタチン 10⁻⁷ M (Sim),あるいは溶媒 (Veh)を添加して、培養の初期(4日目),中期(12日目),後期(20日目)で、BMP-4のmRNA量を定量した。PCR cycleは22 cyclesでRT-PCRを行い、サザンドットブロードにて測定を行った。結果はサザンドットブロードにて測定を行ったcyclophilinのmRNA量で補正した。

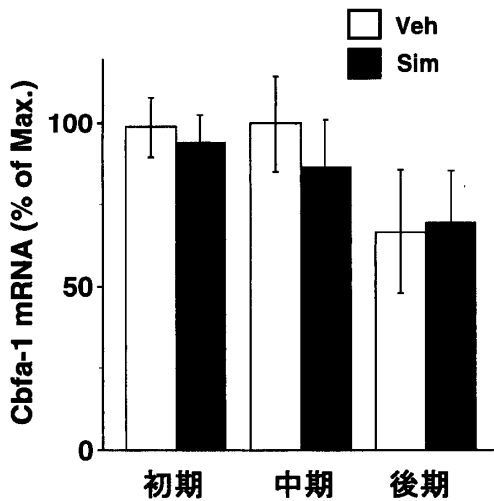


図4 スタチン添加におけるCbfa-1遺伝子発現に対する影響

MC3T3-E1細胞に、シンバスタチン 10^{-7} M (Sim), あるいは溶媒 (Veh) を添加して、培養の初期 (4日目), 中期 (12日目), 後期 (20日目) で、BMP-4のmRNA量を定量した。PCR cycleは24 cyclesでRT-PCRを行い、サザンドットブロードにて測定を行った。結果はサザンドットブロードにて測定を行ったcyclophilinのmRNA量で補正した。

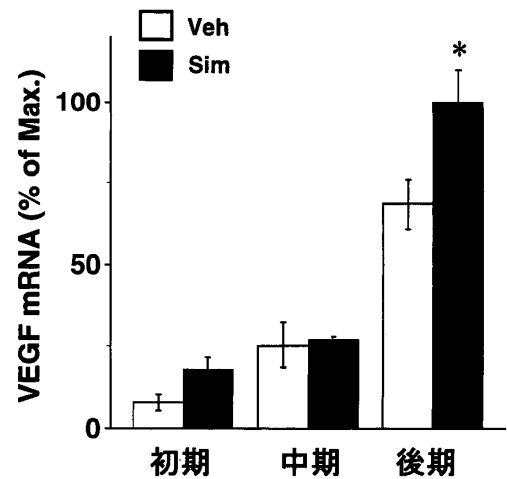


図6 スタチン添加におけるVEGF遺伝子発現に対する影響

MC3T3-E1細胞に、シンバスタチン 10^{-7} M (Sim), あるいは溶媒 (Veh) を添加して、培養の初期 (4日目), 中期 (12日目), 後期 (20日目) で、VEGFのmRNA量をノーザンドットブロードにて測定を行った。結果はcyclophilinのmRNA量をノーザンドットブロードにて測定を行い補正した。*($p < 0.001$)は溶媒添加のみとの差が有意であることを示す。

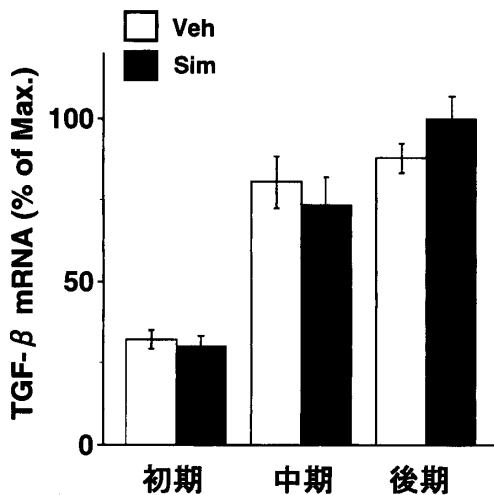


図5 スタチン添加におけるTGF-β遺伝子発現に対する影響

MC3T3-E1細胞に、シンバスタチン 10^{-7} M (Sim), あるいは溶媒 (Veh) を添加して、培養の初期 (4日目), 中期 (12日目), 後期 (20日目) で、TGF-βのmRNA量をノーザンドットブロードにて測定を行った。結果はcyclophilinのmRNA量をノーザンドットブロードにて測定を行い補正した。

塊の形成が認められた。そして、培養24日目までこの石灰化は亢進した。これをCPCで溶出し、定量化したものを図1で示す。培養4日目と比較すると石灰化量は培養8日目以降で有意に増加し、かつ、この増加は培養24日目まで経時的に持続した。このことから、24日目までの培養において本研究では4日目を培養初期、12日目を培養中期、20日目を培養後期とした。この3期におけるスタチン添加の効果を、遺伝子発現などの変動により詳細に検討した。

MC3T3-E1細胞に、シンバスタチン, あるいは溶媒のみを添加して、培養の初期 (4日目), 中期 (12日目), 後期 (20日目) で、骨マーカーのmRNA量の測定を行った。BMP-2のmRNAの発現は、培養が進むにつれて減少していったが、シンバスタチン添加で初期において溶媒のみの添加に比べて、約2倍の有意な増加が認められた (図2)。BMP-4のmRNAの発現量も培養初期が最も多く、培養が進むにつれて減少していったが、シンバスタチンの添加ではBMP-4 (図3) の遺伝子発現量には影響を与えなかった。Cbfa-

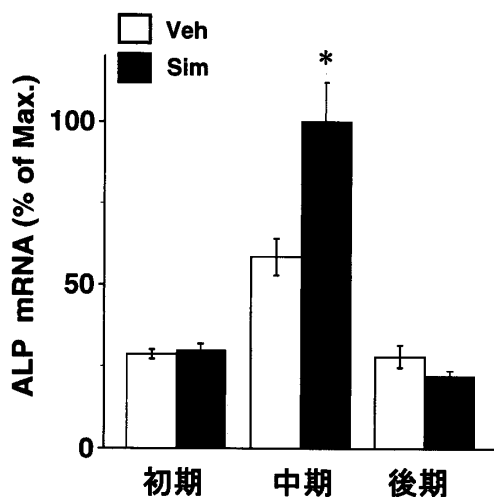


図7 スタチン添加におけるALP遺伝子発現に対する影響
MC3T3-E1細胞に、シンバスタチン 10^{-7} M (Sim), あるいは溶媒 (Veh) を添加して、培養の初期 (4日目), 中期 (12日目), 後期 (20日目) で、ALPのmRNA量をノーザンドットブロットにて測定を行った。結果はcyclophilinのmRNA量をノーザンドットブロットにて測定を行い補正した。*($p < 0.001$)は溶媒添加のみとの差が有意であることを示す。

