

骨粗鬆化ラットの骨組織およびラット骨肉腫由来細胞株 (ROS17/2.8) における活性型 vitamin D₃ による osteocalcin mRNA の発現

西村 藤夫

愛媛大学医学部整形外科

The expression of osteocalcin mRNA in bones of osteopenic rats and rat osteosarcoma cells(ROS17/2.8) by treatment with active vitamin D₃

Fujio Nishimura

Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Ehime University

Summary

It has been reported that a new synthetic vitamin D₃ analogue, 2-(3-hydroxypropoxy)-1,25-dihydroxyvitamin D₃ [ED-71], has a stimulative effect on bone formation in vivo, and it is expected to be a therapeutic drug for osteoporosis. It has also been reported that active vitamin D₃ prevents bone loss by reducing bone turnover in osteoporotic animals. To clarify the functional differences between active vitamin D₃ and ED-71, levels of osteocalcin mRNA which mean osteoblastic function were examined by northern blot hybridization in vitro and in vivo.

In the first experiment, rat osteosarcoma cells (ROS 17/2.8) were exposed to vehicle or to various concentrations of 1,25(OH)₂D₃ and ED-71 (10⁻¹¹M-10⁻⁸M) for 24 hours. Osteocalcin mRNA levels increased in a dose-dependent manner when either 1,25(OH)₂D₃ or ED-71 was added to the medium.

In the second experiment, the effects of 1,25(OH)₂D₃ and ED-71 on experimental osteoporosis in rats induced by a combination of ovariectomy and immobilization were evaluated. Rats were given orally 1,25(OH)₂D₃ or ED-71 using medium chain triglyceride as a vehicle twice a week and sacrificed at 1, 2, 4 and 8 weeks after the operations. Bone mineral content was preserved in the ED-71 0.2 μg/kg treated group. Serum osteocalcin levels increased in the 1,25(OH)₂D₃ 0.2 μg/kg and ED-71 0.2 μg/kg treated groups at 4 and 8 weeks. Osteocalcin mRNA levels in the bones of rat hind limbs increased consistently in the ED-71 0.2 μg/kg treated group.

These findings suggest that ED-71 may prevent the osteoporotic decrease of bone mass not only by normalizing bone resorption but also by stimulating osteoblasts.

Key Words

osteocalcin, mRNA, vitamin D₃, osteoporosis

1994年12月14日受理

愛媛大学医学部整形外科

【緒 言】

骨組織は絶えず代謝回転を続けており、既存骨の一部は破骨細胞により吸収され、それに続いて、骨芽細胞による骨形成が行われている。骨の形態と骨量は、この骨代謝回転（骨リモデリング）により維持されている。骨粗鬆症は、破骨細胞による骨吸収量が骨芽細胞による骨形成量より慢性的に過大となり、結果として全体の骨量が減少した状態と考えられ、骨脆弱性が増加して骨折をきたす全身的骨疾患である。それ故に骨粗鬆症は、社会の高齢化に伴い重要な疾患であり、その治療法の開発が望まれている。しかしながら、治療薬の一つである活性型 vitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃ あるいは 1 α (OH)₂D₃) の骨粗鬆症に対する効果は、亢進した骨吸収の抑制による骨代謝回転の抑制の結果であることが動物実験により報告されており^{4),5),14),20)}、一旦減少した骨量を増加させることは困難である。活性型 vitamin D₃ の新規誘導体の一つである 2 β -(3-hydroxypropoxy)-1,25(OH)₂D₃(ED-71) は、動物実験において骨形成を増加させて骨量を増加させることが報告されており^{9),22),31)}、骨粗鬆症に対する治療薬として期待されている。しかし、ED-71 の遺伝子レベルでの作用メカニズムはまだ不明である。一方、硬組織である骨組織においては軟部組織に比べて核酸の抽出が困難であったために、実際の骨組織内における遺伝子発現に関する研究は最近になってようやく可能となってきた。

本研究では、まず培養細胞を用いた *in vitro* における各種骨関連蛋白質の mRNA の発現を測定して、1,25(OH)₂D₃ と ED-71 の遺伝子レベルでの作用を明らかにした。続いて、卵巣摘除および坐骨神経切除を併用した骨粗鬆症モデルラットにおいて 1,25(OH)₂D₃ と ED-71 が骨塩量に及ぼす効果を検索した。さらにその骨粗鬆症モデルラットの後肢骨より total mRNA を抽出して骨組織内での osteocalcin mRNA の変動を測定し、*in vivo* における活性型 vitamin D₃ の遺伝子レベルでの作用を検討した。

