
平成10年度

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

軟骨・骨の加齢変化とホルモン・サイトカインによる
組織修復能の再活性化

研 究 報 告 書

主任研究者 池 田 恭 治

平成10年度
厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
研 究 報 告 書

軟骨・骨の加齢変化とホルモン・サイトカインによる
組織修復能の再活性化

平成11年3月

主任研究者 池田 恭治

平成10年度 研究報告書 目次

1. 総括研究報告書	1
軟骨・骨の加齢変化とホルモン・サイトカインによる 組織修復能の再活性化	2
国立長寿医療研究センター 老年病研究部 部長	池田 恭治
2. 分担研究報告書	14
① ホルモン型ビタミンDによる骨修復能の活性化	15
国立長寿医療研究センター 老年病研究部 部長	池田 恭治
② ホルモン・サイトカインによる軟骨修復能の活性化	20
京都大学再生医科学研究所 生体分子設計学分野 教授	開 祐司
③ 骨特異的なエストロゲン作用の分子メカニズム	26
東京大学分子細胞生物学研究所 分子系統分野 教授	加藤 茂明
④ 新規老化抑制遺伝子 (<i>klotho</i>) 欠損マウスにおける 骨粗鬆化の解析	31
東京大学医学部 整形外科学教室 講師	川口 浩

1. 總 括 研 究 報 告 書

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

軟骨・骨の加齢変化とホルモン・サイトカインによる
組織修復能の再活性化

主任研究者 池田恭治（長寿医療研究センター 老年病研究部長）

研究要旨

軟骨の分化進行が、BMP と PTH/PTHrP シグナルの正負のバランスによって制御されていることを明らかにした。骨粗鬆症モデルラットにおいてホルモン型ビタミン D が、骨吸収を抑制し骨形成を促進する効果を、血清カルシウム作用とは独立に発揮することを見いだした。エストロゲンの骨特異的作用に関与する可能性がある受容体 AF-1 領域にリン酸化依存的に結合する転写共役因子を同定した。老年病モデルマウス *klotho* の骨粗鬆化に骨髄中のプレ B 細胞の減少が関与すること、ヒト *klotho* 遺伝子座のマイクロサテライト多型が加齢に伴う骨粗鬆化と相関することを明らかにした。以上から、ホルモン・サイトカインの作用を活かして軟骨・骨の組織再生能力を賦活化する治療への道が開かれ、*klotho* はこのコンセプトを検証する絶好のモデルを提供することが示された。

池田 恭治 長寿医療研究センター
老年病研究部
部長

川口 浩 東京大学医学部
整形外科学講座
講師

開 祐司 京都大学再生医科学研究所
生体分子設計学分野
教授

加藤 茂明 東京大学分子細胞生物学
研究所
分子系統分野
教授

A. 研究目的

軟骨・骨の退行性変化を基盤として発病する変形性関節症・骨粗鬆症は、高齢者の日常生活を制限し、寝たきりにつながる重要な疾患であるが、薬物治療は未だ確立されていない。本研究では、これらの疾病が、軟骨・骨の修復能の低下に起因するという発想に基づき、ホルモン・サイトカインに

よって自己の再生・修復能力を活性化することによって独自の予防・治療法の開発を企図した。

初年度は、サイトカインによる関節軟骨の修復、加齢に伴う過剰な骨吸収を抑制する全身性因子 OPG/OCIF、閉経後女性のみならず男性の骨維持にも中心的な役割を担うエストロゲンの第二の受容体、多様な老年病症状候群を呈するモデル動物 *klotho* における老人性骨粗鬆症の病態解明など大きな研究成果を挙げた。

本年度はこれらの成果をさらに推し進める形で、より質の高い関節軟骨再生方法の開発をめざして、*in vitro* および *in vivo* の実験系を用い、副甲状腺ホルモンと BMP による軟骨分化の制御機構を解析した。また、骨組織修復能の活性化を図るために、エストロゲンとホルモン型ビタミン D に焦点を絞り、骨リモデリングに及ぼす影響と骨作用の分子メカニズムについて検討した。老化のモデルとして注目される *klotho* マウスの骨粗鬆化のメカニズムをさらに掘り下げるとともに、ヒト *klotho* 遺伝子多型と骨粗鬆症との関連についても臨床的調査研究を行った。

B. 研究方法

1. ホルモンによる骨組織修復能の活性化

ビタミン D の骨作用と血清カルシウム上昇作用との関連を詳細に解析するために、閉経後骨粗鬆症の実験モデルである卵巣摘除ラットに、ビタミン D そのもの (cholecalciferol) あるいは体内でホルモン型ビタミン D に変換される alfacalcidol

を3カ月間経口投与し、血清カルシウム、尿中カルシウム排泄、腰椎および大腿骨における骨密度 (BMD)、腰椎 (海綿骨優位) および大腿骨骨幹部 (皮質骨優位) における骨強度を測定した。

同じく卵巣摘除したラットに、alfacalcidol あるいは 17β -estradiol を3カ月投与し、骨吸収および骨形成過程に及ぼす作用を、それぞれの生化学マーカーである尿中デオキシピリジノリン排泄と血清オステオカルシン、さらには骨形態計測法を用いて解析した。

