

特 別 寄 稿

“軟骨細胞の増殖と分化をめぐる最近の話題”

鈴 木 不 二 男

大阪大学歯学部生化学教室

1) はじめに

私は最初、赤堀四郎先生の下で有機化学の基礎を学んだ後、須田正己先生および竹田義朗先生の下で酵素化学および代謝調節の研究に従事していたが、歯学部の生化学講座に所属することになったので、骨や歯のような硬組織を相手にして生化学的に見ても興味深い研究ができぬものかと思案を巡らせていた。そこで採りあげたのが骨形成機構に関する生化学的研究であった。1973年頃のことであった。

四肢や脊椎をはじめとして大部分の骨は、最初は無血管組織である軟骨ができた後に血管が侵入して骨に置換する、いわゆる“内軟骨性骨化”という仕組みで形成される。したがってまず軟骨形成の機構を解明することが先決であると考えた。そこでまず、成長軟骨細胞培養系の確立、次いでこの細胞の増殖・分化モデル系の開発を試みた。次にこの系に対する種々の成長因子の作用ならびに軟骨細胞自身が産生する増殖・分化モジュレーターを探索してその構造と機能について解析を試みた。

2) 成長軟骨細胞と骨髄細胞との逐次混合培養系の確立

軟骨は血管が存在しない特殊な結合組織であり、軟骨細胞および軟骨細胞が産生する基質から成り立っている。肋軟骨・骨移行部の切片を

ヘマトキシリン・エオジンで染色し顕微鏡で観察すると、未分化の軟骨細胞層では細胞は小さく、かつ、まばらな状態で存在するが、増殖軟骨細胞層に入ると細胞は扁平化し長軸方向に並ぶ。さらに成熟軟骨細胞層になるにつれて細胞は肥大化し、骨に接した成長軟骨部では、肥大化した細胞が規則正しく柱状に並ぶ。一方、基質産生の面では、増殖軟骨細胞層から成熟軟骨細胞層に移るにつれて活発に軟骨型プロテオグリカン (PG) およびⅡ型コラーゲンなどの軟骨に特異的な基質を合成・分泌する。すなわち、細胞は自らが産生した基質の中に浮かんた状態となる。したがって軟骨細胞では、細胞と基質との相互作用が重要である。さらに骨に接した石灰化軟骨細胞層ではアルカリホスファターゼ活性が誘導されるとともにビタミンD₃受容体が発現する。ここで初めて骨側から幼若赤血球を含んだ骨髄細胞が柱状の軟骨細胞層の間隙に侵入し、最後は骨に置換する。したがって内軟骨性骨形成の機構を解明するためには、まず軟骨細胞の増殖と分化の機構を明らかにすることが先決である。

ラットやウサギの肋軟骨・骨移行部から無菌的に成長軟骨細胞層を分離・培養すると細胞が増殖するにつれてⅡ型コラーゲンや軟骨型PGを産生する。この基質の部分電子顕微鏡で観察するとコラーゲンの繊維とともに電子密度の

Current topics on growth and differentiation of chondrocytes.

Fujio Suzuki

(Department of Biochemistry, Osaka University Dental School, Suita, 565 Japan)

大阪府吹田市山田丘 1-8 (〒565)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 18: 1-9, 1993

高い基質小胞を認めることができた¹⁾。しかし、*in vivo* の骨に近い軟骨基質中に認められる基質小胞のようにリン酸カルシウムの結晶が成長する像は見出せなかった。そこで十分、基質および基質小胞が産生されるまでに成長軟骨細胞を培養しておいた後で、同系のラットの大腿骨から骨髓細胞を分離して混合培養を行うと、基質小胞に付随した結晶状の構造物を認めることができた。この結晶の元素分析を行ったところ、P と Ca のピークが検出された。すなわち、成長軟骨細胞と骨髓細胞との逐次混合培養系を組み立てることにより石灰化まではシミュレートしうることができた。