【対象および方法】

1) ラット骨肉腫由来細胞株 (ROS17/2.8) における各種骨関連蛋白質の mRNA の発現

骨芽細胞の特性を有するラット骨肉腫由来細胞株 ROS17/2.8 (理化学研究所) を骨芽細胞様細胞として用いた。まず ROS17/2.8 細胞を 100mm culture dish (Corning) 上に 1.6×10^6 / dish の濃度で播種し、charcoal 処理を施した 5% fetal calf serum (FCS) (Filton) 添加 Ham's F-12 培養液 (Sigma) を用いて培養した。

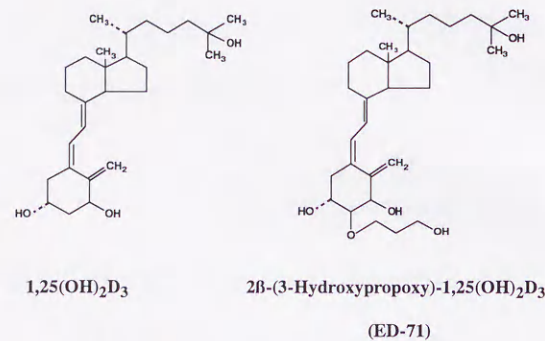


Fig. 1 Chemical structures of 1,25(OH)₂D₃ and ED-71.

次に、細胞が semi-confluent になるまで CO₂ 5%, 37°C の条件下で培養した後、0.1% エタノールで溶解した 10^{-11} M ~ 10^{-8} M の濃度の 1,25(OH)₂D₃ (中外製薬) あるいは 2 β -(3-hydroxypropoxy)-1 α ,25-dihydroxy vitamin D₃ (ED-71) (中外製薬) (Fig. 1) を添加した 1% FCS 添加 Ham's F-12 培養液に交換した。また、コントロールの dish は、溶解液の 0.1% エタノールのみを添加した培養液に交換した。24 時間後に acid guanidinium phenol-chloroform 法²⁾ (AGPC 法) に準じて total RNA を抽出した。20 μ g の RNA を 1% agarose gel にて電気泳動し、nylon membrane (Hybond N⁺, Amersham) に blotting した。続いて osteocalcin に対する oligonucleotide probe (42-mer corresponding to the Cys²³-Ile³⁶ region of rat osteocalcin cDNA), alkaline phosphatase に対する oligonucleotide probe (50-mer corresponding to the Ile¹⁴⁶-Ala¹⁶² region of rat alkaline phosphatase cDNA) および osteopontin に対する oligonucleotide probe (45-mer corresponding to the Ser¹¹²-Thr¹²⁶ region of rat osteopontin cDNA)¹⁸⁾ を用いて hybridization および autoradiography を行なった。実験を triplicate で行い、NIH-image (for Macintosh) 画像解析プログラムによってそれぞれの mRNA 発現量を internal control である β -actin mRNA 発現量で補正した。そして、コントロールの発現量を 1 とした比率にて比較検討した。

2) 骨粗鬆症モデルラットの作製

実験動物として数回の出産歴のある体重 230-250 g の成熟雌の Wistar 系ラット (7-8 ヶ月齢) 78 匹を用いた。60 匹に対して pentobarbital 40 mg/kg の腹腔内注射による麻酔下に、両側卵巣を摘出する卵巣摘出術 (OVX) と両側の坐骨神経を約 1 cm にわたって切除する坐骨神経切除術 (NX) の併用手術を施し、骨粗鬆症モデルラッ

トを作成した²¹⁾。12 匹に対して皮切および筋膜切離のみを施し sham 群とした。手術後、ラットは自由に行動させて標準の食餌と飲水を自由に摂取させた。実験開始時に base-line control 群として 6 匹のラットを、pentobarbital 麻酔下に心臓採血にて屠殺した。なお、この実験は愛媛大学医学部動物実験指針に従い、愛媛大学医学部附属動物実験施設を利用して行った。

3) 薬剤の投与および実験群

以下の様に 6 群の実験群を作製した。1,25(OH)₂D₃ および ED-71 投与群には、それぞれの薬剤を vehicle (medium chain triglyceride) に溶解し、それぞれを 0.1 μ g/kg, 0.2 μ g/kg の投与量で週 2 回経口ゾンデにて確実に腹腔内に投与した。コントロールの vehicle 群と sham 群には vehicle を週 2 回同様に投与した。また、すべてのラットについて一週ごとに体重測定を行った。

