

ビタミン D の骨への直接作用

上 野 豊

東京慈恵会医科大学整形外科科学講座

(受付 平成 15 年 9 月 12 日)

THE EFFECT OF VITAMIN D ON THE BONE TISSUE

Yutaka UENO

Department of Orthopedic Surgery, The Jikei University School of Medicine

Toxic doses of vitamin D induce bone resorption both *in vivo* and *in vitro*, whereas pharmacologic doses have bone-protective effect *in vivo*. To investigate the dose-dependent differences in the effects of vitamin D on bone resorption, I examined the *in vivo* effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ (1, 25(OH)₂D₃) on the expression of the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) mRNAs in the bone of rats that had undergone thyroparathyroidectomy (TPTX) and were receiving or not receiving infusions of parathyroid hormone (PTH). Continuous infusion of 50 ng/h of PTH greatly increased expression in bone of RANKL mRNA but not of OPG mRNA. When graded oral doses of 1, 25(OH)₂D₃ were administered daily for 14 days to normocalcemic TPTX rats receiving continuous infusions of PTH, PTH-induced RANKL mRNA expression was inhibited by 0.01 and 0.1 μ g/kg of 1, 25(OH)₂D₃ but not by 0.5 μ g/kg of 1, 25(OH)₂D₃. Regulator of G protein signaling-2 gene expression was suppressed by 1, 25(OH)₂D₃ dose-dependently, but PTH/PTH-related protein (PTHrP) receptor mRNA expression was not altered. Morphometric analyses revealed that 1, 25(OH)₂D₃ suppressed PTH-induced osteoclast number *in vivo*. These results suggest that toxic doses of 1, 25(OH)₂D₃ stimulate bone resorption by inducing RANKL but pharmacologic doses of 1, 25(OH)₂D₃ within a certain range inhibit PTH-induced bone resorption. This inhibition appears to be mediated by suppression of PTH/PTHrP receptor-mediated signaling.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2004 ; 119 : 1-12)

Key words: receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, osteoclasts, vitamin D, bone resorption

I. 緒 言

骨組織は、生涯を通じて代謝を続ける器官であり、骨量の維持は骨形成を担当する骨芽細胞と骨吸収を担当する破骨細胞の機能のバランスの上になりたっている¹⁾。すなわち、骨形成に比較して骨吸収が優位になれば骨量は減少し、逆に骨吸収と比較して骨形成が優位となれば骨量は増加するため、骨形成と骨吸収のアンバランスは様々な骨代謝疾患を惹起する。したがって、生体における骨

芽細胞と破骨細胞の形成ならびに機能の調節機序を明らかにすることは極めて重要である。こうした骨の代謝は様々なホルモンならびに局所因子により調節されているが、その中でも最も重要な因子はビタミン D、副甲状腺ホルモン(parathyroid hormone: PTH) ならびにカルシトニン(calcitonin)と考えられる。とくに、抗くる病因子として発見されたビタミン D²⁾の活性型代謝産物である活性型ビタミン D (1, 25-dihydroxyvitamin D₃: 1, 25(OH)₂D₃) は、*in vitro* において骨吸収

を司る破骨細胞の形成ならびに活性を促進することが広く知られている。

骨吸収を司る破骨細胞は多数の核と ruffled border membrane と呼ばれる特殊な膜を有する巨細胞で、単球・マクロファージ系の細胞が骨髄の環境下において分化・融合することにより形成される³⁾⁴⁾。近年、破骨細胞の分化を調節する因子が同定され骨代謝を分子レベルで説明することが可能となった。単球系細胞から破骨細胞への分化は、骨芽細胞ならびに骨髄間質細胞の膜状に発現している tumor necrosis factor (TNF) ファミリーに属する蛋白である破骨細胞分化因子 (receptor activator of nuclear factor κ B ligand; RANKL) によって調節され^{5)~7)}、ビタミン D, PTH, インターロイキン 11 などの骨吸収因子が骨芽細胞の RANKL 遺伝子の発現を増加させることも報告されている。一方、破骨細胞前駆細胞には RANKL の受容体として働く膜蛋白質である receptor activator of nuclear factor κ B (RANK) が発現しており、RANKL からのシグナルが伝達され破骨細胞へと分化することが明らかになっている⁸⁾。さらに、Kitazawa ら⁹⁾は、マウスの RANKL 遺伝子の upstream に、1, 25(OH)₂D₃ を結合したビタミン D 受容体が結合する配列であるビタミン D 応答配列が存在することを報告している。

一方、1, 25(OH)₂D₃ は、骨の器官培養系において骨吸収活性を示すほかに、*in vitro* の共存培養系でも破骨細胞形成を促進することから、強力な骨吸収因子の一つと考えられてきた。しかし、*in vivo* では、中毒量のビタミン D あるいは過剰量の 1, 25(OH)₂D₃ を投与しない限り骨吸収は促進せず、高カルシウム血症を生じることもない。逆に、薬理量の 1, 25(OH)₂D₃ 誘導体は、その骨量維持・増加の目的で代謝性骨疾患の治療薬として臨床に広く用いられている。こうした矛盾、すなわち、投与量によるビタミン D の骨代謝への作用の違いが、いかなる機序によるものであるかを明らかにするためには、1, 25(OH)₂D₃ の *in vivo* における骨への直接作用の詳細を解明することが重要と考える。

そこで著者は、甲状腺・副甲状腺を摘出した (thyroparathyroidectomy: TPTX) ラットに

1, 25(OH)₂D₃ を投与し、骨組織における骨吸収の主要な役を演ずる破骨細胞の分化・活性化に直接関与する RANKL, 破骨細胞形成抑制因子 (osteoprotegerin: OPG) などの発現量の変化について分子細胞学的に分析した。

