

氏名	脇能 広
生年月日	
本籍	神奈川県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博乙第198号
学位授与の日付	平成11年9月30日
学位授与の要件	論文博士(学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	Walker256/S担癌ラットの骨粗鬆症病態発症機序の解析と病態モデルとしての評価に関する研究
論文審査委員(主査)	正宗 行人(研究科・教授)
論文審査委員(副査)	宮本 謙一(医病院・教授) 二階堂 修(薬学部・教授) 佐々木琢磨(がん研・教授) 大谷 啓一(東京医科歯科大学・教授)

学位論文要旨

【Abstract】

Estrogen-deficiency causes high turnover of bone remodeling. This paper indicated that Walker256/S carcinosarcoma caused a postmenopause-like osteoporosis in the rat. When subcutaneously inoculated into female Wistar-Imamichi rats (6 weeks old), Walker256/S caused decrease in the bone weight, calcium and inorganic phosphorus contents, and bone mineral density (BMD), accompanied with an enlarged spleen and an ateliotic uterus within 2 weeks after tumor inoculation. In histomorphological study on tibia of the tumor-bearing rats, the secondary trabecular bone mass was significantly decreased without change in the trabecular number and tumor metastasis. Moreover, it was clear that the number of osteoblasts was decreased and the number of osteoclasts was increased in the tumor-bearing rats. In biochemical analyses, hypercalciuria and hypophosphaturia were observed in the tumor-bearing rats, not accompanied with changes in the serum calcium, inorganic phosphorus, and parathyroid hormone-related peptide levels. The serum TNF- α level was increased with the tumor growth. Particularly, it was characteristic that not only serum levels of estradiol and progesterone but serum levels of pituitary hormones such as luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin, but not growth hormone. Moreover, Walker256/S tumor expressed LH-RH mRNA and secreted LH-RH peptide. In the case of Walker256/S-bearing mature female rats, the osteoporosis-like changes were also observed, together with a pause of the estrus cycle upon the metestrus or diestrus stage.

This paper also indicated that selective inhibitors of cyclic AMP-specific phosphodiesterase (PDE 4) stimulated osteoblastogenesis and inhibited osteoclastogenesis in the *in vitro* bone marrow cell culture system. Furthermore, two PDE 4 inhibitors, denbufylline and XT-44 (1-*n*-butyl-3-*n*-propylxanthine) were confirmed to be effective on the bone loss in Walker256/S-bearing rats by oral administration. XT-44 also recovered the lowered femur BMD in other osteoporosis models (ovariectomized rats and sciatic neurectomized rats). On the other hand, the osteoporotic changes in Walker256/S-bearing rats were able to be treated by salmon calcitonin and estradiol.

From these results, Walker256/S ectopically secretes LH-RH and causes postmenopause-like osteoporosis in the rat, and the tumor-bearing rats should be a useful model for osteoporosis. Moreover, the PDE 4 inhibitor is indicated as a candidate of effective therapeutic drug for osteopenia.

近年、高齢化社会の進展に伴い骨粗鬆症に対する関心が高揚してきている。

骨は常に吸収と形成をくり返すことにより、再構築 (remodeling) を営んでいる。健常成人では骨吸収と骨形成との間に平衡状態が保たれ (coupling)、骨塩量は一定に維持される。骨はリン酸カルシウムなどのミネラル (骨塩) とコラーゲンを主成分とする基質から構成され、適度の硬度と弾性が保たれている。ところが、骨吸収と骨形成の動的平衡状態が破綻し (uncoupling)、骨の脆弱性が増し、骨塩量の減少および微細構造の変化をきたした病態では、骨の強度は低下し、骨折を起こしやすくなり骨の粗鬆化がおこる。このような状態がいわゆる骨粗鬆症 (osteoporosis) である。ゆえに、骨粗鬆症とは、骨吸収と骨形成との間の平衡関係が崩れ、骨吸収が優位となり、骨の単位容積あたりの骨塩量が異常に減少し、著しい疼痛や変形を与え、その機械的構造物としての機能が耐えきれない病態をいう。老齢女性に見られる閉経後骨粗鬆症はその典型的な病態である。