4) 血清中 Ca, P, ALP, TRAP 値の測定

手術後 1, 2, 4, 8 週目の午前 10 時に薬剤の最終投与を行い、6 時間後の午後 4 時に各群 3 匹ずつ体重測定を行った後、pentobarbital 麻酔下に心臓採血にて屠殺し、血清は分離採取して -80°C で保存した。Ca 値はカルシウム-HR キット (和光純薬) で、P 値は無機リン-HR II キット (和光純薬) で測定した。Alkaline phosphatase (ALP) 活性は P-ニトロフェノール法にて、tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) 活性は Bessay-Lowry 法に準じてそれぞれ測定した。

5) Radio-immunoassay 法による血清中 osteocalcin 値の測定

Osteocalcin 値は radio-immunoassay (RIA) 法²⁴⁾ により osteocalcin diagnostic kit (Biomedical Technologies) を使用して測定した。まず、予備の実験として無処置のラットより採取した血清を 1/50, 1/20, 1/10, 1/5 に希釈し RIA により標準曲線を作製し 1/20 希釈血清が最適であることを確認した後、実験群の血清を triplicate で測定した。

6) 骨塩量および骨体積の測定

左大腿骨を筋組織をつけて摘出し 70% エタノールにて固定した後、軟部組織を丁寧に剥離し、骨塩量 (Bone Mineral Content: BMC) を dual energy x-ray absorptiometry (DXA) (DCS-600, アロカ株) にて測定した。測定に際し大腿骨を長軸方向に 10 等分間隔で前後方向にスキャンし、遠位の 1-3 スキャン部位の骨塩量を遠位 BMC, 4-7 スキャン部位を中位 BMC, 近位の 8-10 スキャン部位を近位 BMC として算出した²⁶⁾。また、1-10 スキャン部位の骨塩量を総 BMC とした。骨塩量の測定の後に、微量秤量器 (AE200, Mettler) を用いて左大腿骨の骨体積 (bone volume) を測定し、大腿骨

の総 BMC を骨体積で除した値を骨塩量/骨体積 (BMC / volume) として算出した。

7) 骨粗鬆化ラットの骨組織における osteocalcin mRNA の発現

Vehicle 群, 1,25(OH)₂D₃ 0.2 μ g/kg 群および ED-71 0.2 μ g/kg 群に対して、前述の心臓採血による屠殺後、直ちに両下腿骨および右大腿骨を摘出した。骨周囲の軟部組織を骨膜を含めて除去し、軟部組織の附着する骨端関節部を切除した。下腿骨と大腿骨の膝側より骨髓組織を注射針を用いて機械的に除去し、30ml の生食で髓腔内を洗浄後、骨組織を直ちに液体窒素にて凍結保存した。粉碎した両下腿骨と右大腿骨を氷冷した solution D 溶液 (4M GTC / 25mM sodium citrate (pH 7) / 0.5% sarcosyl / 0.1M 2-mercaptoethanol) 6 ml 中で、ポリトロン (Kinematica) を用いて 30 秒間、2 回ホモジナイズした。次に、solution D 溶液を 4 ml 加えて軽く振盪攪拌した後、12000 cpm, 2 min 遠沈にて硬組織を除去し、上清を採取した⁹⁾。その後は、AGPC 法²⁾ に準じて total RNA を抽出し、*in vitro* の実験と同様に 20 μ g の RNA を用いて osteocalcin mRNA の発現量を比較した。

8) 統計処理

In vitro の実験ではコントロールとの比較を unpaired-T test にて検定した。

In vivo の実験では Fischer's protected LSD test を用いて多重比較検定を行った。

【結 果】

1) ラット骨肉腫由来細胞株 (ROS17/2.8) における各種骨関連蛋白質の mRNA の発現

Osteocalcin mRNA の発現は 0.6 kb の band として、ALP mRNA は 2.6 kb の band として、osteopontin mRNA は 1.6 kb の band として検出された (Fig. 2)。1,25(OH)₂D₃ 添加により osteocalcin mRNA の発現は、 10^{-11} M の添加でコントロールに比べて有意に増加しはじめ、 10^{-10} M ~ 10^{-8} M の添加でコントロールに比べて 6-7 倍に有意に増加した (Fig. 3)。これに比し、ED-71 添加により osteocalcin mRNA の発現は、 10^{-11} M の添加ではコントロールに比べて有意な上昇は認められず、 10^{-10} M ~ 10^{-8} M の添加でコントロールに比べて濃度依存性に増加し、 10^{-8} M の添加では 9 倍の有意の増加を示した。ALP mRNA 量は、1,25(OH)₂D₃ 添加により 10^{-10} M から濃度依存性に増加したが、ED-71 添加では、 10^{-8} M において有意の増加が認められた。Osteopontin mRNA 量は、1,25(OH)₂D₃ 添加により 10^{-11} M から濃度依存性に有意に増加したが、ED-71 添加では、 10^{-9} M から濃度依存性に有意に増加し、 10^{-8} M では 4 倍の増

