

解 説

破骨細胞の骨吸収調節機構及び骨粗鬆症治療薬開発

禹 済泰

中部大学応用生物学部応用生物化学科

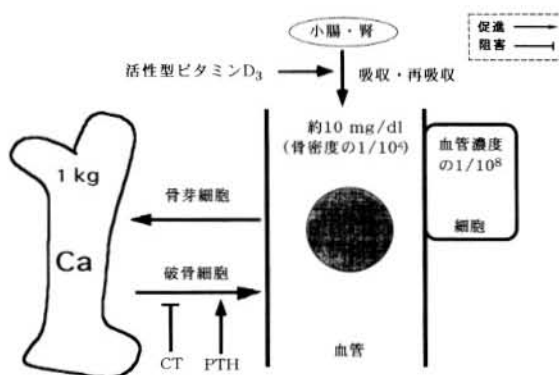
1. はじめに

近年まで、高齢者に多く見られるような、背中が曲がる、骨に痛みを感じる、骨折頻度が高まる等の現象は病的なものではなく、老化現象の一つとして片付けられる場合が多かった。しかし、最近になって、骨が生体を支える支持組織としてだけではなく、体内で最大のカルシウム貯蔵庫としてカルシウム代謝など生命現象の維持に不可欠な組織であることが知られて以来、上記の症状はカルシウムのバランスが崩れ、骨量が減少する病気『骨粗鬆症』であることが明らかになった。骨組織は骨芽細胞による『骨形成』と破骨細胞による『骨吸収』という一連の過程（骨のリモデリングという）が繰り返されることによって維持されているダイナミックな器官である。骨の量や機能は骨形成と骨吸収のバランスによって正常に維持されているが、破骨細胞による骨吸収亢進は骨粗鬆症をはじめとする多くの代謝性骨疾患を引き起こす。

近年、細胞生物学、分子生物学などの新しい手法が骨代謝研究の基礎的な分野に導入され、骨芽細胞だけではなく破骨細胞の分化や機能調節機構に作用するホルモンやサイトカインの役割が次々に明らかにされてきており、それに伴い、その過程を作用する生理活性物質の探索ならびに機能発現機構の解析が可能になってきた。筆者らは破骨細胞の分化と機能を調節する天然化合物は破骨細胞の研究のための有用なツールとしてだけではなく、骨吸収抑制剤として臨床応用も可能であると考え、破骨細胞の分化や機能発現系を確立し、その化合物の探索してきた。本稿では、最近の研究から得られて破骨細胞に関する新知見と筆者らが行ってきた破骨細胞の分化や機能を調節する天然低分子生理活性物質の探索及びその作用機構について述べる。

2. カルシウム代謝と破骨細胞

骨は体内のカルシウムの99%（大人の場合約1 kg）以上を含有し、細胞外液中カルシウム濃度維持に不可欠である。細胞内外の1万倍のカルシウム濃度差で細胞の増殖、分化、機能を果たしているが、そのためには血中カルシウム濃度は一定の範囲に維持される必要がある（図1）。この血中カルシウム濃度の全身的な調節を行っているのは、副甲状腺ホルモン（PTH）、ビタミンD₃、カルシトニン（CT）などのカルシウム調節ホルモンである。血中のカルシウム濃度が低下すると、活性型ビタミンD₃の作用により、腸管からのカルシウムの吸収や腎からのカルシウム再吸収が促進され、血中カルシウム濃度が上昇する。また副甲状腺細胞からPTHが血中に分泌され、骨に作用して破骨細胞による骨吸収を促進し、血液中にカルシウムを動員する。血中カルシウム濃度が高くなると、甲状腺のC細胞からカルシトニンが放出され、破骨細胞の骨吸収作用を抑制することにより血中カルシウム濃度が低下する。これらの組織の中でカルシウム代謝にもっとも重要な働きをする組織は骨と、そのリモデリングである。



CT: calcitonin; PTH: parathyroid hormone

図1 カルシウム調節ホルモンとその作用

3. 破骨細胞の分化調節

骨を分解（吸収）し、カルシウムを溶出する役割を担う破骨細胞は多核の巨大な細胞で、多分化能血液幹細胞に由来する破骨細胞の前駆細胞が単核破骨細胞へと分化し、その単核破骨細胞同士が互いに融合して多核化する（Suda et al. 1992）（図2）。最近の研究成果から、破骨

