

グルコルチコイドの骨作用に関する研究

国立長寿医療研究センター 運動器疾患研究部

池田 恭治

1. 背景と目的

ステロイド骨粗鬆症は、骨密度の低下が顕著になる前から骨質の劣化が顕著になり、投与早期から骨折が起こる重大な合併症である。我が国でもガイドラインが作成され、ステロイドの使用が予定されている場合には、骨折防止のために予防的な薬物投与が勧告されているほどである。ステロイド骨粗鬆症の病理基盤はまだ解明されておらず、治療法も確立していない。

骨の代謝は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスの上に成り立っており、骨粗鬆症の病態は原因の如何を問わず、これら細胞活性のアンバランスに起因する代謝異常と理解される。ステロイド骨粗鬆症では、骨吸収はそれほど亢進しておらず、骨形成の抑制が顕著な低回転型の代謝異常を示し、骨吸収が亢進する閉経後骨粗鬆症などに見られるいわゆる高回転型の骨粗鬆症と対極の病態にある。グルコルチコイドを投与した患者の骨組織解析では、骨芽細胞や骨細胞のアポトーシスが見られることが報告されている。

我々は、骨代謝の実行細胞である破骨細胞と骨芽細胞とは別に、骨の内部に埋もれて存在する骨細胞 (osteocyte) に注目してきた。骨細胞は、骨小腔と呼ばれる洞穴のなかに1個ずつ孤立して存在するが、無数の長い細胞突起を伸ばして骨細胞同士あるいは骨表面の骨芽細胞とギャップジャンクションを介してネットワークを形成している。骨細胞は、骨芽細胞から派生するが分裂機能をは失い *in vitro* で増幅させることは不可能で細胞株も存在しない。我々は、骨細胞の生理機能を生体内にある状態で明らかにする目的で、骨細胞特異的にジフテリア毒素受容体を発現するトランスジェニックマウスを作製し、ジフテリア毒素の単回皮下投与によって骨細胞の70%程度をablationできる実験系を開発した(参考文献1)。

このマウスを用いて、骨細胞をなくすと皮質骨に破骨細胞の浸潤と、弱齢にもかかわらず微小骨折が発生し骨の強度が低下した。さらに時間経過とともに、海綿骨の減少と骨髄の脂肪化が起こり、骨および骨髄の老化が促進することが観察された。以上の結果から、骨細胞は骨表面の破骨細胞や骨芽細胞に司令を送り、骨代謝を骨の内部から制御するという重要な生理機能を担っていると結論づけた。

骨細胞が骨質の維持と深く関わっているとの実験結果、グルコルチコイドを投与した患者では骨細胞のアポトーシスが見られるとの臨床成績、さらに骨細胞にグルコルチコイド受容体 (GR) が高発現しているとの予備の実験結果から、我々はステロイド骨粗鬆症の中核が骨細胞にあるとの仮説を立て、これを検証する目的で骨細胞特異的にGRを欠損するマウスを樹立し、これに対してグルコルチコイドの影響を解析することを試みた。

2. 方法

C57BL/6マウス(6ヶ月齢)の背部皮下にプレドニゾロン徐放性ペレットを植え込み、2ヶ月間慢性的にプレドニゾロンの過剰状態を作製した。骨細胞特異的にCre recominbaseを発現させるために

DMP1-Creマウスを作製して、reporterマウスと交配させることにより骨細胞での発現を確認した。GR floxマウスを導入し(参考文献2)、DMP1-Creマウスと交配させることにより骨細胞特異的なGRノックアウトマウスを作製した。骨の解析は、マイクロCTスキャン(長崎大学附属病院・伊東昌子准教授による)と組織形態計測法により行った。

3. 結果

徐放ペレットからのプレドニゾロンの慢性投与によって、腰椎海綿骨の減少と、大腿骨の皮質骨の菲薄化が起ることを確認した。組織形態計測の結果、破骨細胞の数や骨吸収には変化が見られなかったが、骨形成が著明に抑制されることが判明した。以上は、ヒトのステロイド骨粗鬆症に類似した病態と考えられた。

DMP1-Creマウスが骨細胞にターゲットされることが確認され、またGRの免疫染色によって骨細胞での発現が認められた。そこで、GR floxマウスとDMP1-Creマウスを交配することにより、骨細胞特異的にGRをノックアウトしたマウスを樹立した。このマウスにプレドニゾロンを慢性投与すると、皮質骨への作用がブロックされた。正常マウスにプレドニゾロンを投与するとアポトーシス関連の遺伝子群の発現が増加したのに対して、骨細胞でのGRノックアウトではこれらの発現が抑制されていたことから、骨細胞への影響は少なくとも一部はアポトーシスを介したものであることが推察された。

4. 考察

遺伝子の改変が可能なC57BL/6において、徐放ペレットによる慢性的なグルコルチコイド過剰状態の再現によりヒトのステロイド骨粗鬆症の病態に類似したモデルを作製した。すなわち、エストロゲン欠乏での病態とは対照的に、破骨細胞や骨吸収の亢進は見られず、骨芽細胞による骨形成の明らかな低下が認められた。その結果、骨強度の維持に重要な皮質骨の菲薄化が特徴的に認められた。

一方、DMP1-Creによって骨細胞特異的にGRをノックアウトしたマウスにグルコルチコイドを慢性投与した場合には、皮質骨への影響が回避されることから、ステロイド骨粗鬆症の病態形成に骨細胞のGRが大きく寄与することが示唆された。骨細胞でGRのないマウスは、通常状態では若干骨量が低下傾向であり、生理状態下ではGRは骨量維持にpermissiveな役割を、一方、慢性のグルコルチコイド過剰状態では骨質の悪化と骨強度の低下をもたらすことから、2面的な作用を及ぼすことが示唆される。

転写制御因子であるGRの下流で骨細胞のアポトーシスや代謝調節機能に関わる遺伝子群のさらなる解析により、骨細胞のGRをターゲットして、ステロイド骨粗鬆症の発症を防止するような治療法開発への応用が期待できる。

5. 参考文献

- 1) Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, Ito M, Takeshita S, and Ikeda K: Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. **Cell Metab** 5: 464-475, 2007
- 2) Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P.C., Bock, R., Klein, R., and Schutz, G. (1999). Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. **Nature genetics** 23, 99-103.