閉経後骨粗鬆症患者において、我々がすでに同定している TGF- β 1 の多型と活性型ビタミン D あるいはホルモン補充療法の治療効果との相関を解析した。

エストロゲン受容体 (ER) α , ER β の全長および各種欠失変異体をコードする発現ベクターを培養動物細胞に Ca-Pi 法にて導入し、CAT や β -gal 遺伝子を reporter として、レセプターの転写促進能を評価した。また転写共役因子の効果も同様な手法で調べた。*In vitro* での転写共役因子との結合は大腸菌内で発現させた組み換えタンパクをプローブにした GST-pull down assay で行った。

2. ホルモン・サイトカインによる軟骨分化の制御機構

マウス胚性腫瘍由来 ATDC5 細胞培養系を用いて、軟骨分化を制御する増殖分化因子シグナルネットワークを解析するために、Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)、Transforming Growth Factor- β (TGF- β)、

Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2)、Parathyroid Hormone(1-34) (PTH(1-34))などの増殖分化因子を添加して、細胞増殖に対する作用と軟骨初期分化誘導に対する作用を評価した。さらに、同様の条件にて軟骨結節の増殖が停止するまで 21 日間培養した後に、上記の各種増殖分化因子を添加して、軟骨後期分化誘導に対する作用も検討した。

成熟ウサギの大腿骨膝蓋窩に軟骨下骨に達する関節軟骨全層欠損を作成して、軟骨初期分化に対する PTH/PTHrP シグナルの作用を検討した。成熟家兎の大腿骨膝蓋窩表面から電気ドリルで深さ 4 mm の円柱状の穴を開けて軟骨下骨に達する関節軟骨全層欠損を作成した。直径が 3 mm 以下の欠損では、欠損内に遊走した未分化細胞は 2 週間ほどで軟骨細胞に分化して、欠損深部から骨に置換されていく。ところが直径が 5 mm を超える欠損では軟骨分化が誘導されない。従って、欠損部は線維性組織で充填されるが、軟骨形成はおこらない。

本研究では、オスモティックポンプを使って欠損部中央から recombinant human PTH(1-84) (25 ng/hr)を持続的に注入した。欠損部の組織修復を safranin-O 染色により組織化学的に検索した。欠損部内に遊走する未分化細胞の細胞増殖動態を免疫組織学的に Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)を経時的に検出することにより評価した。また、修復組織に遊走した細胞の PTH 応答能を抗 PTH/PTHrP 受容体抗体を用いた免疫組織染色により評価した。

3. *Klotho* 遺伝子と骨・軟骨の老化

5-7 週齢の *klotho* マウスと野生型マウスで骨髄、末梢血、脾臓での有核細胞数を計測後、特異的表面抗原として B220 (Bリンパ球)、Gr-1 (顆粒球)、CD3 (Tリンパ球)、TER119 (赤芽球)、F4/80 (マクロファージ) の抗体を用いフローサイトメトリーで細胞分画を調べた。さらに B220 陽性細胞の分化程度を検討するため細胞膜上 IgM μ 鎖の抗体を用いた 2 カラー分析を行った。

閉経後非血縁日本人女性 377 例 (41~91 歳、平均年齢 65.6 歳) を対象に、マイクロサテライト法によって CA 反復配列数の解析を行い、末梢白血球から抽出した DNA 遺伝子型と、閉経後年代別での骨密度 (腰椎 L2-4 および全身骨密度の Z-score) との関連につき解析した。

C. 研究結果と考察

1. エストロゲンとホルモン型ビタミン D による骨組織修復能の活性化

卵巣摘除によって減少した骨量 (BMD) を、高カルシウム血症を惹起しない量の活性型ビタミン D は、用量依存的に回復させた。一方、ビタミン D そのものは、高カルシウム血症を起こすほど高用量を投与した場合にのみ、有意な BMD 増加作用が観察された。以上の結果を、横軸に血清カルシウム、縦軸に BMD の二次元プロットを行って解析すると、同程度の血清カルシウム上昇効果において、活性型ビタミン D はビタミン D よりも有意に強い BMD 増加作用を示すことが明らかになった。すな

わち、活性型ビタミン D の骨粗鬆症治療作用の少なくとも一部は血清カルシウムの上昇とは独立に発揮されることが示された。

活性型ビタミン D は尿中デオキシピリジノリン排泄を抑制し、この骨吸収抑制作用は、骨形態計測法による骨吸収面および破骨細胞数の低下によっても確認された。活性型ビタミン D の骨吸収抑制作用は、同じ血清カルシウム値で比較した場合、ビタミン D よりも有意に強かった。

代表的な骨吸収抑制薬であるエストロゲンと比較したところ、エストロゲンが骨吸収とともに骨形成をも用量依存的にかつ著名に抑制したのに対して、活性型ビタミン D は、血清オステオカルシン濃度および骨形態計測における骨形成速度 (BFR) などの骨形成の指標を維持もしくは促進した。

閉経後骨粗鬆症患者のなかでも、TGF- β 1 遺伝子の CC genotype を有するグループが TT、TC 群より有意に活性型ビタミン D に対して BMD が増加することが明らかとなった。