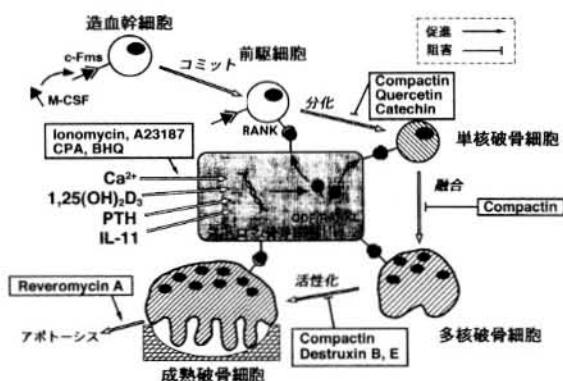


図2 破骨細胞の分化、融合、成熟過程に作用する生理活性物質

細胞分化における骨芽細胞の機能は破骨細胞の分化を誘導する因子（ODF）の発現によることが明らかとなった。骨吸収促進因子による骨芽細胞のODF産生経路は次の3つの異なるシグナル系にわけられる。

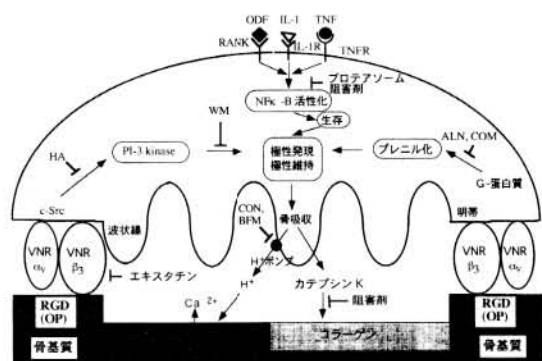
- 1) 活性型ビタミンD₃とそのレセプター系、
- 2) IL-6やIL-11などのgp130系、
- 3) PTHやPGE₂などのプロテインキナーゼA系を介する経路である（Suda et al. 1999, 高橋他1999）。

1)と2)はそれぞれビタミンD₃レセプターノックアウトマウス、IL-6レセプタートランスジェニックマウスを用いた研究で証明されている（吉沢他1997, Udagawa, et al. 1995）。私達は骨髄細胞と骨芽細胞の共存培養系で、細胞内カルシウム上昇剤が破骨細胞の分化を誘導することを見出した（Takami, et al., 1997）。この破骨細胞の分化誘導も骨芽細胞の細胞内カルシウム濃度上昇によるODFの産生を介することが明らかとなり、ODF産生の第4シグナル経路の存在が示された（Takami et al. 2000）。また、compactin (mevastatin), quercetinが破骨細胞の分化を阻害することを見出した（未発表）。抗脂血症の薬として臨床に用いられているcompactinは、コレステロール合成代謝経路

のメバロン酸合成酵素（HMG-CoA reductase）活性を阻害することによって内因性コレステロールの産生を抑制することが知られている。compactinの破骨細胞分化阻害効果は、メバロン酸から合成される誘導体で、低分子G-タンパク質のプレニル化を触媒するタンパク質転移酵素の基質であるファルネシル2リン酸、ゲラニルゲラニル2リン酸の合成が阻害された結果起こる低分子G-タンパク質のプレニル化の抑制に由来した（未発表）。低分子G-タンパク質のプレニル転移酵素の特異的な阻害剤が、破骨細胞の分化を抑制する結果はこの可能性を示唆しているとともに、破骨細胞の分化に低分子G-タンパク質のプレニル化が重要であることを示している。タマネギの成分でMAPキナーゼ（P38）阻害活性を有する物質として知られているquercetinは破骨細胞の分化を阻害した（未発表）。その阻害機構としては、破骨細胞分化過程に必須で、ODFのシグナルによって起こるMAPキナーゼ（p38）のリン酸化を阻害することによることが示唆された（Matsumoto et al. 2000）。quercetinは我々がふだん食品から摂取可能なものなので、骨吸収亢進を予防できる効果が期待される。