3) *In vivo* の状態をよく反映する軟骨細胞増殖・分化モデル系の開発

しかし、軟骨細胞単独の系では *in vitro* で石灰化させることが困難であった。そこでウサギ肋軟骨・骨移行部の成長軟骨細胞を分離して、

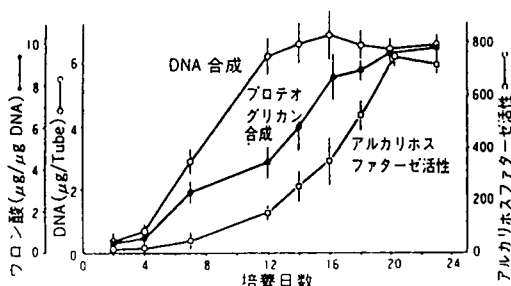


Fig. 1 高密度浮遊培養系における軟骨細胞の増殖・分化のシミュレーション

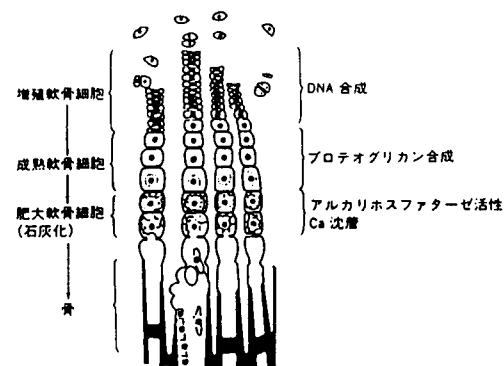


Fig. 2 成長軟骨における増殖・分化のパターン

その細胞懸濁液を 15 ml のプラスチック遠心管に入れて軽く遠心し細胞をペレット状とした後、高密度浮遊培養を行ったところ、約 1 週間後には、軟骨組織様の白い塊が成長することが分かった。この塊の切片を顕微鏡で観察すると、すべての細胞が分化型の球形を呈し、しかも細胞の周囲にはトルイジン・ブルーでメタクロマジアを呈する基質が豊富に存在しており、*in vivo* の軟骨組織像と極めてよく似ていることが分かった。そこで次に DNA 量、ウロン酸量およびアルカリホスファターゼ活性を経日的に測定した結果、Fig. 1 に示すように培養開始 4 日後から DNA 量が上昇し始め、次いでウロン酸量が、最後にアルカリホスファターゼ活性が上昇した。しかもこの 3 者の間には 3~4 日の phase のずれがあること、とくにアルカリホスファターゼ活性は増殖の盛んな時期には低く、増殖が止まりかける頃になってはじめて顕著に上昇し、その活性は *in vivo* のレベルにまで上昇することが明らかとなった²⁾。従来の単層培養法や多層培養法ではアルカリホスファターゼの誘導は極めて低く、この点が高密度浮遊培養法と異なる最も大きな差であった。そこでアリザリン・レッドでカルシウムの存在を調べたところ、培養 1 週間後では全く反応しなかったが、3 週間後には強い赤色の呈色を認めることができた。さらに電子顕微鏡による観察でも基質小胞に付随した石灰化が進行している様子が観察された。また、DNA 合成、プロテオグリカン合成、およびアルカリホスファターゼ活性の 3 者のマーカーが上昇する順序は極めて重要な意味を持っており、増殖軟骨細胞から、基質を多量に産生する成熟軟骨細胞を経て遂には石灰化軟骨細胞にまで分化することにほかならない (Fig. 2)。以上のように軟骨細胞を高密度で浮遊培養を行うと、細胞自身が産生した基質の中で軟骨細胞が増殖し、基質産生、肥大化の過程を経て石灰化の段階にまで誘導しうる、すなわち *in vivo* の成長軟骨部で起こっている現象を、時間的にも空間的にも極めて忠実に再現しうることが分かった。

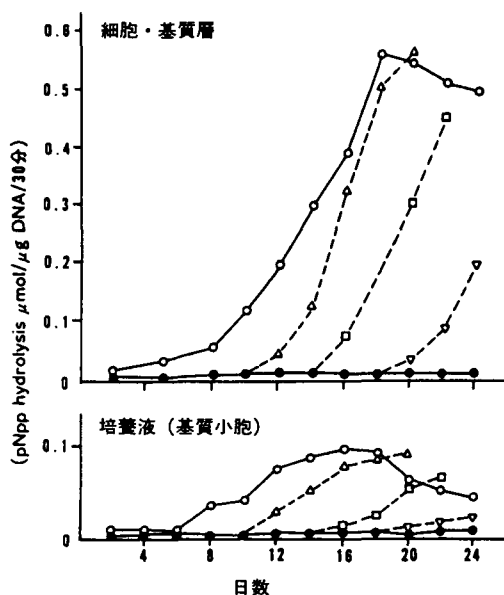


Fig. 3 アルカリホスファターゼの誘導に及ぼす FGF の可逆的な影響
遠心管軟骨細胞培養系に FGF を添加して (●), 10 (△), 14 (□), 18 日目 (▽) より一部の培養系から FGF を除いた。(○) は FGF 無添加の対照群を示す