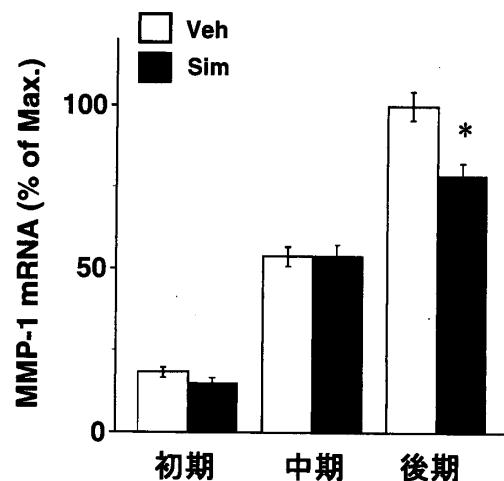


図9 スタチン添加におけるMMP-1遺伝子発現に対する影響

MC3T3-E1細胞に、シンバスタチン 10^{-7} M (Sim), あるいは溶媒 (Veh) を添加して、培養の初期 (4日目), 中期 (12日目), 後期 (20日目) で、MMP-1のmRNA量をノーザンドットブロットにて測定を行った。結果はcyclophilinのmRNA量をノーザンドットブロットにて測定を行い補正した。*($p < 0.001$)は溶媒添加のみとの差が有意であることを示す。

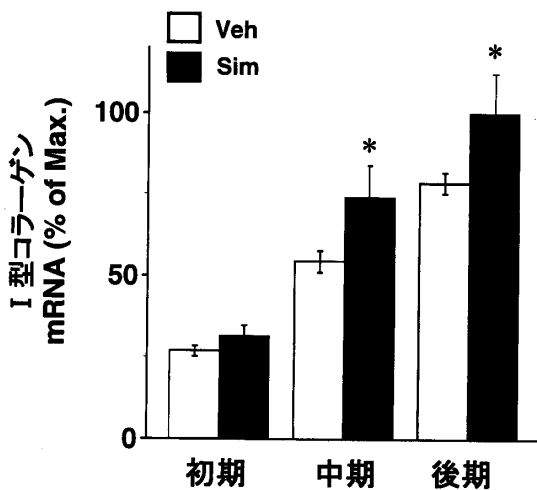


図8 スタチン添加におけるI型コラーゲン遺伝子発現に対する影響

MC3T3-E1細胞に、シンバスタチン 10^{-7} M (Sim), あるいは溶媒 (Veh) を添加して、培養の初期 (4日目), 中期 (12日目), 後期 (20日目) で、I型コラーゲンのmRNA量をノーザンドットブロットにて測定を行った。結果はcyclophilinのmRNA量をノーザンドットブロットにて測定を行い補正した。*($p < 0.001$)は溶媒添加のみとの差が有意であることを示す。

1の遺伝子発現量は、培養全般を通してあまり変化はなかった。さらに、シンバスタチンの添加でも、mRNA発現量に変化を与えなかった (図4)。TGF- β の遺伝子発現量は、培養が進むにつれて増加していったが、シンバスタチンの添加でもmRNA発現量に変化を与えなかった (図5)。VEGFの遺伝子発現量も培養が進むにつれて増加したが、シンバスタチンの添加で培養の後期では溶媒のみの添加に比べて、さらに約1.3倍の有意な増加が認められた (図6)。ALPの遺伝子発現量は培養の中期では、初期・後期に比べ約2倍に増えたが、シンバスタチンの添加で培養中期では溶媒のみの添加に比べて、さらに約1.8倍の有意な増加が認められた (図7)。I型コラーゲンの遺伝子発現は培養が進むにつれて増えていったが、シンバスタチンの添加で培養中期と後期では、溶媒のみの添加に比べ、さらに約1.3倍の有意な増加が認められた (図8)。MMP-1のmRNA発現量は培養の中期から後期で増加したが、この増加は、シンバスタチンの添加で培養後期において、

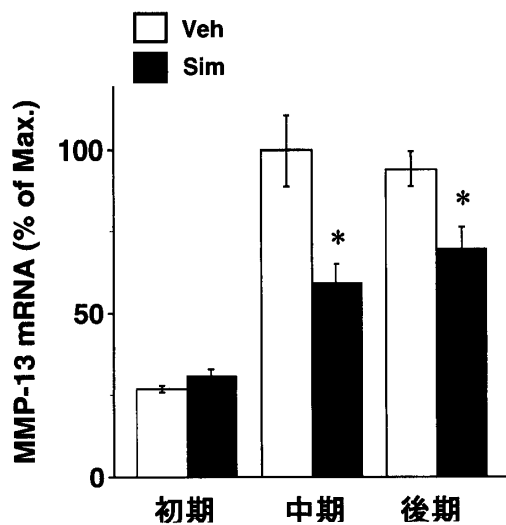


図10 スタチン添加におけるMMP-13遺伝子発現に対する影響

MC3T3-E1細胞に、シンバスタチン 10^{-7} M (Sim), あるいは溶媒 (Veh) を添加して、培養の初期 (4日目), 中期 (12日目), 後期 (20日目) で、MMP-13のmRNA量をノーザンドットブロットにて測定を行った。結果はcyclophilinのmRNA量をノーザンドットブロットにて測定を行い補正した。*($p < 0.001$)は溶媒添加のみとの差が有意であることを示す。

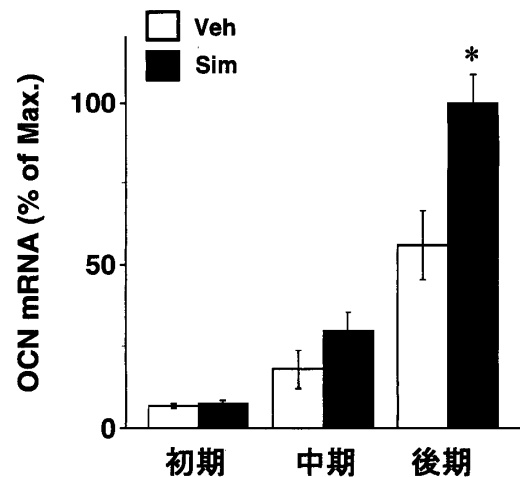


図12 スタチン添加におけるOCN遺伝子発現に対する影響

MC3T3-E1細胞に、シンバスタチン 10^{-7} M (Sim), あるいは溶媒 (Veh) を添加して、培養の初期 (4日目), 中期 (12日目), 後期 (20日目) で、OCNのmRNA量をノーザンドットブロットにて測定を行った。結果はcyclophilinのmRNA量をノーザンドットブロットにて測定を行い補正した。*($p < 0.001$)は溶媒添加のみとの差が有意であることを示す。

