

平成10年度

厚生省長寿科学総合研究（須田班）

総括研究報告書及び分担研究報告書

昭和大学 須田立雄

骨粗鬆症治療薬の開発に関する基礎的研究

主任研究者：須田立雄（昭和大学歯学部・教授）

骨芽細胞と破骨細胞の分化と機能の調節機構の解明と、開発途上にある骨粗鬆症治療薬の作用機序の解析を試みた。(1)慢性関節リウマチにおける骨破壊にTリンパ球が産生するIL-17が関与する可能性が示された。(2)Cbfa1以外で骨芽細胞の分化に関与する転写因子がBMP処理により誘導される可能性が示された。(3)アデノウイルスベクターを用いて外来遺伝子を破骨細胞に導入することに成功した。(4)PTHが脂肪細胞の分化を遺伝子レベルで抑制する可能性が示された。(5)ED-71の骨作用は、骨吸収抑制作用と骨形成促進作用を介して発揮されることが示された。(6)bFGFはステロイド投与により惹起される骨折治癒の遅延を回復させた。

【研究組織】

- 須田立雄（昭和大学歯学部口腔生化学・教授）
- 山口 朗（長崎大学歯学部口腔病理学・教授）
- 田中 栄（東京大学医学部整形外科学・助手）
- 堀 正幸（旭化成工業株式会社・骨代謝研究所 所長）
- 久保田直樹（中外製薬株式会社・創薬研究所 主席研究員）
- 田村 誠（科研製薬株式会社・中央研究所 薬理部長）

A. 研究目的

骨粗鬆症は、骨の形成と吸収の平衡が乱れ、骨量が減少する代謝性骨疾患である。多くの研究機関で、本症の発症機構の解析や治療薬の開発が試みられているにも拘わらず、依然として骨量を回復させる有効な治療指針が確立していない。その主要な原因は、骨形成を司る骨芽細胞と骨吸収を司る破骨細胞の分化と機能の調節機構が殆ど解明されていないことに起因する。我々は骨芽細胞と破骨細胞の分化と機能を解析できる実験系を確立し、その調節機構の解析を進めてきた。本研究では、骨芽細胞と破骨細胞の分化と機能の調節機構の解明を目的とした。

さらに、開発途上にある骨粗鬆症治療薬の作用メカニズムの解析を試みた。

B. 研究方法

- (1) マウスの骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系にIL-17を添加して、破骨細胞の形成を観察した。COX-2の阻害剤としては、NS398とIndomethacinを用いた。また、IL-7の破骨細胞形成促進作用に対するODFのデコイレセプターであるOCIF (osteoclastogenesis inhibitory factor) の作用も検討した。RA及びOA患者より採取した滑膜組織を培養し、その培養上清を集めそのIL-17の濃度を測定した。また、RA及びOA患者より関節液を集め、そのIL-17量を測定した。更に、滑膜組織の培養上清並びに関節液を共存培養系に添加し破骨細胞形成促進活性をIL-17抗体の存在下あるいは非存在下で測定した。さらに、滑膜組織のIL-17産生細胞を免疫組織学的に解析した。
- (2) 胎生18.5日のCbfa1欠損マウス(Cbfa1^{-/-})の頭頂骨形成予定域より線維性結合組織を採取し、コラーゲンゲル内で14日間培養した。ゲル内で組織片より遊走した細胞をコラーゲナーゼ処理で回収し実験に供した。また、胎生

18.5日の野生型マウス (Cbfa1^{+/+}) および Cbfa1ヘテロ接合体マウス (Cbfa1^{+/-}) の頭頂骨を同様にコラーゲンゲル内で培養し、Cbfa1^{-/-}の細胞との性状を比較した。さらに Cbfa1^{-/-}の頭蓋冠由来細胞を39回継代培養し(母細胞)、限界希釈法で単一細胞に由来する2種類のクローン化細胞株 (C2細胞、C6細胞)を分離した。

- (3) 破骨細胞は、マウス骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養によって得られた多核細胞を使用した。破骨細胞における遺伝子の発現は、非増殖型の組換えアデノウイルス感染の2日後に特異的な抗体によるウエスタンブロット染色を行うと共に、破骨細胞のアクチンリング形成と骨吸収能を解析した。また、マウス頭蓋骨にインターロイキン1を単独で、あるいは組換えウイルスと共に注入し、頭蓋骨に誘導された骨吸収に及ぼす組換えウイルスの効果を調べた。
- (4) 雌性リタイアSDラットの大腿骨および脛骨より骨髄細胞を集めた。骨髄細胞を14~16日間培養し、confluent cell layerを得た。そこに各種薬剤を投与し、8日後に脂肪細胞の同定をOil Red O染色で行った。また、PPAR- γ 2遺伝子、AEBP1遺伝子の各発現量をRT-PCRにて解析した。更に5ヶ月齢ラットに卵巣摘出術を施し、6ヶ月後からhPTH(1-34)を6ヶ月間投与した。屠殺後、左脛骨を摘出し、骨形態計測を行った。また骨髄中の脂肪髄の面積割合を測定し、骨髄脂肪化率を検討した。
- (5) 8~9ヶ月齢のWistar-Imamichi 雌性ラットの卵巣を摘出(OVX)した。OVX後3ヶ月よりED-71あるいはhPTH(1-84)を3ヶ月間投与した。また、OVX後5ヶ月よりED-71を1ヶ月間経口投与した。一方、8ヶ月齢のWistar-Imamichi 雌性ラットをOVXし、OVX後5ヶ月よりED-71を1ヶ月間経口投与した。投与終了2週間前よりテトラサイクリンおよびカルセインによる骨の二重ラベルを行った。腰椎を摘出し、骨密度測定及び骨形態計測を行った。
- (6) 8週令のSDラットにデキサメタゾンを1週間皮下投与した後、右後肢腓骨を切断後整復した。bFGFを含浸させた架橋ゼラチン製剤

を骨折部周辺に投与した。経時的に屠殺し、仮骨骨塩量、骨密度、骨強度を測定した。さらに、腓骨はanti-bFGF, anti-FGFR1+anti-FGFR3抗体を用いた免疫染色に供した。

C. 研究結果

- (1) RAの滑膜組織ではインターロイキン17 (IL-17) の産生が亢進していること、Tリンパ球のある種のサブセットがその産生にあずかること、そしてIL-17は極めて強力に破骨細胞の形成を促進するサイトカインであることが明らかとなった。RAにおける関節破壊にIL-17も重要な役割を担っているものと考えられる。
- (2) 骨芽細胞の分化を決定する重要な転写因子であるCbfa1の機能を解析することを目的として実験を行った。欠損マウスの頭蓋冠由来の細胞株の性状を解析した結果、Cbfa1は骨形成および骨芽細胞に重要な転写因子であるが、骨芽細胞前駆細胞はCbfa1が存在しなくてもBMPで誘導される他の因子を介してオステオカルシンを産生する段階まで分化できることが明らかとなった。
- (3) アデノウイルスベクターを用い破骨細胞にCsk遺伝子を導入し、破骨細胞のc-Src活性の調節とそれが及ぼす機能調節の解析を試みた。Csk遺伝子の導入にともなってc-Srcのチロシンキナーゼ活性の低下が、変異型Cskの導入によってc-Srcの活性の増強が認められた。Csk遺伝子の発現に伴って破骨細胞の細胞骨格の破壊、骨吸収能の著明な低下が認められた。IL-1によって誘導されたin vivoでの骨吸収促進をCskウイルスは著明に抑制した。
- (4) hPTH(1-34)は骨髄中の未分化間葉系細胞の分化を転写因子の遺伝子発現調節を介して脂肪細胞への分化を抑制した。更に、卵巣摘出ラット脛骨骨幹部の骨髄腔では、疑似手術群に比較して著明に脂肪組織が増加していたのに対して、hPTH(1-34)の投与により脂肪組織量の増加が用量依存的に抑制された。
- (5) ED-71の作用機序について、卵巣摘出 (OVX) ラットを用い解析したところ、ED-71は低用