4) 軟骨細胞の増殖分化モデル系に対する各種成長因子およびホルモンの作用

次に上記モデル系に対する各種成長因子やホルモンの影響を検討した。まず bFGF を添加すると軟骨細胞の増殖および軟寒天培地中でのコロニー形成が強く促進された (Fig. 3)。しかし培養 8 日目あるいは 12 日目に bFGF を添加するとアルカリホスファターゼ活性が顕著に阻害された³⁾。逆に最初から bFGF を添加しておくとアルカリホスファターゼ活性の誘導は認められないが、それを途中で除くと、その時点からアルカリホスファターゼ活性の上昇が見られた。さらに bFGF はアルカリホスファターゼ活性ばかりでなく、カルシウムの取り込みをも可逆的に抑制することが示された。さらに軟骨細胞の II 型コラーゲン合成に対する bFGF の影響を検討した²⁾。³⁵S-メチオニンで標識した軟骨細胞の蛋白質をペプシンで消化するとコラー

ゲンの α 鎖を分離しうる。次いでこの α 鎖の電気泳動を行うと培養 6 日目頃から分子量約 10 万の II 型コラーゲン α 鎖が出現する。さらに培養 12 日目頃から分子量約 7 万の新たなバンドが現われる。これは石灰化軟骨細胞層に特有の X 型コラーゲンの α 鎖であると考えられる。ところが、bFGF を添加した場合には、II 型コラーゲンはそれほど影響を受けないが、石灰化軟骨細胞とともに出現する X 型コラーゲンの発現が強く抑制された。したがって、以上の結果はコラーゲン合成の面からも bFGF が石灰化軟骨細胞への分化、すなわち最終分化を抑制することが確かめられたことを示している。

次に血小板や骨をはじめ軟骨にも多く含まれていることが分かっているトランスフォーミング成長因子 β (TGF β) の作用を検討した。前記モデル系に TGF β を添加すると細胞増殖やウロン酸量にはそれほど大きな影響は見られないが、アルカリホスファターゼ活性およびカルシウム含量が用量依存的に低下した。すなわち、TGF β は軟骨細胞に対して bFGF と同様の作用があることが判明した²⁾。

一方、同じ培養系を用いて副甲状腺ホルモン (PTH) およびカルシトニン (CT) の作用を検討した⁴⁾。従来の培養法ではアルカリホスファターゼの誘導が殆ど起こらなかったため、PTH や CT の作用を調べることが事実上、不可能であった。まず PTH の場合、アルカリホスファターゼ活性および ⁴⁵Ca の取り込みの両者とも強く抑制されたが、途中で PTH を除くと再び両者とも上昇し始めた。ところが、CT では逆に両者とも促進された。骨吸収に対して PTH は阻害的に、CT は促進的に作用することはよく知られた事実であるが、これと同様の現象が軟骨側でも起こっていることが初めて明らかとなった。

