

After culturing for a further 24 h at 37°C, the gel was used for the contraction assay (see Fig. 4Ba). The lateral surface of the gel was carefully detached from the culture well with a fine needle. The culture plate was then placed on a hotplate (MP-10 DM; Kitazato Supply, Shizuoka, Japan) and kept at 37°C. The gel images were captured with a digital camera (QV-800SX, Casio, Tokyo, Japan) every 1 min throughout the experiment. Contraction of the gel was then evaluated by measuring its surface area with image analysis software (Adobe Photoshop, Adobe Systems Inc., USA).

Measurement of ATP release with luciferase bioluminescence

For the measurement of the extracellular ATP concentration ($[ATP]_o$), BAECs and BBECs were seeded on 96-well culture plates at densities of 5000 cells well⁻¹. After culturing for 3 days, $[ATP]_o$ was measured using luciferin–luciferase chemiluminescence as previously described (Oike *et al.* 2000).

Western blotting of eNOS protein expression

Expression of eNOS protein in BAECs and BBECs was assessed by chemiluminescence Western blotting. Cells were lysed with 2% SDS and the lysate was electrophoresed through 7.5% polyacrylamide gel. Western blot analysis for eNOS protein was then performed using anti-eNOS polyclonal antibody (StressGen Biotechnologies Co., San Diego, CA, USA) and a chemiluminescence system (SuperSignal West Dura, Pierce Co., Rockford, IL, USA). Emitted chemiluminescence was detected and analysed with a lumino image analyser (FAS-1000, Toyobo, Osaka, Japan).

L-[³H]arginine uptake

Measurement of cellular uptake of L-[³H]arginine (Amersham, Uppsala, Sweden) was performed as previously reported (Nelin *et al.* 2001) with slight modifications. BBECs and BAECs were seeded on 6-well culture plates at a density of 25 000 cells well⁻¹. After culturing for 3 days, the cells were washed three times with Hanks' balanced salt solution (HBSS, Sigma, St Louis, MO, USA). To determine total L-[³H]arginine uptake, 1 ml of HBSS with 1 μ Ci ml⁻¹ L-[³H]arginine was placed on each well. Non-specific uptake of L-[³H]arginine was determined with HBSS containing 1 μ Ci ml⁻¹ L-[³H]arginine and 10 mM unlabelled L-arginine. After 15 min of incubation at 37°C, the cells were washed three

times with ice-cold HBSS, and lysed with 1 ml well⁻¹ of 0.2 N NaOH. Aliquots were added to scintillation cocktail and radioactivity was quantified with a liquid scintillation spectrometer (LSC3500, Aloka Co., Tokyo, Japan).

Drugs and solutions

Krebs solution used in the present study contained (mM); NaCl 132.4, KCl 5.9, CaCl₂ 1.5, MgCl₂ 1.2, glucose 11.5, Hepes 11.5, and pH was adjusted to 7.4 by NaOH. Hypotonic solution (~30%) was prepared by adding distilled water to Krebs solution at a water : Krebs ratio of 3 : 7. We have previously shown that altering the ionic composition of Krebs solution by adding water does not influence the cellular Ca²⁺ responsiveness (Oike *et al.* 2000). All drugs used in the present study were purchased from Sigma.

Statistics

Pooled data were expressed as means \pm s.e.m. values. Statistic significance was examined with Student's unpaired *t* test. A probability below 0.05 ($P < 0.05$) was considered to show a significant difference.

Results

Effects of ATP and A23187 on NO production in BAECs and BBECs

We have previously reported that ATP induced Ca²⁺ transients both in BBECs and BAECs, but the concentration–response relationship in BBECs was shifted to higher concentrations than that in BAECs (Kimura *et al.* 1998a, 2000b). This was confirmed in this study; i.e. ATP (1 μ M) induced Ca²⁺ oscillations in Krebs solution in BAECs (Fig. 1Aa), and a similar Ca²⁺ response was obtained with 10 μ M ATP in BBECs (Fig. 1Ab and c). The Ca²⁺ ionophore A23187 (1 μ M) also induced $[Ca^{2+}]_i$ elevation in both cell types (Fig. 1Ba and b). The net increments in 1 μ M A23187-induced Ca²⁺ transients were not significantly different in BAECs and BBECs (Fig. 1Bc).

We then evaluated Ca²⁺-dependent NO production in BAECs and BBECs using DAF-2. We have previously demonstrated that Ca²⁺ mobilization evoked by ATP or A23187 induced an increase in NO production in BAECs (Koyama *et al.* 2002). As shown in Fig. 2A, a solution exchange alone did not induce any apparent change in DAF-2 fluorescence up to 20 min in both BAECs and BBECs, even in the presence of 3 mM L-arginine. In BAECs, ATP (1 μ M) induced a gradual increase in

DAF-2 fluorescence (○, Fig. 2B), which was inhibited by pretreatment with 0.1 mM L-NAME (Fig. 2D), suggesting that DAF-2 fluorescence was properly linked to cellular NO production. In contrast, BBECs did not show any increase in DAF-2 fluorescence in response to 10 μ M ATP (●, Fig. 2B), even though this concentration of ATP induced Ca^{2+} transients in BBECs (Fig. 1A). A23187 also induced an increase in DAF-2 fluorescence in BAECs, but not in BBECs (Fig. 2C). These results are summarized in Fig. 2D, and indicate that ATP and A23187 do not induce NO production in BBECs.

Effects of hypotonic stress on NO production in BAECs and BBECs

We have previously reported that hypotonic stress (HTS), as an example of mechanical stress, induces NO production in a Ca^{2+} -dependent manner due to ATP release in BAECs (Kimura *et al.* 2000a; Oike *et al.* 2000). So we then compared the HTS-induced, ATP-mediated NO production in BAECs and BBECs. HTS (−30%) induced

ATP release in BAECs as previously reported (Oike *et al.* 2000). $[\text{ATP}]_o$ was elevated to 55.8 ± 5.9 nM after being exposed to HTS for 10 min ($n = 14$), whereas it was 28.8 ± 3.2 nM when the cells were kept in isotonic solution for the same period ($n = 14$, Fig. 3A). In contrast, a HTS-induced increase in $[\text{ATP}]_o$ was not observed in BBECs; i.e. $[\text{ATP}]_o$ was 25.6 ± 2.5 nM in isotonic solution ($n = 13$) and 28.1 ± 2.3 nM in hypotonic solution ($n = 13$, $P > 0.05$ versus isotonic). As expected, HTS induced an increase in DAF-2 fluorescence in BAECs, but not in BBECs (Fig. 3B).

Endothelium-dependent relaxation of smooth muscle cell-embedded collagen gels

To further investigate NO production in BBECs and BAECs, we have developed a novel method for detecting cultured endothelium-dependent vasorelaxation. Endothelial cells were overlaid onto a BASMC-embedded collagen gel lattice as shown in the cartoon (Fig. 4Ba) so that endothelium-derived substances could affect the gel contraction.

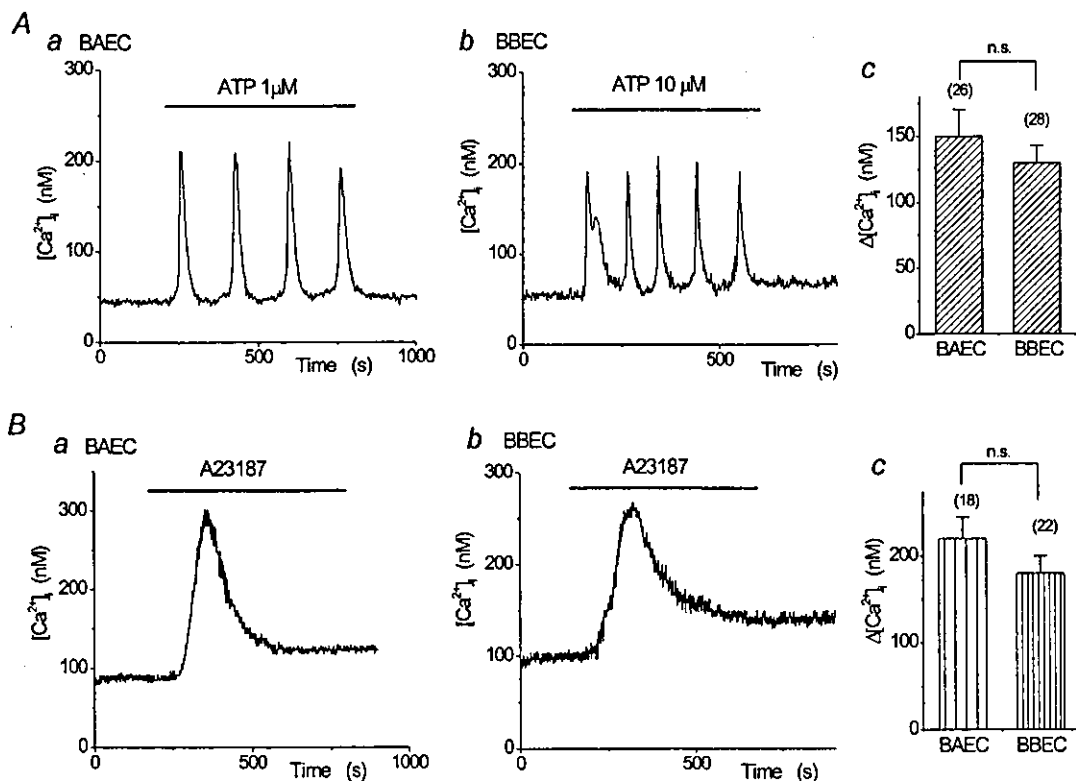


Figure 1. Ca^{2+} transients induced by ATP and A23187 in bovine aortic (BAECs) and brain microvascular (BBECs) endothelial cells

A, representative traces of ATP-induced Ca^{2+} oscillations in BAECs (a) and BBECs (b). Similar levels of net $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) were obtained with 1 μ M and 10 μ M ATP in BAECs and BBECs, respectively (c). B, A23187 (1 μ M) induced Ca^{2+} transients in both BAECs (a) and BBECs (b) to a similar degree (c). n.s., $P > 0.05$.