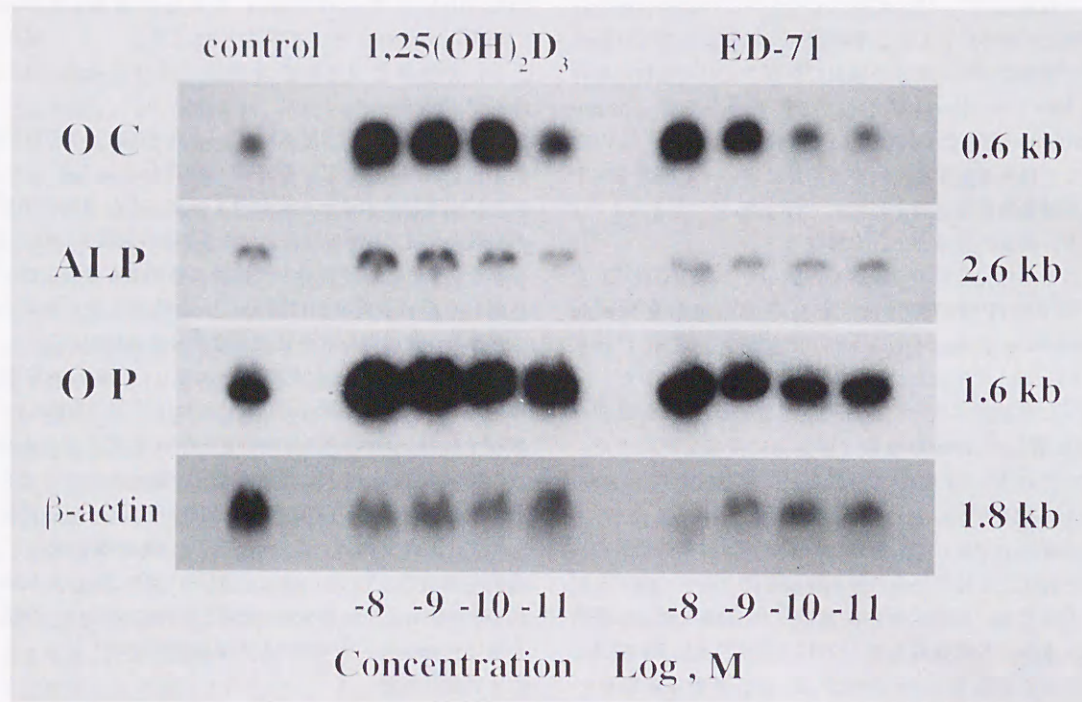


Fig. 2 Northern-blot analysis of osteocalcin, alkaline phosphatase and osteopontin mRNA in ROS 17/2.8 cells treated with 1,25(OH)₂D₃ and ED-71.