5) 各種成長因子およびホルモンの受容体の発現

Fig. 4 は前記モデル系における各種成長因子およびホルモンの受容体の発現を比較検討した

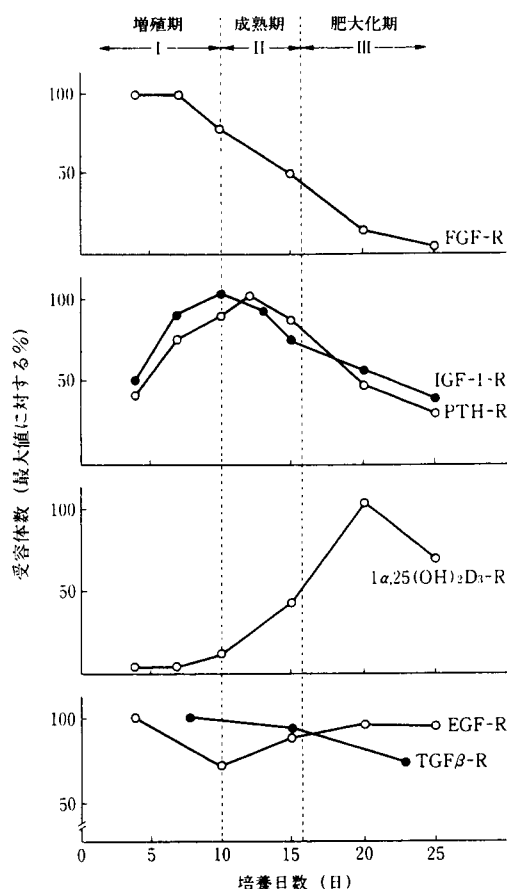


Fig. 4 高密度浮遊培養系での軟骨細胞の分化に伴う増殖因子受容体レベルの変動

ものである⁵⁾。Iは培養開始から10日目まで、すなわち増殖軟骨細胞の時期、IIは培養10日目から16日目まで、成熟軟骨細胞の時期、またIIIは培養16日目から25日目まで、肥大化、石灰化軟骨細胞の時期（最終分化期）を示す。¹²⁵Iで標識したbFGFの軟骨細胞への結合は増殖期にピークがあり、成熟軟骨細胞期には低下し始め石灰化軟骨細胞層に入ると殆ど消失した。またIGF-IおよびPTHの結合は成熟軟骨細胞期にピークがあり、これら両者ともPG合成促進作用があることとよく符合する。活性型ビタミンD₃受容体の発現は石灰化軟骨細胞の時期に最も高くなることが明らかとなった。これに対してEGFやTGFβの受容体の発現は軟骨細胞の分化段階とは関係なく発現することが分

かった。さらに肋軟骨組織の連続スライスを用いた組織レベルでのアルカリホスファターゼ活性、¹²⁵I-bFGFおよび¹²⁵I-PTH結合能を調べた場合においても培養系での結果が再現された。またCTの他、甲状腺ホルモンやインターロイキン-6なども最終分化を促進することが分かっている。これらの事実から前記モデル培養系が*in vivo*における細胞の増殖、分化の過程を時間的にも空間的にも忠実に反映していると結論された。

6) 骨誘導因子 (Bone morphogenetic protein ; BMP) の作用

1965年、Urist⁶⁾は脱灰骨基質を皮下や筋肉内に移植するとその部位に新たな骨が誘導されることを発見し、この未知の因子をBone morphogenetic protein (BMP)と命名した。それ以来、多くの人々がBMPの本体を追究してきたが、やっと最近になってWozneyら⁷⁾が、ヒト骨肉腫細胞からBMP cDNAをクローニングすることに成功し、その一次構造が決定された。その結果、BMP-1は別として、BMP-2からBMP-7はTGFβのスーパーファミリーに属することが明らかになった。我々⁸⁾はコラーゲン・コーポレーション(米国)との共同研究によりBMP-2とBMP-3の混合物が軟骨細胞の増殖、PTH受容体の発現、PG合成の促進、さらにはアルカリホスファターゼ活性の誘導およびカルシウムの取り込みに至る全過程を促進することを見出した。さらに骨芽細胞様細胞株、MC3T3-E1に(BMP-2+BMP-3)を添加すると48～60時間後にc-fosの発現が促進されるが、この現象とオステオカルシンの産生、すなわち骨芽細胞のマーカーの発現との間に密接な関係があることを明らかにした⁹⁾。

7) 軟骨細胞の増殖・分化を制御する Chondromodulin-I (ChM-I)