In this assay, we used the classical endothelial agonist ACh (Furchgott & Zawadzki, 1980) as a Ca²⁺ mobilizing agent. ACh (10 μM) induced Ca²⁺ transients in BAECs (Fig. 4Aa). The same concentration of ACh (10 μM) induced smaller Ca²⁺ responses in BBECs (not shown), and a similar Ca²⁺ response was obtained with a higher concentration of ACh (100 μM, Fig. 4Ab).

BASMC-embedded collagen gel lattices showed a rapid contraction in response to noradrenaline (NAD, 1 μM) both in BAEC- and BBEC-overlaid gels (Fig. 4Bb and c, ○). Pretreatment with L-NAME did not affect the NAD-induced contraction both in BAEC- and BBEC-overlaid gels (Fig. 4Bb and c, ●), thereby suggesting that NAD does not evoke NO production in these overlaid endothelia. Subsequent application of 10 μM ACh induced a relaxation of the precontracted gels in BAEC-overlaid gels (Fig. 4Bb, ○). The relaxation was not observed in

the absence of overlaid BAECs (not shown) and was significantly inhibited when the gel was pretreated with L-NAME (Fig. 4Bb, ●), thereby indicating that the relaxation of the gel was due to BAEC-derived NO. In contrast, when BBECs were overlaid on to a BASMC-embedded collagen gel, the precontracted gel did not show relaxation in response to 100 μM ACh (Fig. 4Bc, ○).

Therefore, these results indicate that [Ca²⁺]_i elevation leads to the release of a significant amount of NO in BAECs but not in BBECs.

Western blotting of eNOS protein expression in BAECs and BBECs

To explore the cellular mechanisms responsible for lower NO production in BBECs, we then examined the expression of eNOS protein in BAECs and BBECs with

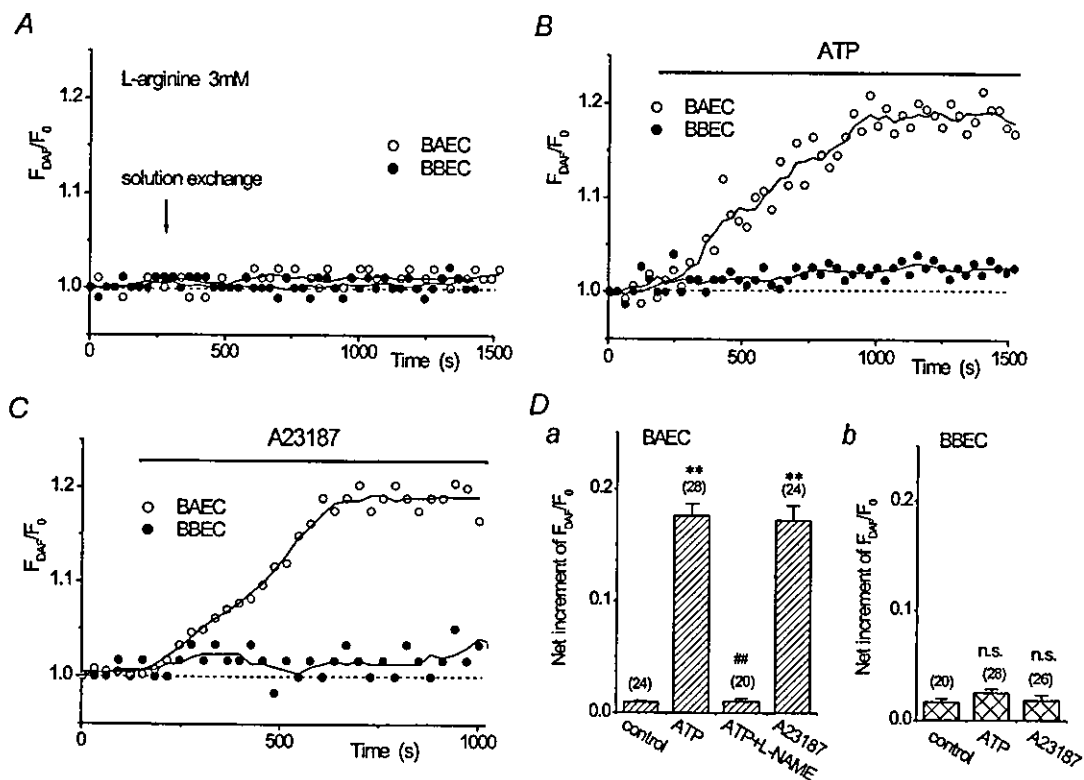


Figure 2. Effects of ATP and A23187 on NO production, assessed with DAF-2, in BAECs and BBECs
 A, solution exchange alone did not induce an increase in DAF-2 fluorescence in both BAECs (○) and BBECs (●). Representative results are shown. DAF-2 fluorescence (F_{DAF}) is expressed relative to its initial value ($t = 0, F_0$). Circles are the actual values of DAF-2 fluorescence and continuous lines were drawn by averaging the adjusting five points. Measurements were performed in the presence of 3 mM L-arginine. B, ATP (1 μM) induced an increase in DAF-2 fluorescence in BAECs (○), whereas 10 μM ATP did not show any apparent increase in DAF-2 fluorescence in BBECs (●). Representative results are shown. C, A23187 (1 μM) also increased DAF-2 fluorescence in BAECs (○) but not in BBECs (●). Representative results are shown. D, net increment of relative DAF-2 fluorescence at 10 min after solution exchange (control) or the application of ATP or A23187 in BAECs (a) and BBECs (b). Note that L-NAME (0.1 mM) inhibited ATP-induced DAF-2 fluorescence. ** $P < 0.01$ vs. control. ## $P < 0.01$ vs. ATP alone. n.s., $P > 0.05$ vs. control.

Western blotting. Though expression of eNOS protein was observed in BBECs, BAECs showed much a denser band of eNOS (Fig. 5A). Densitometric analysis revealed that the expression level of eNOS protein relative to that of the housekeeping β -actin protein was 0.133 ± 0.006 in BAECs ($n = 6$) but 0.092 ± 0.006 in BBECs ($n = 6$, Figs 5B; $P < 0.01$).

Cellular L-[³H]arginine uptake in BBECs and BAECs

To further examine the possible cause of the reduction of NO production in BBECs, we finally examined the cellular L-arginine uptake in BAECs and BBECs. As shown in Fig. 6, uptake of L-[³H]-arginine over 15 min was significantly lower in BBECs than in BAECs (BAECs, 930.6 ± 28.4 d.p.m. ($\mu\text{g protein}^{-1}$); BBECs, 638.4 ± 15.7 d.p.m. ($\mu\text{g protein}^{-1}$), $n = 5$ for both cell types, $P < 0.01$).

Discussion

We have previously reported that ATP induces Ca^{2+} oscillations in BAECs and BBECs with different concentration–response relationships (Kimura *et al.* 1998a, 2000b). The present study showed that Ca^{2+} transients induced by $1 \mu\text{M}$ ATP in BAECs were similar

to those induced by $10 \mu\text{M}$ ATP in BBECs (Fig. 1A). Furthermore, the Ca^{2+} ionophore A23187 ($1 \mu\text{M}$) induced Ca^{2+} transients in both BAECs and BBECs (Fig. 1B). In spite that the similar degree of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation was induced by ATP and A23187 in BAECs and BBECs, these agents induced an increase in DAF-2 fluorescence only in BAECs (Fig. 2), thereby suggesting that $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation does not lead to detectable NO production in BBECs. In addition, HTS induced NO production in BAECs but not in BBECs (Fig. 3B), so we suppose that mechanical stresses that can be mimicked by HTS do not evoke NO production in BBECs. We have previously shown that HTS-induced NO production is due to endogenous ATP release (Kimura *et al.* 2000a), which was also absent in BBECs (Fig. 3A). Anion channels (Sabirov *et al.* 2001; Hisadome *et al.* 2002) and vesicular exocytosis (Bodin & Burnstock, 2001) have been suggested as components of the mechanical stress-induced ATP release pathway, and tyrosine kinases and the RhoA/Rho-kinase cascade have been reported as cellular mechanisms for HTS-induced ATP release (Koyama *et al.* 2001). Therefore it can be speculated that BBECs lack some of these or any other as yet unknown mechanisms that are involved in HTS-induced ATP release.