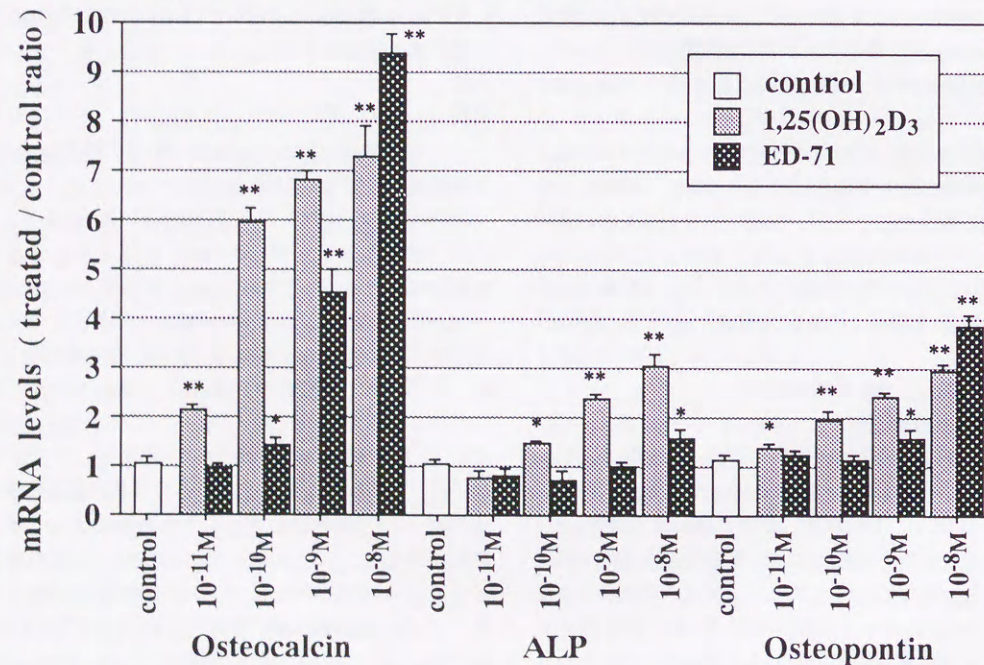


Fig. 3 Effects of 1,25(OH)₂D₃ and ED-71 on osteocalcin, alkaline phosphatase and osteopontin mRNA levels in ROS 17/2.8 cells. Vertical bars mean standard deviation. * p < 0.05, ** p < 0.01, significantly different from control level.

加が認められた。

2) 体重の変動

骨粗鬆症モデルラットにおいて、実験開始時の体重を100としその後の体重の変動を%で示した (Fig. 4)。Sham 群は実験期間を通じて体重に大きな変動を認めなかった。Vehicle 群は他の薬剤投与群と共に手術直後に約7%の体重減少を来したが3週目に手術時の体重に回復し、その後徐々に増加し8週目には約10%の体重増加を認めた。これに比し、ED-71 0.2 μg 投与群では、体重の回復に遅延を認め4週、8週の時点で vehicle 群と比べて有意な低下を認めた。

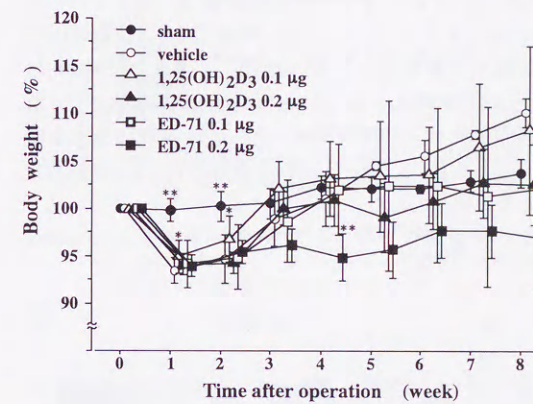


Fig. 4 Percent change of body weight. Vertical bars mean standard deviation. (N = 12 at 1, 9 at 2, 6 at 3, 4 and 3 at 5, 6, 7, 8 week.) * p < 0.05, ** p < 0.01, significantly different from vehicle group.

3) 血清中 Ca, P, ALP, TRAP 値の変動

血清 Ca 値は、1,25(OH)₂D₃投与群においては有意な変動は認めなかったが、ED-71 投与群では vehicle 群に対して有意な上昇を認めた (Table. 1) (4, 8週目の data を示す)。血清 P 値は、1,25(OH)₂D₃投与群および ED-71 投与群において vehicle 群に対して有意な上昇を認めた。血清 ALP 値は、各群ともに有意な変動は認めなかったが、しだいに上昇する傾向を認めた。血清

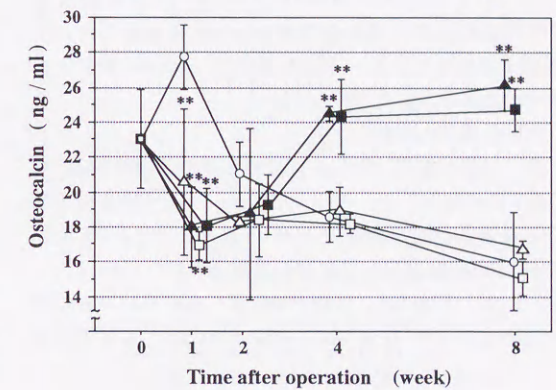


Fig. 5 Serum osteocalcin level at 0, 1, 2, 4 and 8 weeks. (□) represent base-line control (0 w) group, (○) vehicle, (△) 1,25(OH)₂D₃ 0.1 μg, (▲) 1,25(OH)₂D₃ 0.2 μg, (□) ED-71 0.1 μg and (■) ED-71 0.2 μg respectively. Vertical bars mean standard deviation. ** p < 0.01, significantly different from vehicle group.