転写共役因子群のエストロゲン受容体 AF-1 に対する関与を調べたところ、SRC-1(ERAP 160)、TIF は関係無く、CBP/P300 が効率よく転写促進能を亢進することがわかった。しかし AF-1 機能の MAP kinase によるリン酸化により調節には CBP/P300 は関与しなかった。そこでリン酸化依存的に結合する核内因子を検索したところ、分子量約 68000 の蛋白を見出した。この因子 (p68) の性状と、AF-1 及び AF-2 に対する効果を調べているところである。今後骨組織での機能、および病態との関連を

探る予定である。

2. ホルモン・サイトカインによる軟骨分化の制御機構

コンフルエントに達して増殖を停止した未分化 ATDC5 細胞培養系の DNA 合成は、FGF-2 によって促進された。これに対応して培養系の saturation cell density は上昇したが、軟骨初期分化の「場」となる細胞凝集領域の形成は認められなかった。また、type II collagen mRNA の発現誘導も認められなかった。IGF-I は、DNA 合成を FGF-2 よりも弱いものの有意に促進した。IGF-I の添加により培養系内に細胞凝集領域の形成が認められた。しかし、type II collagen mRNA の発現誘導は直接には促進されず、IGF-I は軟骨前駆細胞に対する直接の分化促進因子として作用しているのではなく、細胞凝集領域の形成に作用していることが明らかとなった。

これに対して、BMP-2 は培養系の DNA 合成には促進的にも抑制的にも作用しなかった。しかし、type II collagen mRNA の発現は特異的に誘導され、培養系に軟骨分化が誘導されたことは細胞形態からも確認できた。すなわち、至適濃度の BMP-2 は、細胞凝集領域の形成を経ることなく軟骨前駆細胞の初期分化を促進する分化因子の作用を発現した。ATDC5 細胞は内因性の BMP-4 を未分化段階から発現しているため、BMP-2/-4 が autocrine/paracrine 形式の分化シグナルとなっていることが示唆された。TGF- β も、培養系の DNA 合成に影響を及ぼすことがなく、type II collagen

mRNA の発現も誘導した。しかし、細胞形態は紡錘形の線維芽細胞様に変化して、特異的な軟骨基質形成は認められなかった。このことは、TGF- β が BMP とは異なり軟骨初期分化因子として機能していないことを示していた。一方、TGF- β と FGF-2 は相乗的に軟骨前駆細胞の増殖を促進した。

PTH(1-34)は、細胞凝集領域の形成と共に発現する PTH/PTHrP 受容体を介して、軟骨分化に負のシグナルを伝達すると推測されている。これに対応して、PTH(1-34)は未分化 ATDC5 細胞の増殖ならびに細胞形態に影響を与えなかった。

初期軟骨分化により形成された軟骨結節の成長が終了する培養 21 日目の ATDC5 細胞培養系に対する各増殖分化因子の作用を検討したところ、BMP-2 は、軟骨後期分化マーカーである type X collagen mRNA の発現、ALP 活性の亢進のみならず、形成された軟骨基質の石灰化をも強力に促進した。これに対して、TGF- β はそのいずれの指標によっても抑制的に作用することが判明した。すなわち、BMP は軟骨後期分化の促進シグナルとなっているのに対して TGF- β は抑制シグナルとなっていた。一方、PTH(1-34)は評価した全ての後期分化マーカーの発現を阻害した。IGF-I は、ATDC5 細胞の軟骨後期分化の進展には作用を及ぼさなかった。

ウサギ大腿骨膝蓋窩に作成した関節軟骨全層欠損は、関節軟骨の自然治癒が誘導される直径 3 mm の系における修復組織の PCNA 陽性細胞率は $58.8 \pm 10.6\%$ と高値を示したのに対して、軟骨修復が誘導され

ない直径 5 mm の欠損においては $14.8 \pm 3.0\%$ と有意に低値を示した。直径 5 mm の欠損においても FGF-2 の投与により軟骨修復が誘導される実験条件では、PCNA 陽性細胞率は直径 3 mm の欠損と同様の高値を示した。すなわち、関節軟骨全層欠損における軟骨組織修復能は、欠損分に遊走する軟骨組織幹細胞の旺盛な増殖能の維持と相関することが明らかとなった。

これに対して、軟骨の自然修復が誘導されるはずの直径 3 mm の欠損であっても、PTH を投与すると修復組織内における軟骨分化誘導が著明に阻害されることが明らかとなった。このとき、修復組織の PCNA 陽性細胞率は $60.3 \pm 4.9\%$ と高値を示し、修復組織の細胞密度もコントロール群のそれと同様であった。これらの結果は、PTH/PTHrP シグナルが *in vivo* においても軟骨初期分化に対して負の制御作用を表すことを示唆している。また、その作用機序は、軟骨幹細胞の増殖抑制ではなく幹細胞の初期分化誘導そのものの抑制に基づいていることを示していた。

さらに、PTH/PTHrP 受容体の免疫組織学的検索により、修復組織内に遊走した未分化細胞は明らかに PTH/PTHrP 受容体を発現していた。このことは、胎生期にみられる軟骨多段階分化モデルの上では、細胞凝集領域の形成に伴って出現する PTH/PTHrP 応答性の軟骨前駆細胞が欠損分の修復組織を構成していることを示唆している。PTH 投与により軟骨分化が阻害されると欠損部は、4 週後までに PTH/PTHrP 受容体陰性の繊維組織により