骨端軟骨や成長軟骨細胞は、その増殖に際して血清中の成長因子の要求性が低く、また軟骨以外の正常組織細胞では、細胞が増殖して

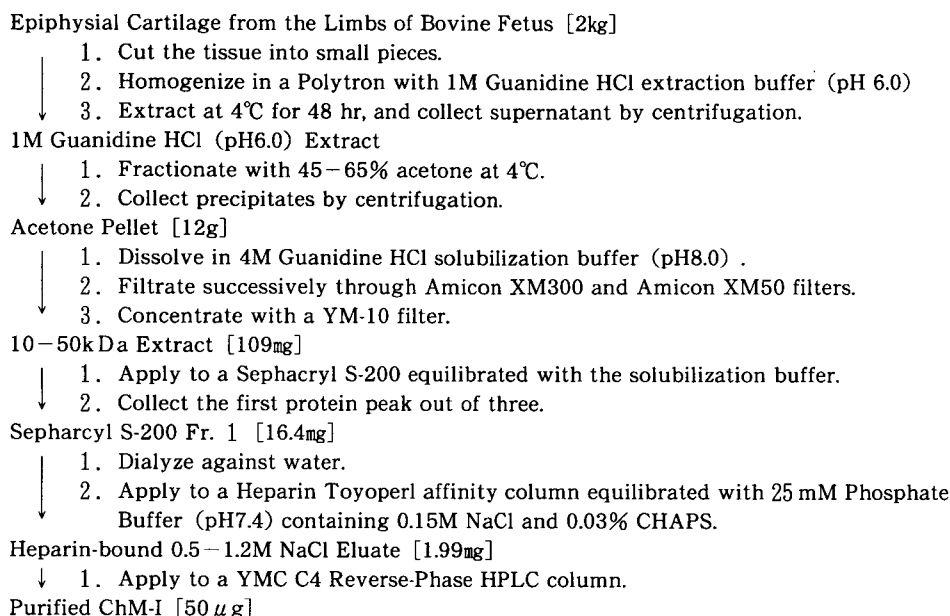


Fig. 5 Chondromodulin-I (ChM-I) の精製過程

confluent に達すると contact inhibition がかかるが、軟骨細胞では正常細胞であっても contact inhibition がかからない。さらに軟寒天培地中で足場がなくてもコロニーを形成する。また軟骨細胞では増殖、成熟、および分化が細胞密度に強く依存するなど、その性質は正常状態であっても腫瘍細胞やトランスフォームした細胞の特徴を備えている。したがって癌細胞が TGFβ を産生するのと同様に、軟骨細胞も自ら増殖因子を産生して周囲の基質中に分泌することが予測された。実際、Klagsbrun ら¹⁰⁾が、ウシ軟骨から強力な増殖因子の精製に成功し、彼等はこれを Cartilage-derived growth factor (CDGF) と名付けたが、その後の研究により、この CDGF は bFGF と同一の分子であることが明らかになった。

一方、我々¹¹⁾は軟骨細胞が産生する PG は PTH, CT, ソマトメジン様因子、あるいは甲状腺ホルモンなどによって促進されることを明らかにしたが、このほかに Dorfman ら¹²⁾によって軟骨細胞自身が産生した細胞外基質によ

て、言わば positive feedback のような機構で PG 合成が促進される可能性が指摘されていた。我々¹³⁾もウシ胎仔軟骨よりウサギ肋軟骨細胞の DNA 合成および PG 合成をともに促進する物質を精製し、これを Cartilage-derived factor (CDF) と名付けた。さらにその後の研究により CDF が bFGF と共存させると軟骨細胞の DNA 合成が相乗的に促進することを明らかにした¹⁴⁾。しかし、大量の出発材料を入手することが困難であったため、その構造を明らかにするには至らなかった。ところが、最近、新鮮なウシ胎仔軟骨を大量に入手する機会に恵まれ、2 kg の軟骨から Fig. 5 に示した精製過程を経て bFGF の作用を相乗的に促進する 50 μg の精製標品を得ることができた。我々はこの有効物質が軟骨細胞の増殖・分化を modulate すること、また軟骨中には同様の活性を示す物質が数種類含まれていることから、この物質を CDF に代わって Chondromodulin-I (ChM-I) と改名した¹⁵⁾。精製した ChM-I を bFGF とともに軟骨細胞培養系に添加すると、1 ~ 200

1	MTENSDKVPIALVGPDDVEFCSPPAYAAVTVKPSSPARLLKVGAVVLISG	50
51	<u>AVLLLLGA</u> IGAFYFWKGSNDHIYNVHYTMSINGKLQDGSMEIDAGNNLET	100
101	FKMGSGAEEAVEVNDNFQNGITGIRFAGGEKCYIKAQVKARIPVGTMTKQ	150
151	SISSELEGKIMPVKYEENSLIWVAGDQPVKDNSFLSSKVLELCGDLPIFW	200
201	LKPTYPKELQRRERRELVRKIVTTTTTRRLRSGPQGTPAPGRPNNGTRPSV	250
251	QEDAEPFNPDPNYHQQEGESMTFDPRLDHEGICCEICRRSYTHCQKICEP	300
301	<u>LGGYHPWPYNYQGCRSACRVIMPCSWWVARILGMV</u>	335

