◆ 総 説 ◆

一酸化窒素の骨代謝調節機構について

塚原 宏一^{*1}・三浦 雅一^{*2}・畠 啓視^{*2}・木村 宏輝^{*1}堀 親秀^{*1}・土田 晋也^{*1}・平岡 政弘^{*1}山本 和高^{*3}・石井 靖^{*3}・須藤 正克^{*1}

要 旨

骨格系の代謝の基本は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成の繰り返しである。これらの細胞は全身性因子の統御の下、様々な局所因子を分泌し auto-crane/paracrine 的に互いの機能調整を行っている。

本稿では、その広範な生理的役割が注目されている一酸化窒素 (NO) が骨組織における強力な局所メディエータであることを支持する最近の研究成果を紹介した。とくに、成長期ラットの骨発育において inducible 型の NO 合成酵素活性が重要な役割を果たすことを証明したわれわれの研究について詳述した。最後に、NO の骨代謝調節機構を対象とする研究の将来の方向性に触れた。

序 言

Furchgott らが命名した血管内皮由来弛緩因子 (endothelium-derived relaxing factor)¹⁾の本体が一酸

化窒素 (NO) であると言われてから約10年がたとうとしているが、その間、血管拡張調節因子としての NO に関する知見がかなり集積された²⁾。同時に、NO の生体内における合成経路の解明も進み、血管内皮細胞ばかりでなく、平滑筋細胞、腎糸球体メサンギウム細胞、肝細胞、神経細胞、マクロファージなど非常に多種の細胞に一酸化窒素合成酵素 (NOS) が存在し、NO が多彩な生理作用を有することが明らかになった³⁾。NO は L-アルギニンを基質として合成されるが、これまで生物種や臓器、組織、細胞により構造、調節機構の異なる様々な NOS が同定されクローニングされている。

ところで、哺乳類、鳥類の骨代謝は、巨視的にはカルシウム調節ホルモンを中心とする全身的なカルシウム代謝調節機構の制御下に置かれている。しかし、骨の微小環境においては、骨吸収と骨形成の両過程は破骨細胞および骨芽細胞がおのおのの前駆細胞から分化した後、増殖あるいは融合し、そして活性化されるという複雑な段階を経て営まれており、その各段階での緻密かつ複雑な調節は全身性ホルモンの統御の下で、骨の微小環境を構成する各種細胞から分泌される数多くのペプチド性、非ペプチド性の局所因子により制御されている^{3)~5)}。

最近、NO もこの骨代謝にかかわる重要な auto-crane/paracrine 因子の1つであることが提唱されている^{3)~5)}。すなわち、NO あるいは NO 供与薬剤が in vitro^{6)~9)}および in vivo¹⁰⁾で破骨細胞の骨吸収活性を抑

^{*1}福井医科大学小児科

(〒910-11 福井県吉田郡松岡町下合月23-3)

^{*2}三菱化学ビーシーエル研究開発部

^{*3}福井医科大学放射線科

Nitric oxide and bone metabolism

Hirokazu Tsukahara^{*1}, Masakazu Miura^{*2}, Keishi Hata^{*2}, Kouki Kimura^{*1}, Chikahide Hori^{*1}, Shinya Tsuchida^{*1}, Masahiro Hiraoka^{*1}, Kazutaka Yamamoto^{*3}, Yasushi Ishii^{*3}, Masakatsu Sudo^{*1}

^{*1}Department of Pediatrics, Fukui Medical School

^{*2}Department of Research & Development, Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories

^{*3}Department of Radiology, Fukui Medical School

Key Words : 一酸化窒素

骨代謝

成長期ラット

一酸化窒素合成酵素阻害剤

aminoguanidine

表1 対象ラットの服薬状況および体重、血圧の変動 (平均±SD)

	Group					
	I Control	II L-NAME (20mg/dℓ)	III L-NAME (50mg/dℓ)	IV L-NAME (80mg/dℓ)	V AG (400mg/dℓ)	VI AG (400mg/dℓ) L-arginine (2g/dℓ)
n	16	5	6	5	6	6
Calculated avg intake, mg/day		9.4±1.8*	21.7±2.7*	30.8±4.4*	129±22	107±10 (AG) 537±50 (L-Arg)
BW, g						
8 wk	278±11	271±8	278±12	274±6	271±15	283±11
12wk	417±34	433±51	403±42	368±11†	403±21	410±40
SBP, mmHg						
8 wk	120±6	120±12	113±6	116±5	120±6	120±6
12wk	121±7	153±14‡	180±26‡	214±20§	127±9	125±9

*P<0.001グループII～IV; †P<0.01 vs. グループI, II; ‡P<0.005 vs. 他のグループ; §P<0.001 vs. 他のグループ