現在、骨粗鬆症治療薬として臨床使用されている薬物として活性型ビタミンD₃、カルシトニン、エストロゲン製剤、ビスフォスフォネート剤、カルシウム製剤、イプリフラボン、ビタミンKがある。そして、ビスフォスフォネートとイプリフラボンを除けば全てカルシウム代謝に関連したホルモン、ビタミン等の生体内活性物質であり、あまりにも合成新薬の数が少ないことに気付く。この理由として、硬組織である骨代謝に関する研究が他の組織に比べて著しく立ち後れていたことが挙げられる。骨の評価は主に組織学的解析によるところが大きく、従来は硬組織病理学者の独占的な分野であった。また、臨床的に骨粗鬆症の病理・生理を理解することは難しく、その解明のためのヒトの骨粗鬆症を正確に反映する動物病態モデルの無いことが研究が進まなかった要因といえる。そして、病態モデル動物などの小動物用の骨塩量測定機器を含めた簡便な一次スクリーニング系が不十分であったことに原因していると考えられる。現在、骨粗鬆症病態動物モデルとして卵巣摘除動物、低カルシウム食負荷動物あるいは不動化動物が用いられている。しかしながら、これらのモデルの作製には、術式に熟練を要したり、摂餌量、体重の調節などの飼育管理が難しいなど、技術的に煩雑であり、なおかつ、骨粗鬆症病態の発症には長時間を要するなどの問題点が多い。従って、医薬品開発を目的とする場合、基礎実験に要する労力ばかりかそれに費やす被験物質の総消費量は、他の疾患をターゲットとした場合に比べ遙かに多いことは予想に難くない。以上のような要因が重なり合い骨粗鬆症治療を目的とした合成新薬開発の道を阻んで来たものと推察される。

本研究は、より簡便な動物病態モデルの確立と、新規病態モデルを用いた新しい骨粗鬆症治療薬の開発を目的に企画された。樹立された癌細胞を動物に移植することにより生じる癌性骨粗鬆症は、病態モデルの作成の簡便さという点では優れている。事実、各種の担癌動物で骨低下を認めたとの報告は多い。ラットに自然発症した乳癌由来のWalker256もまた、癌性骨粗鬆症様病態をもたらすことが良く知られているが、本癌腫の中にもPTHrPを異所性に分泌して高カルシウム血症を伴った骨粗鬆症を起こす株と、骨転移性の骨減少症を起こす株のあることが報告されている。本邦においてもWalker256は多くの施設で継代維持され、

様々な研究に繁用されている癌細胞株であるが、高カルシウム血症を起こさないため骨粗鬆症研究に用いられることはなかった。しかし、著者が、本癌腫を金沢大学がん研究所化学療法部より分与していただき、これの担癌ラットの病態を精査したところ、血清中カルシウム、無機リン濃度が変化することなく、また骨転移することなしに2週間で大腿骨や脛骨の骨塩量、骨密度の低下を引き起こすことが明らかとなった。そこで、高カルシウム血症を起こすWalker256と区別するため、Walker256/Sと命名し、その発症機序の解明を試みるとともに、この動物モデルが新しい骨粗鬆症治療薬の開発に有用であるかどうかを評価した。さらに、PTHやカルシトニン、cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) をセカンドメッセンジャーとした細胞内情報伝達機構により骨代謝を調節していることが知られている。そこで、cAMPを含むcyclic nucleotideを分解する酵素であるphosphodiesterase (PDE) の阻害剤が、骨吸収抑制と骨形成促進の両方の作用を有した新規骨粗鬆症治療薬の候補となり得ると考え、各種PDEアイソザイム阻害剤の骨粗鬆症治療薬への応用を検討し、Walker256/S担癌ラットを初めとする骨粗鬆症動物モデルを用いて評価した。

1. 骨塩量測定装置の実験小動物への応用 臨床で使用されている骨塩量測定装置 (DCS-600 アロカ製) のX-線エネルギーを低エネルギーに改造し (DCS-600R アロカ製)、健常動物や骨粗鬆症モデル動物の摘出大腿骨を測定するなどして基礎データを積み重ねることにより、従来正確に測定できなかった実験小動物の骨の微細な変化を精密に捕らえることを可能とした。