II. 対象と方法

1. 動物

8 週間齢の雄性 Sprague-Dawley ラットを 1.2% のカルシウムと 0.9% のリンを含んだ飼料で飼育し実験に用いた。エーテル麻酔下に TPTX を施行し、施行後は L-サイロキシン (Sigma, St. Louis, MO) 4 mg を 1 日おきに経口投与した。手術後 2 日目に血清カルシウムを測定し、低カルシウム血症を呈していることを確認後実験に供した。ラット PTH(1-34) (Peninsula Laboratories Inc., Belmont, CA) は、infusion ポンプ (model 2002; Alza Corporation, Palo Alto, CA) を皮下に植え込むことにより、時間当たり 50 ng で 2 週間持続注入した。1, 25(OH)₂D₃ (和光純薬, 大阪) は、体重 1 kg あたり 0.01 μ g, 0.1 μ g, 0.5 μ g を 2 週間連日経口投与した。すべての手順は、昭和大学の動物実験委員会のガイドラインに従って行った。

2. 血中カルシウム, リン, PTH, 1, 25(OH)₂D₃ 濃度と尿中デオキシピリジノリンの測定

血清カルシウムとリン値は、自動分析装置 (model AU-550; オリンパス, 東京) を用いて測定した。PTH の血中濃度は、ラット PTH IRMA キット (Immutopics, Ins., San Clemente, CA) を用いて radioimmuno assay 法により測定した。1, 25(OH)₂D₃ の血中濃度は、仔牛胸腺ビタミン D 受容体 (ヤマサ醤油, 千葉) を用いた radioreceptor assay 法¹⁰⁾ により、尿中のクレアチニン (creatinin (Cr)) は、自動分析装置で測定した。骨吸収マーカーである尿中のデオキシピリジノリン (deoxypyridinoline (D-pyr)) は、PYRILINKS-D 分析評価キット (Metra Biosystems, Mountain View, CA) を用いて測定し、尿中 Cr 値にて補正した¹¹⁾。

3. Reverse transcription-polymerase chain reaction と southern blotting

RNA は、繊維組織、骨髄、海綿骨を完全に除去

したラット大腿骨の皮質部から TRIzol (GIBCO-BRL, Rockville, MD) を用いた AGPC 法によって抽出した。各サンプルから得られた 5 μ g の total RNA に逆転写酵素 (Superscript II RT; Life Technologies, 東京) と random hexamer を加えて逆転写反応を行い, cDNA を作製した。得られた cDNA を鋳型として, 遺伝子特異的な primer を用い (Table 1), polymerase chain reaction (PCR) 反応を行った。PCR 法用の primer の配列は Genome Database (<http://www.gdb.org>) より入手した。PCR は, サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700; Perkin-Elmer Corp.) を用いて行った。各遺伝子の PCR 条件は Table 2 に示した。PCR 産物は 2% のアガロースゲルの上で電気泳動によって分離し, アルカリ溶液で変性後, ナイロンメンブラン (Hybond N⁺ membrane; Amersham International plc, Bucks, U.K.) へ転写した。southern-hybridization は各遺伝子特異的なオリゴヌクレオチド (Table 3) を [γ -³²P]-ATP (Du Pont-New-Eng-

land Nuclear, Boston, MA) の存在下に T₄-Polynucleotide キナーゼ (Life Technologies, 東京) によりエンドラベリングして, Iida らの方法に従って行った¹²⁾。遺伝子の発現の定量は, Bio-Image アナライザー-BAS2000 (富士フィルム, 東京) を用いて行い, 各遺伝子の発現量は β -actin の発現量を用いて補正した。

4. 骨形態計測

骨の形態観察のため, 屠殺の 2, 5 日前にカルセイン (同仁, 熊本) (8 mg/kg.bw) を全てのラットに皮下注射し標識を行った。大腿骨を摘出後, Villanueva 法によって染色し, 非脱灰の状態 で methylmethacrylate に包埋した。形態計測は包埋した標本を 20 μ m で薄切後, イメージ分析コンピュータ (Osteoplan II, Carl Zeiss, Thornwood, NY) を用い顕微鏡下に行った。形態計測の各パラメータは, アメリカ骨代謝学会の定義¹³⁾ に従って, 計測した。

5. 統計の分析

各種実験間の有意差検定は, Student's-*t* 法を用

Table 1. Sequence of PCR primers used for mRNA phenotyping analysis

Target mRNA	Primer sequences	Nucleotide
RANKL	S-cgctctgttctctgtactttcgagcg	195-783
	A-tcgtgctcctcctttcatcaggtt	
OPG	S-agtttatttaacagactgccaccag	1955-2220
	A-gtaataagaggcgcatagtcagta	
cathepsin-K	S-tgtctgaaaagagcatagacaacag	3-567
	A-atagttctcagacacacagtccaca	
PTH/PTHrP receptor	S-gatgtctttaccaagaggaacaga	133-463
	A-gattgaagtcataaatgtaatcggg	
RGS-2	S-aaagcaaggaaaatctataccgact	411-794
	A-atcaatagttctgagcgatgttttc	
β -actin	S-tctagcaccatgaagatc	2845-3158
	A-aaacgcagctcagtaacag	

Table 2. The conditions of PCR for each gene

Gene	Denaturation	Annealing	Elongation	Cycles
RANKL	94°C 30 sec	58°C 45 sec	72°C 1 min	30
OPG	94°C 30 sec	58°C 45 sec	72°C 1 min	24
cathepsin-K	94°C 30 sec	58°C 45 sec	72°C 1 min	20
PTH/PTHrP receptor	94°C 30 sec	58°C 45 sec	72°C 1 min	24
RGS-2	94°C 30 sec	58°C 45 sec	72°C 1 min	24
β -actin	94°C 30 sec	58°C 45 sec	72°C 1 min	20

いて行い、 $p < 0.01$ を有意差ありとした。

III. 結 果

1. 血中カルシウム、リン、PTH、1, 25(OH)₂D₃ 濃度と尿中 D-Pyr 濃度

PTH ならびに 1, 25(OH)₂D₃ 投与後の血清カルシウム、リン、PTH、1, 25(OH)₂D₃ 濃度と尿中 D-Pyr 濃度は、Table 4 に示した。TPTX により、血清カルシウムと 1, 25(OH)₂D₃ 濃度は減少したのに対し、リン濃度は上昇した。TPTX ラットに 1, 25(OH)₂D₃ を投与すると、血清カルシウム濃度は濃度依存的に上昇し、0.5 μg の 1, 25(OH)₂D₃ の連日投与により正常範囲に回復した。