- Bone**, 23:223-231, 1998.
16. Gao Y-H, Yamaguchi A, et al.: Potential role of Cbfa1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF). **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 252:697-702, 1998.
 17. Takiguchi T, Kobayashi M, Yamaguchi A, et al.: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblast differentiation and suppresses matrix metalloproteinase-1 production in human bone cells isolated from mandibulae. **J. Periodont. Res.**, 33:476-485, 1998.
 18. Kelly, K., Tanaka, S., Rodriguez, B.R., Baron, R. and Gimble, J.M.: Murine bone marrow stromal-derived BMS2 adipocytes support differentiation and function of osteoclast-like cells in vitro. **Endocrinology**, 139:2092-2101, 1998.
 19. Tanaka, S., Takahashi, T., Takayanagi, H., Miyazaki, T., Oda, H., Nakamura, K., Hirai, H. and Kurokawa, T.: Modulation of osteoclast function by adenovirus-mediated epidermal growth factor receptor. **J. Bone Miner. Res.**, 13:1714-1720, 1998.
 20. Takayama, Y., Tanaka, S., Nagai, K. and Okada, M.: Adenovirus-mediated overexpression of C-terminal Src Kinase (Csk) in type I astrocytes with cell spreading and attachment to fibronectin. ~Correlation with tyrosine phosphorylation of paxillin and FAK. **J. Biol. Chem.**, 274:2291-2297, 1999.

G. 知的所有権の取得状況

なし

慢性関節リウマチにおける関節破壊とインターロイキン17

主任研究者：須田立雄（昭和大学歯学部・教授）

慢性関節リウマチ(RA)の関節破壊機構の解明は、RAの病因および病態解明の上からも重要である。関節破壊においては、様々なサイトカイン、マトリックスメタロプロテアーゼ、PGE₂などが関与すると考えられている。本研究において、RAの滑膜組織ではインターロイキン17 (IL-17) の産生が亢進していること、Tリンパ球のある種のサブセットがその産生にあずかること、そしてIL-17は極めて強力に破骨細胞の形成を促進するサイトカインであることが明らかとなった。RAにおける関節破壊にIL-17も重要な役割を担っているものと考えられる。

A. 研究目的

我々は、破骨細胞の形成を観察できる骨芽細胞と血液細胞の共存培養系を確立し、破骨細胞形成の調節メカニズムを解析してきた。その結果、破骨細胞への分化には、骨芽細胞と血液細胞の直接接触が必須であること、この破骨細胞の分化過程は、活性型ビタミンDやPTHのほか、さまざまなサイトカインによっても制御されていることが明らかにされた。現在までに得られた知見は、骨芽細胞はホルモンやサイトカインの刺激に反応し、その細胞膜上に破骨細胞分化因子 (ODF) を発現することを示している。破骨細胞の前駆細胞は、細胞間接触機構を介して骨芽細胞が発現するODFを認識し、破骨細胞に分化するものと考えられる。

慢性関節リウマチ (RA) の関節破壊機構の解明は、RAの病因および病態解明の上からも重要である。関節破壊においては、滑膜細胞の異常増殖によるパンスス形成が惹起され、さらにT細胞の増殖や様々なサイトカイン (IL-1 β , TNF- α , IL-6 など)やマトリックスメタロプロテアーゼ、PGE₂、

一酸化窒素の産生亢進がその病因として報告されている。さらに、RA関節で軟骨下骨に多数の破骨細胞が出現することから、破骨細胞が関節破壊に重要な役割を果たしていることが示唆されている。著者らは、RAの関節病変における破骨細胞形成の仕組みに興味を持ち、各種サイトカインのRA病態における役割について検討してきた。

IL-17はT細胞が産生するサイトカインであり、IL-1と似た機能を示す興味深いサイトカインである。本研究において、我々はIL-17が破骨細胞の分化を誘導することを共存培養系を用いて見出した。更に、変形性関節症患者 (OA) に比較してRA患者の関節液中のIL-17濃度が有意に高いことが明らかとなった。

B. 研究方法

マウスの骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系にIL-17を添加して破骨細胞の形成を観察した。COX-2の阻害剤としてはNS398とIndomethacinを用いた。破骨細胞の同定は酒席酸抵抗性酸ホ

スファターゼ (TRAP) 染色、カルシトニンレセプターの発現及び吸収窩形成能の解析より行った。また、IL-7の破骨細胞形成促進作用に対するODFのデコイレセプターであるOCIF (osteoclastogenesis inhibitory factor) の作用も検討した。RA及びOA患者より採取した滑膜組織を培養し、その培養上清を集めた。培養上清中のIL-17の濃度をELISA法で測定した。また、RA及びOA患者より関節液を集め、そのIL-17量を測定した。更に、滑膜組織の培養上清並びに関節液を共存培養系に添加し、破骨細胞形成促進活性をIL-17抗体の存在下あるいは非存在下で測定した。更に、滑膜組織のIL-17産生細胞を免疫組織学的に解析した。

C. 研究結果

①マウスの共存培養系において、IL-17は濃度依存的に破骨細胞の形成を促進した。IL-17が促進する破骨細胞形成をCOX-2の阻害剤であるNS398とIndomethacinは完全に抑制した。②IL-17を共存培養系あるいは骨芽細胞の単独培養系に添加するとPGE₂産生は促進されたが、骨髄細胞の単独培養系においてはそのような促進効果は認められなかった。③OCIFはIL-7が促進する破骨細胞形成を完全に抑制した。④RA患者の滑液中のIL-17量はOA患者のそれよりも優位に高かった。RA患者の滑液あるいは滑膜組織の培養上清を共存培養系に添加すると破骨細胞の形成は促進され、それはanti-IL-17抗体により抑制された。⑤IL-17抗体を用いた免疫染色を行ったところ、RAの滑膜組織にはIL-17抗体陽性の単核細胞が認められたが、OAの滑膜組織にはIL-17抗体陽性細胞は認められなかった。IL-17抗体に陽性を示した細胞はCD4⁺、CD45RO⁺のmemory T細胞のサブセットに属することが示された。

D. 考察

1985年、清水らはRA関節の軟骨下骨に多数の破骨細胞様多核細胞が出現することを報告した。我々も、RAの関節破壊における破骨細胞の関与の可能性について検討してきた結果、破骨細胞の前駆細胞である顆粒球・マクロファージ系の細胞群 (CFU-GM) がRA膝関節近傍の骨髄に多数存在すること、また、RAの滑膜組織内にTRAP, carbonic anhydrase II, 液胞型プロトンATPase, ビトロネクチンレセプターを発現する破骨細胞様多核細胞が多数出現することを明らかにした。一方、大分医大の藤川らはRA滑膜内に存在するTRAP陽性多核細胞は骨吸収能を有していることを証明した。このように、RA患者の滑膜組織中には破骨細胞様細胞が存在する。

IL-17はT細胞が産生するサイトカインであり、IL-1と似た機能を示す興味深いサイトカインである。本研究により、IL-17が破骨細胞の分化を誘導することが明らかとなった。また、関節液中のIL-17濃度を測定した結果、変形性関節症例に比較してRA患者の方が有意に高値であることが明らかとなった。更に、RA患者滑膜におけるIL-17の発現につき検討したところ、抗IL-17抗体で染色されるTリンパ球系の細胞が多数存在した。以上の結果より、RA患者の関節においては、増殖したTリンパ球が産生するIL-17により破骨細胞の分化の促進および骨吸収の活性化が惹起される可能性が示唆された。また、OCIFはIL-7の誘導する破骨細胞形成を完全に抑制することから、OCIFはRAにおいて認められる関節破壊の抑制薬となる可能性が示された。