The absence of detectable Ca^{2+} -dependent NO production in BBECs may contradict previous reports

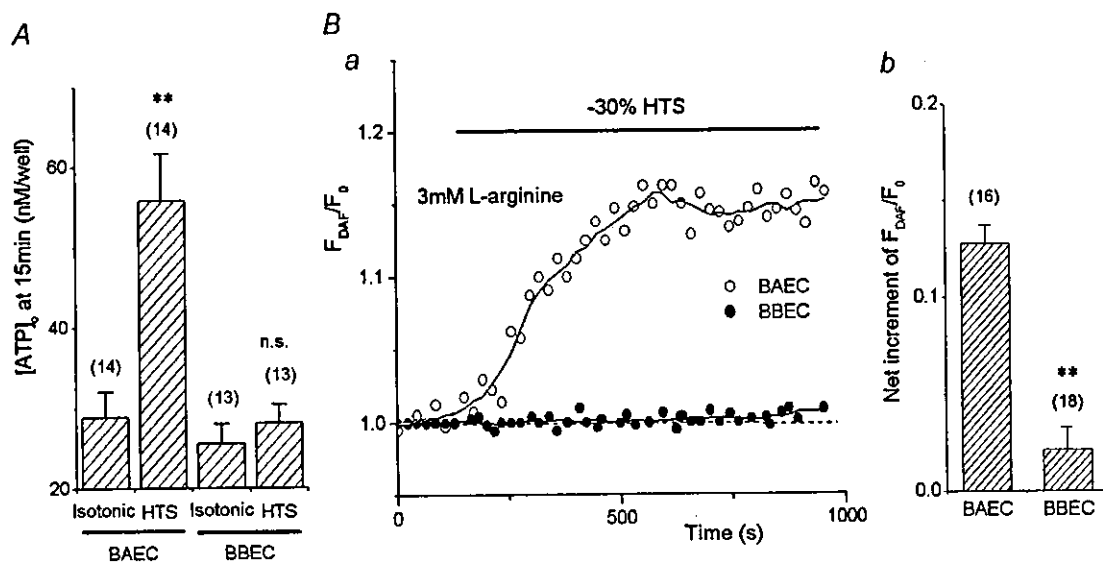


Figure 3. Effects of hypotonic stress (HTS) on ATP release and subsequent NO production in BAECs and BBECs

A, HTS (-30%) induced an increase in $[\text{ATP}]_0$ in BAECs but not in BBECs. Luciferin chemiluminescence was measured for 10 min, and converted into corresponding $[\text{ATP}]_0$ with $[\text{ATP}]_0$ -chemiluminescence standard curves obtained in each solution. ** $P < 0.01$ vs. BAEC isotonic. n.s., $P > 0.05$ vs. BBEC isotonic. Ba, gradual increase in DAF-2 fluorescence was evoked by HTS in BAECs (\circ) but not in BBECs (\bullet) in the presence of 3 mM L-arginine. Representative results are shown. Bb, Statistical analysis of net increment of relative DAF-2 fluorescence at 10 min after starting HTS. ** $P < 0.01$ vs. BAECs.

showing the expression of eNOS protein in cerebral microvessels in mouse (Ishii *et al.* 2002), rat (McNeill *et al.* 1999; Yamakawa *et al.* 2003) and pig (Gobeil *et al.* 2002). We have also observed that though the expression level is significantly lower than in BAECs, eNOS protein is certainly expressed in BBECs (Fig. 5). However, no previous studies have directly shown the production of NO in cerebral microvessels. Because the amount of NO generated by eNOS is relatively smaller than that produced by inducible NOS (Stoclet *et al.* 1999), very few methods have been introduced to measure NO production in cultured endothelium, i.e. a porphyrinic-based microsensor (Malinski & Taha, 1992) and the NO-sensitive fluorescent dye DAF-2 (Kojima *et al.* 1998).

Though DAF-2 has been successfully used to measure NO production in cultured endothelium (Kimura *et al.* 2001b; Koyama *et al.* 2002), the specificity of DAF-2 fluorescence to NO has been questioned, because it is influenced by micromolar concentrations of Ca^{2+} (Broillet *et al.* 2001). Therefore, we have developed a novel method in this study for detecting NO production in cultured endothelium (Fig. 4Ba). Endothelium-overlaid, BASMC-embedded gels showed relaxation in response to ACh, when BAECs were overlaid (Fig. 4Bb). ACh-induced relaxation was inhibited by L-NAME and was not observed in the absence of BAECs, thereby indicating that the relaxation of the gel was due to NO generated by the overlying BAECs. Thus we suppose that this

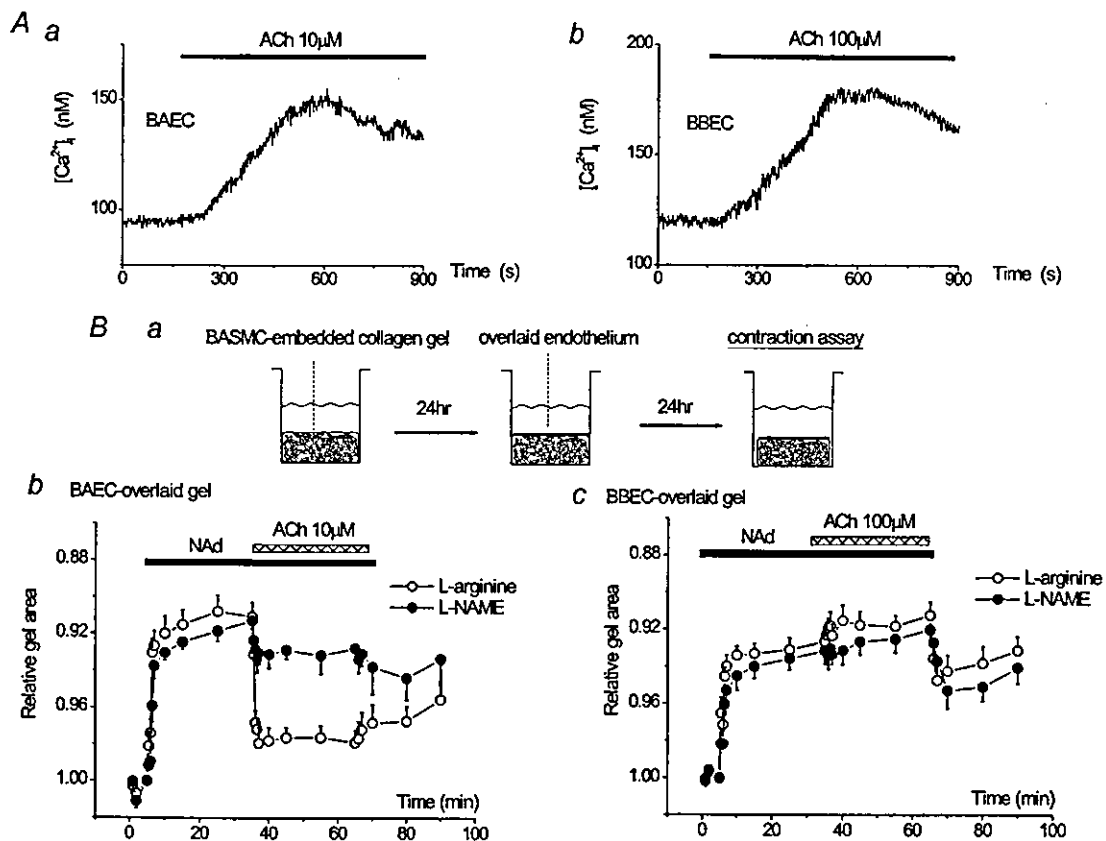


Figure 4. Endothelium-dependent relaxation of smooth muscle-embedded, endothelium-overlaid collagen gels

A, ACh (10 μ M) induced Ca^{2+} transients in BAECs (a). A similar degree of $[Ca^{2+}]_i$ elevation was obtained with a higher concentration of ACh in BBECs (100 μ M, b). Representative traces of 30 (BAEC) or 28 (BBEC) cells are shown. Ba, *in vitro* model vessel consisting of bovine aortic smooth muscle cells (BASMC) embedded in a collagen gel lattice with overlaid endothelium. BASMC were embedded in type I collagen gel, and BAECs or BBECs were overlaid after 24 h. A gel contraction assay was performed after a further 24 h (right). Noradrenaline (NAd, 1 μ M) induced a rapid contraction of the gels. Subsequent application of 10 μ M ACh induced relaxation of precontracted gels when BAEC was overlaid (b, \circ , $n = 20$). Note that L-NAME (0.1 mM) inhibited ACh-induced gel relaxation but did not affect initial gel contraction (b, \bullet , $n = 6$). BBEC-overlaid gels did not show relaxation in response to 100 μ M ACh both in control (\circ , $n = 22$) and L-NAME-treated gels (c, \bullet , $n = 6$).

method is applicable for detecting NO production in cultured endothelium. Using this method, we observed that BBECs did not induce vasorelaxation in response to 100 μM ACh (Fig. 4Bc), while this concentration of ACh induced considerable Ca^{2+} transients in BBECs (Fig. 4Ab). Pretreatment with L-NAME did not affect the initial gel contraction induced by NAd, thereby eliminating the possibility that NAd induced NO production and therefore subsequent ACh failed to generate further NO in BBECs.

Therefore, these results strongly suggest that BBECs do not generate significant amounts of NO in response to $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation. However, since we have examined NO production only in non-stimulated BBECs, this study does not exclude the possibility that eNOS in cerebral microvascular endothelium may generate NO under some pathophysiological environments, as previously suggested (McNeill *et al.* 1999; Gobeil *et al.* 2002; Yamakawa *et al.* 2003). For instance, McNeill *et al.* (1999) reported that chronic treatment of rat cerebral microvessels with oestrogen increased the expression of eNOS and discussed the possibility that this might be involved in the neuroprotective effect of oestrogen and sex-related differences in cerebrovascular events. Furthermore, it is well known that shear stress generates NO in a Ca^{2+} -independent manner in endothelium (Fleming *et al.* 1998), and we have only observed the absence of ATP-mediated, Ca^{2+} -dependent mechanosensitive NO production in BBECs (Fig. 3). Therefore it should be noted that the present study does not rule out the presence and importance of shear stress-induced, Ca^{2+} -independent eNOS activation in BBECs.

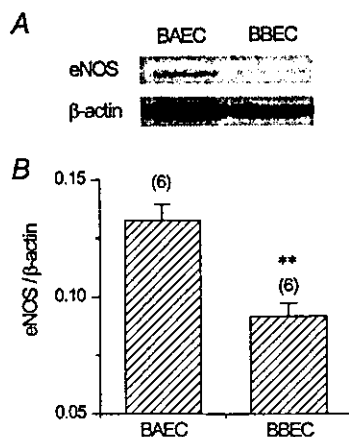


Figure 5. Expression of eNOS protein in BAECs and BBECs, assessed by Western blotting

A, expression of eNOS and β -actin proteins in BAECs and BBECs. Same amount of total cellular protein (5 μg) was applied to each lane. Note that eNOS protein expression was lower in BBECs than in BAECs. B, densitometric analysis of the eNOS protein bands. Values are normalized to β -actin band density. $**P < 0.01$ vs. BAECs.