Fig. 6 コンドロモジュリン-I (ChM-I)前駆体のアミノ酸配列

前駆体蛋白質に認められた膜貫通領域を二重下線で、プロセシングシグナル配列を濃い網掛けで、ウシ胎仔軟骨から精製した成熟型ChM-IのN末端アミノ酸配列とそのリジルエンドペプチダーゼ消化断片から決定したアミノ酸配列を下線で、成熟型ChM-Iに含まれるシステイン残基を網掛けで、糖鎖結合部位と推定されるアミノ酸残基は傍点で示した。

ng/mlの間で用量依存的にDNA合成を促進した。さらに同じ濃度で軟寒天中でのコロニー形成も強く促進した。なおChM-Iは単独でも軟骨細胞のDNA合成、コロニー形成およびプロテオグリカン合成を促進した。精製したChM-IはSDS-PAGEで分子量約25 kDの幅広いバンドを示すので糖蛋白質であると思われる。

そこで精製したChM-IのN末端28残基のアミノ酸配列およびリジルエンドペプチダーゼ消化断片21残基のN末端アミノ酸配列を基にしてオリゴヌクレオチド・プライマーを合成し、ウシ胎仔骨端軟骨cDNAテンプレートからPCR法によりChM-I cDNA断片を増幅しサブクローニングした。このDNA断片をプ

ロープにしてウシ胎仔骨端軟骨 polyRNA をノーザンブロットによりChM-I mRNAを検索した。その結果、骨端軟骨細胞は約1.7 kbの単一ChM-I mRNAを発現していることが明らかとなった。次に各種のウシ胎仔組織および成牛組織からtotal cellular RNAを調製し、ノーザンブロットを行ったところ、ChM-I mRNAの発現は現在までに調べた限りでは、軟骨に特異的であった。次にλgt 10に組み込んだウシ胎仔骨端軟骨cDNAライブラリーをスクリーニングして、ChM-I前駆体cDNAをクローニングした¹⁵⁾。その結果ChM-I前駆体は335個のアミノ酸残基から成り、そのC末端部に121個のアミノ酸残基から成る成熟ChM-Iがコードされていることが分かった(Fig. 6)。なお9番目と22番目のスレオニン残基にO-グリコシドとして、また30番目のアスパラギン残基にN-グリコシドとして、それぞれ糖鎖が結合しているものと推定される。ChM-I前駆体にはN末端リーダー配列は存在しないが、そのN末端付近にはバリン、ロイシン、イソロイシンを多く含む疎水性の27残基から成る膜貫通領域があり、また成熟ChM-IのN末端の直前にはRERRのプロセッシング

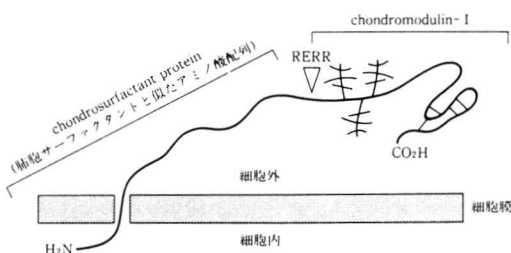


Fig. 7 ChM-I 前駆体の構造模式図

グ・シグナルが存在するので、ChM-I 前駆体が膜蛋白質として合成された後に、成熟型として切り出されて基質中に分泌されるものと推定される (Fig. 7)。ChM-I cDNA を COS 細胞に発現させるとウェスタン・ブロットにより ChM-I とほぼ等しい分子量の幅広いバンドを示す産物が、その培養上清中に回収された。Hydropathy 解析の結果、糖鎖結合部位を含む成熟 ChM-I の N 末端側は親水性ドメインであるが、8 個のシステイン残基を含む C 末端側は逆に疎水性ドメインである。成熟 ChM-I と相同性を示すアミノ酸配列は見い出されていないので、これは新規糖蛋白質であると言えるが、成熟 ChM-I が切り出された後に軟骨細胞膜に留まると思われる前駆体の N 末端側約 2/3 の部分は、肺胞 type II 細胞が特異的に産生する Surfactant apoprotein C と高い類似性を示すことが分かった。これは全く予想していなかった事実であるが、Surfactant apoprotein C は分娩時に胎児の肺で産生される界面活性作用を示す蛋白質であることから、軟骨細胞の膜表面に残る ChM-I 前駆体の N 末端側も何らかの生理作用を発現している可能性があると考えられるので、我々はこの部分を Chondrosurfactant protein (Ch-SP) と命名した¹⁵⁾。