E. 結論

RAの関節破壊機構の解明は、RAの病因および病態解明の上からも重要である。本研究において、IL-17は破骨細胞の形成を強力に促進するサ

イトカインであることが示された。また、RAの滑膜組織においてはIL-17の産生が上昇しており、IL-17はRAの骨破壊に重要な役割を担っていることが示唆された。

F. 研究発表

1. Jimi, E, Nakamura, I., Ikebe, T., Akiyama, S., Takahashi, N., & Suda, T.: Activation of NF- κ B is involved in the survival of osteoclasts promoted by interleukin-1. **J. Biol. Chem.**, 273:8799-8805, 1998.
2. Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinoshita, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N. & Suda, T.; Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 95:3597-3602, 1998.
3. Nakamura, I., Jimi, E., Duong, L.T., Sasaki, T., Takahashi, N., Rodan, G.A. & Suda, T.: Tyrosine phosphorylation of p130Cas is involved in actin organization in osteoclasts. **J. Biol. Chem.**, 273:11144-11149, 1998.
4. Matsuzaki, K., Udagawa, N., Takahashi, N., Yamaguchi, K., Yasuda, H., Shima, N., Morinaga, T., Toyama, Y., Yabe, Y., Higashio, K. & Suda, T.: Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 246:199-204, 1998.
5. Tsurukai, T., Takahashi, N., Jimi, E., Nakamura, I., Udagawa, N., Nogimori, K., Tamura, M. & Suda, T.: Isolation and characterization of osteoclast precursors that differentiate into osteoclasts on calvarial cells within a short period of time. **J. Cell. Physiol.**, 177:26-35, 1998.
6. Matsuzaki, K., Katayama, K., Takahashi, Y., Nakamura, I., Udagawa, N., Tsurukai, T., Nishinakamura, R., Toyama, Y., Yabe, Y., Hori, M., Takahashi, N. & Suda, T.: Human osteoclast-like cells are formed from peripheral blood mononuclear cells in a co-culture with SaOS-2 cells transfected with the PTH/PTHrP receptor gene. **Endocrinology**, 140:925-932, 1999.
7. Jimi, E., Nakamura, I., Duong, L.T., Ikebe, T.,

Takahashi, N., Rodan, G.A. & Suda, T.: Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromal cells. **Exp. Cell Res.**, 247:84-93, 1999.

8. Takahashi, N., Udagawa, N. & Suda, T.: A new member of TNF ligand family, ODF/RANKL/TRANCE/OPGL, regulates osteoclast differentiation and function. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 256:449-455, 1999.
9. Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M.T. & Martin, T.J.: Modulation of osteoclast differentiation and function by osteoblasts/stromal cells. **Endocrine Reviews**, in press, 1999.
10. Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K., Itoh, K., Ishiyama, S., Saito, S., Inoue, K., Kamatani, N., Gillespie, M.T., Martin, T.J. & Suda, T.: IL-17 detected in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclast formation via osteoclast differentiation factor (ODF) synthesis. **J. Clin. Invest.**, in press, 1999.
11. Jimi, E., Akiyama, S., Tsurukai, T., Okahashi, N., Kobayashi, K., Udagawa, N., Nishihara, T., Takahashi, N. & Suda, T.: Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. **J. Immunol.**, in press, 1999.
12. Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Goto, M., Mochizuki, S., Tsuda, E., Morinaga, T., Udagawa, N., Takahashi, N., Suda, T. & Higashio, K.: A novel mechanism modulating osteoclast differentiation and function. **Bone**, in press, 1999.

G. 知的所有権の取得状況

なし

Cbfa1は骨芽細胞の分化と骨形成に必須の転写因か？

分担研究者：山口 朗（長崎大学歯学部・教授）

骨芽細胞の分化を決定する重要な転写因子であるCbfa1の機能を解析することを目的として実験を行った。欠損マウスの頭蓋冠由来の細胞株の性状を解析した結果、Cbfa1は骨形成および骨芽細胞の重要な転写因子であるが、骨芽細胞前駆細胞はCbfa1が存在しなくてもBMPで誘導される他の因子を介してオステオカルシンを産生する段階までは分化できることが明らかとなった。

A. 研究目的

Runtドメイン遺伝子ファミリーに属する転写因子Cbfa1/Pebp2aAのノックアウトマウスでは全く骨が形成されないが、一部の骨形成予定域にはALP陽性細胞が出現し、頭蓋冠より採取した細胞にBMP-2を添加するとオステオカルシンの産生が誘導される (Cell, 89:755-764,1997)。これらの結果は、Cbfa1は骨形成に重要な転写因子であるが、Cbfa1が欠損していても骨芽細胞の分化はある程度まで進行することを示唆している。本研究では、この点をさらに詳細に検討するためにCbfa1ノックアウトマウスの頭蓋冠から細胞株を樹立し、その性状を解析した。

B. 研究方法

胎生18.5日のCbfa1欠損マウス(Cbfa1^{-/-})の頭頂骨形成予定域より線維性結合組織を採取し、コラーゲンゲル内で14日間培養した。ゲル内で組織片より遊走した細胞をコラーゲナーゼ処理で回収し実験に供した。また、胎生18.5日の野生型マウス(Cbfa1^{+/+})およびCbfa1ヘテロ接合体マウス(Cbfa1^{+/-})の頭頂骨を同様にコラーゲンゲル内で培養し、細胞を回収し、Cbfa1^{-/-}の細胞との性状

を比較した。さらにCbfa1^{-/-}の頭蓋冠由来細胞を39回継代培養し（母細胞）、限界希釈法で単一細胞に由来する2種類のクローン化細胞株（C2細胞、C6細胞）を分離した。

C. 研究結果

①Cbfa1^{+/+}およびCbfa1^{+/-}マウスから採取した頭蓋冠由来培養細胞ではosteocalcin (OCN)およびalkaline phosphatase (ALP) mRNAの弱い発現が認められたが、Cbfa1^{-/-}マウス頭蓋冠由来細胞では両者のmRNAの発現はみられなかった。しかし、これらの細胞をBMP-2 (500 ng/ml)で3日間処理すると、Cbfa1^{+/+}およびCbfa1^{+/-}頭蓋冠細胞ではOCNとALP mRNAが著明に上昇し、Cbfa1^{-/-}頭蓋冠細胞でも両者のmRNAの発現が誘導された。②Cbfa1^{+/+}頭蓋冠細胞ではType X collagen mRNAの発現は認められなかったが、Cbfa1^{+/-}およびCbfa1^{-/-}頭蓋冠細胞ではType X collagen mRNAの弱い発現が認められた。そして、BMP-2で処理するとCbfa1^{+/-}、Cbfa1^{-/-}頭蓋冠細胞でのType X collagen mRNAの発現は増強した。その程度は、Cbfa1^{-/-}細胞でより顕著であった。また、Cbfa1^{+/+}細胞でもBMP-2によりType X collagen

mRNAの弱い発現が誘導された。③*Cbfa1*^{-/-}細胞から樹立されたC2, C6細胞を種々の濃度のBMP-2で処理すると、100 ng/ml以上の濃度でOCN, ALP, 副甲状腺ホルモン受容体のmRNAの発現が誘導された。④C2, C6細胞はBMP-2非添加の培養条件でも軟骨細胞に関連するmRNA (aggrecan, type II collagen, type X collagen)を発現していたが、C6細胞ではaggrecan, type II collagen mRNAの強い発現がみられた。これらの細胞を種々の濃度のBMP-2で処理すると、BMP-2の濃度によってこれらのmRNAの発現に及ぼす作用が異なっていることが明らかとなった。つまり、C2細胞では10 ng/mlという低濃度ではaggrecan, type II collagen mRNAの発現が著明に亢進したが、100, 500 ng/mlという高濃度では、その作用はあまり顕著でなかった。

