

論文の内容の要旨

論文題目 脊椎後縦靭帯骨化症およびインスリン情報伝達分子の
骨化制御機構に関する研究

氏 名 阿久根 徹

緒言

整形外科領域で骨化異常をきたす難治性疾患の一つに後縦靭帯骨化症 (Ossification of the posterior longitudinal ligament : OPLL) がある。OPLL は脊椎後縦靭帯に異所性骨化をおこす疾患で、OPLL が骨化進展すると脊髄が圧迫され重篤な麻痺をきたす。OPLL は、その発生原因も骨化進展メカニズムも明らかでなく、発生や進行を防ぐ方法はない。このような難治性疾患の解決には OPLL の骨化進展のリスクファクターを明らかにし、そのメカニズムを細胞・分子レベルで解明することが極めて重要な課題である。以前より OPLL 患者には、耐糖能異常者が多いことが指摘されてきたが、糖代謝関連因子の何が OPLL と関連するかについての詳細な研究はなかった。そこで本研究第 1 章では、OPLL 骨化傾向 (OPLL の骨化の程度) と糖代謝関連因子との関連について検討し、インスリン分泌の亢進が OPLL 骨化傾向を促進する可能性があることを明らかにした。

インスリンは糖代謝調節ホルモンとしての役割以外に骨同化作用を持つ骨形成因子としても知られている。また、インスリンはインスリン受容体に結合して細胞内にシグナルを伝える以外に、インスリン様成長因子-I (IGF-I) 受容体にも親和性があり、IGF-I シグナルも細胞内に伝達することが知られている。骨代謝調節に関わる多くの因子の中で、インスリンと IGF-I は骨に対する重要な同化作用があることが知られている。インスリン欠乏型糖尿病患者では骨量減少が見られ、ストレプトゾトシンによる膵β細胞破壊ラットでは急速に骨量減少をきたし、インスリン補充により回復する。また IGF-I 欠乏の Laron 症候群でも骨量減少がみられる。しかしながら、インスリン/IGF-I による骨化制御機構の詳細なメカニズムは明らかでない。そこで本研究第2章では、インスリン/IGF-I 細胞内情報伝達分子として重要なインスリン受容体基質 (IRS) に着目し、IRS-2 シグナルの骨代謝調節メカニズムに関する検討をおこなった。以下は、各研究内容の要約である。

第1章 脊椎後縦靭帯骨化におけるインスリンシグナルの関与

対象は、1994年から1999年に東京大学医学部附属病院整形外科にて、OPLLによる脊髄麻痺のために手術を施行した52名の患者(男性47名、女性5名、32-78歳、平均57.4歳)である。

方法。OPLL 骨化傾向(OPLL の骨化の程度)の指標は、術前1週以内に撮影した頸椎、胸椎、腰椎側面単純レントゲン像における OPLL 罹患椎体数とした。糖代謝関連因子として、空腹時血糖値、空腹時インスリン値、ヘモグロビン A1c 値を測定し、更に 75 g 経口糖負荷試験(OGTT)をおこない、負荷後 30 分の時点における血糖値およびインスリン値を測定し、インスリン反応性インデックスを算出した。また、耐糖能分類は WHO の基準に従い、正常型(normal glucose tolerance)、境界型(impaired glucose regulation)、糖尿病型(diabetes mellitus) の3群に分類した。OPLL 骨化傾向と年齢、肥満度および糖代謝の各指標との関連性を、相関分析および重回帰分析により検討した。

結果。52例における OPLL 骨化傾向は、年齢とは負の相関性があり、肥満度とは正の相関性があった。糖代謝の指標の中では、空腹時血糖値とヘモグロビン A1c 値は OPLL 骨化傾向と相関性はなかったが、空腹時インスリン値とインスリン反応性インデックスは、OPLL 骨化傾向と有意な相関性があった。更に、OPLL 骨化傾向を目的変数、その他の因子を独立変数とする重回帰分析をおこなったところ、インスリン反応性インデックスが、他の因子の影響を排しても OPLL 骨化傾向と有意な関連を持つことが明らかとなった。一方、耐糖能と OPLL 骨化傾向との関係を検討したところ、52例の80%以上は正常群ないしは境界群に属し、糖尿病型に属する者は20%未満であったが、糖尿病型で

は OPLL 骨化傾向は、正常型、境界型におけるそれらよりも低値で、耐糖能が著明に悪化すると OPLL 骨化傾向は低くなることが明らかとなった。また、正常型、境界型の中で OPLL 骨化傾向が高い者は、ほぼ全例インスリン反応性インデックスが平均値以上の者で占められていた。以上の結果より、OPLL 骨化傾向は糖代謝の指標の中で、インスリン反応性インデックスで示されるインスリン分泌反応性と強く関連し、軽度耐糖能障害がありインスリン抵抗性を代償すべく高濃度のインスリン分泌がおこなわれている者ほど OPLL 骨化傾向が高いことが明らかとなった。