TPTX ラットに PTH を持続投与すると、血清カルシウム濃度は正常範囲にまで回復した。これらのラットに 2 週間、薬理量の 1, 25(OH)₂D₃

(0.01 または 0.1 μg/kg) を投与したところ、血中カルシウム濃度には変化が生じなかった。これに対して、中毒量の 1, 25(OH)₂D₃ (0.5 μg/kg) を投与したラットでは、高カルシウム血症が生じ、血中 1, 25(OH)₂D₃ 濃度も高値を呈した。

骨吸収マーカーである D-Pyr の尿中排泄量についてみると、TPTX ラットでは著しく減少したが、このラットに薬理量の 1, 25(OH)₂D₃ (0.01 または 0.1 μg/kg) を投与してもその値には変化がみられなかった。しかし、中毒量 (0.5 μg/kg) の 1, 25(OH)₂D₃ を投与したラットでは、著しく D-Pyr の排泄が増加した。一方、TPTX ラットに PTH を持続注入することにより、D-Pyr の尿中排泄は正常ラットのレベルにまで回復したが、さらに、薬理量の 1, 25(OH)₂D₃ (0.01 または 0.1 μg/kg) を投与することにより、PTH による D-Pyr

Table 3. Sequence of oligonucleotides used for Southern blot hybridization

Gene	Sequences
RANKL	5'-gagcctcaggctgccccgccggccacatcgaccacgaaccttccatcatagctggaa-3'
OPG	5'-agcccagtgtttctgttctctgtagttgtacctaagctgactccaagtagacatttagta-3'
cathepsin-K	5'-ttgctgctaccctgggtgagctttgctctatccccggaggaaacgctggacacgcagtg-3'
PTH/PTHrP receptor	5'-aaagtctaccctgagctaaagagacaaggacgcgccaccggcagcagcgagagg-3'
RGS-2	5'-cgaaatctctgattgcccaaaatccaaggagctacaagtgctgcttaccacagctc-3'
β-actin	5'-ctcactgtccaccttccagcagatgtggatcagcaagcaggagtacgatgagtcggccc-3'

Table 4. Serum levels of calcium, phosphorus, and 1, 25-(OH)₂D₃ and urinary deoxypyridinoline excretion in TPTX rats

Operation	Treatment		Serum levels			Urinary level
	PTH (ng/h)	1, 25-(OH) ₂ D ₃ (μg/kg bw)	Ca (mg/dl)	P (pg/dl)	1, 25-(OH) ₂ D ₃ (pg/ml)	D-Pyr/Cr (nM/mM)
Sham	0	0	9.6±0.3 ^b	7.5±0.2 ^b	67.6±7.9 ^b	75.1±2.2
		0	5.1±0.2 ^a	10.5±0.4 ^a	29.8±2.3 ^a	54.2±3.0 ^a
		0.01	6.9±0.5 ^a	10.0±0.5 ^a	42.5±5.7	59.8±2.7 ^a
TPTX	0	0.1	7.9±0.8 ^b	9.2±0.6	45.1±8.6	59.6±3.3 ^a
		0.5	10.3±0.7 ^b	6.9±0.6 ^b	105.9±11.5	91.7±4.9 ^b
		0	10.4±1.1 ^b	6.8±1.2	79.4±16.5	84.8±2.2 ^b
		0.01	11.1±0.9 ^b	7.4±1.0	73.4±15.3	71.8±1.2 ^{b,c}
TPTX	50	0.1	11.2±0.6 ^b	6.5±0.8 ^b	84.2±9.8	66.5±1.8 ^{b,c}
		0.5	14.6±1.2 ^{a,b}	3.5±0.4 ^{a,b}	133.5±21.3	110.2±3.7 ^{a,b,c}

Eight-week-old rats were either sham-operated or TPTX under light ether anesthesia. Either PTH (50 ng/h) or vehicle was infused at a flow rate of 0.5 μl/h for 2 weeks. 1, 25-(OH)₂D₃ was orally administered for 2 weeks. Rats were killed 12 h after the final administration of 1, 25-(OH)₂D₃. Values are expressed as the means±SE of at least 5 rats. a; $p < 0.01$ (significantly different from sham rats), b; $p < 0.01$ (significantly different from TPTX rats administered the vehicle), c; $p < 0.01$ (significantly different from TPTX rats treated with PTH).

の増加は著しく阻害された。しかし、中毒量の1,25(OH)₂D₃ (0.5 μg/kg)の投与はD-Pyrの尿中排出を更に増加させることが確認された。

2. RANKL, OPG ならびにカテプシン K mRNA の発現に対する 1, 25(OH)₂D₃ の作用

TPTX ラットでは、皮質骨のRANKLならびにカテプシン K mRNA の発現は著しく低下したが、OPG mRNA の発現には変化が認められなかった (Fig. 1A, B)。また、2週間連日薬理量の1,25(OH)₂D₃ を投与したTPTX ラットの皮質骨では、測定したすべての遺伝子の発現量に変化はなかった。しかし、中毒量である0.5 μg の1,25(OH)₂D₃ を投与したTPTX ラットでは、RANKLならびにカテプシン K mRNA の発現は著しく増加し、sham ラットと同等の発現に回復した (Fig. 1A, B)。

3. RANKL, OPG ならびにカテプシン K mRNA の発現に対する PTH と 1, 25(OH)₂D₃ の相互作用

1,25(OH)₂D₃ の骨作用には、直接作用とPTHの産生抑制を介した間接作用の存在が報告されている。そこで、TPTX ラットにPTHを持続注入しPTHの分泌抑制による間接作用を排除できる実験系を用いることにより、1,25(OH)₂D₃ の骨への直接作用を分子レベルで検討した。すなわち、TPTX ラットにPTHを持続注入することにより、PTH濃度を正常範囲(20.1±2.3 pg/ml)に維持し、血清カルシウム値を正常化させた。こうしたラットに1,25(OH)₂D₃ を投与し、PTHにより亢進したRANKLならびにカテプシン K mRNA の発現に対する1,25(OH)₂D₃ の効果を検討したところ、薬理量の1,25(OH)₂D₃ (0.01, 0.1 μg/kg)はPTHにより亢進したRANKLならびにカテプシン K mRNA の発現を著しく抑制した。一方、中毒量の1,25(OH)₂D₃ はこれらの遺伝