一方、10 ng/mlのBMP-2ではtype X collagen mRNAの発現上昇はみられなかったが、100, 500 ng/mlのBMP-2で処理するとtype X collagen mRNAの発現は著明に亢進した。さらに、C6細胞では種々の濃度のBMP-2で処理してもaggrecan, type II collagen mRNAの発現には大きな変動が見られなかったが、100, 500 ng/mlのBMP-2処理でtype X collagenの発現が著明に亢進した。⑤C2, C6細胞は骨芽細胞の分化に関与すると考えられている転写因子*Dlx5*のmRNAをBMP-2非添加の状態でも発現していた。そして、*Dlx5* mRNAの発現はBMP-2を添加すると時間依存性的および用量依存的に上昇した。

D. 考察

我々は*Cbfa1*ノックアウトマウスの解析から、*Cbfa1*は骨芽細胞の分化と骨形成に必須の転写因子であることを報告した(Cell89:755-764,1997)。また、我々は*Cbfa1*欠損マウスの頭蓋冠由来培養細胞をBMP-2で処理するとOCNの産生が誘導されることも見出した(Cell89:755-764,1997)。こ

れらの結果より、*Cbfa1*は骨芽細胞の分化過程で重要な転写因子であるが、BMP-2で誘導される*Cbfa1*以外の転写因子も骨芽細胞の分化過程で重要な役割を担っていることを示唆している。本研究ではこの点を明らかにする目的で*Cbfa1*欠損細胞の性状を解析した。

本研究により*Cbfa1*欠損細胞でもBMP-2で処理することにより、OCN, ALP, PTHRのmRNAの発現が誘導されることが明らかとなった。これらの結果は、*Cbfa1*欠損細胞をBMP-2で処理すると*Cbfa1*以外で骨芽細胞の分化に関与する転写因子が誘導されている可能性を示している。我々はその候補として*Dlx5*の可能性を考えた。*Cbfa1*欠損細胞株をBMP-2で処理すると*Dlx5* mRNAの発現が上昇したが、*Dlx5*はBMP-2非添加の状態でもすでに発現していた。そのため、*Dlx5*はBMP-2によって発現が亢進する転写因子であるが、BMP-2によって発現誘導される転写因子ではないことが明らかとなった。現在、*Cbfa1*欠損細胞株を用いてBMP-2によって誘導される転写因子の同定を試みている。

*Cbfa1*は骨芽細胞の分化を調節する転写因子であるが、軟骨細胞の分化過程でどのような役割を担っているかは明らかにされていない。本研究で樹立した*Cbfa1*欠損細胞株はBMP-2非添加の状態でも、すでに軟骨細胞のマーカーであるaggrecanとtype II collagenのmRNAを発現していた。また、*Cbfa1*欠損細胞はBMP-2の処理により、野生型細胞より容易に軟骨細胞へ分化誘導することも明らかとなった。この結果は、*Cbfa1*は軟骨細胞の分化過程、特に軟骨細胞の成熟過程では、抑制的に作用している可能性を示唆している。本研究で樹立した*Cbfa1*欠損細胞株は、osteochondroprogenitorと呼べる性状を備えており、骨芽細胞と軟骨細胞の研究に有用と考えられる。

E. 研究発表

Cbfa1は骨形成に必須な転写因子であるが、骨芽細胞前駆細胞はCbfa1が存在しなくてもBMPで誘導される他の因子を介してある段階までは分化できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishida S, Nakamura T, Yamaguchi A, et al.: The effect of monoclonal anti-human GP130 antibody on the bone metabolism in normal and ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*, 62:227-236, 1998.
2. Wada Y, Yamaguchi A., et al.: Changes in osteoblast phenotype during differentiation of enzymatically isolated rat calvaria cells. *BONE*, 22:479-485, 1998.
3. Kawasaki K, Yamaguchi A., et al.: Effects of recombinant human BMP-2 on differentiation of cells isolated from human bone, muscle and skin. *BONE*, 23:223-231, 1998.
4. Gao Y-H, Yamaguchi A., et al.: Potential role of Cbfa1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 252:697-702, 1998.
5. Takiguchi T, Kobayashi M, Yamaguchi A, et al.: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblast differentiation and suppresses matrix metalloproteinase-1 production in human bone cells isolated from mandibulae. *J. Periodont. Res.*, 33:476-485, 1998.

G. 知的所有権の取得状況

なし

アデノウイルスベクターを用いた破骨細胞機能の調節

分担研究者：田中 栄（東京大学医学部整形外科・助手）

非レセプター型のチロシンキナーゼであるc-Srcは破骨細胞に大量に発現しており、骨吸収に重要である。c-Srcの活性を負に調節する遺伝子であるC-terminal Src Kinase (Csk) を組み込んだアデノウイルスベクターは破骨細胞の細胞骨格を破壊し、骨吸収をin vitroのみならずin vivoでも抑制した。

キーワード：破骨細胞、アデノウイルスベクター、c-Src、Csk

A. 研究目的

骨粗鬆症における病的な骨吸収を抑制するためには破骨細胞の骨吸収メカニズムを知り、その機能を調節することが重要である。われわれは最近アデノウイルスベクターを用いて破骨細胞に効率よく遺伝子導入が可能であることを明らかにした。本研究の目的はアデノウイルスベクターを用いてc-Srcの活性をネガティブに調節する遺伝子であるCskを導入することによって破骨細胞機能を調節することである。

B. 研究方法

破骨細胞としてはマウス骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養によって得られた破骨細胞様の多核細胞（マウスOCL）を使用した。非増殖型の組換えアデノウイルスは、斎藤らの方法（COS-TPC法）に従って作製した。即ち、増殖に必要なE1A、E1Bの2つの遺伝子は欠損し、CAG（cytomegalovirus IE enhancer + chicken β -actin promoter + rabbit β -globin poly(A) signal）プロモーターを持つほぼ全長のウイルスゲノムを含むコスミドカセットに目的遺伝子（CskおよびKinase-deficient Csk）を挿入し、293細胞での相同組換えにより目的の

アデノウイルスベクターを得た。破骨細胞における遺伝子の発現は、組換えアデノウイルス感染の2日後に特異的な抗体によるウエスタンブロットを行って確認した。c-Srcの活性は、エノラーゼを基質としたキナーゼアッセイによって調べた。c-Cbl, p130Cas, Pyk2のチロシンリン酸化は免疫沈降物の抗リン酸化チロシン抗体を用いたウエスタンブロットによって調べた。破骨細胞のアクチンリング形成はrhodamine-labelled phalloidineによって行い、破骨細胞の骨吸収能は、破骨細胞によって象牙質切片上に形成された吸収窩の面積を測定することによって定量した。In vivoでの解析はBoyceらのモデルを用いて行った。すなわちマウス頭蓋骨にインターロイキン1を単独で、あるいは組換えウイルスとともに注入し、頭蓋骨に誘導された骨吸収を定量した。

C. 研究結果

CskおよびKinase-deficient Csk (Csk-KD) を組み込んだアデノウイルスはそれぞれの遺伝子を効率よく破骨細胞に発現させることが可能であった。Cskの大量発現によって破骨細胞におけるc-

Srcのキナーゼ活性の抑制が認められ、c-Cbl, p130Cas, Pyk2のリン酸化の低下が見られた。一方Csk-KDの発現によってc-Srcの活性化が認められた。Cskウイルスを感染させた破骨細胞ではアクチンリングの形成が抑制されるとともに吸収窩形成の抑制が認められた。In vivoでもCskウイルスはIL-1によって誘導された骨吸収を強力に抑制した。一方Csk-KDウイルスは破骨細胞のアクチンリング形成を抑制せず、in vitro, in vivoでの骨吸収をむしろ促進する効果が認められた。Csk, Csk-KDいずれのウイルスも破骨細胞の生存維持には関与していなかった。