2. Walker256/S carcinosarcoma 担癌ラットの骨粗鬆症様病態の解析 若齢 (6週齢) Wistar-Imamichiラットの背部皮下にWalker256/S腫瘍塊を移植すると、2週間で大腿骨の骨塩量・骨密度が腫瘍非移植健常ラットに比べて有意に低下した。米国では、Walker256は副甲状腺ホルモン関連ペプチド(PTHrP)を分泌し、PTHrP依存性の高カルシウム血症を起こす、と報告されているが、Walker256/S担癌ラットでは血清中のカルシウム、無機リン濃度には変動を認めず、血清中のアルカリフォスファターゼの特徴的変動と尿中カルシウム排泄の増加、無機リン排泄の低下が観察された。また、骨病理組織標本から腫瘍の骨転移の無いことも確認した。

3. 発症機序の検討 Walker256/S担癌雌性ラットでは、健常ラットに比べて脾臓重量の有意な増加と子宮重量の有意な低下が観察された。脛骨の病理組織学的形態計測において、腫瘍移植7日目では、破骨細胞が有意に増加し、骨芽細胞が減少していた。脾腫は担癌ラットでの免疫系の亢進を示唆しており、事実、血清中TNF- α が上昇していた。また、子宮重量の低下から女性ホルモン分泌異常が疑われた。そこで、腫瘍移植後の血清中エストラジオール、プロゲステロン、卵胞刺激ホルモン(FSH)、黄体形成ホルモン(LH)推移を調べたところ、いずれも腫瘍の増殖に伴い血清中濃度が低下することが明らかとなった。血清プロラクチン濃度も低下していたが、成長ホルモン濃度には変化は認められなかった。さ

らに、Walker256/Sは、黄体形成ホルモン遊離ホルモン(LH-RH)を産生分泌していることが明らかとなった。すなわち、Walker256/S担癌ラットでは、血清中のLH-RHレベルが増加するため、脳下垂体でのLH-RH受容体の脱感作とフィードバックによる視床下部からのLH-RH分泌の低下により、脳下垂体からのLHやFSH分泌が低下し、結果として女性ホルモン分泌が低下したため子宮萎縮を招いたものと考えられた。なお、Walker256/SからのPTHrPの産生・分泌は確認できなかった。

骨の代謝には女性ホルモンが重要な役割を果たしていることは良く知られた事実である。特に、エストロゲンはTNF- α を初めとする骨吸収性サイトカインの分泌や作用を抑制していると考えられている。Walker256/S担癌ラットでは、PTHrPに依存しないで、TNF- α の上昇とエストロゲンの低下が相まって骨芽細胞形成が抑制され、破骨細胞形成が促進された結果、短期間で骨粗鬆症様病態が惹起されるものと考えられる。そして、Walker256/S担癌ラットの骨粗鬆症様病変はエストラジオールやカルシトニン投与により抑制できることを示した。

4. Walker256/S担癌成熟ラットの病態解析 Walker256/Sが性ホルモン分泌を低下させることが明らかとなったので、成熟雌性ラットに移植した場合の性周期について検討を加えた。健常成熟ラットでは4-5日の周期で血中女性ホルモンの一過性上昇を伴った性周期が観察されるのに対し、Walker256/S担癌成熟ラットでは、血中女性ホルモンは低値で推移し、性周期は発情後期あるいは発情休止期で停止し、閉経状態を引き起こすことが明らかとなった。すなわち、Walker256/S担癌ラットは閉経後骨粗鬆症モデルになり得ることを示した。

5. PDE 4阻害剤の骨粗鬆症治療効果 PDEは現在までに、少なくとも7種類のアイソザイムが知られているが、骨代謝に関与するPDEアイソザイムは知られていない。そこで、*in vitro* 骨髄細胞培養系を用いてPDE阻害剤の効果を検討したところ、非選択的PDE阻害剤であるIBMXと選択的PDE 4阻害剤が、骨芽細胞形成を促進し、また破骨細胞様多核巨細胞の形成を抑制した。しかし、選択的PDE 3およびPDE 5阻害剤にはこのような作用はなかった。そこで、PDE 4阻害剤のdenbufyllineおよびXT-44 (1-*n*-butyl-3-*n*-propylxanthine)の効果をWalker256/S担癌ラットをはじめ卵巢摘除ラット、坐骨神経切除ラットにおいて検討した。その結果、いずれのPDE 4阻害剤も経口投与により、いずれの骨粗鬆症モデルの大腿骨骨密度の低下を有意に抑制、あるいは増加させた。さらに、XT-44は健常ラットには何ら影響を与えないことも確認した。