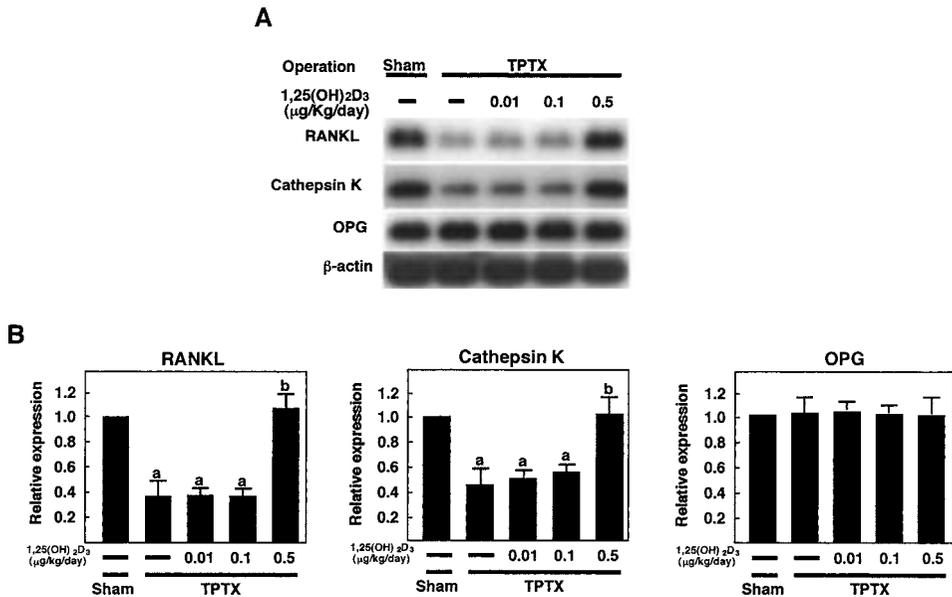


Fig. 1. Effect of 1,25-(OH)₂D₃ on the expression of RANKL, cathepsin K and OPG mRNAs in the cortical bone of TPTX rats. Eight-week-old rats were either sham operated or TPTX under light ether anesthesia. Two days after the operation, either 1,25-(OH)₂D₃ or vehicle was daily administered orally for 2 weeks at a dose of 0.01, 0.1, or 0.5 μg/kg bw. Twelve hours after the final administration of 1,25-(OH)₂D₃, total RNA was prepared from the cortical bone of each rat. A : Southern blots of RANKL, cathepsin K and OPG mRNAs in the cortical bone of TPTX rats. B : Relative expression of RANKL, cathepsin K, and OPG. For relative quantification, the value from the cortical bone of sham rats administered the vehicle was used as the standard (ratio 1). Values are expressed as the means±SE of 4 rats. a ; p<0.01 (significantly different from sham rats). b ; p<0.01 (significantly different from TPTX rats given vehicle).

子発現を抑制せず、さらに増強させることがわかった (Fig. 2A, B).

4. 1, 25(OH)₂D₃による骨吸収関連遺伝子の発現抑制メカニズム

次に、1, 25(OH)₂D₃によるRANKLおよびカテプシンK mRNAの発現抑制が、PTHのシグナル伝達系の阻害によるか否かを明らかにする目的で、骨組織のPTH/PTH related protein受容体(PTH/PTHrP-R)ならびにPTHによりその発現が制御されている初期応答遺伝子であるregulators G-protein signaling-2 (RGS-2)¹⁴⁾のmRNA発現の変化について検討した。TPTXにより、PTH/PTHrP-R mRNAの発現は影響を受けなかったが、RGS-2 mRNAの発現量は減少した。また、TPTXラットにPTHを持続注入した

場合にも、骨組織のPTH/PTHrP-R mRNAの発現に変化は認めないもののRGS-2 mRNAの発現は増加した。一方、1, 25(OH)₂D₃を連日投与した場合にも、PTH/PTHrP-R mRNAの発現には変化が認められなかったが、PTHによって増加したRGS-2 mRNAの発現が濃度依存的に減少することが観察された (Fig. 3A, B).

5. 骨形態計測

カルセインでラベルした大腿骨を用いて、石灰化速度 (mineral apposition rate: MAR), 石灰化面積 (mineralizing surface/bone surface: MS/BS), 骨形成率 (bone formation rate/BS: BFR/BS), 破骨細胞数 (Osteoclast number/bone perimeter: N. Oc/B. Pm) の測定を行った。これらすべてのパラメータはTPTXにより減少し