D. 考察

骨吸収病変の治療の一つの選択肢として遺伝子治療に対する期待は非常に大きいと考えられる。これまで破骨細胞をターゲットとした遺伝子治療が困難であった理由としては破骨細胞への遺伝子導入が極めて難しかったということが挙げられる。われわれはこれまでにアデノウイルスベクターを用いることによって破骨細胞に効率よく遺伝子の導入が可能であることを示してきた。また今回アデノウイルスベクターを用いてCsk遺伝子を導入することで破骨細胞のc-Srcの活性を抑制し、そのシグナル伝達系を抑制することによって破骨細胞機能を調節することが可能であることが明らかになった。今回の結果はc-Srcをターゲットとした遺伝子治療によって破骨細胞の機能を調節できることを示している。しかしアデノウイルスベクターは発現が一過性である、生体内の免疫反応を惹起するなどの問題点が挙げられており、さらなるベクターの改良が必要である。このようなベクターの開発によって近い将来遺伝子治療の骨吸収病変への応用が可能になると考えられる。

E. 研究発表

アデノウイルスベクターを用いたCsk遺伝子導入法は骨吸収性疾患の遺伝子治療法として有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kelly, K., Tanaka, S., Rodriguez, B.R., Baron, R. and Gimble, J.M.: Murine bone marrow stromal-derived BMS2 adipocytes support differentiation and function of osteoclast-like cells in vitro. **Endocrinology**, 139:2092-2101, 1998.
- 2) Tanaka, S., Takahashi, T., Takayanagi, H., Miyazaki, T., Oda, H., Nakamura, K., Hirai, H. and Kurokawa, T.: Modulation of osteoclast function by adenovirus-mediated epidermal growth factor receptor. **J. Bone Miner. Res.**, 13:1714-1720, 1998.
- 3) Takayama, Y., Tanaka, S., Nagai, K. and Okada, M.: Adenovirus-mediated overexpression of C-terminal Src Kinase (Csk) in type I astrocytes with cell spreading and attachment to fibronectin. ~Correlation with tyrosine phosphorylation of paxillin and FAK. **J. Biol. Chem.**, 274:2291-2297, 1999.

G. 知的所有権の取得状況

なし

骨髄未分化間葉系細胞に対するヒトPTH(1-34) の分化調節作用

堀 正幸（旭化成工業株式会社骨代謝研究所・所長）

骨髄中の未分化間葉系細胞の分化に対するヒトPTH(1-34)の作用を*in vitro*で検討したところ、PTHは転写因子の遺伝子発現調節を介して脂肪細胞への分化を用量依存的に抑制することが明らかとなった。さらにこのPTHの作用を*in vivo*で検証した結果、卵巣摘出ラット脛骨骨幹部の骨髄腔では、疑似手術群に比較して著明に脂肪組織が増加していたのに対して、hPTH(1-34)を投与されたラットでは、脂肪組織量の増加が用量依存的に抑制されることが観察された。以上の結果から、PTHは骨量増加作用のみならず骨髄腔中の脂肪組織の進展を抑制し、骨髄環境の改善作用も有することが示唆された。

キーワード：hPTH(1-34)、未分化間葉系細胞、骨芽細胞、脂肪細胞

A. 研究目的

骨髄中には軟骨細胞、骨芽細胞、脂肪細胞、間質細胞などへの多分化能を有する未分化間葉系細胞が存在することが推定されており、正常な骨代謝過程ではこれら細胞群への分化振り分けと成熟化がバランスよく制御されていると考えられている。

一方、骨粗鬆症を始めとする代謝性骨疾患の一部では、骨量の減少と前後して骨髄腔が脂肪組織に置換する、いわゆる脂肪髄が観察されることが報告されているため、このような病態では、未分化間葉系細胞から骨芽細胞への分化が障害または抑制され、逆に脂肪細胞への分化が亢進している可能性がある。

現在、当社で骨粗鬆症治療剤として開発を行っている副甲状腺ホルモン(PTH)は、これま

で軟骨細胞や骨芽細胞の分化を調節する作用を有することが、幾つかのグループで報告されているが、骨髄中脂肪細胞の分化に対しては、PTHがどのような作用を有するかについては殆ど明らかではない。

そこで我々は骨髄未分化間葉系細胞の脂肪細胞への分化に対するヒト副甲状腺ホルモンの作用を*in vitro*および*in vivo*で解析した。

B. 研究方式

(1) 培養細胞を用いた実験

実験には雌性リタイアSDラットを用いた。左右の大腿骨および脛骨を採取し両骨幹端部を切断して、リン酸緩衝生理食塩水にてwash outすることで骨髄細胞を回収した。骨髄細胞は遠心洗浄した後、Falcon 6well plateに $4.4 \times 10^6/\text{cm}^2$ の細

胞密度で赤血球ごと播種した。培地は10%ウシ胎児血清添加 α MEMを用いた。最初の培地交換は播種3~5日後に行い、以後は2~3日毎に実施した。この培養条件では、播種14~16日後に接着細胞が増殖しconfluentに到達する。各種薬剤処理はこの時点から8日間行った。脂肪細胞の同定はホルマリン固定した細胞をOil Red O染色することで行った。また細胞からTotal RNAを分離し、PPAR- γ 2遺伝子、AEBP1遺伝子の各発現量をRT-PCRにて解析した。

(2) 卵巣摘出ラットを用いた実験

実験には5ヶ月齢のFischer系ラットを用いた。ラットに卵巣摘出術あるいは疑似手術を施し、6ヶ月後から、hPTH(1-34) 1.5 μ g/kg、6 μ g/kg、30 μ g/kg、60 μ g/kgをそれぞれ週1回6ヶ月間皮下投与、またはhPTH(1-34) 20 μ g/kgを週3回6ヶ月間皮下投与した(n=6~7)。屠殺後、左脛骨を摘出し、骨幹部(腓骨接合部直上部)より輪切り切片を取得、皮質骨骨形態計測を自動画像解析装置で行った。また骨髄脂肪化率を解析するために、骨髄の中心部より正方形のエリア(276 mm \times 276 mm)を抽出し、骨髄中の脂肪髄の面積割合を測定した。

C. 研究結果

(1) 培養細胞を用いた実験

confluentに到達した骨髄細胞をデキサメサゾン 10^{-7} M、インスリン 10^{-5} M、BRL49653 5×10^{-5} Mの存在下で8日間培養したところ、薬剤非添加群に比較してOil Red O染色陽性脂肪細胞のコロニー形成が著明に誘導された(図1、図2)。

一方、デキサメサゾン+インスリン+BRL49653存在下でhPTH(1-34)を共存させた群では、脂肪細胞のコロニー形成は著明に抑制され、hPTH(1-34) 0.5 ng/ml以上の濃度範囲で、有意な

用量依存的抑制作用が観察された(図1,2)。

薬剤添加8日目におけるPPAR- γ 2遺伝子の発現は、薬剤非添加群に比較してデキサメサゾン+インスリン+BRL49653添加群で著明に促進されていたが、hPTH(1-34)を共存させた群では強力に抑制されていた(data not shown)。またAEBP1遺伝子の発現は薬剤非添加群で僅かに観察されたが、デキサメサゾン+インスリン+BRL49653添加群では強く抑制されていた。一方、hPTH(1-34)の共存群ではAEBP1遺伝子の発現は薬剤非添加群に比較して、さらに著明に促進されていた(data not shown)。

(2) 卵巣摘出ラットを用いた実験

脛骨骨幹部の病理組織像を比較したところ、疑似手術群に比べ卵巣摘出群で明らかな骨髓腔の拡大と、骨髓内の脂肪組織量の増加が観察された。一方、hPTH(1-34) 20 μ g/kg週3回の投与群では骨髓腔拡大の抑制と、脂肪組織量の増加が著しく抑制されていることが観察された(図3)。

同部の皮質-全断面面積比(Cortical Area/Total Area)は、疑似手術群に比較して卵巣摘出群で減少傾向が観察されたが、hPTH(1-34)投与群では投与量依存的、且つ有意な減少抑制効果が観察され、hPTH(1-34)の骨量増加作用が認められた(図4)。一方、同一標本における骨髓内脂肪面積比(Adipose Area/Marrow Area)は卵巣摘出群で著明な増加が観察されたが、hPTH(1-34)投与群では投与量依存的に、卵巣摘出による骨髓内脂肪面積比の増加が抑制され、特に高投与量群では有意な改善効果が認められた(図4)。