Expression of eNOS alone is not enough to induce Ca^{2+} -dependent NO production but its substrate L-arginine and cofactors such as calmodulin, tetrahydrobiopterin and NADPH are also essential (Moncada *et al.* 1991). In this study we propose two possible mechanisms for the absence of detectable NO production in spite of a sufficient $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation in BBECs, namely lower expression of eNOS protein (Fig. 5) and lower cellular L-arginine uptake (Fig. 6). Cellular uptake of L-arginine in vascular endothelium is achieved by cationic amino acid transport systems such as γ^+ and γ^+L , and it is known that the efficiency of endothelial amino acid transport is markedly site specific (for a review see Mann *et al.* 2003). However, we cannot conclude from the present results that these mechanisms are solely responsible for the absence of detectable NO production in BBECs. Another possibility would be that eNOS protein is not coupled properly with other cofactors in BBECs. Therefore, it remains to be elucidated whether significant NO production could be obtained if the expression of eNOS protein is increased in pathological conditions.

It has been suggested that EDHF rather than NO plays a significant role in endothelial control of vascular tone in smaller vessels (Garland *et al.* 1995). The results of the present study have further clarified that $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation in brain microvascular endothelium does not lead to considerable NO production, and may support a recent report showing that cerebral microcirculation is controlled by neurone-to-astrocyte signals (Zonta *et al.* 2003). In conclusion, the present study has revealed that constitutive Ca^{2+} -dependent and HTS-induced NO production is not detectable in BBECs, and suggests that there may be a marked site specificity in the generation of NO in endothelium.

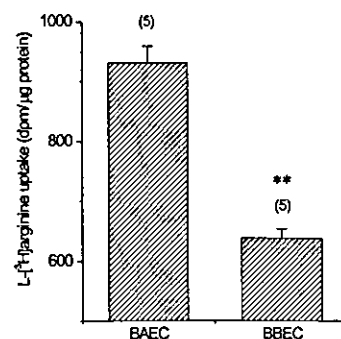


Figure 6. Uptake of L-[^3H]arginine in BAECs and BBECs

Cells were incubated with L-[^3H]arginine for 15 min at 37°C, and the incorporated L-[^3H]arginine was measured as described in Methods. Results are shown as radioactive disintegrations per minute (d.p.m.) per μg cell protein (mean \pm s.e.m., $n = 5$). $**P < 0.01$ vs. BAECs.

References

- Bodin P & Burnstock G (2001). Evidence that release of adenosine triphosphate from endothelial cells during increased shear stress is vesicular. *J Cardiovasc Pharmacol* **38**, 900–908.
- Broillet M, Randin O & Chatton J (2001). Photoactivation and calcium sensitivity of the fluorescent NO indicator 4,5-diaminofluorescein (DAF-2): implications for cellular NO imaging. *FEBS Lett* **491**, 227–232.
- Chen Y, McCarron RM, Golech S, Bembry J, Ford B, Lenz FA, Azzam N & Spatz M (2003). ET-1- and NO-mediated signal transduction pathway in human brain capillary endothelial cells. *Am J Physiol* **284**, C243–C249.
- Fleming I, Bauersachs J, Fisslthaler B & Busse R (1998). Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. *Circ Res* **82**, 686–695.
- Furchgott RF & Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373–376.
- Garland CJ, Plane F, Kemp BK & Cocks TM (1995). Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol Sci* **16**, 23–30.
- Gobeil F Jr, Dumont I, Marrache AM, Vazquez-Tello A, Bernier SG, Abran D, Hou X, Beauchamp MH, Quiniou C, Bouayad A, Choufani S, Bhattacharya M, Molotchnikoff S, Ribeiro-Da-Silva A, Varma DR, Bkaily G & Chemtob S (2002). Regulation of eNOS expression in brain endothelial cells by perinuclear EP3 receptors. *Circ Res* **90**, 682–689.
- Hisadome K, Koyama T, Kimura C, Droogmans G, Ito Y & Oike M (2002). Volume-regulated anion channels serve as an auto/paracrine nucleotide release pathway in aortic endothelial cells. *J General Physiol* **119**, 511–520.
- Ishii M, Shimizu S, Shiota K, Yamamoto S, Kiuchi Y & Yamamoto T (2002). Stimulation of tetrahydrobiopterin synthesis by cyclosporin A in mouse brain microvascular endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 1134–1141.
- Kashiwagi S, Kajimura M, Yoshimura Y & Suematsu M (2002). Nonendothelial source of nitric oxide in arterioles but not in venules: alternative source revealed in vivo by diaminofluorescein microfluorography. *Circ Res* **91**, e55–64.
- Kimura C, Cheng W, Hisadome K, Wang YP, Koyama T, Karashima Y, Oike M & Ito Y (2002). Superoxide anion impairs contractility in cultured aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol* **283**, H382–H390.
- Kimura C, Koyama T, Oike M & Ito Y (2000a). Hypotonic stress-induced NO production in endothelium depends on endogenous ATP. *Biochem Biophys Res Commun* **274**, 736–740.
- Kimura C, Oike M & Ito Y (1998a). Acute glucose overload abolishes Ca²⁺ oscillation in cultured endothelial cells from bovine aorta: a possible role of superoxide anion. *Circ Res* **82**, 677–685.
- Kimura C, Oike M & Ito Y (2000b). Hypoxia-induced alterations in Ca²⁺ mobilization in brain microvascular endothelial cells. *Am J Physiol* **279**, H2310–H2318.
- Kimura C, Oike M, Kashiwagi S & Ito Y (1998b). Effects of acute glucose overload on histamine H2 receptor-mediated Ca²⁺ mobilization in bovine cerebral endothelial cells. *Diabetes* **47**, 104–112.
- Kimura C, Oike M, Koyama T & Ito Y (2001a). Alterations of Ca²⁺ mobilizing properties in migrating endothelial cells. *Am J Physiol* **281**, H745–H754.
- Kimura C, Oike M, Koyama T & Ito Y (2001b). Impairment of endothelial nitric oxide production by acute glucose overload. *Am J Physiol* **280**, E171–E178.
- Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y & Nagano T (1998). Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem* **70**, 2446–2453.
- Koyama T, Kimura C, Park SJ, Oike M & Ito Y (2002). Functional implications of Ca²⁺ mobilizing properties for nitric oxide production in aortic endothelium. *Life Sci* **72**, 511–520.
- Koyama T, Oike M & Ito Y (2001). Involvement of Rho-kinase and tyrosine kinase in hypotonic stress-induced ATP release in bovine aortic endothelial cells. *J Physiol* **532**, 759–769.
- Lopez-Jaramillo P, Gonzalez MC, Palmer RM & Moncada S (1990). The crucial role of physiological Ca²⁺ concentrations in the production of endothelial nitric oxide and the control of vascular tone. *Br J Pharmacol* **101**, 489–493.
- McNeill AM, Kim N, Duckles SP, Krause DN & Kontos HA (1999). Chronic estrogen treatment increases levels of endothelial nitric oxide synthase protein in rat cerebral microvessels. *Stroke* **30**, 2186–2190.
- Malinski T & Taha Z (1992). Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature* **358**, 676–678.
- Mann GE, Yudilevich DL & Sobrevia L (2003). Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol Rev* **83**, 183–252.
- Moncada S, Palmer RM & Higgs EA (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**, 109–142.
- Nelin LD, Nash HE & Chicoine LG (2001). Cytokine treatment increases arginine metabolism and uptake in bovine pulmonary arterial endothelial cells. *Am J Physiol* **281**, L1232–L1239.
- Oike M, Kimura C, Koyama T, Yoshikawa M & Ito Y (2000). Hypotonic stress-induced dual Ca²⁺ responses in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol* **279**, H630–H638.
- Sabirov RZ, Dutta AK & Okada Y (2001). Volume-dependent ATP-conductive large-conductance anion channel as a pathway for swelling-induced ATP release. *J General Physiol* **118**, 251–266.

- Stoclet JC, Muller B, Gyorgy K, Andriantsiohaina R & Kleschyov AL (1999). The inducible nitric oxide synthase in vascular and cardiac tissue. *Eur J Pharmacol* **375**, 139–155.
- Xia Y, Tsai AL, Berka V & Zweier JL (1998). Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca^{2+} /calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem* **273**, 25804–25808.
- Yamakawa H, Jezova M, Ando H & Saavedra JM (2003). Normalization of endothelial and inducible nitric oxide synthase expression in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats by angiotensin II AT1 receptor inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab* **23**, 371–380.

- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T & Carmignoto G (2003). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* **6**, 43–50.

Acknowledgements

The authors thank Dr M. Hirakawa for his initial support with Western blotting experiments. This study was carried out as a part of 'Ground Research Announcement for the Space Utilization' promoted by National Space Development Agency of Japan and Japan Space Forum. This study was also supported in part by a grant-in-aid from the Japan Society for the promotion of Science (No. 14570081).