充填された。

3. *Klotho* 遺伝子と骨・軟骨の老化

Klotho マウスの骨髄においては野生型マウスに比べて全有核細胞数が約 1/2、末梢血、脾臓において約 1/6 に減少していた。*Klotho* マウスの骨髄での全有核細胞にしめる各細胞の割合は野生型マウスに比べて、B220 陽性細胞が約 1/3 に減少 ($P < 0.001$)、Gr-1 陽性細胞は軽度増加、CD3 陽性細胞、TER119 陽性細胞は共に増加 ($P < 0.05$)、F4/80 陽性細胞には変化なかった。さらに B220 陽性細胞の分化程度を検討するため細胞膜上 IgM μ 鎖の抗体を用いた 2 カラー分析を行ったところ、B リンパ球のうち特に未分化な pre-B リンパ球の割合が減少していることが分かった。末梢血、脾臓でも同様に *klotho* マウスでは B リンパ球の減少と顆粒球の軽度の増加が認められた。

閉経後女性 377 例における *klotho* 遺伝子座マイクロサテライト多型によって CA 反復配列数の解析を行い、末梢白血球から抽出した DNA 遺伝子型と、閉経後年代別の骨密度 (腰椎 L2-4 および全身骨密度の Z-score) との関連につき解析した。CA 反復配列数は 10 種類認められ、各反復配列数の頻度は、2 が 143 例 (25%)、4 が 261 例 (45%)、5 が 40 例 (7%)、7 が 7 例 (1%)、10 が 16 例 (3%)、11 が 39 例 (7%)、12 が 23 例 (4%)、13 が 30 例 (5%)、14 が 13 例 (2%)、15 が 3 例 (0.7%) であった。閉経後 5 年未満の症例 (61 例) および閉経後 10 年未満の症例 (131 例) に

おいては *klotho* 遺伝子座多型と骨密度の間には有意な相関は認められなかった。しかしながら、閉経後 10 年以上経過した症例 (246 例) では、CA 反復配列数 10 の allele を有する群で腰椎骨密度 (L2-4 Z score) が他の群に対して有意に低かった (+; -0.607, -; 0.250, $p = 0.048$)。また、閉経後 20 年以上経過した対象群 (102 例) では、同 allele を有する群で、L2-4 Z score は有意に低く (+; -868, -; 0.355, $p = 0.029$)、10 年後の群より差が大きくなった。一方、閉経後 20 年以上経過した症例 (102 例) では、CA 反復配列数 12 を有する遺伝子型でも骨密度との相関が見られ、同遺伝子型を有する群の L2-4 Z score および全身骨密度 (total Z score) とともに有意に他の群よりも高値を示した (L2-4 Z score; +: 1.146, -: 0.220, $p = 0.048$ および total Z score; +: 1.04, -: 0.201, $p = 0.026$)。以上より、老化に伴う骨密度減少の背景に、老化関連遺伝子 *klotho* の関与が存在する可能性が示唆された。

D. 結論

In vitro の多段階軟骨分化系およびウサギの関節軟骨全層欠損モデルを駆使して、軟骨の初期および後期分化の進行が、BMP と PTH/PTHrP シグナルの正負のバランスによって制御されていることを明らかにした。軟骨分化制御の実体解明に一步近づき、従来不可能とされてきた軟骨再生能力の再活性化への道が開かれた。

エストロゲン受容体の AF-1 領域にリン酸化依存的に結合する転写共役因子の同定

に成功し、骨特異的なエストロゲン作用の分子メカニズムを解明する大きな手がかりが得られた。

ホルモン型ビタミン D が、閉経後骨粗鬆症など骨代謝回転が高まった病態では、骨吸収を抑制し骨形成を促進するとの、修復能力賦活化に適した薬効を発揮することを明らかにした。Klotho マウスの骨髄の解析から、骨の粗鬆化にプレ B 細胞の減少が関与すること、ヒト klotho 遺伝子の多型が老人性骨粗鬆症の遺伝的マーカーになる可能性を見いだした。

E. 研究発表

主任研究者

1. 論文発表

- ① Shira-ishi A, et al: The advantage of alfacalcidol over vitamin D in the treatment of osteoporosis. *Calcif Tissue Int*, 1999 in press
- ② Shira-ishi A, et al: Alfacalcidol inhibits bone resorption and stimulates formation in an ovariectomized rat model of osteoporosis: distinct actions from estrogen. Submitted
- ③ Yamada Y, et al: Association of a polymorphism of the transforming growth factor- β 1 with genetic susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res* 13: 1569-1576, 1998

- ④ Yamada Y, et al: TGF- β 1 gene polymorphism and bone mineral density in Japanese adolescents. *Am J Med*, 1999 in press

2. 学会発表

- ① Ikeda K, et al: Satellite Symposium "Alfacalcidol- New Aspects of a Physiological Therapy" in European Congress on Osteoporosis, Berlin, September 14, 1998