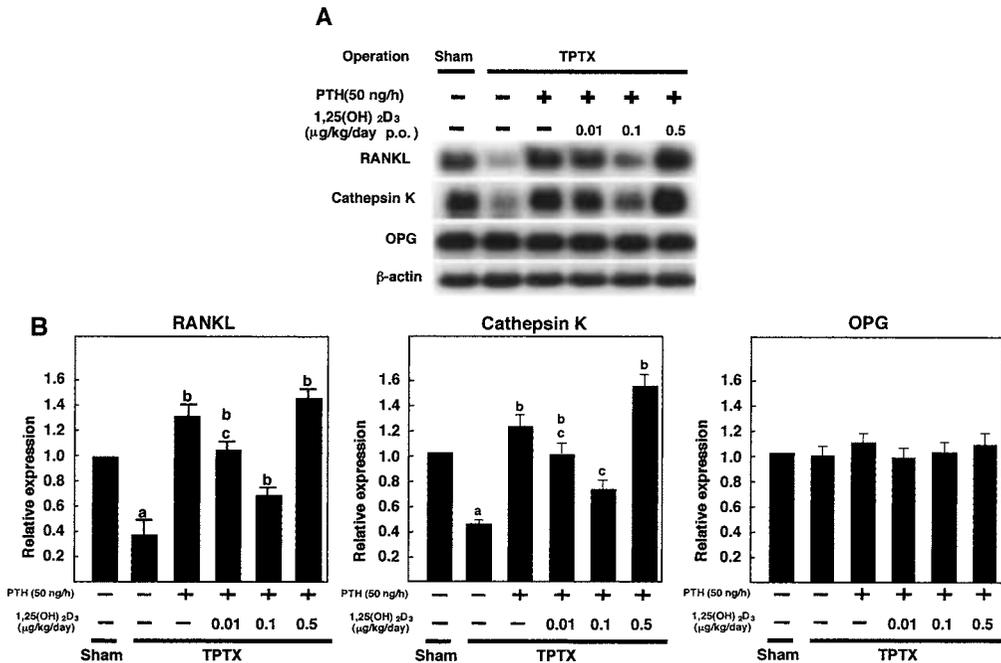


Fig. 2. *In vivo* effects of PTH and 1, 25-(OH)₂D₃ on the expression of RANKL, cathepsin K and OPG mRNAs in the cortical bone of TPTX rats. Eight-week-old rats were either sham operated or TPTX under light ether anesthesia. Two days after the operation, either vehicle (2% cysteine-HCl in 0.9% saline) or rat PTH (1-34) at 50 ng/h (flow rate, 0.5 μl/h) was infused for 2 weeks using an osmotic mini-pump. 1, 25-(OH)₂D₃ was daily administered orally for 2 weeks at a dose of 0.01, 0.1 or 0.5 μg/kg bw. Twelve hours after the final administration of 1, 25-(OH)₂D₃, total RNA was prepared from cortical bone of each rat. A: Southern blots of RANKL, cathepsin K and OPG mRNAs in the cortical bone of TPTX rats. B: Relative expression of RANKL, cathepsin K, and OPG. For relative quantification, the value from the cortical bone of sham rats administered the vehicle was used as the standard (ratio 1). Values are expressed as the means ± SE of 4 rats. a; *p* < 0.01 (significantly different from sham rats). b; *p* < 0.01 (significantly different from TPTX rats given vehicle). c; *p* < 0.01 (significantly different from TPTX rats treated with PTH).

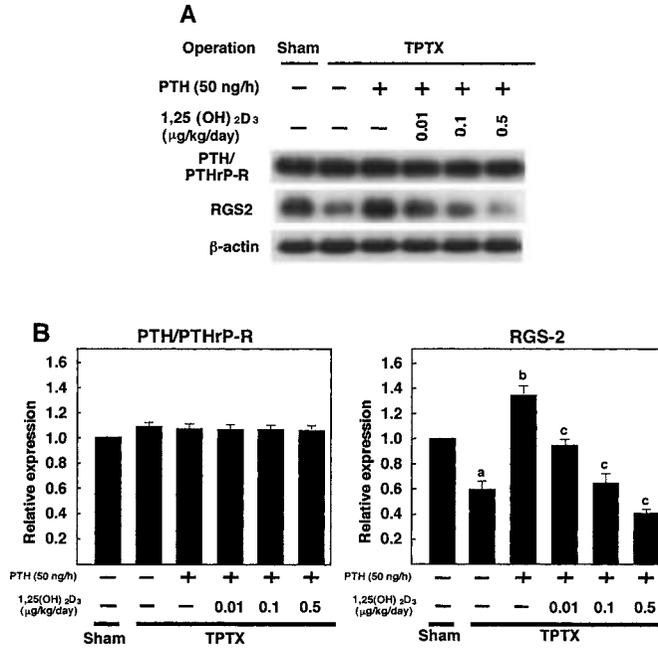


Fig. 3. *In vivo* effects of PTH and 1,25-(OH)₂D₃ on the expression of PTH/PTHrP-receptors (PTH/PTHrP-R) and regulators of G protein signaling (RGS-2) mRNAs in the cortical bone of TPTX rats. Eight-week-old rats were either sham operated or TPTX under light ether anesthesia. Two days after the operation, either vehicle or PTH (50 ng/h) was infused at a flow rate of 0.5 μl/h for 2 weeks. 1,25-(OH)₂D₃ was daily administered orally for 2 weeks at a dose of 0.01, 0.1, or 0.5 μg/kg. A: Southern blots of PTH/PTHrP-R and RGS-2 mRNAs in the cortical bone of TPTX rats. B: Relative expression of PTH/PTHrP-R, and RGS-2. For relative quantification, the value from the cortical bone of sham rats administered the vehicle was used as the standard (ratio 1). Values are expressed as the means±SE of 4 rats. a; *p*<0.01 (significantly different from sham rats). b; *p*<0.01 (significantly different from TPTX rats given vehicle). c; *p*<0.01 (significantly different from TPTX rats treated with PTH).

Table 5. Morphometric parameters of cortical bone of the femur

	MAR (μm/day)	MS/BS (%)	BFR (μm ³ /cm ³ .y)	N. Oc/B. Pm (Number/10 mm)
Sham	4.70±0.49 ¹	25.53±2.50 ¹	40.55±6.61 ¹	196.0±10.5 ¹
TPTX	1.84±0.31	5.88±2.49	5.51±1.03	79.7±13.8
TPTX+PTH	4.73±0.74 ⁴	25.53±2.53 ¹	26.20±4.43 ¹	233.0±22.6 ¹
TPTX+PTH+1,25-(OH) ₂ D ₃	2.09±0.28 ²	18.21±4.05 ¹	14.71±1.86 ^{1,3}	138.5±16.7 ³

Rats were constantly infused for 2 weeks with either vehicle (2% cysteine-HCl in 0.9% saline) or rat PTH (1-34) at 50 ng/h (flow rate; 0.5 μl/h) using an osmotic mini-pump. 1,25-(OH)₂D₃, (0.1 μg/kg bw) dissolved in PBS containing 0.2% ethanol and 0.01% Tween 20, was daily administered orally for 2 weeks. Mineral apposition rate (MAR), mineralizing surface (MS/BS), bone formation rate (BFR/BS), and number of osteoclasts (N. Oc/B. Pm) were measured by the methods of Parfitt et al.¹³⁾. Values are expressed as the means±SE of 4 rats.