D. 考察

卵巣摘出動物では骨量の低下と共に骨髓腔中の脂肪組織量が増加し、この脂肪組織量の増加は脂肪細胞数と個々の細胞の大きさが増加する

ことに因ることが報告されている^{1,2)}。またこの脂肪組織の増加は骨形態計測学的には、骨吸収のパラメーターより、むしろ骨形成のパラメーターとよく相関（負相関）することから、骨芽細胞の分化・機能との関連性が強く示唆されている³⁾。実際、Owenら⁴⁾やFriedensteinら⁵⁾によって骨芽細胞と脂肪細胞の両者に分化し得る単一細胞由来のクローンが単離されており、骨組織に特異的に存在する幹細胞（間質幹細胞：stromal stem cell、または未分化間葉系細胞：pluripotent mesenchymal progenitorと呼称）が骨芽細胞と脂肪細胞にそれぞれバランスよく分化すること。この分化調節機構が、よりマクロな骨代謝調節機構に極めて密接に関与していることが想定されている⁶⁾。

今回、本研究により、hPTH(1-34)はラット骨髄中の未分化間葉系細胞から脂肪細胞への分化を*in vitro*で抑制し、卵巣摘出に起因した脂肪髄の発症進展を*in vivo*でも抑制することが初めて明らかとなった。これまでにPTHは極めて強力な骨量増加作用を有することが、我々を含めた複数の研究施設で実証されているが、この作用メカニズムは必ずしも明確ではない。Nishidaら⁷⁾やIsogaiら⁸⁾は骨髄中の未分化間葉系細胞から骨芽細胞への分化をPTHが促進する可能性を報告している。さらに今回の卵巣摘出ラットを用いた実験から、卵巣摘出術とPTH投与による骨量の変化と骨髄中脂肪組織面積の変化は逆相関する傾向が認められた。これらの結果を併せて考えると、PTHが未分化間葉系細胞、とりわけ骨芽細胞と脂肪細胞の分化調節機構に重要に関与している可能性が強く示唆される。すなわち、脂肪細胞への分化抑制作用のメカニズムが骨量増加作用のメカニズムに密接に関わっている可能性が推測される。

今回、我々はその観点に立った作用メカニズムの解析に着手し、PTHが脂肪細胞の分化を促進する転写因子PPAR- γ 2 (Peroxisome Proliferator Activated Receptor- γ 2)^{9, 10)}の遺伝子発現を抑制すること。また、脂肪細胞の分化を抑制する転写因子AEBP1 (Adipocyte Enhancer Binding Protein 1)¹¹⁾の遺伝子発現を促進することを見出した。これらの結果はPTHが脂肪細胞の分化を遺伝子レベルで抑制していることを示唆していると共に、骨芽細胞の分化促進作用においても転写因子を介したメカニズムが関与している可能性を示唆している。今後、PTHの薬効メカニズム解明に向けてさらに詳細に検討する予定である。

E. 結論

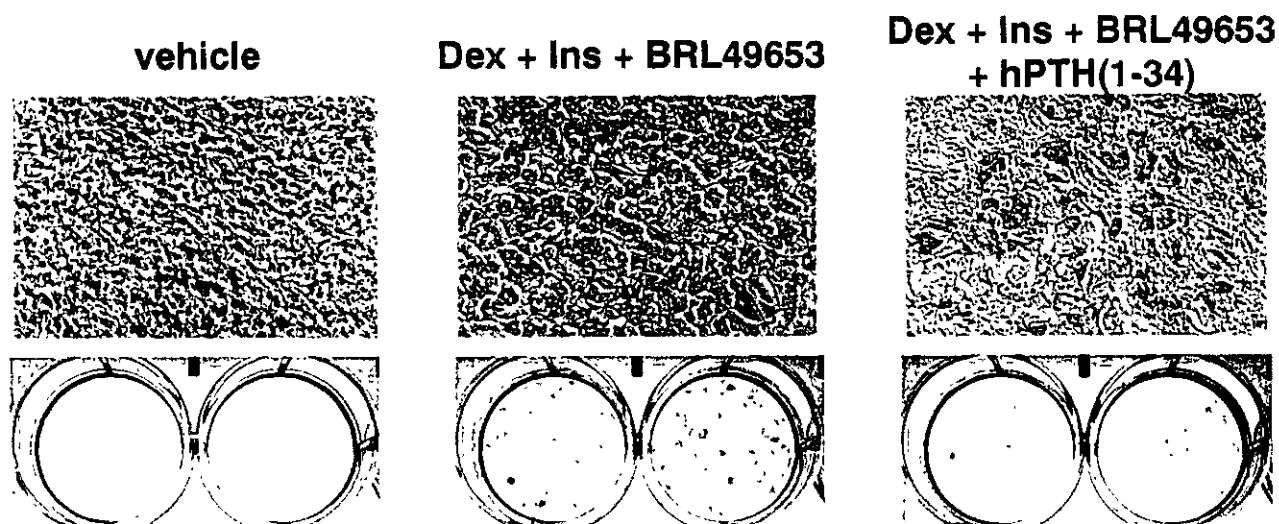
ヒト副甲状腺ホルモンは、骨髄脂肪細胞の分化を抑制し、卵巣摘出に起因した脂肪髄の進展を抑制する。

F. 引用文献

- 1) Martin, R. B. and Zissimos, S. L.: Relationships between marrow fat and bone turnover in ovariectomized and intact rats. *Bone*, 12:123-131, 1991
- 2) Burkhardt, R., Kettner, G., Bohn, W., Schmidmeier, M., Schlag, R., Frisch, B., Mallmann, B., Eisenmenger, W. and Gilg, T. H.: Changes in trabecular bone, hematopoiesis and bone marrow vessels in aplastic anemia, primary osteoporosis and old age: A comparative histomorphometric study *Bone*, 8:157-164, 1987.
- 3) Martin, R. B., Chow, B. D. and Lucas, P. A.: Bone marrow fat content in relation to bone remodeling and serum chemistry in intact and

- ovariectomized dogs. *Calcif. Tissue Int.*, 46:189-194, 1990
- 4) Benett, J. H., Joyner, C. J., Triffitt, J. T and Owen, M. E.: Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J. Cell Sci.*, 99:131-139, 1991.
- 5) Friedenstein, A. J., Chailakhyan, P. K. and Gerasimov, U. V.: Bone marrow osteogenic stem cells: In vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet.*, 20:263-272, 1987.
- 6) Gimble, J. M., Robinson, C. E., Wu, X. and Kelly, K. A.: The function of adipocytes in the bone marrow stroma: An update. *Bone*, 19:421-428, 1996.
- 7) Nishida, S., Yamaguchi, A., Tamizawa, T., Endo, N., Mashiba, T., Uchiyama, Y., Suda, T., Yoshiki, S. and Takahashi, H. E.: Increased bone formation by intermittent parathyroid hormone administration is due to the stimulation of proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in bone marrow. *Bone*. 15:717-723, 1994.
- 8) Isogai, Y., Akatsu, T., Ishizuya, T., Yamaguchi, A., Hori, M., Takahashi, N and Suda, T.: Parathyroid hormone regulates osteoblast differentiation positively or negatively depending on the differentiation stage. *J. Bone Miner. Res.*, 11:1384-1393, 1996.
- 9) Tontonoz, P., Hu, E. and Spiegelman, B. M.: Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR- γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, 79:1147-1156, 1994.
- 10) Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R. A., Budavari, A. I. and Spiegelman, B. M.: mPPAR- γ 2 : tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Gene Dev.*, 8:1224-1234, 1994.
- 11) He, G. P., Muise, A. Li, A. W. and Ro, H. S.: A eukaritoic transcriptional repressor with carboxypeptidase activity. *Science*, 378:92-96, 1995.
- G. 研究発表
1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし
- H. 知的所有権の取得状況
なし