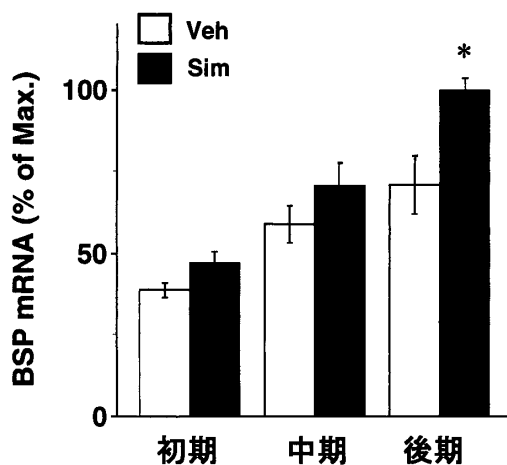


図11 スタチン添加におけるBSP遺伝子発現に対する影響
MC3T3-E1細胞に、シンバスタチン 10^{-7} M (Sim), あるいは溶媒 (Veh) を添加して、培養の初期 (4日目), 中期 (12日目), 後期 (20日目) で、BSPのmRNA量を定量した。PCR cycleは22 cyclesでRT-PCRを行い、サザンドットブロットにて測定を行った。結果はサザンドットブロットにて測定を行ったcyclophilinのmRNA量で補正した。*($p < 0.001$)は溶媒添加のみとの差が有意であることを示す。

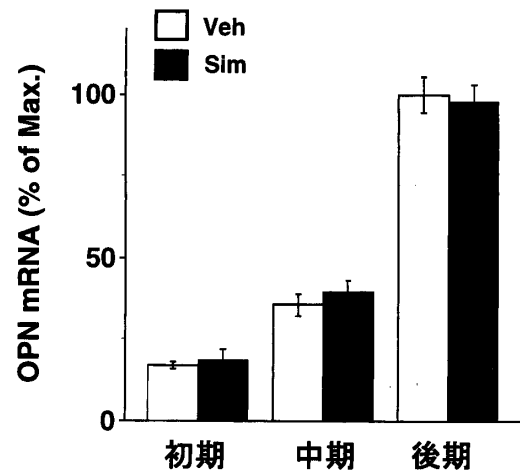


図13 スタチン添加におけるOPN遺伝子発現に対する影響

MC3T3-E1細胞に、シンバスタチン 10^{-7} M (Sim), あるいは溶媒 (Veh) を添加して、培養の初期 (4日目), 中期 (12日目), 後期 (20日目) で、OPNのmRNA量をノーザンドットブロットにて測定を行った。結果はcyclophilinのmRNA量をノーザンドットブロットにて測定を行い補正した。

表2 シンバスタチンによる遺伝子発現の変化

	初期	中期	後期
BMP-2	+		
BMP-4			
Cbfa-1			
TGF-β			
VEGF			+
ALP		+	
Col I		+	+
MMP-1			-
MMP-13		-	-
BSP			+
OCN		+	+
OPN			

+, 増加；-, 減少

著しく抑制された (図9)。MMP-13のmRNA発現量も培養の中期から後期で増加したが、シンバスタチンの添加で培養の中期と後期において、この増加は、抑制を受けた (図10)。BSPのmRNA発現量は培養の中期から後期で増加するが、シンバスタチンの添加で培養後期で、この増加はさらに強調された (図11)。OCNの遺伝子発現量は培養の中期と後期で増加したが、シンバスタチンの添加では培養後期で溶媒のみの添加に比べ、さらに約1.7倍の増加がおこった (図12)。OPNの遺伝子発現量は培養の中期では初期と比べ増加したが、後期では中期と比較して約2.3倍増加した。しかし、この増加はシンバスタチンの添加でも変化を受けなかった (図13)。これらのmRNAの測定結果をまとめて表2に示す。

2. スタチンによるVEGFタンパク質量への影響

図14に示すように、溶媒のみを添加したMC3T3-E1細胞では、24時間の培養上清中に放出されたVEGF量は培養初期では93.75 ± 7.46 pg/mlであったが、中期では578.75 ± 94.96 pg/ml、後期では1.91 ± 0.35 ng/mlと増加した。シンバスタチン添加により、培養の初期では90.15 ± 15.02 pg/mlと溶媒のみの添加との間に有意差は認められなかった。しかし、中期では956.20 ±

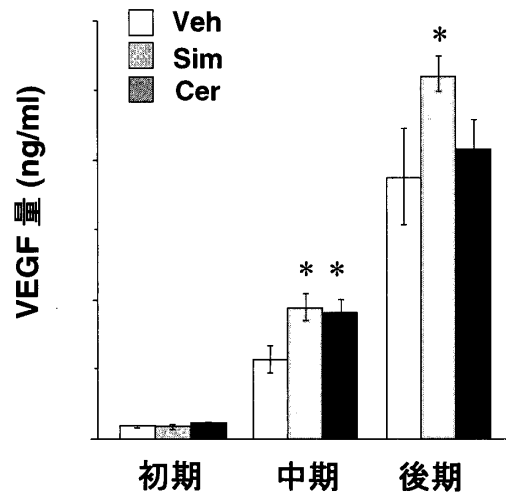


図14 スタチンによるVEGFタンパク質量への影響

MC3T3-E1細胞に、シンバスタチン 10⁻⁷ M (Sim), セリバスタチン10⁻⁸ M (Cer), あるいは溶媒 (Veh) を添加して、培養の初期 (4日目), 中期 (12日目), 後期 (20日目) で、24時間の培養上清中に放出されたVEGF量をELISA法にて測定を行った。*(p < 0.001)は溶媒添加のみとの差が有意であることを示す。

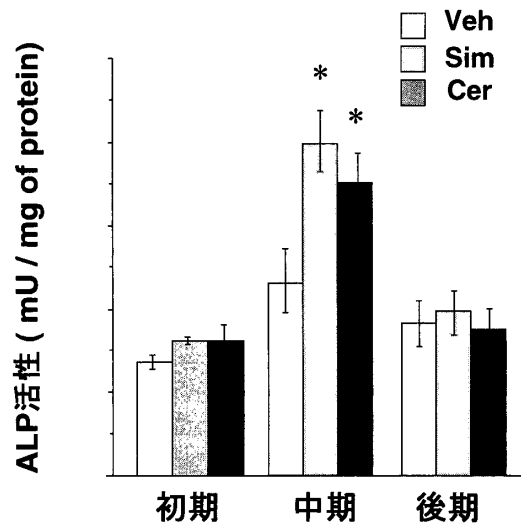


図15 スタチンによるALP活性への影響

MC3T3-E1細胞に、シンバスタチン 10⁻⁷ M (Sim), セリバスタチン10⁻⁸ M (Cer), あるいは溶媒 (Veh) を添加して、培養の初期 (4日目), 中期 (12日目), 後期 (20日目) で、細胞基質中のALP活性をBessey - Lowry法にて測定を行い、得られた結果をBradford法で総タンパク質量を測定し、補正した。*(p < 0.001)は溶媒添加のみとの差が有意であることを示す。