ステロイド長期投与による骨粗鬆症の発症機序 について教えてください。

高柳涼一*

Ryoichi Takayanagi

現在、ステロイド誘発性骨粗鬆症の発症要因としてはグルココルチコイド (GC) の骨に対する直接作用が最も重要と考えられている。二次性副甲状腺機能亢進症は比較的大量の GC 投与時に認められる。また、GC が下垂体からの LH, FSH 分泌を抑制して性ステロイドの分泌を抑制することも骨粗鬆症発症に関与する (図)¹⁾。

1. 骨代謝に及ぼす影響

ヒトのステロイド骨粗鬆症では、GC 投与初期の 3~6 か月は急激に骨量が減少し、その後は緩やかな減少に移行する 2 相性を示す。マウスモデルでは骨量減少の 2 相性の説明として、GC 投与初期は骨形成の急激な低下に加え、骨吸収の亢進により急激な骨量低下をきたし、慢性期では骨形成、骨

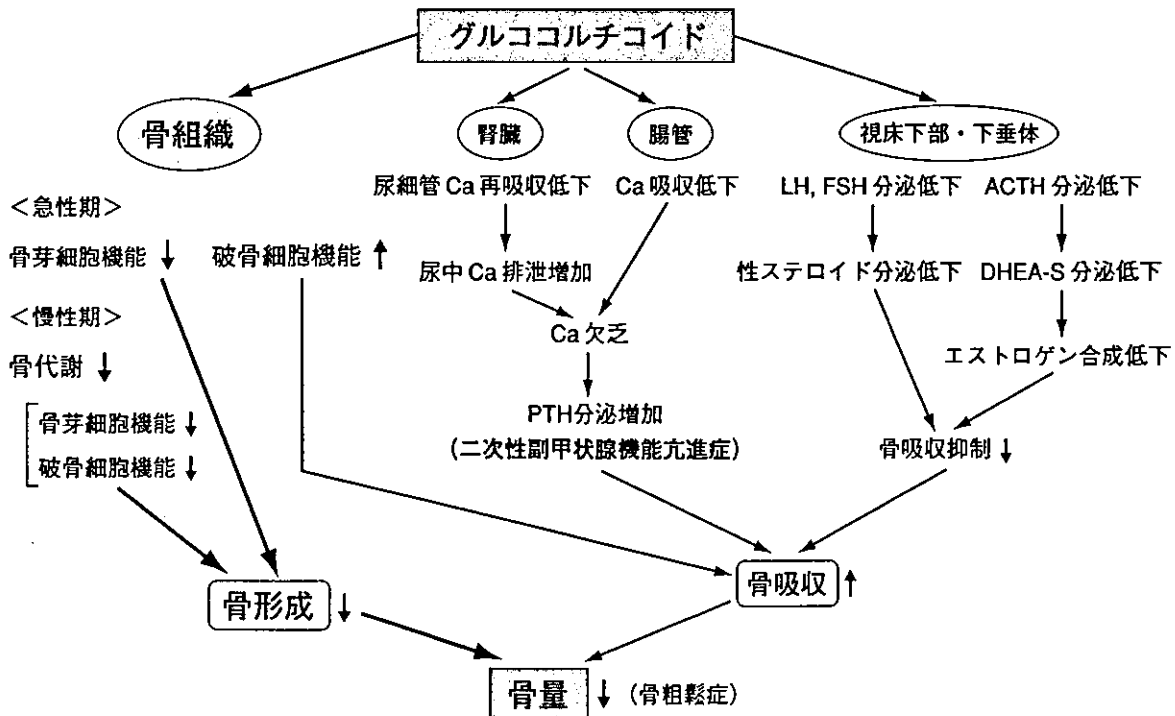


図 グルココルチコイドによる骨量減少の病態生理

* 九州大学大学院医学研究院老年医学 (〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1)
TEL 092-642-6912 FAX 092-642-6940 E-mail: takayana@geriat.med.kyushu-u.ac.jp

吸収ともに抑制され、緩やかな骨量の低下をきたすことが示唆された²⁾。ヒトでも、20~30代で15~25 mg/日のプレドニゾロンを3~6年間投与された骨組織では30%の骨芽細胞がアポトーシスに陥っていることが示された³⁾。一方、骨吸収はGCの投与量や期間により破骨細胞機能変動することが原因と推定されるが、これまでの報告では、破骨細胞の骨吸収に対するGCの影響は一定の見解が得られていない。しかし、少なくとも、GC投与時はGC投与の慢性期でも骨形成が骨吸収を下回っており、これを反映して、海綿骨では穿孔部の増加よりも骨梁の菲薄化がより顕著であることが示されている。

GCは前駆体細胞から骨芽細胞への分化・増殖の抑制、骨芽細胞のアポトーシスを誘導し骨形成を抑制する。この分子機構は完全には解明されていないが、インスリン様成長因子IGFの合成抑制や、コラゲナーゼ、蛋白分解酵素のmRNA量の増加作用、骨芽細胞分化に重要な転写因子であるCbfa1の低下、間質細胞を骨芽細胞ではなく脂肪細胞へ分化させるPPAR γ の上昇作用が報告されている。

II. 二次性副甲状腺機能亢進症

GCは十二指腸および上部空腸でのCa吸収を低下させ、腎尿細管へ直接作用してCa再吸収を抑制する。このようにGCの小腸と腎への作用によりCa欠乏が生じ、PTHの分泌が刺激され(二次性副甲状腺機能亢進症、図)、増加したPTHが骨吸収を促進する。しかしながら、ステロイド骨粗

鬆症患者の血中PTHは上昇していないこと、GCによる腎でのCa再吸収の抑制は臨床的にGC骨粗鬆症が発症する(プレドニゾロン換算で7.5~10 mg/日)よりもかなり大量(30~35 mg/日)のGCが必要であることなど、二次性副甲状腺機能亢進症がステロイド骨粗鬆症の主因とする考え方は否定的である。比較的大量のGC投与では骨形成抑制に加えて、二次性副甲状腺機能亢進症が惹起される可能性がある。

III. 性ホルモンへの影響

過剰量のGCは、下垂体よりの黄体化ホルモン(LH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)の抑制を介してエストロゲン、テストステロン、DHEA、DHEA-Sの分泌を抑制し、骨粗鬆症を進展させる(図)。DHEA-Sは末梢組織でエストロゲンに変換されるので、閉経後女性の主要なエストロゲン源と考えられている。

文 献

- 1) 高柳涼一, 大中佳三, 河手久弥: ステロイド骨粗鬆症の病態と治療指針. *Clinical Calcium* 13: 134-140, 2003
- 2) Weinstein RS, Chen J, Powers CC, et al: Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. *J Clin Invest* 109: 1041-1048, 2002
- 3) Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, et al: Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. *J Clin Invest* 102: 274-282, 1998

* * *

X. 骨粗鬆症の治療法

研究段階の話題の薬物

Rho-kinase 阻害剤

Rho-kinase inhibitor

大中佳三 高柳涼一

Key words : Rho-kinase, Rho-kinase 阻害剤, 骨芽細胞, 骨形成, 骨粗鬆症

はじめに

低分子 GTP 結合蛋白質 (G 蛋白) である Ras や Rho は, 細胞の増殖, 分化や極性決定, 骨格維持など種々の重要な機能を果たしている¹⁾. Rho family は Rho, Rac, cdc42 の 3 つの subfamily よりなり, Rho とその下流の標的分子の一つである Rho-associated kinase (Rho-kinase) は, 細胞骨格や細胞接着の制御をはじめ, 平滑筋細胞のカルシウム感受性収縮反応, 細胞周期の調節, 転写調節など様々な機能を担うことが明らかにされてきている²⁾. 本稿では Rho-kinase 阻害剤の骨粗鬆症治療薬としての可能性について, 自験成績を交えて述べてみたい.

1. Rho-kinase

Rho-kinase は Rho の下流の標的分子の一つとして同定された蛋白質で, 活性型 Rho により活性化されるセリン・スレオニンキナーゼである. Rho-kinase は分子量約 15 万の蛋白質で, N 末より catalytic (kinase) domain, coiled-coil domain, PH domain の 3 つの domain よりなり, coiled-coil domain の C 末側に Rho が結合する (図 1). Rho-kinase の基質としては, ミオシン軽鎖, ミオシン軽鎖ホスファターゼのミオシン結合サブユニット (MBS), ERM family (ezrin, radixin, moesin), adducin, LIM キナーゼなど

が知られている. Rho-kinase は MBS を介してミオシン軽鎖ホスファターゼ活性を抑制し, ミオシン軽鎖のリン酸化レベルを制御する結果, 血管平滑筋細胞の収縮性に関与する³⁾.

2. Rho-kinase 阻害剤

Rho-kinase の特異的阻害剤として Y-27632³⁾ と fasudil⁴⁾ の 2 つが知られている. いずれも ATP に競合的に Rho-kinase を阻害する. fasudil の代謝活性体である hydroxyfasudil は, より強力な阻害作用をもつ. Rho-kinase に対する Y-27632 と hydroxyfasudil の Ki 値はそれぞれ, 0.14 μ M と 0.17 μ M で, プロテインキナーゼ C やミオシン軽鎖キナーゼに対する Ki 値の 1/100 以下である⁵⁾. fasudil は既にくも膜下出血後の脳血管攣縮予防の治療薬として保険適用を受け, 臨床応用されている⁶⁾.

3. Rho-kinase と疾患との関連

Rho/Rho-kinase 系の関与する可能性のある病態が, Rho-kinase 阻害剤あるいは Rho-kinase のドミナントネガティブ変異体遺伝子を用いた研究により明らかにされてきた. その結果, Rho-kinase が冠動脈攣縮, 脳血管攣縮や高血圧症などの血管平滑筋の過大収縮, 狭心症や心筋梗塞, 脳梗塞などの動脈硬化性疾患, 更に気管支喘息や緑内障, 癌, AIDS などに関与する

Keizo Ohnaka, Ryoichi Takayanagi: Department of Geriatric Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University 九州大学大学院医学研究院老年医学

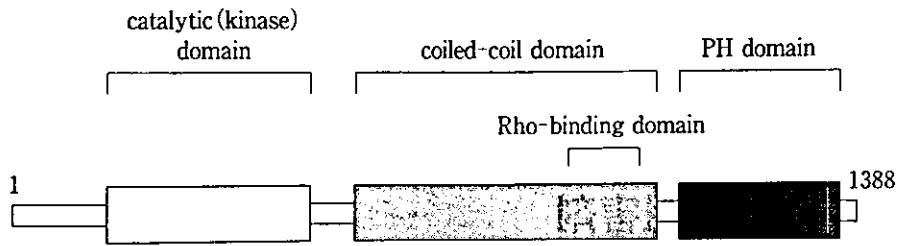


図1 Rho-kinase の分子構造(文献⁹⁾より改変引用)

