

論文の内容の要旨

論文題目 破骨細胞における窒素含有型ビスフォスフォネートの作用メカニズムに関する研究

指導教員 中村 耕三 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月 入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 松本 卓巳

【背景】

ビスフォスフォネート製剤は強力な骨吸収抑制剤であり、骨ペーজেット病、閉経後骨粗鬆症、癌の骨転移など骨吸収の増加を特徴とした様々な疾患の治療に用いられている。しかしその作用機序についてはいまだに不明な点が多い。

リセドロネートやアレンドロネートに代表される窒素含有型ビスフォスフォネートはメバロン酸代謝経路に作用し、経路の最終産物である farnesyl pyrophosphate (FPP) や geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) の産生を阻害する。FPP や GGPP は破骨細胞のアポトーシス、細胞骨格制御、液胞輸送の制御に重要な役割を果たす small G 蛋白の活性に関与しており、この活性阻害作用が破骨細胞における作用機序と考えられている。しかし、今までの多くの報告がマクロファージや細胞株を破骨細胞の代用としたものであり、骨吸収活性を担う唯一の細胞である破骨細胞そのものにおいて細胞内のシグナル伝達を詳細に解析したものはなかった。また、その骨吸収抑制作用が破骨細胞のアポトーシス誘導によるのか、アポトーシスとは独立した骨吸収抑制効果によるものなのか、という問題に関しても未だはつきりとした結論がでていない。

【目的】

窒素含有型ビスフォスフォネートによって生じる破骨細胞内におけるシグナ

ル伝達変化をアポトーシス誘導、骨吸収活性抑制とで独立して明らかにすること、および生体内での作用メカニズムを明らかにすること。

【方法】

窒素含有型ビスフォスフォネートの代表としてリセドロネートを選択した。*in vitro* の系において、ウイルスベクターを用いて遺伝子導入した破骨細胞や遺伝子改変マウス由来の破骨細胞にリセドロネート投与を行い、タンパク発現、生存、骨吸収活性の変化を解析し、リセドロネートによって修飾される生存および骨吸収活性を制御するシグナル経路を同定した。*in vitro* の系より得られた知見に基づき、**Bim** ノックアウトマウスへのリセドロネート投与を行い、その骨量増加作用、組織学的な変化を解析し、生体内での作用メカニズムを考察した。また *in vitro* の系におけるシグナル解析から骨吸収シグナルへの関与が明らかとなった **Akt** に関して、その微小管制御メカニズムに注目し、*in vitro* における微小管の動態解析や微小管結合蛋白の解析、**Akt1&Akt2** ダブルノックアウト破骨細胞の骨吸収活性、細胞骨格の解析を行い、骨吸収活性制御における働きを解明した。

【結果】

まず、*in vitro* においてマウス骨髄細胞とマウス初代骨芽細胞との共存培養によって得られた破骨細胞に対しリセドロネート投与実験を行った。**30 μM** のリセドロネートは破骨細胞にミトコンドリア経路を介したアポトーシスを誘導した。ミトコンドリア経路を介したアポトーシスを制御する **Bcl-2 family** タンパクのうち、**Bim** の発現が増加した。**Bim** ノックアウト破骨細胞へのリセドロネート投与では、アポトーシス誘導は抑制されるが、骨吸収活性の低下は抑制されなかった。リセドロネートがアポトーシス誘導とは独立して骨吸収抑制効果を持つことが示唆された。

生体内での作用機序を解明するため、14週齢の **Bim** ノックアウトマウス（以下 **Bim KO** マウス）へリセドロネート生体投与実験を行った。体重あたり **0.01mg/kg** のリセドロネートを14日間連続皮下投与した。X線撮影、骨密度測定により野生型マウス（以下 **WT** マウス）および **Bim KO** マウスの両方でリセドロネート投与により明らかな骨量増加が認められた。骨吸収マーカーである血清中の **CTx-I** は **WT** マウスおよび **Bim KO** マウスの両方で有意に減少していた。組織学的な検討では、**Bim KO** マウスでは破骨細胞のアポトーシスが有意に抑制されていた。リセドロネート投与により破骨細胞数は **WT** マウスでは約1.5倍に増加した。**Bim KO** マウスではもともと **WT** マウスと比較して破骨細胞数は約1.5倍に増加しており、リセドロネート投与による破骨細胞数の変化はみられなかった。これらの結果より、リセドロネートは破骨細胞のアポトーシスには依存せずに骨量増加作用を持つことが示唆された。