4. 破骨細胞の骨への接着及び極性発現

分化過程を終えた成熟破骨細胞が骨吸収を行なうためには、骨組織を認識し、接着する必要がある。破骨細胞の骨基質への接着には、特異的な接着レセプター、主に $\alpha v \beta 3$ インテグリン（ビトロネクチンレセプター）を介して骨基質中にあるオステオポンチンのRGD（Arg-Gly-Asp）配列を認識することが重要であると考えられている（図3）。RGDペプチド、RGD配列を有するエキスタチンおよび抗 $\alpha v \beta 3$ 抗体は、破骨細胞の骨表面への接着を拮抗的に阻害し、骨吸収を抑制する（Nakamura et al. 1996, Crippes et al. 1996）。最近、 $\beta 3$ インテグリンノックアウトマウスが破骨細胞の機能不全により骨硬化症を呈することが示され、インテグリンが破骨細胞の機能発現に重要な役割を果たしていることが明らかとなった（McHugh et al. 2000）。破骨細胞が骨基質と接着した後、破骨細胞の機能発現において注目されてきた細胞内シグナル伝達経路はc-Srcを中心としたチロシ



VNR: vitronectin receptor; HA: harbimycin (c-Src tyrosine kinase inhibitor);
WM: wortmanin (PI-3 kinase inhibitor);
CON: concanamycin (V-A TPase inhibitor);
BFM: bafilomycin (V-A TPase inhibitor);
ALN: alendronate (bisphosphonate 誘導体);
COM: compactin; OP, steopontin

図3 骨吸収調節機構とその抑制薬剤の作用

ンリン酸化系である。c-Srcの局在を免疫染色で調べると、波状縁および細胞内小胞膜上に集中して存在し、明帯や外側基底膜上にはほとんど存在しない (Boyce et al. 1992)。c-Srcのノックアウトマウスは他の組織には影響を及ぼさずに、破骨細胞の骨吸収機能不全による大理石病を引き起こすことが報告されている (Soriano et al. 1991)。

筆者らはV-ATPase阻害活性を持つことが知られているdestruxinが、破骨細胞の分化や接着能は抑制せず、破骨細胞の極性化過程に起こるアクチンリングの形成を可逆的に阻害することを見出した (Muroi et al. 1994, 中川他2000)。さらに、destruxinは破骨細胞の骨吸収機能に必須分子であるc-Srcと、V-ATPaseのサブユニットの一つである $\alpha 3$ サブユニットの膜周辺部への移動過程を阻害し、器官培養レベルで骨吸収を抑制した (未発表)。destruxinは破骨細胞特有の極性発現とその維持を阻害するので、骨吸収抑制剤として臨床応用するために標的分子の同定と動物レベルで骨吸収抑制活性を調べる必要がある。また、compactinは上記の分化阻害機構で極性化されている破骨細胞にも作用し、アクチンリングの破壊を誘導した (Woo et al. 2000)。この結果は低分子G-タンパク質のプレニル化が破骨細胞分化だけではなく極性化機構に関与することを示唆し、今後の解明が期待される。

5. 骨吸収機能に関連する関連酵素

骨組織は主な有機成分であるコラーゲンと、カルシウムとリンを主体とする無機成分からなっている。有機物と無機物の結合形はまだ明らかではないが、コラーゲン繊維と無機カルシウムはリン酸エステル結合を通じてつながっている (Glimcher 1984)。骨吸収は支持組織の主成分を占めている可溶性のコラーゲン繊維の分解と、充填されているヒドロキシアパタイト、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ が可溶性の Ca^{2+} と HPO_4^{2-} に加水分解されることによる。骨吸収の初期段階においては破骨細胞で解糖が促進すると同時に、炭酸脱水素酵素の作用により H^+ の生産が増加する (Vaes 1968)。このプロトンはプロトンポンプ (V-ATPase)により骨吸収空間に分泌されて一方では骨のヒドロキシアパタイトの分解に関与し、他方では破骨細胞と骨吸収空間のpHを低下させてリソソームを活性化し、酵素などの蛋白質分泌を促進するとともに、骨コラーゲンの分解能を有するシステインプロテアーゼを活性化する (Katsunuma et al. 1994)。分泌、活性化された破骨細胞のプロテアーゼはこの酸性条件下で脱ミネラル化された骨コラーゲン繊維を分解する。