分担研究者

関 祐司

1. 論文発表

- ① C. Shukunami, Y. Ohta, et al.: Sequential progression of the differentiation program by bone morphogenetic protein-2 in chondrogenic cell line ATDC5, *Exp. Cell Res.*, 241: 1-11, 1998.
- ② C. Shukunami, Y. Hiraki: Expression of the cartilage-specific functional matrix chondromodulin-I mRNA in rabbit growth plate chondrocytes, and its responsiveness to growth stimuli in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249: 885-890, 1998.
- ③ S. Kudo, H. Mizuta, et al: Inhibition of chondrogenesis by parathyroid hormone in vivo during repair of full-thickness defects of articular cartilage,

投稿中, 1999

2. 学会発表

- ① 宿南知佐、猪山賢一他、Chondromodulin-I の内軟骨性骨形成における役割、日本発生生物学会第31回大会、1998
- ② 工藤智志、水田博志他、関節軟骨全層欠損の修復過程に及ぼす PTH の影響、第13回日本整形外科学会基礎学術集会、1998
- ③ 水田博志、工藤智志他、関節軟骨修復過程における細胞増殖に関する免疫組織学的検討、第13回日本整形外科学会基礎学術集会、1998
- ④ 光井かおり、高野貴晴他、組換えヒト Chondromodulin-I の CHO 細胞による生産およびその血管新生抑制作用、第71回日本生化学会大会、1998

加藤茂明

1. 論文発表

- ① Sekine, K., Ohuchi, H., Fujiwara, M., Yamasaki, M., Yoshizawa, T., Sato, T., Yagishita, N., Matsui, D., Koga, Y., Itoh, N., Kato, S.: FGF10 is essential for the limb and lung formation. *Nature Genetics*, 21, 138-141, 1999.
- ② Takeyama, K., Masuhiro, Y., Fuse, H., Endoh, H., Murayama, A., Kitanaka, S.,

Suzawa, M., Yanagisawa, J., Kato, S.: Selective interaction of vitamin D receptor with transcriptional coactivators by a vitamin D analog. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 1049-1055, 1999

- ③ Yanagisawa, J., Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Suzawa, M., Toriyabe, T., Kashiwagi, K., Watanabe, M., Kawabata, M., Miyazono, K., Kato, S.: Convergence of TGF β and vitamin D signaling pathways on SMAD proteins acting as common transcriptional co-activators. *Science*, 283, 1317-1321, 1999.
- ④ Sasaki-Iwaoka, H., Maruyama, K., Endoh, H., Komori, T., Kato, S., Kawashima, H.: A trans-acting enhancer modulates estrogen-mediated transcription of reporter genes in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.*, 1999 (in press).
- ⑤ Kato, S., Sekine, K., Matsumoto, T., Yoshizawa, T.: In vivo function of VDR in gene expression-VDR knock-out mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1999 (in press).
- ⑥ Takeda, S., Yoshizawa, T., Nagai, Y., Yamato, H., Fukumoto, S., Sekine, K., Kato, S., Matsumoto, T., Fujita, T.: Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D requires its

- binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells: Studies using VDR knockout mice. *Endocrinology*, 140, 1005-1008, 1999.
- ⑦ Kato, S., Kitamoto, T., Masuhiro, Y., Yanagisawa, J.: Molecular mechanism of a cross-talk between estrogen and growth factors signaling pathways. *Oncology*, 55 (suppl 1), 5-10, 1998.
- ⑧ Kitanaka, S., Takeyama, K., Murayama, A., Sato, T., Okumura, K., Nogami, M., Hasegawa, Y., Niimi, H., Yanagisawa, J., Tanaka, T., Kato, S.: Inactivating mutations in the human 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene in patients with pseudovitamin D-deficient rickets. *N. Engl. J. Med.*, 338, 653-661, 1998.
- ⑨ Harada, H., Kuboi, Y., Miki, R., Honda, C., Masushige, S., Nakatsuka, M., Koga, Y., Kato, S.: Cloning of rabbit TR4 and its bone cell-specific activity to suppress estrogen receptor-mediated transactivation. *Endocrinology*, 139, 204-212, 1998.
- ⑩ Murayama, A., Takeyama, K., Kitanaka, S., Koderu, Y., Hosoya, T., Kato, S.: The promoter of the human 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene confers positive and negative responsiveness to PTH, calcitonin and 1 α , 25(OH)₂D₃. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249, 11-16, 1998.
- ⑪ Watanabe, M., Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Yano, T., Yoshikawa, H., Yanagisawa, J., Kato, S.: A putative tumor suppressor, TSG101, acts as a transcriptional suppressor through its coiled-coil domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 245, 900-905, 1998.
- ⑫ Kato, S., Sekine, K., Matsumoto, T., Yoshizawa, T.: Molecular genetics of vitamin D receptor acting in bone. *J. Bone Miner. Metab.*, 16, 65-71, 1998.
- ⑬ Kato, S., Yanagisawa, J., Murayama, A., Kitanaka, S., Takeyama, K.: The importance of 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene in vitamin D-dependent rickets. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 7, 377-383, 1998.
- ⑭ Kishimoto, H., Hoshino, S., Ohori, M., Kontani, K., Nishina, H., Suzawa, M., Kato, S., Katada, T.: Molecular mechanism of human CD38 gene expression by retinoic acid. *J. Biol. Chem.*, 273, 15429-15434, 1998.
- ⑮ Takeshita, A., Imai, K., Kato, S., Kitano, S., Hanazawa, S.: 1 α , 25-Dehydroxyvitamin D₃ synergism

toward transforming growth factor- β 1-induced AP-1 transcriptional activity in mouse osteoblastic cells via its nuclear receptor. *J. Biol. Chem.*, 273, 14738-14744, 1998.