¹Significantly different from TPTX rats administered the vehicle, *p*<0.001;

²Significantly different from TPTX rats treated with PTH, *p*<0.001;

³Significantly different from TPTX rats treated with PTH, *p*<0.01;

⁴Significantly different from TPTX rats administered the vehicle, *p*<0.01.

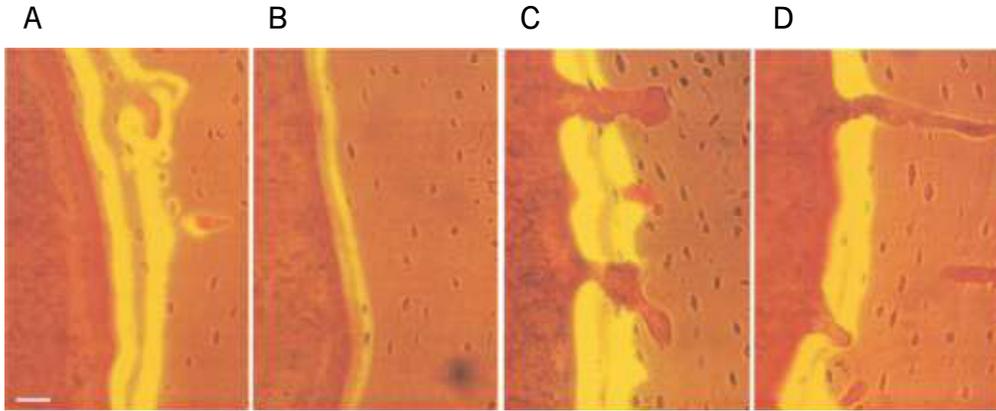


Fig. 4. Photomicrographs of bone sections from rats treated with the vehicle alone (A), and from TPTX rats treated with the vehicle (B), PTH (C), and PTH plus $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (D). Eight-week-old rats were either sham operated or TPTX under light ether anesthesia. Two days after the operation, either PTH (50 ng/h) or vehicle was infused at a flow rate of $0.5 \mu\text{l/h}$ for 2 weeks. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ was daily administered orally for 2 weeks at a dose of $0.1 \mu\text{g/kg}$ bw. All rats were subcutaneously injected with calcein ($8 \mu\text{g/kg}$ bw) on the fifth and second days before sacrifice. Scale bar, $20 \mu\text{m}$.

たが、PTHを持続注入することによりいずれのパラメータも著しく増加した。一方、さらに、薬理量の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($0.1 \mu\text{g/kg}$)を投与したラットでは、PTHにより亢進したMAR, BFR/BSならびにN. Oc/B.Pmのパラメータは、いずれも著しく抑制された (Table 5, Fig. 4)。

IV. 考 察

ビタミンDは、小腸、骨、腎臓、副甲状腺¹⁵⁾などの標的器官の核内に存在するビタミンD受容体 (VDR) との結合を介し、生体のカルシウムと骨代謝を調節する遺伝子の発現を制御していることが明らかにされている。ビタミンDが欠乏した場合、クル病あるいは骨軟化症が発症することからも、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が骨同化作用を有することには異論がないところである¹⁶⁾¹⁷⁾。こうしたビタミンDの骨代謝の作用は、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が腸管に作用してカルシウムとリンの吸収を促進することにより、血清カルシウムとリンのレベルが上昇し、骨形成が促進されるといった間接作用と考えられる¹⁸⁾。また、血清カルシウムの上昇はcalcium-sensing受容体を介して¹⁹⁾PTH合成を抑制するとともに、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は、直接副甲状腺のVDRにも結合し、PTH合成を抑制する。このような作用を有することから、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ とその合成の

アナログであるアルファカルシドール [$1\alpha-(\text{OH})\text{D}_3$]は、くる病/osteomalasia、腎骨異栄養症、骨粗鬆症などの多くの代謝性骨疾患の治療薬として用いられている²⁰⁾²¹⁾。しかし、骨粗鬆症患者のように、ビタミンDが充足された状態において、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を投与した場合、骨にどのような効果を示すかについては、これまでに明確にされていない。

Endoら²²⁾は、副甲状腺を摘出したラットに副甲状腺関連ペプチドを持続投与することにより、骨吸収亢進のモデルラットを作製し、薬理量の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($0.01 \mu\text{g}$ または $0.1 \mu\text{g/kg}$)を投与したところ、これが骨吸収の抑制を介して高カルシウム血症を是正したと報告している。また、Shiraishiら²³⁾は、副甲状腺を摘出したラットにPTHを持続投与し、血中カルシウム濃度を正常範囲に維持したモデル動物を使用した実験において、 $1\alpha-(\text{OH})\text{D}_3$ 投与が骨吸収のマーカーである尿中D-Pyrの排泄を減少させたと報告している。これらの結果は、ビタミンDの充足状態での $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の投与は、PTH合成の抑制を介することなく、別の機序により骨吸収を抑制する可能性を示唆するものである。そこで、著者は、こうした $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の骨への直接作用についてより詳細な分子レベルで検討を行った。その結果、

TPTX ラットにおいて薬理量の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は PTH によって骨組織に誘発された RANKL mRNA の発現の抑制を介して骨吸収を抑制することが明らかになった。これらの事実から、ビタミンD誘導体の種々の骨代謝疾患への有用性は、従来考えられてきた腸管や副甲状腺などの他臓器を介した骨組織への間接的な作用のみならず、他臓器を介さない骨組織への直接作用にも起因すると考えられる。しかしながら、これらの *in vivo* での知見は、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が破骨細胞の形成と活性を促進することや、器官培養の実験で骨吸収を促進するという *in vitro* での報告²⁴⁾ と矛盾している。こうした矛盾、すなわち、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の *in vitro* と *in vivo* での骨吸収への作用の違いはいかなる機序によるものであろうか。 *in vitro* において破骨細胞形成を促進するのに必要な $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の濃度は 10^{-8} M であり、これは健康人の血清 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度の 100~1,000 倍の高濃度である。こうした事実は、*in vitro* と *in vivo* での $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の作用の違いが、投与量または血中濃度に起因する可能性を示唆するものである。そこで、著者は、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の濃度による骨への直接作用についての検討を行った。その結果、中毒量 ($0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$) の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を連日投与した TPTX ラットの骨組織では、RANKL とカテプシン K mRNA の発現の増加が生じるのに対し、薬理量の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0.1 または $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}$) の投与を行ったラットでは、これらの遺伝子の発現に変化は認められなかった。すなわち、中毒量の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は、骨組織に対して RANKL の発現を介して骨吸収を促進するが、薬理量の投与では骨吸収を抑制する作用を発揮すると考えられる。

PTH は、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ と同様に、osteoblasts/stromal 細胞に作用し、RANKL の発現を介して破骨細胞の分化ならびに活性を促進することが明らかになっている⁸⁾。また、Ma ら²⁵⁾ は、副甲状腺を摘出したラットに PTH を持続注入するか、または、腹腔内に1回投与 ($1 \mu\text{g}/\text{kg}$) すると、骨組織における RANKL mRNA 発現の増加と、OPG mRNA 発現減少が生じることを報告している。本研究においても、TPTX ラットに2週間 $50 \text{ ng}/\text{h}$ の流速で PTH を持続注入したところ、皮質

骨の RANKL とカテプシン K mRNA の発現は増加した。こうした事実は、PTH によるこれらの遺伝子の発現促進が、*in vivo* においても破骨細胞の形成と活性制御の本体となっていることを示唆するものと考えられる。PTH は、2つの主要な標的器官である腎臓と骨において、PTH/PTHrP-R に結合することで、細胞の分化と機能を調節している²⁶⁾²⁷⁾。PTH が細胞膜の PTH/PTHrP-R に結合すると、アデニレートシクラーゼとホスホリパーゼ C 経路の活性化が生じ、cAMP、イノシトール三リン酸、細胞内のカルシウムなどの蓄積が生じ、プロテインキナーゼ A (PKA) と C (PKC) が活性化される²⁸⁾⁻³⁰⁾。一方、RGS タンパク質は、GTPase を活性化するタンパク質で、 $G\alpha$ による GTP の加水分解を促進することにより G タンパク質のシグナリングを制限している。最近、RGS 遺伝子ファミリーの RGS-2 の発現が、PTH に反応して早期にそして選択的に骨において増加することが明らかとなり、RGS-2 発現の増加が PTH のシグナルに対して最も早期に生じる細胞内変化の一つであることが報告された¹⁴⁾。RGS-2 の発現は、細胞内の cAMP により制御されていると考えられている。Pepperl ら³¹⁾ は、phenochromocytoma 細胞において、RGS-2 の mRNA 発現が cAMP によって強く上昇したことを報告している。また、Tseng ら³²⁾ は、細胞内の cAMP レベルを上昇させる insulinotropic ペプチド (GIP) で PTC3 細胞を処理すると、RGS-2 mRNA の増加が生じることを報告している。これらの結果から、RGS-2 遺伝子の発現は、細胞内の cAMP レベルの変化によって制御されていることが示唆される。そこで著者は、これまでに明らかとなった $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の骨への作用が PTH シグナル伝達系を介するものであるかを明らかにするために、RGS-2 ならびに PTH/PTHrP-R の発現量についての検討を行った。その結果、TPTX ラットへの PTH の持続注入により骨組織における RGS-2 の発現は上昇したが、その発現は $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の投与によって dose-dependently に抑制されることが明らかになった。一方、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の投与によって、PTH/PTHrP-R mRNA の発現に変化が見られなかったことから、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は骨組織において PTH によっ

て媒介される G-タンパク質シグナリングを抑制する作用を有すると考えられた。

Kondo ら³³⁾ は、PTH は、PTH/PTHrP-R を通じて cAMP/PKA を活性化することにより RANKL 遺伝子の発現を増加させ破骨細胞形成を促進していることを報告している。PTH に対する cAMP の反応性は、グルココルチコイドや $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ などによって修飾されることが明らかにされている。Wong ら³⁴⁾ は、骨芽細胞において、細胞内の cAMP は PTH に反応し上昇するが、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ で処理するとこの上昇が抑制されることを報告している。また、Catherwood³⁵⁾ は、ROS 17/2.8 細胞を用いて、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が PTH レセプターと G タンパク質の間のシグナル伝達を抑制することを明らかにしている。さらに、Kubota ら³⁶⁾ は、UMR106-06 細胞を $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ で処理すると、PTH に反応して上昇する細胞内 cAMP の生産が抑制されることを報告している。これらの事実は、骨芽細胞においても、その PTH に対する反応性がビタミン D の代謝産物によって抑制的に制御される可能性を示唆するものである。こうした知見は、本研究での $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の骨への直接作用の分子レベルでの分析結果と一致するものであり、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の投与は、PTH によって誘発される G タンパク質を介したシグナリングを抑制し、その結果として骨吸収を抑制する可能性を支持するものと考えられる。

以上、*in vivo* におけるビタミン D の骨への直接作用について述べたが、このような作用が、近年、骨代謝疾患に汎用されつつあるビスホスフォネート製剤などによってどのように修飾され得るものであるかについて、さらなる検討を行う必要がある。

V. 結 語

TPTX ラットを用いて、PTH ならびに $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の骨作用を *in vivo* で解析し以下の結果を得た。

1. 薬理量の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 投与は、PTH による骨吸収を阻害し、中毒量では RANKL の発現上昇を介して骨吸収を促進した。

2. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の骨吸収抑制作用は、G-タンパク質シグナリングの抑制を介して発現されると

考えられた。

稿を終えるに臨み、終始懇切なるご指導とご校閲を賜りました東京慈恵会医科大学整形外科学講座教授藤井克之先生に深謝いたします。また、本研究を行うにあたり直接ご指導、ご鞭撻いただいた昭和大学歯学部生化学講座新木敏正講師ならびに絶えずご助言をいただきました埼玉医科大学ゲノム医学研究センター副所長須田立雄教授に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000; 21: 115-37.
- 2) McCollum EV, Simmonds N, Becker JE, Shipley PG. Studies on experimental rickets. XXI: an experiment demonstration of existence of a vitamin which promotes calcium deposition. *J Biol Chem* 1922; 53: 293.
- 3) Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, et al. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7260-4.
- 4) Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley JM, et al. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* 1998; 123: 2600-2.
- 5) Lacey DL, Timms E, Tan TL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93: 165-76.
- 6) Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for Osteoprotegerin/Osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3597-602.
- 7) Wong BR, Josien R, Lee SY, Sauter B, Li HL, Steinman RM, et al. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med*