制すること、また、骨の微小環境を構成する破骨細胞^{10)~12)}、骨芽細胞¹¹⁾¹³⁾¹⁴⁾、軟骨細胞¹⁵⁾¹⁶⁾、血管内皮細胞³⁾⁴⁾⁶⁾のすべてにL-アルギニン依存性のNO合成系が存在すること(興味あることに、骨におけるNO合成系は骨外のものとは性質を異にしている可能性がある)がここ数年のうちに証明された。

われわれは、NOが成長期のラットの生理的骨発育を制御する重要な因子であることを示す研究結果を得たのでここに紹介する。実験対象は成長期ラットで、われわれは慢性的NO合成阻害モデルを作成した。このモデルはNOの慢性欠乏状態を作り上げる目的ですでに確立されたもの^{10)17)~19)}であり、今回は2種類のNOS阻害剤を用いた。すなわち、非選択的阻害剤(constitutive型酵素, inducible型酵素とともに抑制する)としてNG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)¹⁰⁾¹⁷⁾¹⁸⁾を、inducible NOSの選択的阻害剤としてaminoguanidine (AG)^{10)19)~21)}を成長期にあるSDラットに4週間飲用させた。骨代謝状態の評価は、二重エネルギーX線吸収測定装置(DXA)による腰椎骨塩の定量¹⁰⁾²²⁾、および、尿中コラゲン架橋と血中オステオカルシン濃度の測定²³⁾による骨代謝平衡の評価により行った。

実験方法

対象は上述のようにSDラットである。ラットは7週齢で購入し、1匹ずつケージに入れて飼育した。飼料はオリエンタルMFで、水は自由飲水とした。8週になった時点で(N=44; 体重は250gから300g)6群にランダムに分けた(表1)。

グループIは正常コントロール群で、蒸留水を4週間にわたり(12週齢まで)自由飲水させた。グループII～VIは、表1に示したように各種NO関連薬剤を蒸留水に溶かし、4週間にわたり自由飲水させた群である。飲用水は毎日交換して、1日あたりの薬剤服用量を計算

した。

8週と12週の時点で体重と血圧(尾動脈の収縮期血圧)を計測した。12週齢で採尿、採血(尾静脈から)し、最後に腰椎(L1-L4)の骨塩定量(Hologic QDR-1000/Wを用いた)を行った。尿中のNO代謝産物(NOx)の測定(brucine法²⁴⁾を用いた)によりNOの体内産生を評価した。尿中コラゲン架橋と血中オステオカルシン濃度の測定および腰椎骨塩定量により、ラットの骨代謝状態を検討した。これらの検査方法の詳細については以前に報告した²⁵⁾²⁶⁾。データは平均±SDで表示し、統計はANOVA(Bonferroni-Dunn)を用いた。P<0.05で有意な差があると判断した。

成績と考察

(1) 体重と血圧(表1), 尿中NOx(図1)

12週齢の時点では、L-NAMEの最大量投与群(グループIV)の体重増加が最も悪かった。また、L-NAMEの投与群(グループII～IV)では、L-NAMEの用量依存性に血圧が上昇していた。AG単独(グループV)あるいはAG+L-アルギニンの長期投与(グループVI)は体重、血圧には影響を与えなかった。

尿中NOx排泄量については、L-NAMEの投与群(グループII～IV)で用量依存性に正常コントロールに比べ低下していた。また、AG長期投与のラット(グループV)のNOx排泄量も低下していたが、それは大量L-アルギニンの同時投与(グループVI)により正常レベルまで復元した。

以上の結果により、今回のL-NAME投与量(20～80mg/dℓ飲用水)がラットの抵抗血管内皮(おそらく他の組織においても)でのconstitutiveなNO産生を十分抑制するdoseであることを確認できた¹⁷⁾¹⁸⁾。一方、われわれが採用したAGのdose(400mg/dℓ飲用水)が血圧を上昇させることなく有意に尿中のNOx排

図1 4週間の投薬が終了した時点(12週齢時)における尿中NOx排泄量(平均±SD).

* $P < 0.001$ vs. control; ** $P < 0.05$ vs. AG+L-アルギニン, $P < 0.001$ vs. control; *** $P < 0.01$ vs. AG+L-アルギニン, $P < 0.001$ vs. control; **** $P < 0.005$ vs. control.

図2 4週間の投薬が終了した時点(12週齢時)における腰椎骨塩量(BMD)(平均±SD).

* $P < 0.05$ vs. control; ** $P < 0.05$ vs. L-NAME (20, 50mg/dl), $P < 0.001$ vs. control.

泄量を減じ、かつ、その減少が NOS の基質である L-アルギニンの同時大量投与により抑制されたことは、SD ラットでは生理的状态でも inducible NOS が活性化されている部位が存在することを示唆するものであった(この AG 投与量が SD ラットのエンドトキシン・ショックを防止する dose であることも確認している)。

(2) 腰椎骨塩量(図2)

12週齢の時点における骨塩量(BMD)は、AG 単独長期群(グループV)で最も低下していた。この BMD 低下も L-アルギニンの同時大量投与により復元した

図3 4週間の投薬が終了した時点(12週齢時)における尿中コラーゲン架橋(Pyd, dPyd)排泄(平均±SD).

(上図) * $P < 0.05$ vs. L-NAME (20, 80mg/dl), $P < 0.01$ vs. L-NAME (50mg/dl), $P < 0.001$ vs. control, AG+L-アルギニン.

(下図) * $P < 0.05$ vs. L-NAME (20, 50, 80mg/dl), $P < 0.01$ vs. AG+L-アルギニン, $P < 0.005$ vs. control.

図4 4週間の投薬が終了した時点(12週齢時)における血中オステオカルシン濃度(平均±SD).

各群間には有意な差はない。

(グループVI)。また、血圧上昇と NOx 排泄量の減少を導くのに十分な L-NAME を投与した群(グループ II, III)では BMD の低下は認められなかった。L-

図5 骨の微小環境における NO と細胞間情報伝達。

NAME の最大量投与群（グループIV）の BMD は正常コントロールに比べて有意に低下していたが、その程度はこの群のラットの低体重とほぼ比例するものであった。

AG の長期単独投与群に（L-NAME 投与群ではなく）特異的に腰椎の骨塩減少がみられた結果から、inducible 型（constitutive 型ではなく）の NOS 活性を長期に抑制された成長期のラットは、体重増加が順調であるにもかかわらず、osteopenia に陥るということが明らかになった。

（3）骨代謝マーカー（図3，図4）

12週齢の時点においては、AG 単独長期投与のグループVのみにコラゲン架橋（ピリジノリン [Pyd]，デオキシピリジノリン [dPyd]）の有意な排泄増加が認められた。血中オステオカルシン濃度はI～VI群の間に有意な差が認められなかった。

以上の結果により、inducible NOS の長期抑制は成長期ラットの骨代謝平衡を骨吸収亢進の方向に傾けてしまうことが明らかになった。このことが、グループVでみられた osteopenia の基本病因であろうと考えられた。

結 論

慢性的 NO 合成阻害デルを利用して、成長期ラットの骨発育における NO の役割を検討したわれわれの研究成果²⁷⁾を詳述した。本年（1996年）にはいつてからもこの領域の研究報告は着実に増え、同時に複雑化して

いる（図5）。われわれはこれらの事象を科学的に収斂していく必要がある。

今後解明が期待されるトピックを以下に列挙すると、

- (1) 破骨細胞，骨芽細胞，骨細胞の NOS の分子生物学，
 - (2) 骨の形態形成，修復，機械的負荷と NO のかわり，
 - (3) 様々な骨疾患，癌の骨転移に果たす NO の役割および NO 関連薬剤を用いた target therapy，
- などであろうと思われる。

文 献

- 1) Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (London)*. 288 : 373-76, 1980.
- 2) Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A.: Nitric oxide : physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43 : 109-42, 1991.
- 3) Zaidi, M., Alam, A.S.M.T., Bax, B.E., Shankar, V.S., Bax, C.M.R., Gill, J.S., Pazianas, M., Huang, C.L.H., Sahinoglu, T., Moonga, B.S., Stevens, C.R., Blake, D.R.: Role of the endothelial cell in osteoclast control : new perspectives. *Bone*. 14 : 97-102, 1993.
- 4) Collin-Osdoby, P., Nickols, G.A., Osdoby, P.: Bone cell function, regulation, and communication : a role for nitric oxide. *J Cell Biochem.* 57 : 399-408, 1995.
- 5) Evans, D.M., Ralston, S.H.: Nitric oxide and bone. *J Bone Miner Res.* 11 : 300-05, 1996.
- 6) MacIntyre, I. Zaidi, M., Alam, A.S.M.T., Datta, H.K., Moonga, B.S., Lidbury, P.S., Hecker, M., Vane, J.R.: Osteoclastic inhibition : an action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88 :

- 2936-940, 1991.
- 7) Stern, P.H., Diamond, J. : Sodium nitroprusside increases cyclic GMP in fetal rat bone cells and inhibits resorption of fetal rat limb bones. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 75 : 19-28, 1992.
 - 8) Li, L., Collin-Osdoby, P., Sunyer, T., Anderson, F., Osdoby, P. : Superoxide production by isolated avian osteoclasts is upregulated by bone and nitric oxide (abstract). *J Bone Miner Res.* 9 (Suppl 1) : S368, 1994.
 - 9) Löwik, C.W.G.M., Nibbering, P.H., van de Ruit, M., Papapoulos, S.E. : Inducible production of nitric oxide in osteoblast-like cells and in fetal mouse bone explants is associated with suppression of osteoclastic bone resorption. *J Clin Invest.* 93 : 1465-472, 1994.
 - 10) Kasten, T.P., Collin-Osdoby, P., Patel, N., Osdoby, P., Krukowski, M., Misko, T.P., Settle, S.L., Currie, M.G., Nickols, G.A. : Potentiation of osteoclast bone-resorption activity by inhibition of nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91 : 3569-573, 1994.
 - 11) Schmidt, H.H.H.W., Gagne, G.D., Nakane, M., Pollock, J. S., Miller, M.F., Murad, F. : Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J Histochem Cytochem.* 40 : 1439-456, 1992.
 - 12) Sunyer, T., Jiang, X.S., Greenman, R., Osdoby, P., Nickols, G.A., Currie, M., Rodi, C., Misko, T., Collin-Osdoby, P. : Expression of inducible nitric oxide synthase and PCR cloning from avian osteoclasts and osteoclast-like cells (abstract). *J Bone Miner Res.* 9 (Suppl. 1) : S369, 1994.
 - 13) Damoulis, P.D., Hauschka, P.V. : Cytokines induce nitric oxide production in mouse osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 201 : 924-31, 1994.
 - 14) Riancho, J.A., Salas, E., Zarrabeitia, M.T., Olmos, J.M., Amado, J.A., Fernández-Luna, J.L., González-Macías, J. : Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res.* 10 : 439-46, 1995.
 - 15) Stadler, J., Stefanovic-Racic, M., Billiar, T.R., Curran, R. D., McIntyre, L.A., Georgescu, H.I., Simmons R.L., Evans C. H. : Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol.* 147 : 3915-920, 1991.
 - 16) Palmer, R.M.J., Andrews, T., Foxwell, N.A., Moncada, S. : Glucocorticoids do not affect the induction of a novel calcium-dependent nitric oxide synthase in rabbit chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 188 : 209-15, 1992.
 - 17) Arnal, J.F., Laurence, W., Michel, J.B. : Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. *J Clin Invest.* 90 : 647-52, 1992.
 - 18) Ribeiro, M.O., Antunes, E., de Nucci, G., Lovisolo, S.M., Zatz, R. : Chronic inhibition of nitric oxide synthesis : a new model of arterial hypertension. *Hypertension.* 20 : 298-303, 1992.
 - 19) Wu, G. : Nitric oxide synthesis and the effect of aminoguanidine and N^G-monomethyl-L-arginine on the onset of diabetes in the spontaneously diabetic BB rat. *Diabetes.* 44 : 360-64, 1995.
 - 20) Misko, T.P., Moore, W.M., Kasten, T.P., Nickols, G.A., Corbett, J.A., Tilton, R.G., McDaniel, M.L., Williamson, J. R., Currie, M.G. : Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur J Pharmacol.* 233 : 119-25, 1993.
 - 21) Joly, G.A., Ayres, M., Chelly, F., Kilbourn, R.G. : Effects of N^G-methyl-L-arginine, N^G-nitro-L-arginine, and aminoguanidine on constitutive and inducible nitric oxide synthase in rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun.* 199 : 147-54, 1994.
 - 22) Yamauchi, H., Kushida, K., Yamazaki, K., Inoue, T. : Assessment of spine bone mineral density in ovariectomized rats using DXA. *J Bone Miner Res.* 10 : 1033-1039, 1995.
 - 23) Egger, C.D., Mühlbauer, R.C., Felix, R., Delmas, P.D., Marks, S.C., Fleisch, H. : Evaluation of urinary pyridinium crosslink excretion as a marker of bone resorption in the rat. *J Bone Miner Res.* 9 : 1211-219, 1994.
 - 24) Bank, N., Aynedjian, H.S. : Role of EDRF (nitric oxide) in diabetic renal hyperfiltration. *Kidney Int.* 43 : 1306-312, 1993.
 - 25) Tsukahara, H., Miura, M., Hata, K., Hori, C., Tsuchida, S., Yamamoto, K., Ishii, Y., Sudo, M. : Dual energy x-ray absorptiometry in growing rats : comparison with biochemical markers. *J Jpn Soc Bone Morpho.* 5 : 129-34, 1995.
 - 26) Tsukahara, H., Miura, M., Hori, C., Hiraoka, M., Nosaka, K., Hata, K., Konishi, Y., Sudo, M. : Urinary excretion of pyridinium crosslinks of collagen in infancy. *Metabolism.* 45 : 510-14, 1996.
 - 27) Tsukahara, H., Miura, M., Tsuchida, S., Hata, I., Hata, K., Yamamoto, K., Ishii, Y., Muramatsu, I., Sudo, M. : Effect of nitric oxide synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats. *Am J Physiol.* 270 (Endocrinol Metab 33) : E840-E845, 1996.