- ⑩ Maruyama, K., Endoh, H., Sasaki-Iwaoka, H., Kanou, H., Shimaya, E., Hashimoto, S., Kato, S., Kawashima, H.: A novel isoform of rat estrogen receptor beta with 18 amino acid insertion in the ligand binding domain as a putative dominant negative regulator of estrogen action. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 246, 142-147, 1998.
- ⑪ Fukumoto, S., Suzawa, M., Kikuchi, T., Matsumoto, T., Kato, S., Fujita, T.: Cloning and characterization of kidney-specific promoter of human PTH/PTHrP receptor gene: Absence of mutation in patients with pseudohypoparathyroidism type Ib. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 141, 41-47, 1998.
- ⑫ Nishihara, A., Hanai, J., Okamoto, N., Yanagisawa, J., Kato, S., Miyazono, K., Kawabata, M.: Role of p300, a transcriptional coactivator, in signalling of TGF- β . *Genes to Cells*, 3, 613-623, 1998.

川口 浩

1. 論文発表

① 川口浩、筑田博隆: *klotho* 遺伝子と老人性骨粗鬆症. *臨床科学* 34 (10) (特集: 骨粗鬆症「基礎から臨床へ」): 1373-1377, 1998.

② 真鍋典世、川口浩、中村耕三、宮浦千里、尾上佳子、鍋島陽一、黒尾 誠: 新規老化モデル *klotho* マウスにおける骨芽細胞、破骨細胞の分化異常と骨髄造血異常のメカニズム (第 16 回日本骨代謝学会奨励賞受賞論文). *日本骨代謝学会雑誌* 16 (4): 152-154, 1999.

2. 学会発表

① 川口浩: 新規老化抑制遺伝子 (*klotho gene*) と骨粗鬆症. 第 33 回 Ca 代謝研究会. 1998. 6.18 (名古屋大学鶴友会館、名古屋).

② 川口浩、真鍋典世、緒方直史、黒尾 誠、松村 穰、相沢宏樹、鍋島陽一: *klotho* 遺伝子異常による老化マウスの解析. 第 16 回富士ホルモンカンファレンス. 1998. 7. 17-19. (箱根、神奈川).

③ 川口浩: 新規老化抑制遺伝子 *klotho* と骨代謝調節機構. 新潟県医師会生涯教育講座. 1998. 7. 24 (ホテルイタリア軒、新潟).

④ 真鍋典世、川口浩、中村耕三、宮浦千里、尾上佳子、矢野和樹、津田英資、鍋島陽一、黒尾 誠: 新規老化モデル *klotho* マウスにおける骨芽細胞、破骨細胞の分

- 化異常と骨髄造血異常のメカニズム. 第 16 回日本骨代謝学会. 1998. 8. 5 - 8 (東京国際フォーラム、東京).
- ⑤ 緒方直史、松村穰、黒尾誠、鍋島陽一、細井孝之、大内尉義、白木正孝、中村耕三、黒川高秀、川口浩: 老化関連遺伝子 *klotho* 遺伝子および *werner* 遺伝子の閉経後女性の骨密度への関与. 第 16 回日本骨代謝学会. 1998. 8. 5 - 8 (東京国際フォーラム、東京).
- ⑥ 緒方直史、川口浩、中村耕三、黒川高秀、松村穰、黒尾誠、細井孝之、大内尉義、白木正孝: 老化関連遺伝子 *Klotho* 遺伝子および *Werner* 遺伝子の閉経後女性の骨密度への関与. 第 13 回日本整形外科学会基礎学術集会. 1998.9.25-27 (名古屋).
- ⑦ 真鍋典世、川口浩、中村耕三、宮浦千里、尾上佳子、矢野和樹、津田英資、鍋島陽一、黒尾 誠: 新規老化モデル *klotho* マウスにおける骨、骨髄の分子細胞学的解析. 第 13 回日本整形外科学会基礎学術集会. 1998.9.25-27 (名古屋).
- ⑧ 川口浩: 老化抑制遺伝子 *klotho* と骨代謝異常. 第 9 回骨細胞分子研究会. 1998. 11. 14. (京都ホテル、京都).
- ⑨ 川口浩: 老化抑制遺伝子 *klotho* の骨軟骨代謝異常疾患における関与. 岐阜整形外科教育セミナー. 1999. 2. 4 (岐阜会館、岐阜).
- ⑩ 川口浩: 老化抑制遺伝子 *klotho* と骨軟骨代謝異常. 第 57 回関節疾患フォーラム. 1999. 2. 9. (東京 YMCA ホテル、東京).
- ⑪ 川口浩: 老化抑制遺伝子 *klotho* と骨軟骨疾患. 昭和医学会例会. 1999. 2. 25 (昭和大学病院、東京).
- ⑫ Hiroshi Kawaguchi, Noriyo Manabe, Takahide Kurokawa, Yo-ichi Nabeshima, and Makoto Kuro-o. Independent impairment of osteoblast and osteoclast differentiation causing osteopenia in the *klotho* mouse. 3rd Combined Orthopaedic Research Societies Meeting. 1998. 9.28-30 (Hamamatsu, Japan).
- ⑬ Hiroshi Kawaguchi, Noriyo Manabe, Kozo Nakamura, Kazuki Yano, Eiji Tsuda, Yoichi Nabeshima, Makoto Kuro-o. Mechanism of low turnover osteoporosis in the *klotho* mouse exhibiting multiple aging phenotypes. 2nd joint meeting of the American Society for Bone and Mineral Research and the International Bone and Mineral Society. 1998. 12.1 - 6 (San Francisco, USA).
- ⑭ Noriyo Manabe, Hirotaka Chikuda, Chisato Miyaura, Yoshiko Onoe, Makoto Kuro-o, Yoichi Nabeshima, Kozo Nakamura, and Hiroshi