95.29 pg/ml, 後期では2.64 ± 0.15 ng/mlと溶媒のみの添加に比べて、有意な増加を示した。また、セリバスタチンを添加すると、培養初期では

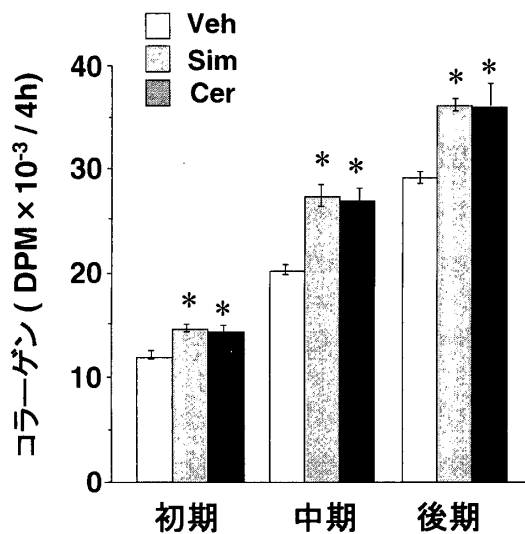


図16 スタチンによるコラーゲン合成量への影響

MC3T3-E1細胞に、シンバスタチン 10^{-7} M (Sim), セリバスタチン 10^{-8} M (Cer), あるいは溶媒 (Veh) を添加して培養し、培養の初期 (4日目), 中期 (12日目), 後期 (20日目) で4時間 [2, 3, 4, 5-³H] でラベルされたL-prolineを取り込ませ、コラーゲナーゼを完全に作用させ分解されたものを4時間で合成されたコラーゲン量とした。*($p < 0.001$)は溶媒添加のみとの差が有意であることを示す。

110.25 ± 13.15 pg/mlで、溶媒のみの添加との間に有意差は認められなかった。しかし、培養中期において918.75 ± 98.08 pg/mlと溶媒のみの添加に比べて、有意な増加を示した。培養後期においては2.10 ± 0.21 ng/mlと溶媒のみの添加に比べて有意な増加は認められなかった。

3. スタチンによるALP活性への影響

図15に示すように、MC3T3-E1細胞でのALP活性を総タンパク質量で補正すると、培養初期では、溶媒添加のみでは1.37 ± 0.08 mU/mg, シンバスタチンの添加で1.62 ± 0.04 mU/mg, セリバスタチンの添加で1.61 ± 0.19 mU/mgであり、スタチン添加による差は認められなかった。培養中期では、溶媒のみの添加で2.35 ± 0.38 mU/mg, シンバスタチンの添加で4.02 ± 0.35 mU/mg, セリバスタチンの添加で3.53 ± 0.31 mU/mgであり、シンバスタチンあるいはセリバスタチン添加により、溶媒のみの添加に比べて有意なALP活性の増加が認められた。また、培養後期では、溶媒のみの添加では1.87 ±

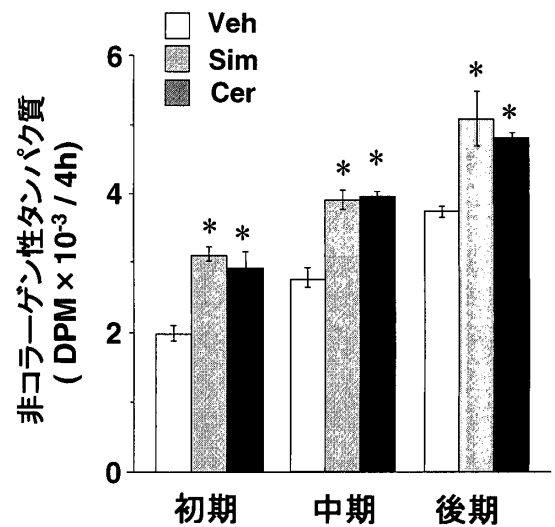


図17 スタチンによる非コラーゲン性タンパク質合成量への影響

MC3T3-E1細胞に、シンバスタチン 10^{-7} M (Sim), セリバスタチン 10^{-8} M (Cer), あるいは溶媒 (Veh) を添加して、培養の初期 (4日目), 中期 (12日目), 後期 (20日目) で4時間 [2, 3, 4, 5-³H] でラベルされたL-prolineを取り込ませ、コラーゲナーゼを完全に作用させ分解なかったものを4時間で合成された非コラーゲン性タンパク質とした。*($p < 0.001$)は溶媒添加のみとの差が有意であることを示す。

0.28 mU/mg, シンバスタチンの添加で1.96 ± 0.26 mU/mg, セリバスタチンの添加で1.76 ± 0.23 mU/mgであり、スタチン添加による差は認められなかった。

4. スタチンによるコラーゲン合成量に与える影響

図16に示すように、MC3T3-E1細胞に [2, 3, 4, 5-³H] でラベルしたL-prolineの取り込みの結果、培養の初期からシンバスタチンの添加, あるいはセリバスタチンの添加でコラーゲンの合成量は溶媒のみの添加に比べて有意に上昇した。また、培養中期, 後期には溶媒のみの添加では培養初期に比べ明らかなコラーゲンの合成の促進が認められたが、スタチンの添加によって、さらに合成は促進された。培養の初期から後期までスタチン添加により、コラーゲナーゼにより分解されなかった非コラーゲン性タンパク質の合成量も、有意な増加を示した (図17)。

5. スタチンによるOCNタンパク質量への影響

図18に示すように、MC3T3-E1細胞が24時間

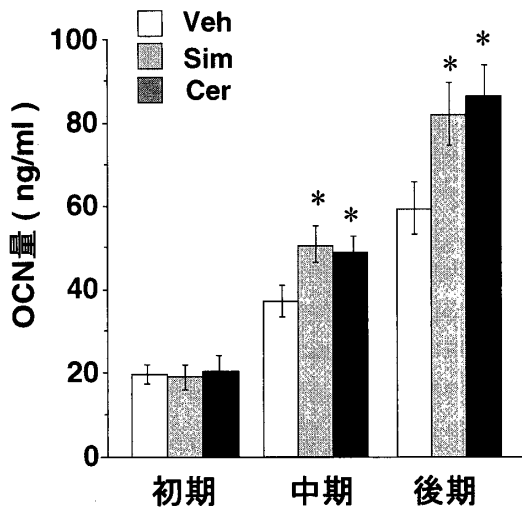


図18 スタチンによるOCN量への影響

MC3T3-E1細胞に、シンバスタチン 10^{-7} M (Sim), セリバスタチン 10^{-8} M (Cer), あるいは溶媒 (Veh) を添加して、培養の初期 (4日目), 中期 (12日目), 後期 (20日目) で、24時間の培養上清中に放出されたOCN量をImmunoradiometric Assayにて測定を行った。* ($p < 0.001$) は溶媒添加のみとの差が有意であることを示す。