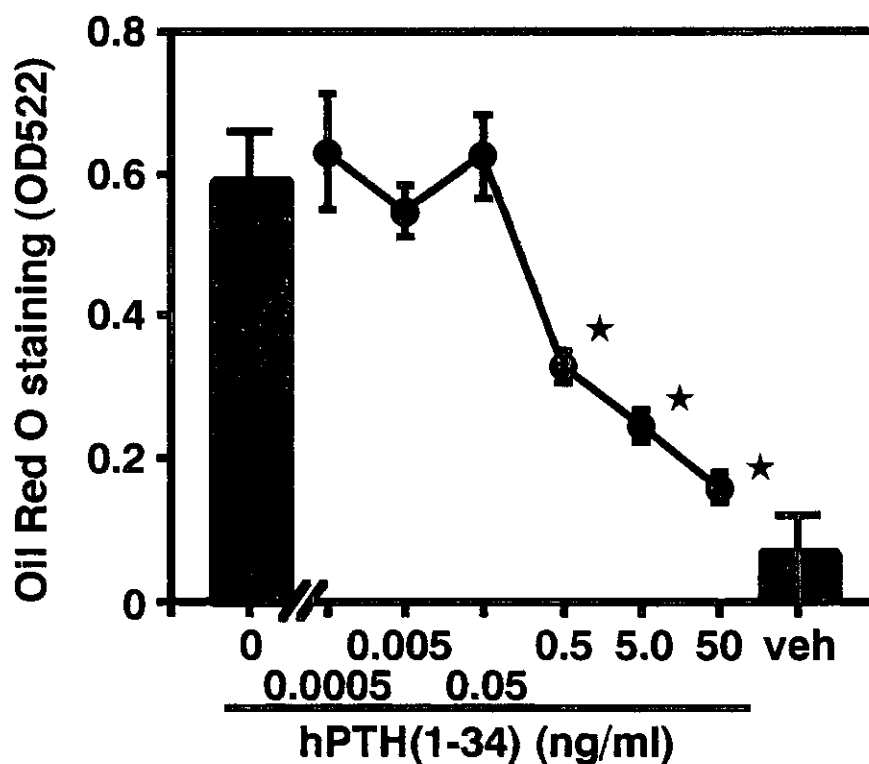
図1 ラット骨髄細胞の脂肪細胞分化に対するhPTH(1-34)の影響



(Oil Red O staining)

Dex : dexamethasone 10^{-7} M
 Ins : insulin 10^{-5} M
 BRL49653 : 5×10^{-5} M
 hPTH(1-34) : 50 ng/ml

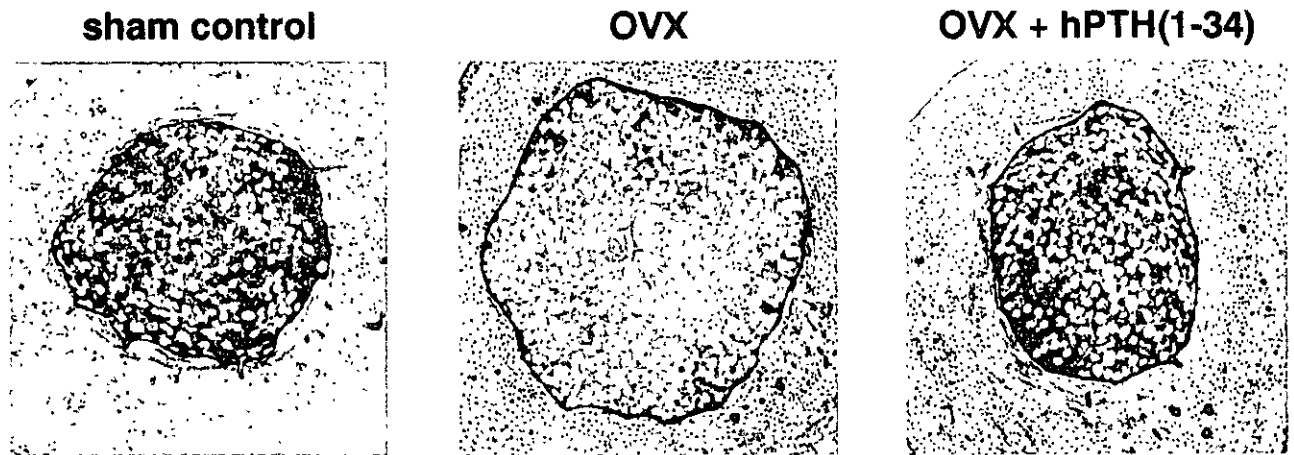
図2 ラット骨髄細胞の脂肪細胞分化に対するhPTH(1-34)の用量依存的抑制作用



Dex + Ins + BRL49653

Dex : dexamethasone 10^{-7} M
 Ins : insulin 10^{-5} M
 BRL49653 : 5×10^{-5} M

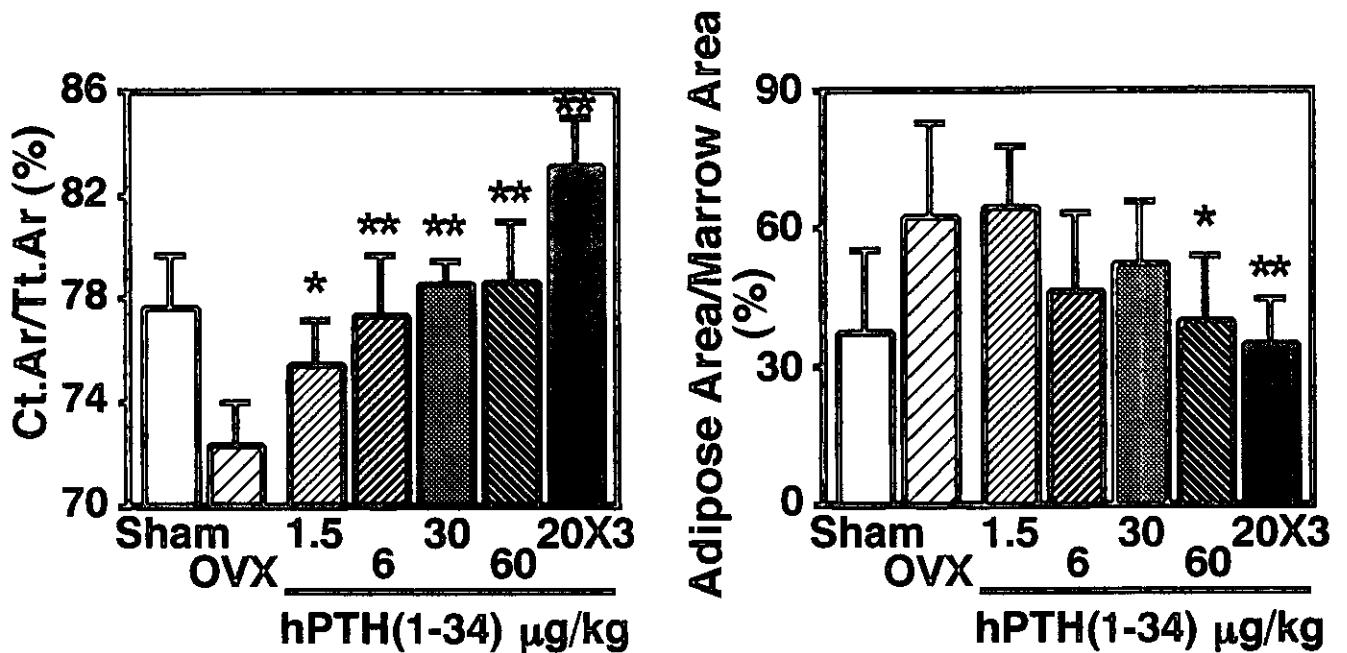
図3 卵巣摘出ラット脛骨骨幹部の病理組織像



(Villanueva bone staining)