8) ChM-I の Angiomodulin (Angioinhibin) 作用

軟骨に豊富に存在している bFGF は、最も強力な血管新生因子であるとされている。しかし、それにも拘わらず何故、軟骨には血管が存在しないのかが大きな疑問であった。これは従来、Folkman が指摘していたように、軟骨には血管新生阻害因子が存在するためであろうと考えられてきた。我々もウシ胎仔軟骨あるいはヒト軟骨肉腫細胞株から軟骨由来抗腫瘍因子 (Cartilage-derived antitumor factor; CATF) を部分精製しているが、その構造は未だに明らかになっていない。そこで、血管内皮細胞増殖阻害活性を示す軟骨抽出物の 100 ~ 300 kD 画分と 10 ~ 50 kD 画分から、血管内皮細胞の

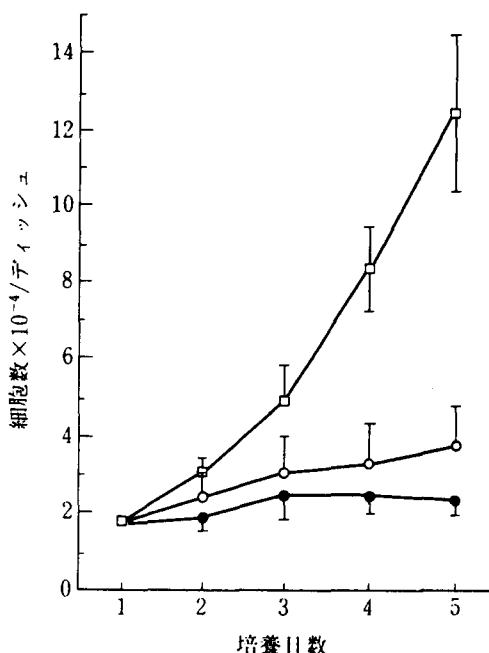


Fig. 8 ChM-I による血管内皮細胞の増殖阻害作用
IV型コラーゲンでコートした 35mm ディッシュにウシ脳より分離した毛細血管内皮細胞を播種し、細胞がディッシュに接着したことを確認した後、
□ 0.1% BAS を含む PSB 溶液
○ ChM-I, 200ng/ml
または ● ChM-I, 1μg/ml を添加した 10% ウシ胎仔血清を含む RPMI1640 培地に交換して 5 日間培養を続けた。

Table 1 ウシ胎仔尾骨・骨端軟骨における bFGF と ChM-I の発現

骨端近傍の各部位	bFGF		ChM-I	
	mRNA	蛋白質	mRNA	蛋白質
zone I (軟骨に接した表層)	+	±	-	-
II (静止軟骨細胞層)	+	±	+	+
III (増殖軟骨細胞)	+	+	±	+
VI (肥大軟骨細胞)	±	+	±	+
V (石灰化軟骨細胞層)	±	+	-	±
骨(骨芽細胞など)	+	±	-	-

DNA 合成阻害活性を指標として活性因子の精製を試みた。その結果、この増殖阻害活性はヘパリンに結合し、0.5 ~ 1.2 M NaCl でヘパリンカラムから溶出すること、また、いずれから出発しても活性因子の見かけの分子量は低分子化

し、15～30 kD 画分に回収された。さらに逆相 HPLC で精製したところ、活性因子は、ChM-I そのものであることが分かった。そこで精製した ChM-I について血管内皮細胞増殖阻害作用を検討したところ、ChM-I 自身がウシ頸動脈血管内皮細胞の DNA 合成およびウシ脳毛細血管内皮細胞の増殖を阻害することが確かめられた (Fig. 8)。その上、コラーゲンゲルを用いたサンドイッチ法により ChM-I が血管内皮細胞による管腔形成をも疎外することが明らかとなった。したがって ChM-I 自身が Chondromodulin 作用と Angiomodulin (Angiostatin) 作用を発現しているものと思われる。そこで次に ChM-I の発現をウシ胎仔尾骨を材料として検討した。Table 1 に示すように in situ ハイブリッド形式法によると ChM-I mRNA の発現は軟骨組織に特異的に認められ、骨化中心に向かって配列する静止軟骨細胞層 (zone II)、増殖軟骨細胞層 (zone III)、肥大軟骨細胞層 (zone IV) にかけて ChM-I mRNA の発現が増強されていた。しかし静止軟骨細胞層の外側に隣接する扁平な未分化間葉系細胞層 (zone I) や軟骨膜およびその周囲の筋組織や骨組織には全く発現していなかった。内軟骨性骨化においては zone II から zone IV にかけては血管は存在しないが、石灰化が始まる zone V では血管が侵入し、未分化な細胞から骨芽細胞や破骨細胞が分化して最終的には軟骨から骨に置換する。ところが、zone V では ChM-I mRNA の発現が消失していた。また抗 ChM-I ペプチド抗体を用いて免疫組織染色を行ったところ、ChM-I mRNA の発現と一致したパターンがえられた。ところが最も強力な血管新生因子である bFGF は、軟骨ばかりではなく筋組織や骨組織にも広く発現し、zone V での消失は認められなかった (Table 1)。これらの結果は、強力な血管新生因子である bFGF が豊富に存在するにも拘わらず、何故軟骨には血管が存在しないのかという疑問に初めて答えうるものと思われる。