の培養上清中に放出されたOCN量は培養初期では 19.18 ± 2.27 ng/mlであった。培養中期では 36.79 ± 4.01 ng/ml, 後期では 59.12 ± 6.50 ng/mlと増加した。シンバスタチン添加により、培養の初期では 18.53 ± 2.85 ng/ml, 中期では 50.26 ± 4.19 ng/ml, 後期では 81.71 ± 7.56 ng/mlとなり、培養の中期, 後期で溶媒のみを添加したものに比べて、有意な増加を示した。セリバスタチンを添加では、培養初期では 20.22 ± 3.36 pg/ml, 中期では 48.51 ± 3.96 pg/ml, 後期においては 85.92 ± 7.70 ng/ml と溶媒のみを添加したものに比べて、培養の中期と後期において、有意な増加が認められた。

6. MC3T3-E1細胞におけるスタチンの石灰化促進

MC3T3-E1細胞に溶媒のみ, シンバスタチン, セリバスタチン, あるいはアトルバスタチンを添加し培養し, アリザリンレッドで染色した結果を図19に示す。それぞれのスタチン添加で、培養16日目で溶媒のみの添加に比べて、肉眼的に明らかな石灰化促進が認められた。この促進は培養20日目・24日目でも、さらに増強された。これを

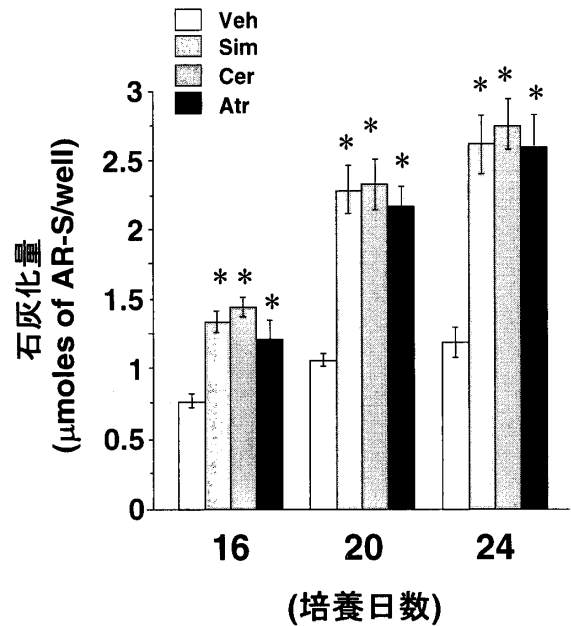


図20 MC3T3-E1細胞の石灰化量に与えるスタチンの影響の定量

MC3T3-E1細胞に、シンバスタチン 10^{-7} M (Sim), セリバスタチン 10^{-8} M (Cer), アトルバスタチン 10^{-5} M (Ato), あるいは溶媒 (Veh) を添加して、培養16日目, 20日目, 24日目でアリザリンレッド-Sで染色を行い、それをCPCで溶出し、波長562nmで吸光度を測定し定量化した。* ($p < 0.001$) は溶媒添加のみとの差が有意であることを示す。

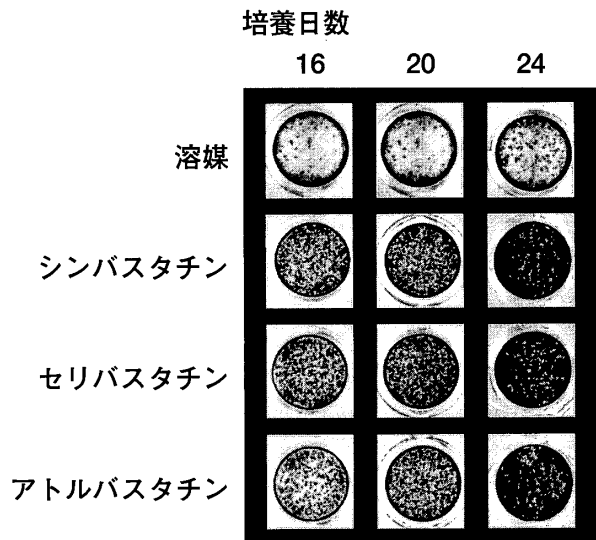


図19 MC3T3-E1細胞の石灰化像に与えるスタチンの影響
MC3T3-E1細胞に、シンバスタチン (10^{-6} M), セリバスタチン (10^{-7} M), アトルバスタチン (10^{-5} M), あるいは溶媒添加して16日, 20日, 24日間培養し, アリザリンレッド-Sでの石灰化像を示した。

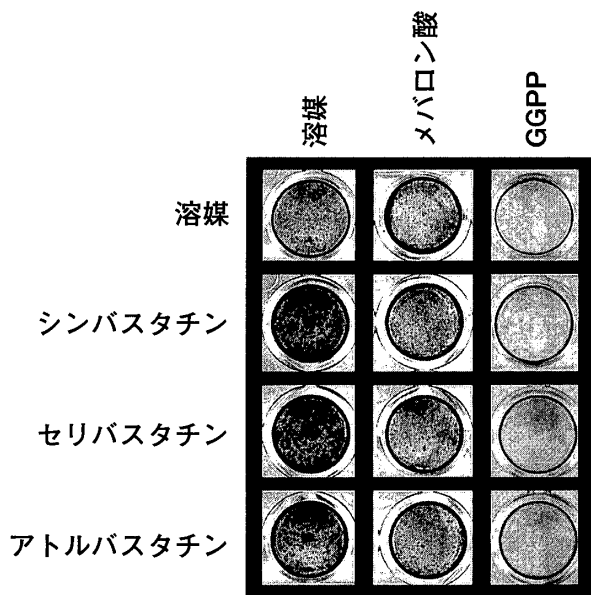


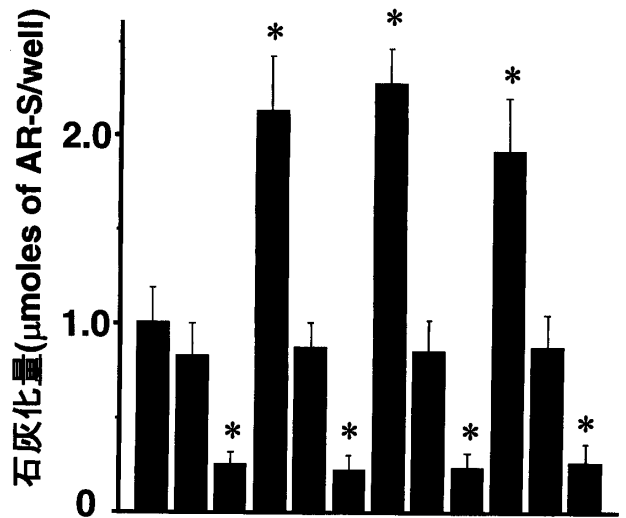
図21 メバロン酸代謝経路産物がスタチンによる石灰化像に与える影響

MC3T3-E1細胞に、シンバスタチン (10^{-6} M), セリバスタチン (10^{-7} M), アトルバスタチン (10^{-5} M), あるいはまたは溶媒添加し、同時にメバロン酸代謝産物であるメバロン酸 (1mM), あるいはGGPP ($20 \mu\text{M}$)を加えて20日間培養を行い、アリザリンレッド-Sでの石灰化像を示した。