卵巣摘出6カ月後よりhPTH(1-34) 20 μ g/kgを週3回6カ月間皮下投与

図4 卵巣摘出ラット脛骨の皮質骨減少および脂肪髄進展に対するhPTH(1-34)投与の影響



卵巣摘出6カ月後よりhPTH(1-34)の各用量を週1回6カ月間皮下投与 (20X3は20 μ g/kgのPTHを週3回6カ月間皮下投与)

厚生科学研究費補助金（厚生省長期慢性疾患総合研究事業）
分担研究報告書

骨粗鬆症治療薬を目指す新規ビタミンD誘導体(ED-71)の開発
卵巣摘出モデルを用いた作用機序の解明

久保田直樹 (中外製薬(株)創薬第二研究所 主席研究員)

研究要旨 新規ビタミンD誘導体である2β-(3-Hydroxypropoxy)-1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ (ED-71)の作用機序について明確にするために、卵巣摘出(OVX)ラットを用いた解析を実施した。その結果、ED-71は、PTHあるいは17β-エストラジオールとは異なり、骨吸収抑制作用と骨形成促進作用を併せ持つ新しいタイプの骨粗鬆症治療薬であり、低用量では骨吸収抑制作用が、至適用量以上においては骨吸収抑制作用に加えて骨形成促進作用が発揮されることが明らかとなった。また、ED-71の低用量から認められる骨吸収抑制作用は、従来から考えられてきた腸管からのCa吸収促進作用および副甲状腺からのPTH分泌抑制作用を介する可能性に加えて、これらとは異なる新たなメカニズムを介する可能性が示された。

キーワード：ビタミンD、骨粗鬆症、卵巣摘出モデル、骨密度、骨吸収、骨形成

A.研究目的

現在、活性型ビタミンD₃およびそのプロドラッグである1α(OH)D₃は骨粗鬆症治療薬として国内で広く用いられている。我々はさらに優れた治療効果が期待される薬剤を目指し、様々なビタミンD誘導体を合成する中で、骨量増加作用が極めて強い誘導体として1α,25(OH)₂D₃の2β位にヒドロキシプロポキシル基を導入したED-71を見出した。これまでの卵巣摘出(OVX)ラットを用いた研究より、ED-71は骨量減少を予防するのみならず、一旦減少した骨量をもとのレベルにまで回復させる作用を有することが示されている。また、骨粗鬆症治療薬として求められる骨量増加作用に伴った骨強度の改善作用を有する化合物であることが明らかにされている。本研究では、ED-71の骨作用の機序について明確にするために、OVXラットを用いた解析を実施した。

B.研究方式

1.モデルの作製および薬剤の投与

<実験 1.>8~9ヶ月齢のWistar-Imamichi雌性ラットの両側卵巣を摘出(OVX)することにより、骨粗鬆症モデルを作製した。ED-71は0.05、0.1および0.2 μg/kgの用量にてOVX後3ヶ月より週2回、3ヶ月間経口投与した。recombinant human PTH(1-84)は、1.25、5および20 nmol/kgの用量にてOVX後3ヶ月より週5回、3ヶ月間皮下投与した。17β-エストラジオールは、OVX後から、4、20および100 μg/kgの用量にて、週5回、3ヶ月間皮下投与した。投与終了2週間よりテトラサイクリンおよびカルセインによる骨の二重ラベルを行った。投与終了後、24時間の絶食を行い、血液、尿を採取するとともに、腰椎を摘出した。

<実験 2.>8ヶ月齢のWistar-Imamichi雌性ラットの両側卵巣をOVXすることにより、

骨粗鬆症モデルを作製した。ED-71 は 0.005、0.01、0.02、0.04 および 0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量にて OVX 後 5 ヶ月より週 5 回、1 ヶ月間経口投与した。

2. 骨密度の測定

腰椎骨密度は、摘出した腰椎の第 2 から第 4 腰椎までの平均骨密度をアロカ社製二重 X 線骨塩量測定装置 (DCS-600) を用いて測定した。

3. 骨形態計測

摘出した第 3 腰椎の硬組織薄切標本を作製し、蛍光顕微鏡下、ビデオカメラ (DK-3000, 日立) にて取り込まれた画像を、ニコン社製描画装置 (コスモゾーン) を用いて各種パラメーターを測定した。

4. 血中および尿中生化学検査

尿中カルシウム (Ca) および尿中クレアチニン (Cre) 量は、自動分析装置 (日立 7170 型) にて測定した。また、副甲状腺ホルモン (PTH) は rat PTH kit (Immutopics, inc) にて、オステオカルシンは rat osteocalcin RIA reagents (Biomedical Technologies inc.) にて測定した。尿中デオキシピリジノリンは PYRILINKS-D kit (Metra Biosystems) にて、測定した。

5. 統計解析

得られたデータは中外製薬統計解析システム上で Dunnett の多重比較検定を行い、危険率 5% 未満の差を有意とした。

C. 研究結果

<実験 1: PTH(1-84)、 17β -エストラジオールとの作用機序の比較>

図 1 に示すように、OVX により一端減少した腰椎骨密度は、PTH(1-84) の投与量に応じて増加し、5 nmol/kg で sham レベルの骨密度に達し、20 nmol/kg の用量においては sham レベル以上に増加した。腰椎の骨形態計測の結果、

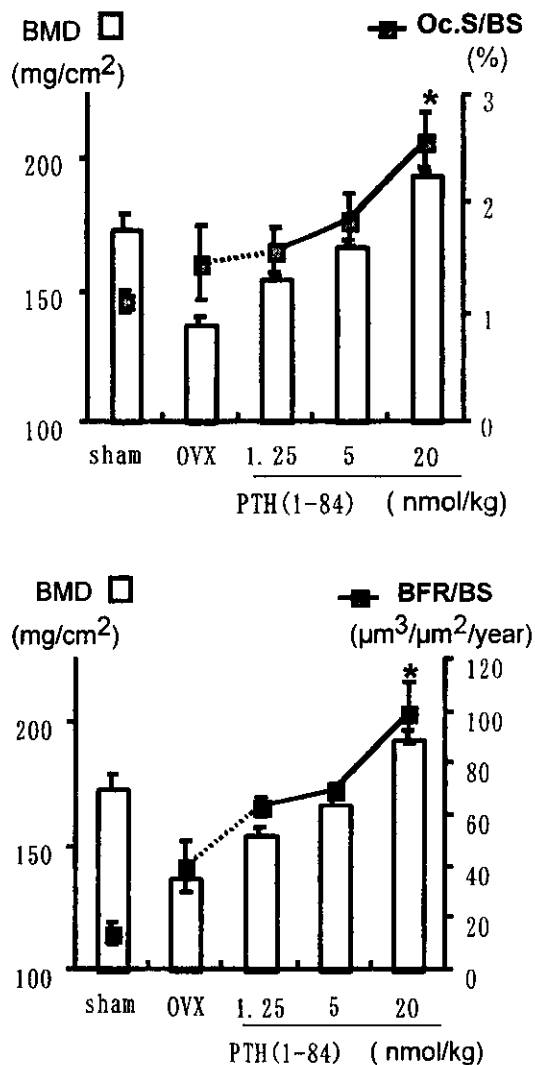


図 1. PTH(1-84) の OVX ラットに対する効果

* $P < 0.05$ (vs. OVX)

骨形成パラメーターである骨形成率 (BFR/BS) は骨密度の増加作用と一致し用量依存的に増加したのに対し、骨吸収パラメーターである破骨細胞面 (Oc.S/BS) は、20 nmol/kg の用量においてのみ上昇した。一方、 17β -エストラジオールは、OVX による骨密度減少を抑制し、図 2 に示したように 4、20 および 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のいずれの用量にておいても sham レベルの骨密度が維持された。また、 17β -エストラジオール