- 1997; 186: 2075-80.
- 8) Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999; 20: 345-57.
 - 9) Kitazawa R, Kitazawa S. Vitamin D₃ augments osteoclastogenesis via vitamin D-responsive element of mouse RANKL gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 650-5.
 - 10) Iida K, Shinki T, Yamaguchi A, DeLuca HF, Kurokawa K, Suda T. A possible role of vitamin D receptors in regulating vitamin D activation in the kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 6112-6.
 - 11) Fujimoto S, Kubo T, Tanaka H, Miura M, Seino Y. Urinary pyridinoline and deoxypyridinoline in healthy children and in children with growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1922-8.
 - 12) Iida K, Taniguchi S, Kurokawa K. Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor and 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase mRNA expression along rat nephron segments. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 194: 659-64.
 - 13) Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. *J Bone Miner Res* 1987; 2: 595-610.
 - 14) Miles RR, Sluka JP, Santerre RF, Hale LV, Bloem L, Boguslawski G, et al. Dynamic regulation of RGS2 in bone: potential new insights into parathyroid hormone signaling mechanisms. *Endocrinology* 2000; 141: 28-36.
 - 15) Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N Engl J Med* 1989; 320: 980-91.
 - 16) Baylink D, Stauffer M, Wergedal J, Rich C. Formation, mineralization and resorption of bone in vitamin D-deficient rats. *J Clin Invest* 1970; 49: 1122-34.
 - 17) Tanaka Y, DeLuca HF. Bone mineral mobilization activity of 1,25-hydroxycholecalciferol, a metabolite of vitamin D. *Arch Biochem Biophys* 1971; 146: 574-8.
 - 18) Weinstein RS, Underwood JL, Huston MS, DeLuca HF. Bone histomorphometry in vitamin D-deficient rats infused with calcium and phosphorus. *Am J Physiol* 1984; 246: E499-505.
 - 19) Brown EM. Mechanisms underlying the regulation of parathyroid hormone secretion *in vivo* and *in vitro*. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1993; 2: 541-51.
 - 20) Reid IR. Vitamin D and its metabolites in the management of osteoporosis. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, editors. *Osteoporosis*. San Diego: Academic Press; 1998. p.1169-90.
 - 21) Easler R, Riggs BL. Vitamin D and osteoporosis. In: Feldman D, Glorieux FH, Pike JW, editors. *Vitamin D*. San Diego: Academic Press; 1998. p.695-711.
 - 22) Endo K, Katsumata K, Hirata M, Masaki T, Kubodera N, Nakamura T, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ as well as its analogue OCT lower blood calcium through inhibition of bone resorption in hypercalcemic rats with continuous parathyroid hormone-related peptide infusion. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 175-81.
 - 23) Shiraishi A, Higashi S, Ohkawa H, Kubodera N, Hirasawa T, Ezawa I, et al. The advantage of Alfacalcidol over vitamin D in the treatment of osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1999; 65: 311-6.
 - 24) Raisz LG, Trummel CL, Holick MF, DeLuca HF. 1,25-Dihydroxycholecalciferol: a potent stimulator of bone resorption in tissue culture. *Science* 1972; 175: 768-9.
 - 25) Ma YL, Cain RL, Halladay DL, Yang X, Zeng Q, Miles RR, et al. Catabolic effects of continuous human PTH (1-38) *in vivo* is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology* 2001; 142: 4047-54.
 - 26) Lee K, Deeds JD, Segre GV. Expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor messenger ribonucleic acids during fetal development of rats. *Endocrinology* 1995; 136: 453-63.
 - 27) Segre GV, Deeds JD, Lee K. Expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor mRNAs during fetal development of

- rats. *Miner Electrolyte Metab* 1995 ; 21 : 129-32.
- 28) Abou-Samra AB, Juppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF, Schipani E, et al. Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 2732-6.
- 29) Civitelli R, Reid IR, Westbrook S, Avioli LV, Hruska KA. PTH elevates inositol polyphosphates and diacylglycerol in a rat osteoblast-like cell line. *Am J Physiol* 1998 ; 255 : E660-7.
- 30) Huang Z, Chen Y, Pratt S, Chen TH, Bambino T, Nissenson RA, et al. The N-terminal region of the third intracellular loop of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor is critical for coupling to cAMP and inositol phosphate/Ca²⁺ signal transduction pathways. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 33382-9.
- 31) Pepperl DJ, Shah-Basu S, VanLeeuwen D, Granneman JG, Mackenzie RG. Regulation of RGS mRNAs by cAMP in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 ; 243 : 52-5.
- 32) Tseng CC, Zhang XY. Role of regulator of G protein signaling in desensitization of the glucose-dependent insulinotropic peptide receptor. *Endocrinology* 1998 ; 139 : 4470-5.
- 33) Kondo H, Guo J, Bringhurst FR. Cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A mediates parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor regulation of osteoclastogenesis and expression of RANKL and osteoprotegerin mRNAs by marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 2002 ; 17 : 1667-79.
- 34) Wong GL, Luben RA, Cohn DV. 1,25-Dihydroxycholecalciferol and parathormone : Effects on isolated osteoclast-like and osteoblast-like cells. *Science* 1977 ; 197 : 663-5.
- 35) Catherwood BD. 1,25-Dihydroxycholecalciferol and glucocorticosteroid regulation of adenylate cyclase in an osteoblast-like cell line. *J Biol Chem* 1985 ; 260 : 736-43.
- 36) Kubota M, Kong NG, Martin TJ. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on cyclic AMP responses to hormones in clonal osteogenic sarcoma cells. *Biochem J* 1985 ; 231 : 11-7.