Kawaguchi. Suppression of B-lymphopoiesis in the klotho mouse exhibiting low turnover osteoporosis. 2nd joint meeting of the American Society for Bone and Mineral Research and the International Bone and Mineral Society. 1998. 12.1 - 6 (San Francisco, USA).

⑮ Naoshi Ogata, Makoto Kuro-o, Yutaka Matsumura, Yo-chi Nabeshima, Takayuki Hosoi, Yasuyosi Ouchi, Kozo Nakamura, and Hiroshi Kawaguchi. Association of polymorphisms of aging related genes, klotho and Werner's syndrome, with the bone loss of

postmenopausal women. 2nd joint meeting of the American Society for Bone and Mineral Research and the International Bone and Mineral Society. 1998. 12.1 - 6 (San Francisco, USA).

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

1. 分 担 研 究 報 告 書

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

ホルモン型ビタミンDによる骨修復能の活性化

分担研究者 池田恭治（長寿医療研究センター 老年病研究部長）

研究要旨

閉経後骨粗鬆症の動物モデルにおいて、活性型ビタミンDが骨吸収を抑制すること、また、同じく骨吸収抑制薬であるエストロゲンと比較した結果、エストロゲンが骨形成も抑制し骨の turnover を低下させるのに対して、活性型ビタミンDは骨形成を維持もしくはむしろ促進することを明らかにした。さらに、活性型ビタミンDの骨作用は、血清カルシウム上昇作用と分離できることを立証し、骨作用をさらに強めたアナログが、骨の老化防止に最適のホルモン薬としての性質を有することが示唆された。一方、閉経後骨粗鬆症患者においては、活性型ビタミンD治療によく反応して骨量が増加するグループと治療が奏功しない群が存在し、活性型ビタミンDに対する骨の反応に個人の遺伝的素因が関与する可能性を示した。

キーワード： 骨粗鬆症、活性型ビタミンD、エストロゲン、骨吸収

A. 研究目的

骨粗鬆症は、変形性関節症と並んで、寝たきりにつながる重要な疾患であり、成因の解明と有効な治療・予防法の確立が重要課題である。骨においては、破骨細胞が骨吸収によって古い骨を破壊・吸収した後、あらたに動員された骨芽細胞が、骨基質を合成しこれにミネラルを沈着させることにより新しい骨を形成するという一連のリモデリング現象が成熟後一生の間続く。すなわち、骨は破壊と形成から成る修復過程を絶えず繰り返しながら、その量と質を維持

していると理解される。加齢とともに、とりわけエストロゲンの低下によって、先行する骨吸収が異常に高まり、骨形成がこれに追いつかないために加速的に骨量が失われていくと考えられている。本分担研究では、ホルモンによって自らが保持する修復能力を再活性化することによって骨の老化を防止するような治療法開発をめざしている。骨の修復能力を高めるためには、異常に高まった骨吸収に歯止めをかけ、骨芽細胞機能を賦活化することによって骨形成を高めるといふ二つの作用が望ましい。

現在のところ骨粗鬆症治療薬としては、カルシウム剤の補充以外に、骨吸収抑制薬としてエストロゲン、カルシトニン、ビスフォスフォネートが米国の食品医薬局から正式に承認されている。一方、骨形成促進薬として承認を受けているものはなく、副甲状腺ホルモン（PTH）の間欠注射がもつとも有望視されているが現在まだ臨床治験段階である。我が国における骨粗鬆症治療の特色として、活性型ビタミン D がもつとも高頻度で用いられている点が挙げられる。活性型ビタミン D の骨量増加作用は、エストロゲンやビスフォスフォネートと比較するときほど強くないが、骨折を防止する効果は有意であるとの臨床成績が蓄積しており、その理由として、1) 骨折防止に深く関わる皮質骨に対する治療効果、2) 骨以外にも筋肉や中枢神経・血管系などの組織への効果により、骨折あるいは転倒を防止している可能性が考えられる。