結 論 本研究で、Walker256/SはLH-RHを過剰発現・分泌することにより宿主における性ホルモン分泌を低下させて性周期を停止させるとともに骨密度を低下させることを明らかにした。一方、選択的PDE 4阻害剤は、骨髄細胞に作用して骨芽細胞形成を促進し、破骨細胞形成を抑制した。さらに、PDE 4阻害剤はWalker256/S担癌ラットを含む発症機序の異なる3種の骨粗鬆症モデルに対して治療効果を示すことを明らかにした。

以上により、Walker256/S担癌ラットを新規な閉経後骨粗鬆症モデルとして提示できた。この動物モデルは簡便かつ短期間で骨粗鬆症を惹起するため、今後の骨粗鬆症治療薬の探索・開発に大きく寄与するのみならず、ホルモン分泌異常に起因した骨代謝異常に関する研究の展開に重要な示唆を与えるものとする。さらに、PDE 4阻害剤は、従来の薬剤とは全く作用機序の異なる骨粗鬆症治療薬候補物質であることを示した。

学位論文審査結果の要旨

骨は硬組織であるがゆえに骨代謝研究が他組織に比べて著しく立ち遅れている。また、適切な骨粗鬆症動物実験モデルのないことが骨粗鬆症治療薬の開発研究の妨げとなっている。

申請者は、上記の問題点を解決することを目的に、まず、ヒト用骨塩量測定装置を小動物用に改良した。そして、この骨塩量測定装置を用いてラット乳癌Walker256/S担癌動物が閉経後骨粗鬆症病態モデルとなり得ることを示し、この病態モデルを用いることで新規な骨粗鬆症治療薬候補物質を簡便、かつ短期間で評価できることを示した。

特に、Walker256/S株は黄体形成ホルモン遊離ホルモン(LH-RH)を産生・分泌するため、担癌ラットでは脳下垂体からの卵胞刺激ホルモン、LH分泌が低下し、血中エストロゲンやプロゲステロン濃度の低下を来し、性周期が停止し、閉経状態となる。また、プロラクチン分泌も低下することから、Walker256/Sはプロラクチン抑制因子を含むプロLH-RH蛋白を分泌していることも分かった。また、本腫瘍移植にตอบสนองして宿主動物の免疫能が上昇した結果、TNF- α のような骨吸収性サイトカイン産生が亢進することなどを明らかにした。このようなことによりWalker256/S担癌ラットではヒトの閉経後骨粗鬆症と類似した高代謝回転型の骨粗鬆症病態を2週間という短期間で惹起することを明快に証明した事は高く評価される。

次いで、申請者は、骨代謝関連ホルモンである副甲状腺ホルモンやカルシトニンの細胞内セカンドメッセンジャーがcyclic AMPであることに着目してcyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE)の各種阻害剤の骨芽細胞、破骨細胞形成に及ぼす影響を検討した結果、選択的PDE4阻害剤が骨芽細胞形成を促進し、破骨細胞形成を抑制することを見出し、さらに、Walker256/S担癌ラットを初めとする骨粗鬆症病態モデルに対しても有効であったことから、PDE4阻害剤が骨粗鬆症治療薬候補物質として有望であることを示した。そして、Walker256/S担癌ラットは既存の骨粗鬆症治療薬のみならず、PDE4阻害剤のような新規な作用機序の物質の効果も十分に評価できる病態モデルであることを示した。

以上の研究は、今後の骨粗鬆症治療薬の探索・開発研究のみならず、ホルモン分泌異常に起因した骨代謝異常に関する研究の発展にも大きく寄与するものと認められる。よって、本論文は博士(薬学)論文に値するものと判定された。