Table 1. Results of serum analysis.

period	treatment	Ca(mg/dl)	P(mg/dl)	Al-p(IU/l)	TRAP(IU/l)
4 w.	sham	10.2(0.6)	5.0(1.0)*	250(43)	17.9(3.6)
	vehicle	10.0(0.1)	6.3(0.2)	297(2)	16.7(3.3)
	1,25(OH) ₂ D ₃ 0.1 μg	10.2(0.2)	6.8(0.4)	291(31)	18.3(1.7)
	1,25(OH) ₂ D ₃ 0.2 μg	10.5(0.3)	7.8(0.6)**	394(75)	19.0(4.2)
	ED-71 0.1 μg	10.6(0.2)*	7.4(0.3)*	250(14)	15.4(1.8)
	ED-71 0.2 μg	11.4(0.2)**	7.3(0.5)*	261(97)	14.6(2.2)
8 w.	sham	10.4(0.1)	5.8(0.8)	260(53)	18.2(2.0)*
	vehicle	10.2(0.3)	6.2(0.3)	315(45)	13.8(1.0)
	1,25(OH) ₂ D ₃ 0.1 μg	10.3(0.1)	7.5(0.9)**	335(104)	16.0(1.7)
	1,25(OH) ₂ D ₃ 0.2 μg	10.2(0.1)	6.4(0.1)	350(5)	13.8(1.6)
	ED-71 0.1 μg	10.6(0.2)	7.7(0.4)**	322(95)	12.5(2.9)
	ED-71 0.2 μg	11.4(0.7)**	7.7(0.2)**	278(119)	12.0(1.5)

Values are means ± SD (n = 3).

* p < 0.05, ** p < 0.01, significantly different from vehicle group.

TRAP 値はしだいに下降する傾向を認め、8週にて sham 群は vehicle 群に対して有意の差を認めた。

4) 血清中 osteocalcin 値の変動

骨代謝活性の指標となる血清中 osteocalcin 値は、1週の vehicle 群が薬剤投与群よりも有意の高値を示した ($p < 0.01$) (Fig. 5)。その後、vehicle 群、1,25(OH)₂D₃ 0.1 μg 投与群および ED-71 0.1 μg 投与群の血清中 osteocalcin 値はしだいに減少する傾向を示した。これに比し、1,25(OH)₂D₃ 0.2 μg 投与群および ED-71 0.2 μg 投与群の血清中 osteocalcin 値はしだいに増加する傾向を示し、4週と8週で、vehicle 群よりも有意の高値を示した ($p < 0.01$)。

5) 骨塩量の変動

左大腿骨の遠位、中位、近位の3つの部位の BMC を DXA にて測定した。遠位 BMC は、4週で有意の差を認めなかったが、8週では sham 群および ED-71 投与群が vehicle 群に比して有意の高値を示した ($p < 0.05$, $p < 0.01$) (Fig. 6a)。中位 BMC は、各群間に有意の差を認めなかった (Fig. 6b)。近位 BMC は、4週では各

群間に遠位 BMC と同様の傾向を認め、ED-71 0.1 μg 投与群は vehicle 群に比し有意の高値を示した ($p < 0.05$) (Fig. 6c)。大腿骨の総 BMC は各群間に遠位骨塩量と同様の変化を認め、8週で ED-71 0.2 μg 投与群が vehicle 群に比し有意の高値を示した (Fig. 6d)。

ラットの体重差による個体差を排除するために大腿骨の総 BMC を骨体積で除した値を骨塩量/骨体積 (BMC / volume) として示すと、この傾向はより顕著となり、4週で ED-71 0.2 μg 投与群が vehicle 群に比べて有意の高値を示し ($p < 0.05$)、8週で sham 群と ED-71 投与群が vehicle 群に比し有意の高値を示した ($p < 0.05$, $p < 0.01$) (Fig. 7)。また、vehicle 群は1週ですでに急激な減少をきたし、その後、漸減した。1,25(OH)₂D₃ 0.2 μg 投与群と ED-71 投与群は、2週までは sham 群のレベルを維持していたが、その後、両薬剤間に大きな違いがみられ、1,25(OH)₂D₃ 0.2 μg 投与群は急激な減少をきたしたが、ED-71 0.2 μg 投与群は、sham 群のレベルを維持していた。