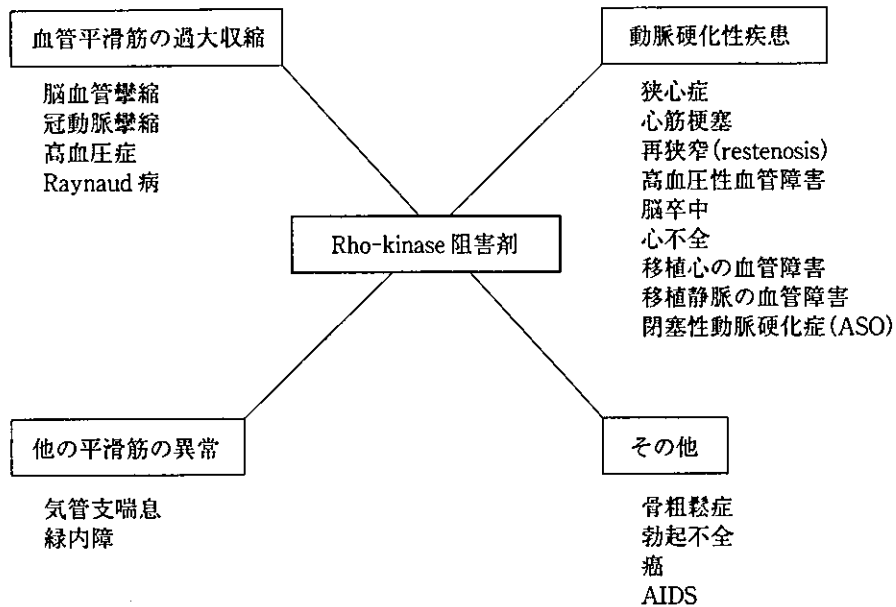


図2 Rho-kinase 阻害剤の治療標的(文献⁹⁾より改変引用)

可能性が報告され、これらの疾患は Rho-kinase 阻害剤による治療標的となる可能性がある(図 2)⁹⁾。

4. Rho-kinase 阻害剤と骨代謝

高脂血症治療薬である HMG-CoA 還元酵素阻害剤(スタチン)が骨量増加作用を有することが報告された⁷⁾。著者らはスタチンの骨形成促進作用を研究する中で、新規スタチンであるピタバスタチンが Rho/Rho-kinase 依存性にヒト骨芽細胞初代培養系において、骨形成促進蛋白である BMP-2 や骨形成マーカーであるオステオカルシンの発現を増加させることを見いだした。スタチンはメバロン酸経路を阻害してコレステロールの合成を低下させるが、同時に蛋白のプレニル化に必要なイソプレノイド中間体の合成も阻害する。ピタバスタチンは培養ヒト骨芽細胞にてリゾホスファチジン酸刺激による

Rho の細胞膜への移行を阻害した。またリゾホスファチジン酸刺激による Rho-kinase の活性を抑制した。そこで Rho-kinase 阻害剤である hydroxyfasudil を培養ヒト骨芽細胞へ添加すると、スタチン同様に BMP-2 やオステオカルシンの発現を増加させた⁸⁾(図 3)。また培養ヒト骨肉腫由来骨芽細胞株においても、Rho-kinase 阻害剤はアルカリホスファターゼ活性を増加させ、Rho-kinase のドミナントネガティブ変異体の導入においても同様の結果を得ている。吉川⁹⁾も Rho-kinase 阻害剤である Y-27632 が、*in vivo*にて BMP-2 によるマウスの異所性骨形成を促進することを報告している。また培養骨芽細胞系での検討でも Y-27632 添加によりアルカリホスファターゼやオステオカルシンの産生が亢進したという⁹⁾。更にドミナントネガティブ型 Rho-kinase cDNA 導入がアルカリホスファターゼ活性や BMP-4 発現を上昇させ、活性

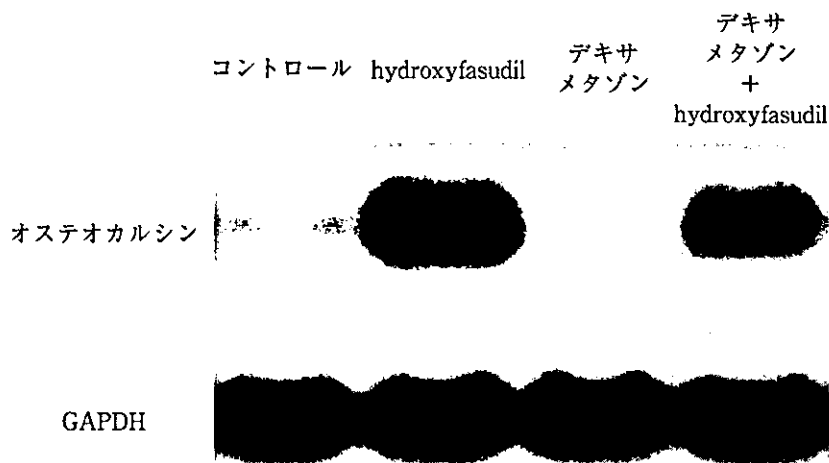


図3 ヒト骨芽細胞初代培養系でのオステオカルシン mRNA 発現に対する Rho-kinase 阻害剤 hydroxyfasudil とデキサメタゾンの影響⁸⁾

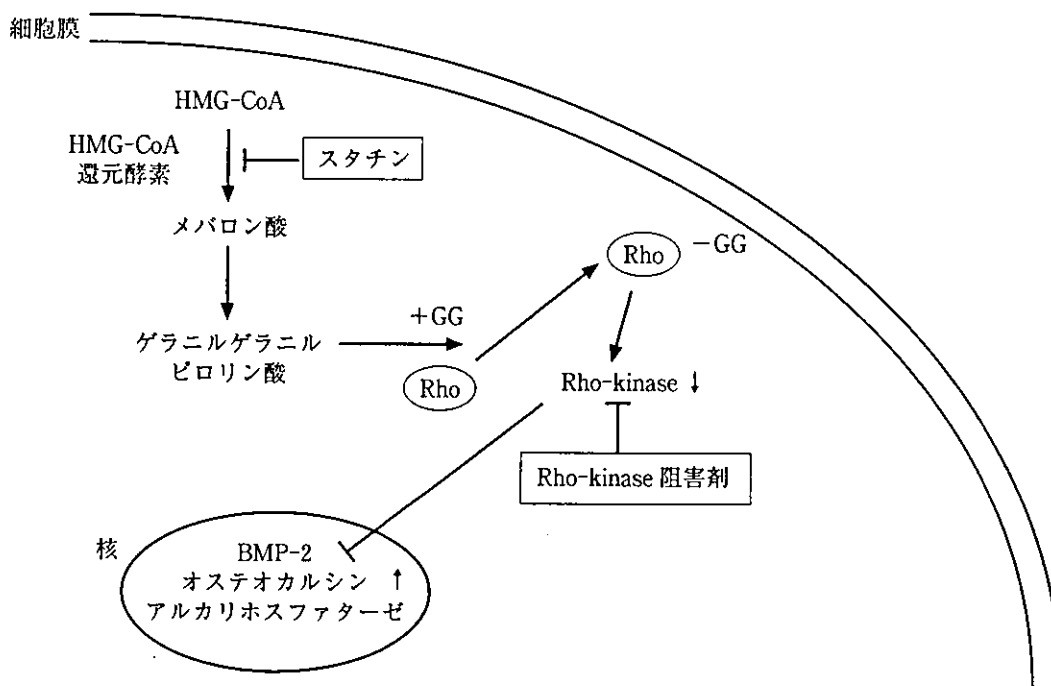


図4 骨芽細胞における Rho-kinase 阻害剤による BMP-2, オステオカルシン, アルカリホスファターゼの調整機構

型 Rho-kinase cDNA 導入ではアルカリホスファターゼ活性の低下を認めたという。これらの結果より、Rho/Rho-kinase 系は骨芽細胞において骨形成を抑制的に調節していると考えられる(図4)。興味深いことに、著者らの検討では糖質コルチコイドであるデキサメタゾン添加によりオステオカルシンの発現が低下したが、hydroxyfasudil を同時添加するとその発現の回復が認められた(図3)。グルココルチコイドの

骨芽細胞への直接作用による骨形成抑制がステロイド誘発性骨粗鬆症の主要な発症機序と考えられており、同症を含む骨粗鬆症に対し、骨形成を促進する薬剤として Rho-kinase 阻害剤の可能性に注目したい。

おわりに

Rho-kinase 阻害剤の骨粗鬆症治療薬としての可能性につき概説した。

■ 文 献

- 1) Takai Y, et al: Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81: 153-208, 2001.
- 2) Fukata Y, et al: Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci* 22: 32-39, 2001.
- 3) Uehata M, et al: Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 389: 990-994, 1997.
- 4) Asano T, et al: Mechanism of action of a novel antivasospasm drug, HA1077. *J Pharmacol Exp Ther* 241: 1033-1040, 1987.
- 5) Shimokawa H: Rho-kinase as a novel therapeutic target in treatment of cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol* 39: 319-327, 2002.
- 6) Shibuya M, et al: Effect of Fasudil HCl, a protein kinase inhibitor, on cerebral vasospasm. *Acta Neurochir Suppl* 77: 201-204, 2001.
- 7) Mundy G, et al: Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 286: 1946-1949, 1999.
- 8) Ohnaka K, 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.
- 9) 吉川秀樹: BMP-2 の応答制御機構の解析. *The Bone* 16: 287-291, 2002.

スタチンと BMP

大中 佳三* 高柳 涼一^{*1)}

骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein ; BMP) は未分化な間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化させ、骨形成を促進するサイトカインである。HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるスタチンが BMP-2 を増加させ、骨形成を促進することが報告され、骨粗鬆症治療薬の候補として注目されている。スタチンによる BMP-2 発現増加の細胞内メカニズムの1つとして Rho/Rho-kinase 系の抑制の関与が考えられる。

Statin and BMP

Department of Geriatric Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyusyu University

Keizo Ohnaka, Ryoichi Takayanagi

Bone morphogenetic proteins (BMP) are cytokines that promote differentiation of mesenchymal stem cells into differentiated osteoblasts and bone formation. Recently, HMG-CoA reductase inhibitors (statins) emerged as a candidate for the treatment of osteoporosis, because they stimulate BMP-2 expression and bone formation. Inhibition of Rho/Rho-kinase pathway may be involved in statin effect on bone formation.