続いて、リセドロネートによって修飾される生存および骨吸収活性を制御するシグナル経路の同定を試みた。破骨細胞において Bim はユビキチン-プロテアソーム系により分解され、この制御には MEK/Erk 経路が関与することが報告されている。そこでリセドロネート投与が Erk の活性化へ及ぼす影響を評価した。リセドロネート投与により Erk の活性は経時的および濃度依存的に減少し、3 μM 以上のリセドロネート濃度において活性が有意に低下した。細胞生存に関与するもう一つの重要な経路である Akt についても影響を評価したところ、Akt の活性はやはり経時的、および濃度依存的に減少し、0.03 μM 以上のリセドロネート濃度において活性が有意に低下した。恒常活性型 MEK1 (CA-MEK1) および恒常活性型 Akt1 (CA-Akt1) をアデノウイルスにより導入した破骨細胞を用いて、リセドロネートの生存能および骨吸収活性への影響を評価した。リセドロネートによるアポトーシスは CA-Akt1 導入破骨細胞では部分的に、CA-MEK1 導入破骨細胞では完全にレスキューされた。この結果はリセドロネート投与によるアポトーシス誘導が主に MEK/Erk 経路を介していることを示唆した。一方で、リセドロネート投与による骨吸収抑制は CA-MEK1 導入破骨細胞ではレスキューされず、CA-Akt1 導入破骨細胞では完全にレスキューされた。骨基質上で骨吸収を行なっている破骨細胞が形成する sealing zone の形成を比較すると、リセドロネート投与によりその形成率は有意に低下するが、CA-MEK1 導入破骨細胞ではレスキューされず、CA-Akt1 導入群では完全にレスキューされた。これらの結果はリセドロネート投与による骨吸収抑制効果が Akt 活性阻害による sealing zone の破断を介していることを示唆した。

リセドロネートの濃度依存的なアポトーシス誘導能、骨吸収抑制効果を評価したところ、破骨細胞のアポトーシス誘導には 3 μM 以上、骨吸収抑制には 0.03 μM 以上のリセドロネート濃度を要することがわかった。これらの結果は、Erk の活性、Akt の活性の濃度依存的な低下と一致しており、低濃度リセドロネートの暴露では骨吸収抑制がアポトーシス誘導とは独立して生じることを示唆した。

続いて、Akt による sealing zone 形成制御のメカニズムの解明を行った。近年、破骨細胞における sealing zone をはじめとするアクチン骨格の構成は微小管によって制御されることが明らかとなっており、特に sealing zone の形成には安定化した微小管が修飾されて生じるアセチル化チューブリンが必要であるとされている。リセドロネート投与によってアクチン骨格の破断と同時に微小管構造も破壊された。Akt の活性低下に伴ってアセチル化チューブリンの発現が低下し、CA-Akt1 の導入によりアセチル化チューブリンが増加した。これらは Akt が微小管の安定化に関与することでアクチン骨格を制御している可能性を示唆した。CA-Akt1 導入破骨細胞では、微小管の安定化に関わる微小管のプラズマ末端集積因子のなかで APC および EB1 の微小管結合が増加していた。

APC は GSK-3 β によるリン酸化を受けることによって微小管結合能を失うことが知られている。GSK-3 β の阻害剤である LiCl によって破骨細胞のアセチル化チューブリンが増加し、また Akt1&Akt2 ダブルノックアウト破骨細胞でみられる骨吸収能の低下、sealing zone 形成の低下が LiCl の添加によって回復した。以上の結果より Akt が GSK-3 β を介して微小管結合蛋白の微小管への結合を制御することで微小管の安定化に寄与し、sealing zone の形成および骨吸収に関与する可能性が示唆された。

【考察】

in vitro の系におけるシグナル解析により、リセドロネートが Erk/Bim 経路に作用して破骨細胞のアポトーシスを誘導し、Akt 経路に作用して破骨細胞の骨吸収活性を阻害することが明らかとなった。また Bim ノックアウトマウスへのリセドロネート投与実験から、リセドロネートの作用機序が破骨細胞のアポトーシス誘導に依存しないことが明らかとなった。アポトーシス誘導と骨吸収活性抑制が独立したシグナル経路によって制御されており、アポトーシス誘導効果の発現には骨吸収抑制効果の発現の 100 倍以上の濃度のリセドロネートが必要であることがわかった。生体内では破骨細胞は骨吸収に伴ってのみしかビスフォスフォネートを細胞内に取り込むことができないため、少量のリセドロネート取り込みによって sealing zone 形成の障害が生じると、それ以上のリセドロネートを取り込むことができないと考えられた。本研究では窒素含有型ビスフォスフォネートとしてリセドロネートしか用いておらず、薬剤による効果の違いに関しては今後さらに検討する必要がある。また本研究で、Akt が微小管の安定化をもたらすことで、sealing zone の形成に関与し、骨吸収活性を制御するという新しい知見を得た。本研究によって得られた知見は、新たなビスフォスフォネート薬の開発や、新たな機序を持つ骨吸収抑制薬の創薬に繋がると考えられる。