ヒト軟骨肉腫細胞株からの血管新生阻害因子の精製には未だ成功していないが、この細胞株

を利用することによりヒト型の有効因子がえられることが期待される。今回、別個のプロジェクトとして進行してきた ChM-I が血管新生阻害作用を発現する作用を兼ね備えていることが明らかになった。その阻害活性は数 nM から 10 nM で最大となり、現在知られている血管新生阻害因子としては最も強力であり、また Natural inhibitor として発見された最初の因子であると言える。今後は、ChM-I の in vivo における抗腫瘍作用についての解析を進めたい。

以上の研究は加藤幸夫教授 (現在、広島大学教授) および開 祐司講師らをはじめとする多くの若い方々との共同で行ったものである。また文部省科学研究費、持田記念医学薬学振興財団、興和生命科学振興財団、三菱財団、千里タイフサイエンス振興財団および上原記念生命科学財団等からのご援助により行われた。ここに併せて感謝の意を表する次第である。

文 献

- 1) F. Suzuki, T. Takase, M. Takigawa, A. Uchida & Y. Shimomura : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 : 2368 - 2372, 1981.
- 2) Y. Kato, M. Iwamoto, T. Koike, F. Suzuki & Y. Takano : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 : 9552 - 9556, 1988.
- 3) Y. Kato & M. Iwamoto : *J. Biol. Chem.*, 265 : 5903 - 5909, 1990.
- 4) Y. Kato, A. Shimazu, K. Nakashima, F. Suzuki, A. Jikko & Y. Kato : *Endocrinology*, 127 : 114 - 118, 1990.
- 5) M. Iwamoto, A. Shimazu, K. Nakashima, F. Suzuki & Y. Kato : *J. Biol. Chem.*, 266 : 461 - 467 : 1991.
- 6) M. R. Urist : *Science*, 150 : 893 - 899, 1965.
- 7) J. M. Wozney, V. Rosen, A. J. Celeste, L. M. Mitsock, M. J. Whitters, R. W. Kriz, R. M. Hewick & E. A. Wang : *Science*, 242 : 1528 - 1534, 1988.
- 8) Y. Hiraki, H. Inoue, C. Shigeno, Y. Sanma, H. Bentz, D. M. Rosen, A. Asada & F. Suzuki : *J. Bone Mineral Res.*, 6 : 1373 - 1385, 1991.
- 9) S. Ohta, Y. Hiraki, C. Shigeno, F. Suzuki, R. Kasai, T. Ikeda, H. Kohno, K. Lee, H. Kikuchi, J. Konishi, H. Bentz, D. M. Rosen & T. Yamamuro : *FEBS Lett.*, 314 : 356 - 360, 1992.
- 10) R. Sullivan & M. Klagsbrun : *J. Biol. Chem.*, 260 : 2399 - 2403, 1985.
- 11) F. Suzuki, T. Yoneda & Y. Shimomura : *FEBS Lett.*, 70 : 155 - 158, 1976.

- 12) Z. Nevo & A. Dorfman : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69 : 2069 - 2072, 1972.
- 13) Y. Kato, Y. Nomura, M. Tsuji, M. Kinoshita, H. Ohmae & F. Suzuki : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 : 6831 - 6835, 1981.
- 14) Y. Hiraki, Y. Kato, H. Inoue & F. Suzuki : *Eur. J. Biochem.*, 158 : 333 - 337, 1986.
- 15) Y. Hiraki, H. Tanaka, H. Inoue, J. Kondo, A. Kamizono & F. Suzuki : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 175 : 971 - 977, 1991.