スタチンと BMP について最近の知見を述べる。

はじめに

骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein ; BMP) は骨芽細胞の分化を促進し、異所性の骨形成を引き起こすサイトカインである。最近 HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A) 還元酵素阻害剤であるスタチンが BMP-2 を増加させ骨形成を促進することが報告され、骨粗鬆症治療薬の候補として注目されている。本稿では

骨形成蛋白 (BMP)

1965年、Urist は¹⁾ 酸脱灰した骨基質を筋肉内へ移植し、異所性の軟骨・骨形成が誘導されることを見いだした。のちに骨基質中に存在し、軟骨・骨誘導能を有する蛋白性因子を骨形成蛋白 (BMP) と命名した。1988年 Wozney らによりヒト BMP-2 と BMP-4 がクローニングされ、現在ま

* Keizo Ohnaka, Ryoichi Takayanagi 九州大学大学院医学研究院老年医学¹⁾ 教授

でに十数種の BMP の存在が報告されている。BMP の主な作用は未分化な間葉系幹細胞の骨芽細胞, 軟骨細胞, 筋肉, 脂肪細胞への分化を調節することである²⁾。BMP は未分化な間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化させ, 骨形成を促進する。また筋肉への分化を抑制する。脂肪細胞への分化は促進, 抑制の両方が報告されており, 使用される細胞により異なる。BMP による骨芽細胞への分化過程では転写因子 Runx2/Cbfa1 が重要で, BMP が受容体に結合した後のシグナル伝達分子である Smad が Runx2/Cbfa1 と結合し, 標的遺伝子の転写を調節すると考えられる。BMP のうち, BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 は骨芽細胞の分化, 骨形成を促進するが, その作用の程度は種や細胞により異なる。BMP-3 は骨芽細胞の分化をむしろ抑制する。

スタチンと BMP-2

1999 年 Mundy ら³⁾ は BMP-2 遺伝子のプロモーターをルシフェラーゼの上流に組み込んだ

アッセイ系を用いて, BMP-2 遺伝子の発現を増加させる物質のスクリーニングを行い, 3 万種以上の天然・合成物質の中から, スタチンの 1 つであるロバスタチンがその作用を有するのを見いだした。ほかのスタチン(シンバスタチン, メバスタチン, フルバスタチン)でも同様の活性が認められた。実際にシンバスタチンはヒト骨芽細胞株 MG-63 で BMP-2 mRNA の発現を特異的に促進し(BMP-4 mRNA の発現には影響せず), BMP-2 蛋白産生を増加させた。またスタチンは, マウス頭蓋冠の器官培養系にて新生骨の形成を促進した。さらにラットの骨粗鬆症モデルにおいてシンバスタチンが骨量増加作用のあることを報告した。

スタチンの作用に関して, Sugiyama ら⁴⁾ はヒト骨肉腫由来細胞株 HOS 細胞においてコンパクトンとシンバスタチンは BMP-2 の発現を促進するが, 親水性スタチンであるプラバスタチンにはその作用がないと報告した。Maeda ら⁵⁾ はシンバスタチンがマウスの前骨芽細胞株である MC3T3-

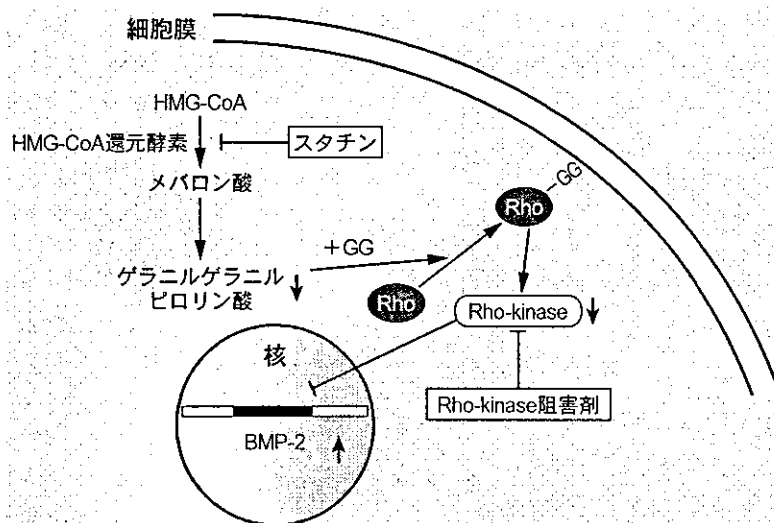


図1 骨芽細胞でのスタチンによる BMP-2 の発現調節 (仮説)

Rho/Rho-kinase 系は BMP-2 の発現を抑制的に調節し, スタチンはこれを阻害して BMP-2 の発現を増加させる。

E1細胞でBMP-2の発現を増加させ、細胞分化とmineralizationを促進することを認めている。またPhillipsら⁶⁾はコンパクトチンが胚性幹細胞から骨芽細胞への分化を促進し、BMP-2の発現増加を伴うことを報告した。

筆者ら⁷⁾はヒト骨芽細胞初代培養系を用いて新規スタチンであるピタバスタチンの骨芽細胞に対する作用について検討を行った。1μMのピタバスタチンにより培養ヒト骨芽細胞のBMP-2 mRNA発現は約2.7倍に増加し、オステオカルシンのmRNA発現は10倍に増加した。オステオカルシンは成熟した骨芽細胞で産生される非コラーゲン性の蛋白で、骨形成のマーカーとして知られる。スタチンがBMP-2の産生を増加して、骨芽細胞の分化を促進することを支持する結果である。ピタバスタチンによるBMP-2やオステオカルシンの発現促進はメバロン酸やゲラニルゲラニルピロリン酸(geranylgeranylpyrophosphate; GGPP)の添加により抑制されたが、種々の細胞内情報伝達系阻害剤では影響を受けず、この作用はメバロン酸経路の阻害によるものと考えられた。スタチンはメバロン酸経路を阻害してコレステロールの合成を低下させるが、イソプレノイド中間体の合成も阻害する。イソプレノイドはRasやRhoなどの低分子GTP(guanosine 5'-triphosphate)結合蛋白のプレニル化に重要である。ピタバスタチンは培養ヒト骨芽細胞でリソホスファチジン酸(LPA)によるRho A蛋白の膜への移行を阻害した。さらに、Rhoの下流の標的分子の1つであるRho-kinase活性を抑制した。実際、Rho-kinaseの特異的阻害剤をヒト骨芽細胞初代培養系に添加すると、スタチンと同様にBMP-2やオステオカルシンの発現を促進した。すなわち、Rho/Rho-kinase系はBMP-2発現を抑制的に調節しており、スタチンによる骨形成促進の細胞内

メカニズムの1つとしてRho/Rho-kinase系の抑制の関与が考えられる(図1)。スタチンによる骨形成促進作用に関してほかのメカニズムの関与があるのか、今後さらなる検討が必要であろう。

おわりに

スタチンとBMPについて、自験成績を含めて概説した。

文 献

- 1) Urist MR: Bone formation by autoinduction. *Science* 150: 893-899, 1965
- 2) Yamaguchi A, Komori T, Suda T: Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 21: 393-411, 2000
- 3) Mundy G, Garrett R, Harris S et al: Stimulation of bone formation *in vitro* and in rodents by statins. *Science* 286: 1946-1949, 1999
- 4) Sugiyama M, Kodama T, Konishi 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
- 5) Maeda T, Matsunuma A, Kawane T et al: Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 874-877, 2001
- 6) Phillips BW, Belmonte N, Vernochet C et al: Compactin enhances osteogenesis in murine embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 478-484, 2001
- 7) Ohnaka K, Shimoda S, Nawata 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

スタチンは骨形成薬となり得るか？

Can statins promote bone formation?

高柳 涼一・大中 佳三

九州大学大学院医学研究院 老年医学



高柳 涼一 (たかやなぎ りょういち) 1975年、九州大学医学部卒業。1983年、米国バンダービルト大学生化学に留学。1993年、九州大学医学部講師。2000年より、九州大学大学院医学研究院 老年医学。研究テーマは、代謝疾患を中心とした老年病の臨床と研究 (骨粗鬆症、生活習慣病、核内受容体など)。

→Key Words:

statin, osteoporosis, bone, Rho-kinase, osteoblast

■ Abstract ■

スタチン (HMG-CoA還元酵素阻害剤) の骨形成促進作用が報告されて以来、多くの観察研究が報告されたが、多数例の無作為割付前向き試験による検証はなされていない。Prospective cohort studyの中でスタチン投与例を抽出解析した研究では効果有りの結果が多かったが、否定的な結果も得られている。一方、動物実験の報告はいずれも骨形成の促進効果を認めている。臨床研究と動物実験の成績の解離の理由として、投与量の差が推測される。動物実験の投与量は臨床例の50~80倍であり、多くのスタチンは経口投与すると95%以上が肝で不活化されるので骨組織へは殆ど移行しないものと推察される。ヒト骨芽細胞培養系での検討では、肝代謝を受けるスタチンを常用量服用したときのヒトの血中濃度では骨形成効果は低いことが示唆された。一方、高濃度のスタチンは細胞毒性を示す。今後、肝代謝を受けないスタチンの骨形成効果の検証や骨組織へ移行するスタチンの開発、Rho-kinase等の細胞内分子を標的とした新規の骨形成薬の開発が望まれる。

■ 1. スタチンの骨形成作用

スタチンはコレステロール合成の律速酵素であるHMG-CoA還元酵素の阻害剤であり、高コレステロール血症の治療薬として広く使用されている。スタチンにはLDL-cholesterol低下作用以外にも心血管系での抗炎症、抗増殖、抗血栓作用を有し、スタチンの心血管イベントの抑制はこれらの多面的効果pleiotropic effectの関与が大きいと考えられ