CPCで溶出し定量化したものを図20に示す。石灰化量は、培養16日目では、スタチン添加で、溶媒のみの添加に比べ約1.9倍に、培養20日目で約2.1倍に、培養24日目で約2.3倍になり、それぞれで有意な促進が認められた。さらに、シンバスタチン、セリバスタチン、アトルバスタチンの添加と同時にメバロン酸を加えて、あるいはメバロン酸代謝産物であるGGPPを加えて20日間培養を行ってみた。すると、メバロン酸を加えることでスタチンによる石灰化促進作用は消え、GGPPを加えることにより、むしろ石灰化は抑制を受けた(図21)。これをCPCで溶出して石灰化を定量化した結果が図22である。

考 察

スタチンは、HMG-CoA還元酵素の阻害剤であり、メバロン酸カスケードを介してRho²⁶⁾, Ras²⁷⁾, Rac²⁸⁾ファミリーのプレニレーションを抑制する事が知られている。この事によりe-NOSの抑制²⁹⁾, i-NOSの促進³⁰⁾, Aktの促進³¹⁾などが



Veh	✓	✓	✓								
Sim				✓	✓	✓					
Cer							✓	✓	✓		
Ato										✓	✓
Mev		✓		✓		✓			✓		
GGPP			✓		✓		✓				✓

図22 メバロン酸代謝経路産物が石灰化量に与える影響

MC3T3-E1細胞に、シンバスタチン 10^{-7} M (Sim), セリバスタチン 10^{-8} M (Cer), アトルバスタチン 10^{-5} M (Ato), あるいは溶媒 (Veh) を添加し、同時にメバロン酸代謝産物であるメバロン酸 1mM (Mev), あるいはGGPP $20 \mu\text{M}$ (GGPP) を加えて20日間培養した。アリザリンレッド-Sで染色を行い、それをCPCで溶出し、波長562nmで吸光度を測定し定量化した。vは試料にそれを加えて培養したことを示す。*($p < 0.001$)は溶媒添加のみとの差が有意であることを示す。

起こると考えられている。

本研究で、MC3T3-E1細胞にスタチン添加する事により、著しい石灰化亢進が認められた。これは、*in vivo*の実験においてスタチンが骨塩量を増加させた結果³²⁾と一致する。また、同時にメバロン酸経路の代謝産物であるメバロン酸やGGPPを添加することで、MC3T3-E1細胞の石灰化促進作用が完全に消失した。このことは、スタチンによるMC3T3-E1細胞への石灰化促進作用は、メバロン酸カスケードを通して起こっている事が推察できる。

Mundyら³²⁾によりスタチンのひとつであるシンバスタチンが、骨芽細胞でBMP-2の遺伝子発

現を上昇させていることが示されている。本研究により、MC3T3-E1細胞において、シンバスタチンは、BMP-2遺伝子発現のみならず、VEGFやALP、I型コラーゲン、BSP、OCNの遺伝子発現を上昇させることが分かった。さらに、シンバスタチンあるいはセリバスタチンが、VEGFタンパク質量、ALP活性、OCNタンパク質量も増加させることも分かった。また、MMP-1、MMP-13の遺伝子発現はシンバスタチンによって抑制を受けた。このことから、スタチンによりMC3T3-E1細胞で石灰化が亢進するのは、骨基質中の主要なタンパク質のひとつである、I型コラーゲンの蓄積によるものであると推察できる。これにはコラーゲンの遺伝子発現の上昇のみならず、コラーゲンの合成量の増加、さらにはコラーゲナーゼによるコラーゲンの分解の抑制も起こっていると考えられる。この現象は、どのような機構によって起こっているかは不明であるが、培養初期のBMP-2の遺伝子発現を上昇させる作用、あるいは培養中期に起こるALP活性の促進、あるいは培養後期VEGFの発現量増加、OCNの発現量の増加、BSPの発現量の増加が石灰化亢進につながっていると考えられる。この結果は、短期間の培養系でのBMP-2³³⁾、OCN³⁴⁾、VEGF²¹⁾、ALP³⁵⁾へのスタチンの影響を見た見解と一致する。骨芽細胞が分化、石灰化を行う過程においてBMP-2³⁶⁾、ALP³⁷⁾、I型コラーゲン³⁸⁾、VEGF³⁹⁾、BSP⁴⁰⁾、OCN⁴¹⁾の分泌を行うという事実とよく一致する。骨芽細胞の分化促進について、BMP-2/Cbfa-1経路は一般的に知られている⁴²⁾。Cbfa-1は遺伝子発現よりも、むしろタンパク質のリン酸化による活性化の過程のほうが重要である⁴³⁾。スタチンがCbfa-1のmRNAを変化させなかったという本研究結果は、スタチンの作用は遺伝子発現よりもむしろ、Cbfa-1の活性化に関与していると推察される。一方で、TGF- β 遺伝子発現はスタチンにより促進されなかった。このことから、I型コラーゲン、OCNの遺伝子発現亢進、MMP-1の遺伝子発現の抑制は、TGF- β に依存するもの⁴⁴⁾ではない事が考えられる。

最近、セリバスタチン等の一部のスタチンにより重篤なミオパチー⁴⁵⁾や横紋筋融解症⁴⁶⁾が報告さ

れた。これはユビキノン (coenzyme Q : CoQ) の合成経路が、メバロン酸カスケードと交差しているため、筋細胞中のCoQの低下がミトコンドリアの機能異常を起し筋細胞を崩壊させるものと考えられている⁴⁷⁾。これはスタチンの改良により生体内での血中半減期の延長、あるいは低濃度でのメバロン酸カスケード介した、コレステロール合成阻害を追求した結果と考えられる⁴⁸⁾。これは本研究でのセリバスタチンが低濃度 (10^{-7} M) でも十分に石灰化促進作用を示した結果と一致する。一方、コレステロール低下作用が強いとされる第三世代 (完全合成型) スタチンであるアトルバスタチンがMC3T3-E1細胞において比較的高濃度 (10^{-5} M) まで効果を示さなかった理由については現在分かっていない。しかし、この結果はGuijarro³⁾らの結果や、Staalら⁴⁹⁾の結果とも一致する。アトルバスタチンは血中での半減期が長いいため、1日1回の投与で、高い血中濃度が維持できる。このため、*in vivo*実験では高い薬効を示す。スタチンは肝臓で主として分解され排泄されることから、培養系で、アトルバスタチンの血中半減期の延長作用という有用性はあまり発揮されないものと思われる。従って、本研究における結果は標的細胞、すなわち骨芽細胞における効果が反映されたものである。以上が*in vivo*と*in vitro*実験で作用強度が異なった原因と考えられる。