一方、活性型ビタミン D が米国において骨粗鬆症治療薬として正式に認可されていない理由として、1) 骨量増加作用が比較的少ないこと、2) 高カルシウム血症のリスクが大きい点が挙げられる。活性型ビタミン D は、PTH とともにカルシウムおよび骨のホメオスターシスを維持する中心的なホルモンであるが、天然のホルモン型である $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ では骨粗鬆症治療薬としての効力は不十分であり、その骨作用メカニズムを解明し、高カルシウム血症の副作用をなくし骨作用をより強力にしたアナログを開発することが必要となる。

ホルモンとしての活性型ビタミン D の

骨作用に関しては、極度のビタミン D 欠乏動物を用いた長年の研究で積み重ねられた成績や、分担研究者の加藤らが樹立したビタミン D 受容体欠損マウスの骨異常がカルシウム補給で血清カルシウムを上昇させると改善する事実などから、腸管からのカルシウム吸収促進を介する血中カルシウム上昇作用が中心的役割を果たすと信じられている。しかしながら、大部分の骨粗鬆症患者のように、ビタミン D の欠乏が軽度あるいはほとんど正常の場合に、活性型ビタミン D の骨効果に血中カルシウムの上昇が必須か否かは明らかでない。以上のような背景に基づいて、今年度はまず、活性型ビタミン D の骨作用が、血清カルシウムの上昇を介する作用とカルシウムに依存しない作用に分離できるかという根本的な問題を取り上げた。閉経後骨粗鬆症のモデル動物に、比較的大量のビタミン D (Cholecalciferol) を投与して血清カルシウムを上昇させた場合と、正常カルシウムを維持するような少量の活性型ビタミン D (Alfacalcidol) で治療した場合の骨効果を、血清カルシウムとの相関において比較検討した。さらに、活性型ビタミン D が骨リモデリング過程にどのような影響を及ぼすかを、骨代謝の生化学マーカーと骨形態計測法を駆使して、代表的な骨吸収抑制薬であるエストロゲンと比較解析した。

B. 研究方法

ビタミン D によるカルシウム上昇作用と骨作用との相関を詳細に解析するために、閉経後骨粗鬆症の実験モデルである卵巣摘

除ラットに、ビタミン D そのもの (cholecalciferol) あるいは活性型ビタミン D (alfacalcidol) を3カ月間経口投与し、血清カルシウム、尿中カルシウム排泄、腰椎および大腿骨における骨密度 (BMD)、腰椎 (海綿骨優位) および大腿骨骨幹部 (皮質骨優位) における骨強度を測定した。

同じく卵巣摘除したラットに、alfacalcidol あるいは 17β -estradiol を3カ月投与し、骨吸収および骨形成過程に及ぼす作用を、それぞれの生化学マーカーである尿中デオキシピリジノリン排泄と血清オステオカルシン、さらには骨形態計測法を用いて解析した。

閉経後骨粗鬆症患者において、我々がすでに同定している TGF- β 1 の多型と活性型ビタミン D あるいはホルモン補充療法の治療効果との相関を解析した。

C. 研究結果

卵巣摘除によって減少した骨量 (BMD) を、高カルシウム血症を惹起しない量の活性型ビタミン D は、用量依存的に回復させた。一方、ビタミン D そのものは、高カルシウム血症を起こすほど高用量を投与した場合にのみ、有意な BMD 増加作用が観察された。以上の結果を、横軸に血清カルシウム、縦軸に BMD の二次元プロットを行って解析すると、同程度の血清カルシウム上昇効果において、活性型ビタミン D はビタミン D よりも有意に強い BMD 増加作用を示すことが明らかになった。すなわち、活性型ビタミン D の骨粗鬆症治療作用の少なくとも一部は血清カルシウムの

上昇とは独立に発揮されることが示された。

また、活性型ビタミン D は尿中デオキシピリジノリン排泄を抑制し、この骨吸収抑制作用は、骨形態計測法による骨吸収面および破骨細胞数の低下によっても確認された。活性型ビタミン D の骨吸収抑制作用は、同じ血清カルシウム値で比較した場合、ビタミン D よりも有意に強かった。

代表的な骨吸収抑制薬であるエストロゲンと比較したところ、エストロゲンが骨吸収とともに骨形成をも用量依存的にかつ著名に抑制したのに対して、活性型ビタミン D は、血清オステオカルシン濃度および骨形態計測における骨形成速度 (BFR) などの骨形成の指標を維持もしくは促進した。

閉経後骨粗鬆症患者のなかでも、TGF- β 1 遺伝子の CC genotype を有するグループが TT、TC 群より有意に活性型ビタミン D に対して BMD が増加することが明らかとなった。

D. 考察

活性型ビタミン D は、骨吸収を促進するホルモンとして知られ、事実、近年活性型ビタミン D が骨髄ストローマ細胞に発現誘導する破骨細胞分化因子/RANKL が同定された。これは、治療域を越えた中毒量の活性型ビタミン D が骨吸収を促進する場合の分子メカニズムであり、治療域の活性型ビタミン D がどのようなメカニズムで骨に作用するかは、驚くべきことにあまり理解されていない。我々は本研究において、エストロゲン欠乏時のように骨の turnover が異常に亢進した病態では、治