ている。1999年にMundyらはスタチンに骨形成促進作用があることを見出し、心血管系以外の組織でのスタチンのpleiotropic effectの存在が明らかとなった¹⁾。即ち、スタチンをヒト骨芽細胞株に添加すると骨芽細胞分化を促進するサイトカインであるBMP-2の発現を誘導し、マウスの頭蓋冠では骨芽細胞の増加が観察された。

■ 2. スタチンの骨折と骨代謝に対する臨床試験

Mundyらの報告後、2000年から2001年にかけてスタチンの処方箋検索等による横断的研究により、スタチンの骨折抑制効果と骨密度増加効果が相次いで報告される一方、否定的な報告もなされた。この時点でスタチンの骨形成促進効果について解決されるべき2つの問題点が浮上した。一つは二重盲検無作為割付前向き臨床試験による検証であり、もう一つは骨形成メカニズムの解明であった。残念ながら、現在までスタチンの骨折抑制効果に対する多数例の無作為割付臨床試験はまだないが、3~4年間の観察による比較的大きなprospective cohort studyの中からスタチン投与例を抽出した解

■ Ryoichi Takayanagi・Keizo Ohnaka
Department of Geriatric Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

疫学研究名	抽出対象	抽出数 (スタチン使用者数)	骨折相対リスク (95%信頼区間)		
			大腿骨	非脊椎骨	脊椎骨
SOF (The Study of Osteoporotic Fractures)	女性8,422人 (65歳以上)	324人	0.19 (0.03~1.38)	0.76 (0.50~1.16)	
FIT (The Fracture Intervention Trial)	女性6,459人 (55~80歳)	284人	0.53 (0.07~3.82)	0.95 (0.59~1.52)	0.60 (0.26~1.39)
HERS (The Heart and Estrogen/ Progestin Replacements Study)	女性3,763人 (49~79歳)	1,001人	0.62 (0.16~2.35)	0.92 (0.64~1.32)	
Rotterdam ³⁾	男性3,105人 女性4,878人 (55歳以上)	145人	0.31 (0.04~2.26)	0.37 (0.12~1.17)	
WHI-OS ⁴⁾ (Womens Health Initiative Observational Study)	女性93,724人 (50~79歳)	7,847人	0.98 (0.73~1.62)	0.85 (0.68~1.08)	1.00 (0.90~1.12)

表1 スタチンと骨折に関する観察研究 (Prospective Cohort Study からの抽出解析)²⁾

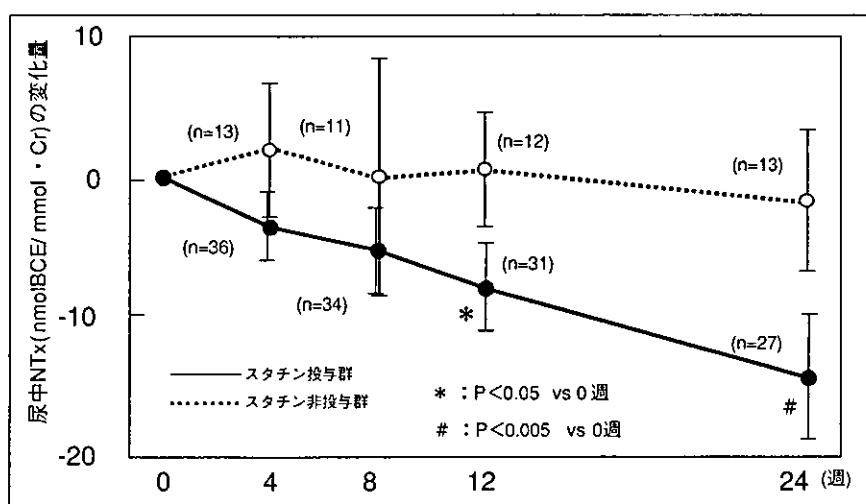
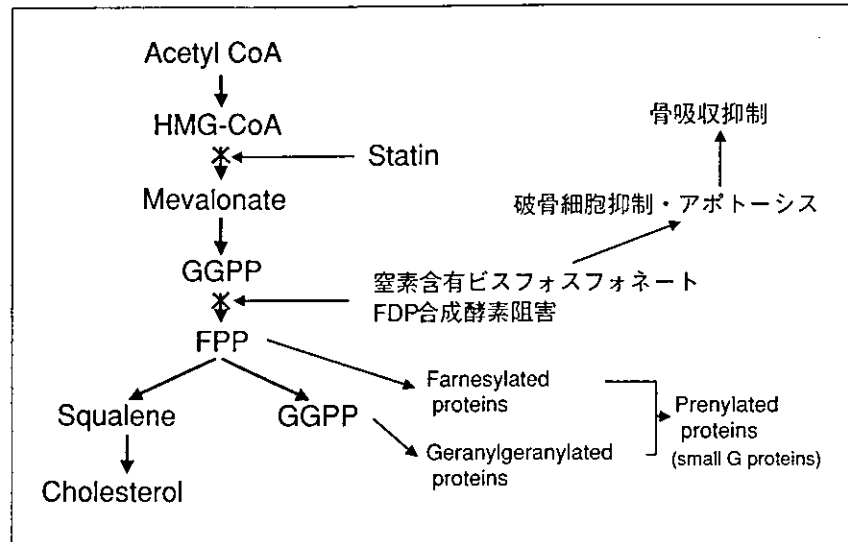


図1 閉経後女性の尿中NTx排泄量に対するフルバスタチンの効果
閉経後1年以上を経た女性2型糖尿病において高コレステロール血症合併患者にフルバスタチンを投与し、非投与群(正脂血症)と比較した。

析が5件報告されている(表1)²⁻⁴⁾。これらの研究はFITのようにアレンドロネートの骨折抑制試験のサブ解析において投与薬や、BMI、ホルモン補充、骨折既往歴等を調整して解析したものであり、スタチンを主対象とした臨床試験ではないが、数百~千例を対象とした4つの研究ではスタチンによる骨折リスクの低下傾向を認めた。しかしながら、約8000例を対象としたWHI研究では骨折リスクの低下が検出できなかった。骨密度に関しては、13~30例規模の試験で骨密度の上昇を認めた報告もある一方、620例の観察で否定的な報告もある。我々は2型糖尿病で、閉経後1年以上を経た高コレステロール血症患者に対してフルバスタチン20mgを投与し、腰椎骨密度と骨吸収マーカーの変

化を6ヶ月間観察した。腰椎の骨密度はフルバスタチン投与前後で有意の変化を認めなかったが、尿中NTx濃度はフルバスタチン投与群で投与開始前に比べ有意の低下を認めた(図1)。フルバスタチン非投与の正脂血症コントロール群ではこのNTx濃度の低下は認められなかった。同様にスタチン投与によるCTxの低下が報告されている。骨粗鬆症治療薬であるビスフォスフォネートは骨組織に特異的に沈着して破骨細胞をアポトーシスに陥らせることにより骨吸収を強力に抑制する。図2に示すように、窒素含有ビスフォスフォネートはコレステロール合成系のFDP合成酵素を阻害することによりFPP(ファルネシルピロリン酸)、GGPP(ゲラニルゲラニルピロリン酸)などのイソプレノイド産生を阻害

図2 スタチンとビスフォスフォネートの作用点



することによりsmall G蛋白の活性化を抑制し、破骨細胞機能を抑制すると考えられている。スタチンも同じ経路を阻害するので、破骨細胞に作用し骨吸収を抑制する可能性は十分にある。実際、Mundyらも1999年の報告の中で、マウスの骨組織の破骨細胞数が約30%減少することを示した¹⁾。即ち、スタチンはビスフォスフォネートと異なり、骨芽細胞作用による骨形成促進と破骨細胞作用による骨吸収抑制の両方の効果を持つと考えられる。

■ 3. スタチンの骨形成作用のメカニズム

BMP-2の阻害剤であるnogginがスタチンの骨形成作用を減弱させることや、BMP変異受容体のトランスジェニックマウスではスタチンの骨形成作用が認められないことからスタチンの骨形成作用はBMP-2発現を介すると考えられる。一方、スタチンの骨形成作用の細胞内分子機構にRho/Rho-kinase系が関与することを我々は見出した⁵⁾。即ち、ヒトの大腿骨片より調製した骨芽細胞の一次培養系において新規のスタチンであるピタバスタチンがオステオカルシンとBMP-2のmRNA発現を著明に上昇させることを観察した。詳細な検討の結果、この効果はスタチンがGGPP合成経路を阻害することによりsmall G蛋白の一つであるRhoの活

性を阻害し、その下流のRho-kinaseを抑制する結果であることが判明した。実際、Rho-kinase阻害剤を直接、ヒト骨芽細胞へ添加するとスタチンと同等のオステオカルシンとBMP-2のmRNAレベルの上昇が観察された。臨床例の検討でスタチンの投与により血中オステオカルシンが上昇したとの報告もなされた⁶⁾。また、マウスの前骨芽細胞株でスタチンがPI3-kinase/Akt経路を介してVEGF産生を更新するとの知見も報告されている⁷⁾。

■ 4. スタチンは骨形成促進薬となり得るか？

Mundyらの報告に次いで、Oxlundらは12ヶ月の老齢ラットにシンバスタチンを経口投与して骨組織を観察し、プラセボに比し、海綿骨の骨密度が23%、骨強度が24%増加したが、皮質骨では変化を認めなかった⁸⁾。この実験でのラットに投与したスタチンは10mg/日/kgでヒトの臨床投与量5~20mg/日の50~80倍に相当する。一般に経口投与されたスタチンは95%以上が肝で代謝され骨組織へ移行するのは非常に低濃度と考えられ、このことが動物実験では必ず有意の効果が得られ、臨床例ではポジティブ、ネガティブが混在する理由と推測される。動物に経口でなく、筋肉内注射でスタチンを投与するとより強い効果が観察されている。