近年、閉経後骨粗鬆症治療薬として用いられ、良好な治療効果を発揮しているビスフォスフォネートは、破骨細胞でメバロン酸代謝経路を阻害するため、破骨細胞の活性の抑制を行うと考えられている⁵⁰⁾。このため、ビスフォスフォネートによる骨塩量の改善は、骨吸収抑制作用が主作用であると考えられる。本研究で明らかにした、スタチンは骨芽細胞において石灰化を促進する。スタチンもビスフォスフォネートもコレステロール合成系を阻害する作用を持つ。スタチンは主として骨芽細胞に作用し、骨形成を促進する。一方、ビスフォスフォネートは破骨細胞に作用し、その活性を抑制することにより骨吸収を抑制する。このようにこれら2つの物質が細胞に対する親和性の違いにより異なる効果が発現するものと考えられる。しかしながら、ビスフォスフォネートが骨芽

細胞に作用するという報告⁵¹⁾もあり，スタチンとビスフォスフォネートとの作用の差異を明らかにするにはより詳細な研究が必要である。

スタチンは*in vivo*実験でも骨量を増加させるという報告があるが，その骨形成作用はあまり強くない。今後，更に強力な骨形成促進作用を有するスタチン製剤の開発が骨粗鬆症治療薬として臨床応用のために必須であると思われる。

結 論

高コレステロール血症治療薬であるスタチンの骨芽細胞分化に対する影響を検討したところ以下の結果を得た。

1. 骨芽細胞にシンバスタチン添加すると，BMP-2，VEGF，ALP，I型コラーゲン，BSP及びOCNの遺伝子発現を強く促進した。また，MMP-1及びMMP-13の遺伝子発現は有意に抑制された。

2. シンバスタチン及びセリバスタチンを骨芽細胞に添加すると，VEGF分泌量，OCN合成量及びALP活性が顕著に上昇した。また，コラーゲンの合成量，非コラーゲン性タンパク質合成量もこれらスタチン添加により著明に増加した。

3. シンバスタチン，セリバスタチン，アトルバスタチンを骨芽細胞に添加すると，石灰化は著明に亢進した。スタチンの石灰化促進作用は，コレステロール合成の中間代謝産物である，メバロン酸及びGGPPの同時に添加すると完全に消失した。

以上の結果から，スタチンは骨芽細胞の分化及び石灰化を強く促進し，骨形成促進作用を有する骨粗鬆症治療薬として有望視される。

謝 辞

稿を終えるにあたり，終始御懇篤なご指導および御校閲を頂きました奥羽大学 大学院歯学研究科 口腔生化学講座 堀内 登 教授に深甚なる謝意を表します。また，本研究を遂行するにあたって多方面から御協力して頂きました奥羽大学 口腔生化学講座の先生方に深く感謝いたします。

なお，本論文の要旨は，第35回 奥羽大学歯学会（平成15年6月）において発表した。

文 献

- 1) Endo, A., Tsujita, Y., Kuroda, M. and Tanzawa, K. : Inhibition of cholesterol synthesis *in vitro* and *in vivo* by ML-236A and ML-236B, competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Eur J Biochem* **77** ; 31-36 1977.
- 2) McKenney, J. M. : New cholesterol guidelines, new treatment challenges. *Pharmacotherapy* **22** ; 853-863 2002.
- 3) Guijarro, C., Blanco-Colio, L. M., Ortego, M., Alonso, C. *et al.* : 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and isoprenylation inhibitors induce Apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res* **83** ; 490-500 1998.
- 4) Raal, F. J., Pilcher, G., Rubinsztein, D. C., Lingenhel, A. *et al.* : Statin therapy in a kindred with both apolipoprotein B and low density lipoprotein receptor gene defects. *Atherosclerosis* **129** ; 97-102 1997.
- 5) Mascaro, C., Ortiz, J. A., Ramos, M. M., Haro, D. *et al.* : Sterol regulatory element binding protein-mediated effect of fluvastatin on cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase transcription. *Arch Biochem Biophys* **374** ; 286-292 2000.
- 6) Paoletti, R., Fahmy, M., Mahla, G., Mizan, J. *et al.* : Rosuvastatin demonstrates greater reduction of low-density lipoprotein cholesterol compared with pravastatin and simvastatin in hypercholesterolaemic patients: a randomized, double-blind study. *J Cardiovasc Risk* **8** ; 383-390 2001.
- 7) Davidson, M., Ma, P., Stein, E. A., Gotto, A. M. *et al.* : Comparison of effects on low-density lipoprotein cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol with rosuvastatin versus atorvastatin in patients with type IIa or IIb hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* **89** ; 268-275 2002.
- 8) Evans, M., Roberts, A. and Rees, A. : The future direction of cholesterol-lowering therapy. *Curr Opin Lipidol* **13** ; 663-669 2002.
- 9) Igel, M., Sudhop, T. and Bergmann, K. : Pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins), including rosuvastatin and pitavastatin. *J Clin Pharmacol* **42** ; 835-845 2002.
- 10) McKenney, J. M. : New cholesterol guidelines, new treatment challenges. *Pharmacotherapy* **22** ; 853-856 2002.
- 11) Takemoto, M. and Liao, J. K. : Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coen-

- zyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**; 1712-1719 2001.
- 12) Nishimura, T., Faul, J. L., Berry, G. J., Vaszar, L. T. *et al.*: Simvastatin attenuates smooth muscle neointimal proliferation and pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* **166**; 1403-1408 2002.
- 13) Bhave, S. A., Stone, J. S., Rubel, E. W. and Coltrera, M. D.: Cell cycle progression in gentamicin-damaged avian cochleas. *J Neurosci* **15**; 4618-4628 1995.
- 14) Zhong, W. B., Wang, C. Y., Chang, T. C. and Lee, W. S.: Lovastatin Induces Apoptosis of Anaplastic Thyroid Cancer Cells via Inhibition of Protein Geranylgeranylation and de Novo Protein Synthesis. *Endocrinology* **144**; 3852-3859 2003.
- 15) Koh, K. K.: Effects of statins on vascular wall: vasomotor function, inflammation, and plaque stability. *Cardiovasc Res* **47**; 648-657 2000.
- 16) Seeger, H., Wallwiener, D. and Mueck, A. O.: Additive antioxidative effect of hormone replacement therapy combined with a statin. *Clin Exp Obstet Gynecol* **27**; 179-181 2000.
- 17) Frascini, A., Biggiogera, M., Bottone, M. G. and Martin, T. E.: Nuclear phospholipids in human lymphocytes activated by phytohemagglutinin. *Eur J Cell Biol* **78**; 416-423 1999.
- 18) Fassbender, K., Simons, M., Bergmann, C., Stroick, M. *et al.*: Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta-amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **98**; 5856-5861 2001.
- 19) Maeda, T., Matsunuma, A., Kawane, T. and Horiuchi, N.: Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **280**; 874-877 2001.
- 20) 前田豊信, 伊藤秀文, 原元信貴, 堀内 登: 骨芽細胞分化促進に対する高コレステロール血症治療薬の比較. *奥羽大歯学誌* **29**; 197-202 2002.
- 21) Maeda, T., Kawane, T. and Horiuchi, N.: Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. *Endocrinology* **144**; 681-692 2003.
- 22) Kawane, T., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y. and Horiuchi, N.: Parathyroid hormone (PTH) suppresses rat PTH/PTH-related protein receptor gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* **287**; 313-322 2001.
- 23) Kurahashi, I., Matsunuma, A., Kawane, T., Abe, M. *et al.*: Dexamethasone enhances vitamin D-24-hydroxylase expression in osteoblastic (UMR-106) and renal (LLC-PK1) cells treated with 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3. *Endocrine* **17**; 109-118 2002.
- 24) Akeno, N., Matsunuma, A., Maeda, T., Kawane, T., *et al.*: Regulation of vitamin D-1alpha-hydroxylase and -24-hydroxylase expression by dexamethasone in mouse kidney. *J Endocrinol* **164**; 339-348 2000.
- 25) Hata, R., Ninomiya, Y., Nagai, Y. and Tsukada, Y.: Biosynthesis of interstitial type of collagen by albumin-producing liver parenchymal cell (hepatocyte) clones in culture. *Biochemistry* **19**; 169-176 1980.
- 26) Monick, M. M., Powers, L. S., Butler, N. S. and Hunninghake G. W.: Inhibition of Rho Family GTPases Results in Increased TNF-alpha Production After Lipopolysaccharide Exposure. *J Immunol* **71**; 2625-2630 2003.
- 27) Cuthbert, J. A. and Lipsky, P. E.: Regulation of proliferation and Ras localization in transformed cells by products of mevalonate metabolism. *Cancer Res* **57**; 3498-3505 1997.
- 28) Maddala, R., Reddy, V. N., Epstein, D. L. and Rao, V.: Growth factor induced activation of Rho and Rac GTPases and actin cytoskeletal reorganization in human lens epithelial cells. *Mol Vis* **17**; 329-336 2003.
- 29) Laufs, U., La Fata, V., Plutzky, J. and Liao, J. K.: Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* **97**; 1129-1135 1998.
- 30) Kolyada, A. Y., Fedtsov, A. and Madias, N. E.: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors upregulate inducible NO synthase expression and activity in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **38**; 1024-1029 2001.
- 31) Kureishi, Y., Luo, Z., Shiojima, I., Bialik, A. *et al.*: The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activities the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nature Med* **6**; 1004-1010 2000.
- 32) Mundy, G., Garrett, R., Harris, S., Chan, J. *et al.*: Stimulation of bone formation *in vitro* and in rodents by statins. *Science* **286**; 1946-1949 1999.
- 33) Ohnaka, K., Shimoda, S., Nawata, H., Shimokawa, H. *et al.*: Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **287**; 337-342 2001.
- 34) Phillips, B. W., Belmonte, N., Vernochet, C.,

- Ailhaud, G. *et al.* : Compactin enhances osteogenesis in murine embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **284** ; 478-484 2001.
- 35) Sugiyama, M., Kodama, T., Konishi, K. Abe, K. *et al.* : Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **271** ; 688-692 2000.
- 36) Hughes, F. J., Collyer, J., Stanfield, M. and Goodman, S. A. : The effects of bone morphogenetic protein-2, -4, and -6 on differentiation of rat osteoblast cells *in vitro*. *Endocrinology* **136** ; 2671-2677 1995.
- 37) Ohgushi, H., Dohi, Y., Katuda, T., Tamai, S. *et al.* : *In vitro* bone formation by rat marrow cell culture. *J Biomed Mater Res* **32** ; 333-340 1996.
- 38) Raisz, L. G. and Kream, B. E. : Regulation of bone formation. *N Engl J Med* **309** ; 29-35 1983.
- 39) Midy, V. and Plouet, J. : Vasculotropin/vascular endothelial growth factor induces differentiation in cultured osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **199** ; 380-386 1994.
- 40) Cooper, L. F., Yliheikkila, P. K., Felton, D. A. and Whitson, S. W. : Spatiotemporal assessment of fetal bovine osteoblast culture differentiation indicates a role for BSP in promoting differentiation. *J Bone Miner Res* **13** ; 620-632 1998.
- 41) Delany, A. M., Dong, Y. and Canalis, E. : Mechanisms of glucocorticoid action in bone cells. *J Cell Biochem* **56** ; 295-302 1994.
- 42) Helvering, L. M., Sharp, R. L., Ou, X. and Geisler, A. G. : Regulation of the promoters for the human bone morphogenetic protein 2 and 4 genes. *Gene* **256** ; 123-138 2000.
- 43) Krishnan, V., Moore, T.L., Ma, Y. L., Helvering, L. M. *et al.* : Parathyroid hormone bone anabolic action requires Cbfa1/Runx2-dependent signaling. *Mol. Endocrinol.* **17** ; 423-435 2003.
- 44) Young, M. F., Kerr, J. M., Ibaraki, K., Heegaard, A. M. *et al.* : Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop* **281** ; 275-294 1992.
- 45) Argov, Z. : Drug-induced myopathies. *Curr Opin Neurol* **13** ; 541-545 2000.
- 46) Ucar, M., Mjorndal, T. and Dahlqvist, R. : HMG-CoA reductase inhibitors and myotoxicity. *Drug Saf* **22** ; 441-457 2000.
- 47) Kaikkonen, J., Nyssonen, K., Tomasi, A., Iannone, A. *et al.* : Antioxidative efficacy of parallel and combined supplementation with coenzyme Q10 and d-alpha-tocopherol in mildly hypercholesterolemic subjects: a randomized placebo-controlled clinical study. *Free Radic Res* **33** ; 329-340 2000.
- 48) Evans, M., Roberts, A. and Rees, A. : The future direction of cholesterol-lowering therapy. *Curr Opin Lipidol* **13** ; 663-669 2002.
- 49) Staal, A., Frith, J. C., French, M. H., Swartz, J. *et al.* : The ability of statine to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity. *J Bone Miner Res* **18** ; 88-96 2003.
- 50) Fisher, J. E., Rodan, G. A. and Reszka, A.A. : In vivo effects of bisphosphonates on the osteoclast mevalonate pathway. *Endocrinology* **141** ; 4793-4796 2000.
- 51) Giuliani, N., Pedrazzoni, M., Negri, G., Passeri, G. *et al.* : Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures *in vitro* and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice *in vivo*. *Bone* **22** ; 455-461.

著者への連絡先：前田豊信，（〒963-8611）郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部口腔生化学講座
Reprint requests : Toyonobu Maeda, Department of Biochemistry, Ohu University, School of Dentistry 31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan