第16回 日本臨床薬理学会 1995年11月1日 東京・明治記念館
ワークショップ4：骨粗鬆症治療薬の臨床薬理学

2. 骨吸収抑制剤ービスホスフォネートと カルシトニンの作用機序ー

高橋直之* 須田立雄*

目的

骨組織は、生涯を通じて形成と吸収を繰り返す動的器官である。骨芽細胞が骨組織の形成を担い、破骨細胞がその破壊・吸収を司る。骨粗鬆症は、破骨細胞による骨吸収が骨芽細胞による骨形成を凌駕し、骨量が減少する疾患である。そのため、骨粗鬆症の治療薬として骨吸収を抑制する薬剤が実際に用いられており、また骨吸収の抑制をターゲットとした薬剤開発が盛んに行われている。

我々は、マウスを用いた破骨細胞形成と機能の評価系を開発し^{1,2)}、(a)破骨細胞形成を調節する骨芽細胞の役割の解析^{3,4)}、(b)破骨細胞の前駆細胞の同定、(c)破骨細胞の機能を調節するP60^{c-src}、PI-3キナーゼ、Forkhead adhesion kinase (p120^{FAK})、低分子Gタンパクrhoのシグナル伝達の解析等を行ってきた^{1,2)}。ところで、骨吸収の抑制を目的とした骨粗鬆症薬の中で、カルシトニンとビスホスフォネートは骨吸収を強力に抑制する薬剤として注目されているが、その作用の詳細な機序は不明な点も多い。本研究は、これまでの研究成果を基に、骨粗鬆症の治療薬として利用されているカルシトニンとビスホスフォネートの破骨細胞の分化と作用発現に対する作用機序について解析した。

方法

マウス骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系に活性型ビタミンD₃[1 α ,25(OH)₂D₃]を添加すると酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ(TRAP、破骨細胞のマーカー酵素)陽性の多核細胞が形成される^{1,2)}。この破骨細胞形成系を用い、破骨細胞の形成に及ぼす薬物の効果を検索した。また、この共存培養系をコラーゲンゲル上で行い、コラーゲナ

ゼで処理することにより吸収能を有する破骨細胞を多数得ることができる。この方法により得られた破骨細胞を象牙質切片上に蒔くと、10時間以内に吸収窩の形成が認められるが、この破骨細胞の機能発現系として用い薬物の効果を評価した。また、破骨細胞は象牙質切片やプレート上でF-アクチンのドットよりなるリング状構造体(アクチンリング)を形成する。このアクチンリングは破骨細胞の明帯に相当するもので、そのアクチンリング形成も破骨細胞の極性発現の指標として解析した。

本研究では、これらの実験系を用い2種類の骨粗鬆症治療薬カルシトニンとビスホスフォネートの作用機序を解析した。カルシトニンはウナギカルシトニンの合成アナログであるエルシトニンを、また、ビスホスフォネートはチルドロネートを用いた。

結果

マウスの共存培養系にカルシトニンを添加しても、1 α ,25(OH)₂D₃の誘導するTRAP陽性細胞の出現は抑制されなかった。このTRAP陽性細胞は、カルシトニンレセプターを含め全ての破骨細胞のマーカーを発現していることから、カルシトニンは破骨細胞前駆細胞からTRAP陽性細胞への分化過程は阻害しないことが示唆された。破骨細胞を象牙質切片上で培養すると、破骨細胞はF-アクチンのリング状構造体(明帯に相当)を構築し吸収窩を形成する。カルシトニンは、破骨細胞のアクチンリングを破壊し、その吸収窩形成を強力に抑制した³⁾。カルシトニンの作用機構には、cAMPを介するAキナーゼ系及びCキナーゼ系の関与が提唱されている。Aキナーゼ系の賦活剤であるフォルスコリンは、破骨細胞のアクチンリングを破壊し吸収窩を抑制したが、Cキナーゼ系の賦活剤であるフォルボールエステルはアクチンリングを破壊せず、吸収窩形成も殆ど抑制しなかった。また、カルシトニンは破骨細胞のAキナーゼ活性を極めて短時間内に上昇させ、

* 昭和大学歯学部生化学

〒142 東京都品川区旗の台 1-5-8

図1 破骨細胞形成と機能発現に対するカルシトニンもビスホスフォネートの作用

その経時変化と濃度依存性は、破骨細胞の細胞骨格系の破壊と良く一致した。また、活性型Aキナーゼを破骨細胞に微量注入すると破骨細胞のアクチンリングは短時間内に破壊された。

一方チルドロネートは、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が誘導する破骨細胞の形成を全く抑制せず、破骨細胞の吸収窩形成能を強力に抑制した⁴⁾。また、チルドロネートは破骨細胞のアクチンリング形成の過程は抑制せず、アクチンリングが形成され波状縁を形成した破骨細胞に特異的に取り込まれた後に、そのアクチンリングを破壊するし、骨吸収活性を抑制することが示された。実際に、チルドロネートを破骨細胞に微量注入すると、短時間内にアクチンリングの破壊が認められた。また、チルドロネートで処理した破骨細胞において、チロシンリン酸化レベルの著しい亢進が認められた。そこで、破骨細胞のチロシンリン酸化反応・脱リン酸化反応に対するチルドロネートの効果を検討したところ、チルドロネートは、破骨細胞のp60^{c-src}チロシンキナーゼ活性を促進せず、ホスホチロシンホスファターゼ活性を強力に抑制することが示された。

考察

以上の実験結果より、カルシトニンもビスホスフォネートもとに破骨細胞に直接作用しその骨吸収活性を抑制することが示唆された。しかし、その抑制機構は互いに異なったものであった。カルシトニンの骨吸収抑制作用は二岐のシグナル伝達系(Cキナーゼ系とAキナーゼ系)が関与すると考えられてきたが、本研究より、カル

シトニンによるアクチンリングの破壊を伴う破骨細胞の機能発現抑制の機序には、Aキナーゼ系の活性化が重要であることが示された(図1)。一方、ビスホスフォネートは、その構造から硬組織に取り込まれる。そのビスホスフォネートはアクチンリングを形成した極性を発現した破骨細胞にのみ取り込まれ、破骨細胞のチロシンホスファターゼを抑制することによりアクチンリングの破壊と吸収活性の抑制を誘導するものと考えられた(図1)。

文献

1. Suda, T., Takahashi, N., and Martin, T. J. : Modulation of osteoclast differentiation. *Endocrine Rev.*, 13:66-80 (1992).
2. Suda, T., Takahashi, N. and Martin, T. J. : Modulation of osteoclast differentiation: Update 1995. *Endocrine Rev. Monographs*, 4:266-270 (1995).
3. Takahashi, N. : Regulation of osteoclast function by calcitonin and its related peptides. *Osteoporosis Japan*, 3:29-17 (1995).
4. Murakami, H., Takahashi, N., Sasaki, T. et al. : A possible mechanism of the specific action of bisphosphonates on osteoclasts: Tiludronate preferentially affects polarized osteoclasts having ruffled borders. *Bone*, 17:137-144 (1995).