上述したように、破骨細胞の波状縁に局在し、プロトンの輸送機能を果たす液胞型V-ATPaseによって、波状縁直下の骨吸収面はpH4.0-5.0程度の酸性条件に保たれている。V-ATPaseが破骨細胞の骨吸収に重要な機能を果たすことは、その特異的な阻害剤であるbafilomycin A1やconcanamycin Bによって骨吸収が抑制されることによって明らかになっている (Visentin et al. 2000, Sundquist and Marks 1994, Gagliardi et al. 1998, Woo et al. 1996)。さらに、最近、破骨細胞にbafilomycin A1を処理するとプロトンの輸送阻害だけではなく、波状縁の構造が破壊されることが報告されている (Palokangas et al. 1997)。これはV-ATPaseが骨吸収面を酸性化する機能以外に、細胞のエンドサイトーシスやエクソサイトーシスに重要な働きを示唆する。筆者らもbafilomycin A1やconcanamycin Bが、破骨細胞の細胞内酸性オルガネラの酸性化阻害を示さない濃度で、破骨細胞の形態変化 (アクチンリング破壊) を可逆的に引き起こすことを見出している (未発表)。

この結果はV-ATPaseが波状縁を含む破骨細胞の構造体維持に重要な機能を果たしていることを示唆する。

このコラーゲン繊維の分解には古くからコラーゲナーゼが関与すると考えられたが、Kirschkeらはコラーゲナーゼとは別に、リソソームにコラーゲンを良く分解するシステインプロテアーゼがあることを見だし、カテプシン群と命名した。コラーゲン分解の主な酵素は、その分解能が最も高いカテプシンLであると考えられていたが、最近、破骨細胞においてカテプシンLに類似したカテプシンKが特異的に大量（破骨細胞での発現量が他の細胞の200倍以上）に産生されることが明らかとなった（Inaoka et al. 1995）。また特異的な阻害剤やアンチセンスオリゴヌクレオチド等を用いてその活性や発現を抑制すると、破骨細胞の骨吸収活性が阻害されることがわかった（Inui et al. 1997）。このことから骨吸収の際の主な骨コラーゲン分解酵素は、カテプシンKであることが示唆された。カテプシンK欠損マウスは大理石病と類似する症状を引き起こすことが報告されている（Gelb et al. 1996）。これらの結果より、カテプシンKが破骨細胞の骨吸収に重要な働きをすることが明らかとなり、カテプシンKの作用は骨吸収の最も下流に位置するステップであるので、骨吸収抑制剤の分子標的としてその選択的な阻害剤の開発が期待される。酸やカテプシン群によって分解・変性された骨基質タンパク質は、エンドサイトーシス波状縁よりによって細胞内に取り込まれ、トランスサイトosisを経て外側基底膜の一部から細胞外へと放出されることが明らかとなった（Salo et al. 1997, Nesbitt and Horton 1997）。この膜輸送過程にも、ある種の酵素の関与が報告され注目されている。さまざまな情報伝達系においてセカンドメッセンジャーとして重要な機能を果たすPI3-キナーゼ（ホスファチジルイノシトールのイノシトール環の第3位をリン酸化する酵素）がその候補である。PI3-キナーゼの特異的な阻害剤であるwortmaninで破骨細胞を処理するとアクチンを含むリング状の形態が破壊され、波状縁の消失や巨大な小胞の蓄積が観察される（Suda et al. 1997）。この小胞上にV-ATPaseの局在が認められ、波状縁由来の小胞であると考えられる。今後詳細な検討が必要で

ある。

6. 破骨細胞の生存の維持

骨吸収機能を終えた破骨細胞はアポトーシスによって排除されると考えられているが、詳細なアポトーシス誘導機構は解明されていない。最終分化を終えた分裂能のない破骨細胞の寿命は生体内で約2週間程度で、*in vitro*で形成された破骨細胞は数日間であると言われている。破骨細胞のアポトーシスはホルモンやサイトカインによって調節されているが、破骨細胞のアポトーシスを促進するものとしてエストロゲンが、抑制するものとしてIL-1, M-CSF, ODF, TNFが知られている（Hughes et al. 1996, Jimi et al. 1999, Kobayashi et al. 2000）。IL-1, ODF, 及びTNFによる破骨細胞の生存促進は核内においてNF κ -Bの活性化を介することが分かっている。筆者らもNF κ -Bの活性化するプロテアソームの阻害剤がIL-1とODFによる単核破骨細胞の生存と融合を阻害することを報告した（Woo et al. 2000）。この結果も破骨細胞の生存にはNF κ -Bの活性化が関わることを支持する。骨吸収停止を誘導する薬剤としてビスホスホネート誘導体が知られている。最近その誘導体アレンドロネートが低分子G-タンパク質のプレニル化を阻害し、破骨細胞のアポトーシスを誘導することが報告されている（Coxon et al. 2000, Reszka et al. 1999）。このことは低分子G-タンパク質のプレニル化が破骨細胞の骨吸収抑制の新たな標的分子として期待できることを示唆している。筆者らは、またリベロマイシンAが破骨細胞に作用しアポトーシスを誘導することを見出した（加藤他 2000）。リベロマイシンAは、上皮細胞成長因子（EGF）で刺激された細胞のチミジン取り込みを抑制するものとして発見されたものであり、その後癌遺伝子srcの発現による癌化を抑制する活性や抗癌活性等を持つことが報告されている（Osada et al. 1991, Takahashi et al. 1992, Takahashi et al. 1997）。リベロマイシンAは破骨細胞においてはミトコンドリアから細胞質へのcytochrome c 放出、カスパーゼ活性化を誘導し、アポトーシスを引き起こした。リベロマイシンのこの活性は骨吸収能を持つ活性化破骨細胞に特異的であり、その特異性は活性化破骨細胞の造る酸性環境に由来するこ