6) 骨粗鬆化ラットの骨組織における osteocalcin

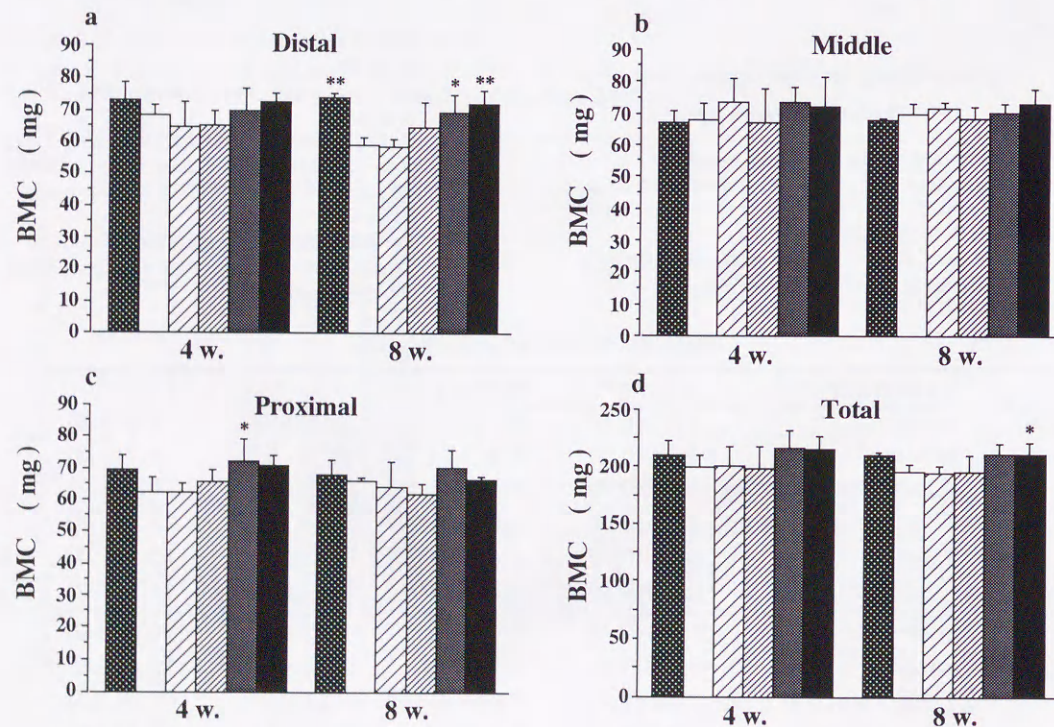


Fig. 6 BMC of distal, middle, proximal and total femur measured by DXA at 4 and 8 weeks. (stippled) represent sham operation group, (white) vehicle, (diagonal lines) 1,25(OH)₂D₃ 0.1 μg, (cross-hatched) 1,25(OH)₂D₃ 0.2 μg, (solid black) ED-71 0.1 μg and (solid grey) ED-71 0.2 μg respectively. Vertical bars mean standard deviation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different from vehicle group.

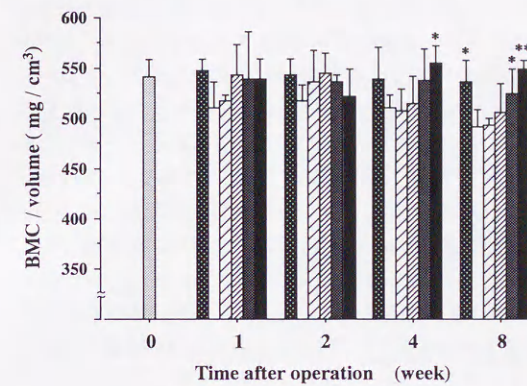


Fig. 7 BMC / volume of whole femur at 0, 1, 2, 4 and 8 weeks. (stippled) represent base-line control (0 w) group, (stippled) sham operation, (white) vehicle, (diagonal lines) 1,25(OH)₂D₃ 0.1 μg, (cross-hatched) 1,25(OH)₂D₃ 0.2 μg, (solid black) ED-71 0.1 μg and (solid grey) ED-71 0.2 μg respectively. Vertical bars mean standard deviation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different from vehicle group.

mRNA の発現

骨粗鬆化ラットの骨組織内の細胞レベルでの osteocalcin mRNA の発現を調べた (Fig. 8)。β-actin 量で補正した osteocalcin mRNA のレベルは、vehicle 群において2週、4週と増加し、8週で plateau となっ

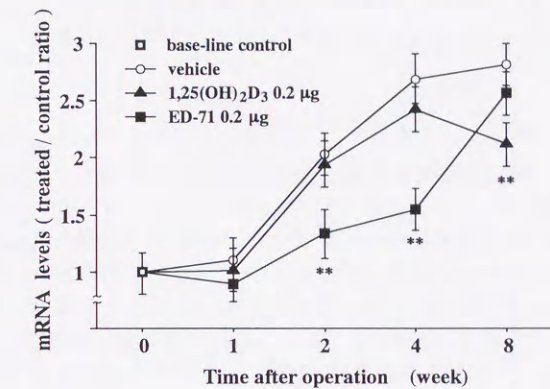


Fig. 9 Effects of 1,25(OH)₂D₃ and ED-71 on osteocalcin mRNA levels in vivo. Vertical bars mean standard deviation. ** $p < 0.01$, significantly different from vehicle group.