考察。OPLL は脊椎後縦靭帯内に存在する未分化間葉系細胞が軟骨細胞へ分化し、軟骨内骨化を経て OPLL が生じるものとされている。糖代謝の主要標的臓器におけるインスリン抵抗性を代償するため膵臓からのインスリン分泌が亢進した結果、高濃度の血中インスリンが後縦靭帯組織内に存在する osteoprogenitor に作用し、骨化を促進する可能性が示唆された。

第 2 章 細胞内情報伝達分子インスリン受容体基質-2 による骨代謝調節機構

細胞膜に存在するインスリン受容体と IGF-I 受容体はチロシンキナーゼ型受容体で、インスリン受容体基質 (insulin receptor substrate: IRS) は、インスリン/IGF-I 受容体の両者に対する共通の基質として重要な細胞内情報伝達作用を担っている。IRS family には少なくとも 4 つのサブタイプが存在し、骨においては IRS-1 と IRS-2 が発現している。IRS-1 欠損マウスの骨組織では、骨形成と骨吸収がともに低下して低骨代謝回転型の骨粗鬆症がみられ、IRS-1 シグナルは骨代謝回転の維持に必須であることが知られている。その一方 IRS-2 に関しては、骨代謝調節作用におけるその役割は明らかにされていない。そこで IRS-2 欠損マウスを用いて、in vivo および in vitro における詳細な解析をおこない IRS-2 シグナルの骨代謝調節機構に関して検討した。

方法および結果。IRS-2 ヘテロマウスの交配により生まれた同腹野生型 (WT) および IRS-2 欠損 (*IRS-2*^{-/-}) 雄マウスを使用した。骨形態学的検討：8 週齢の WT および *IRS-2*^{-/-} マウス長管骨の X 線撮影、 μ -CT 解析、骨密度測定では、WT に比べ *IRS-2*^{-/-} マウス骨組織で 10-15% の骨密度低下を伴う骨粗鬆化が見られた。組織学的検討：脛骨非脱灰標本を作製し TRAP 染色をおこなったところ、*IRS-2*^{-/-} 骨組織で破骨細胞数の増加が見られ、また骨組織形態計測の結果、*IRS-2*^{-/-} では骨吸収の指標の増加と骨形成の指標の低下を伴う骨量減少を示した。in vitro における骨形成能の検討：WT および *IRS-2*^{-/-} 培養骨芽細胞の検討では、細胞増殖能には差がなく、分化能および基質合成能が *IRS-2*^{-/-} 骨芽細胞で低下し、IRS-2 欠損による骨芽細胞の分化能、基質合成能低下が示された。in vitro における骨吸収能の検討：WT および *IRS-2*^{-/-} 由来の骨芽細胞および骨髄細胞の 2 × 2 通

りの組み合わせによる共存培養では、破骨細胞分化能と骨吸収活性のどちらも、破骨細胞支持細胞であるところの骨芽細胞の由来が *IRS-2*^{-/-}であるときに限り亢進し、破骨細胞の progenitor である骨髄細胞の由来とは関係なかった。従って骨吸収能の増加は破骨細胞支持機能をにやう骨芽細胞における *IRS-2* 欠損により生じることが明らかとなった。一方、M-BMMφ 培養系を用いて、支持細胞非存在下での単独破骨細胞分化能および生存能を検討したところ、WT と *IRS-2*^{-/-}間で差がなく、破骨細胞系細胞の内在性 *IRS-2* シグナルは重要でないことが示された。次に、骨芽細胞における RANKL の発現をノーザンブロット法により検討したところ、WT に比べ *IRS-2*^{-/-}骨芽細胞では RANKL 発現の亢進が見られた。以上の結果より、*IRS-2*^{-/-}マウスにおける骨吸収の増加は、*IRS-2*^{-/-}骨芽細胞における RANKL 発現レベルの増加を伴う破骨細胞支持機能の亢進により生じることが明らかとなった。

考察および結論。*IRS-2*^{-/-}マウスは骨芽細胞の分化能、基質合成能低下を伴う骨形成の低下と、骨芽細胞での RANKL 発現亢進による破骨細胞支持機能促進による骨吸収の増加を伴う骨量減少を示し、骨芽細胞における *IRS-2* シグナルは、骨形成の促進と、破骨細胞支持機能抑制による骨吸収の抑制に作用している。*IRS-1* が骨代謝回転維持に重要な役割を果たすのに対し、*IRS-2* は骨芽細胞における骨吸収に対する骨形成の優位性を維持するのに必要であり、これら2つのシグナルの統合によりインスリン/IGF-Iによる強力な骨同化作用が生じているものと考えられる。

結語

本研究では、異常骨化をきたす難治性疾患OPLLの骨化傾向の促進にインスリンシグナルが関与することを明らかにし、次に、その細胞内情報伝達分子*IRS-2*を介するシグナルが、骨芽細胞における骨形成促進と骨吸収抑制作用により、骨芽細胞における骨同化作用の優位性を維持していることを解明した。今後、インスリン/IGF-I情報伝達系を含めた細胞内分子メカニズムの解明が進み、OPLLや他の代謝性骨疾患の骨化制御が可能となるような新たな治療法や予防法開発の可能性に向けた研究が発展することを期待し、本研究がその一助となれば幸いである。