とが示唆された（未発表）。特異性のさらなる解明は、副作用の少ない骨吸収抑制剤の開発に重要なヒントを提供すると思われる。

7. おわりに

破骨細胞の分化や機能調節機構について最近の知見をまとめながら我々の研究成果を紹介した。社会の高齢化に伴う骨吸収亢進による骨粗鬆症患者の急速な増加により、その予防および治療法の確立が急がれている中、これらの破骨細胞に関する新しい知見が骨粗鬆症の予防および治療につながることを期待したい。また、天然物に由来する様々な生理活性物質が破骨細胞の分化や機能発現や生存に多様な作用を有することをが認められた。これらの生理活性物質の作用機構の解明は、遺伝子破壊による特定遺伝子産物の機能解析と同様に、破骨細胞の分化や機能解明のための有効なプローブとしてだけでなく、これらの物質が骨吸収抑制剤として臨床応用のための新しいリード化合物となることを期待したい。

参考文献

- Boyce, B.F., Yoneda, T., Lowe, C., Soriano, P., and Mundy, G.R. 1992 J. Clin. Invest., 90: 1622-1627.
- Coxon, F.P., Helfrich, M.H., Van't Hof, R., Sefti, S., Ralston, S.H., Hamilton, A., and Rogers, M.J. 2000 J. Bone Miner. Res., 15: 1467-1476.
- Crippes, B.A., Engleman, V.W., Settle, S.L., Delarco, J., Ornberg, R.L., Helfrich, M.H., Horton, M.A., and Nickols, G.A. 1996 Endocrinology 137: 918-924.
- Gagliardi, S., Gatti, P.A., Belfiore, P., Zocchetti, A., Clarke, G.D., and Farina, C. 1998 J. Med. Chem., 41: 1883-1893.
- Gelb, B.D., Shi, G.P., Chapman, H.A., and Desnick, R.J. 1996 Science, 273: 1236-1238.
- Glimcher, M.J. 1984 Philos. Trans. R. Soc. Lond. B304: 479.
- Hughes, D.E., Dai, A., Tiffie, J.C., Li, H.H., Mundy, G.R., and Boyce, B.F. 1996 Nat. Med., 2: 1132-1136.
- Inaoka, T., Bilbe, G., Ishibashi, O., Tezuka, K., Kumegawa, M., and Kokubo, T. 1995 Biochem. Biophys. Res. Commun., 206: 89-96.
- Inui, T., Ishibashi, O., Inaoka, T., Origane, Y., Kumegawa, M., Kokubo, T., and Yamamura, T. 1997 J. Biol. Chem., 271: 8109-8112.
- Jimi, E., Akiyama, S., Tsurukai, T., Okahashi, N., Kobayashi, K., Udagawa, N., Nishihara, T., Takahashi, N., and Suda, T. 1999 J. Immunol., 163: 434-442.
- Katsunuma N., Suzuki K., Travis J. and Fritz H. 1994 Biological functions of proteases and inhibitors, p3-21.
- 加藤正徳, 禹濟泰, 長田裕之, 永井和夫 2000 日本農芸化学会2000年度大会講演要旨集, p208.
- Kobayashi, K., Takahashi, N., Jimi, E., Udagawa, N., Takami, M., Kotake, S., Nakagawa, N., Kinoshita, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Morinaga, T., Higashio, K., Martin, T.J., and Suda, T. 2000 J. Exp. Med. 191: 275-286.
- Matsumoto, M., Sudo, T., Saito, T., Osada, H., and Tsujimoto, M. 2000 J. Biol. Chem. 275: 31155-31161.
- McHugh, K.P., Hodivala-Dilke, K., Zheng, M.H., Namba, N., Lam, J., Novack, D., Feng, X., Ross, F.P., Hynes, R.O. and Teitelbaum, S.L. 2000 J. Clin. Invest., 105: 433-440.
- Muroi, M., Shiragami, N., and Takatsuki, A. 1994 Biochem Biophys Res Commun., 205: 1358-1365.
- 中川 大, 高見正道, 禹濟泰, 永井和夫 2000 日本農芸化学会2000年度大会講演要旨集, p208.
- Nakamura, I., Gailit, J., and Sasaki, T. 1996 Cell Tiss. Res. 289: 507-515.
- Nesbitt, S.A. and Horton, M.A. 1997 Science. 276: 266-269.
- Osada, H., Koshino, H., Isono, K., Takahashi, H., and Kawanishi, G. 1991 J. Antibiot. (Tokyo), 44: 259-261.
- Palokangas, H., Mulari, M., and Vaananen, H.K. 1997 J. Cell. Sci. 110: 1767-1780.
- Reszka, A.A., Halasy-Nagy, J.M., Masarachia, P.J., and Rodan, G.A. 1999 J. Biol. Chem., 274: 34967-34973.

- Salo, J., Lehenkari, P., Mulari, M., Metsikko, K., Vaananen, and H.K. 1997 *Science*, 276: 270-273.
- Suda, T., Takahashi, N., and Martin, T.J. 1992 *Endocr. Rev.*, 13:66-80.
- Suda, T., Nakamura, I., Jimi, E., and Takahashi, N. 1997 *J. Bone Miner. Res.* 12: 869-879.
- Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M.T. and Martin, T.J. 1999 *Endocr. Rev.*, 20:345-357
- Soriano, P. Montgomery, C., Geske, R., and Bradley, A. 1991 *Cell*, 64: 693-702.
- Sundquist, K.T. and Marks, S.C. 1994 *J. Bone Miner. Res.*, 9: 1575-1582.
- Takahashi, H., Osada, H., Koshino, H., Sasaki, M., Onose, R., Nakakoshi, M., Yoshihama, M., and Isono, K. 1992 *J. Antibiot. (Tokyo)*, 45: 1414-1419.
- Takahashi, H., Yamashita, Y., Takaoka, H., Nakamura, J., Yoshihama, and M., Osada, H. 1997 *Oncol. Res.*, 9: 7-11.
- 高橋直之, 宇田川信之, 須田立雄 1999 *生化学*, 71: 241-253.
- Takami, M., Woo, J.T., Takahashi, N., Suda, T., and Nagai, K. 1997 *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 237: 111-115.
- Takami, A., Takahashi, N., Udagawa, N., Miyaura, C., Suda, K., Woo, J.T., Martin, T.J., Nagai, K., and Suda, T. 2000 *Endocrinology*, 141: 4711-4719.
- Udagawa, N., Takahashi, N., Katagiri, T., Tamura, T., Wada, S., Findlay, D.M., Martin, T.J., Hirota, H., Taga, T., Kishimoto, T., Suda, T., and Kashiwazaki, S. 1995 *J. Exp. Med.*, 182: 1461-1468.
- Vaes, G. 1968 *J. Cell Biol.*, 39: 676-697 .
- Visentin, L., Dodds, R.A., Valente, M., Misiano, P.J.N., Oneta, S., Liang, X., Gowen, M., and Farina, C. 2000 *J. Clin. Invest.*, 106: 309-318.
- Woo, J.T., Ohba, Y., Tagami, K., Sumitani, K., Yamaguchi, K., and Tsuji, T. 1996 *Biol. Pharm. Bull.*, 19: 297-299.
- Woo, J.-T., Takami, M., and Nagai, K. 2000 *Cytotechnology*, 33: 203-211.
- Woo, J.T., Kasai, S., Stern, P.H., and Nagai, K. 2000 *J. Bone Miner. Res.*, 15: 650-662.
- 吉沢達也, 竹田秀, 加藤茂明 1997 *実験医学 (増刊)*, 15: 472-479.

Title : Natural compounds that regulate osteoclast differentiation and function.

Author : Woo Je-Tea (Department of Biological Chemistry, College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University)

Keywords : Bone resorption, differentiation, function, natural bioactive compound, osteoclast