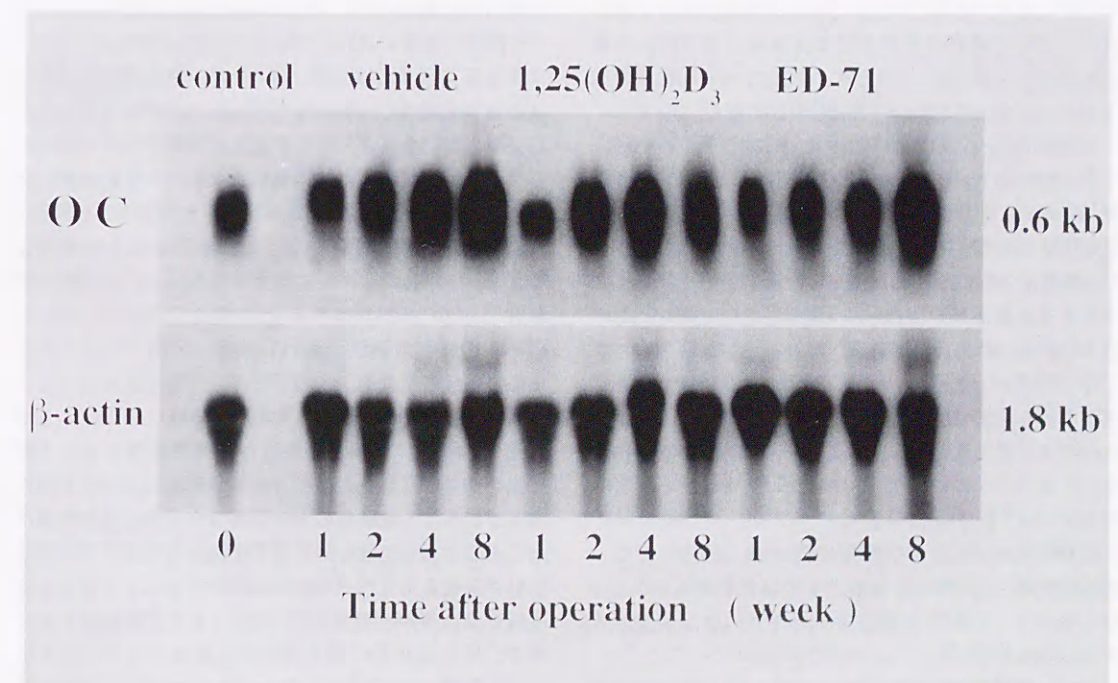


Fig. 8 Northern-blot analysis of osteocalcin, mRNA in the bones of rat hind limb treated with 1,25(OH)₂D₃ and ED-71.

た (Fig. 9)。1,25(OH)₂D₃ 0.2 μg 投与群においては、4 週まで vehicle 群と同じ増加を示したが、8 週で vehicle 群に比し有意の低値を示した。ED-71 0.2 μg 投与群においては、4 週まで vehicle 群に比し有意の低値を示したが、8 週で vehicle 群のレベルに増加した。また、4 週までは 1,25(OH)₂D₃ 0.2 μg 投与群の方が ED-71 0.2 μg 投与群よりも高値を示したが、8 週には逆転していた。

【考 察】

活性型 vitamin D₃ は、Ca の homeostasis に重要な役割を演じているだけでなく in vitro あるいは in vivo において細胞の分化誘導能¹⁾や免疫系の調節³⁰⁾等の種々の作用を持つことが知られている。しかし、活性型 vitamin D₃ の骨細胞に対する作用では、in vitro と in vivo の実験結果が必ずしも一致していない。骨芽細胞様細胞では、osteocalcin (OC) 産生を上昇し²⁹⁾、石灰化を促進する¹⁵⁾。骨髄細胞²⁵⁾、脾細胞¹⁰⁾の培養に添加すると破骨細胞および破骨細胞様細胞の分化を促進する。一方、骨粗鬆症モデル動物における活性型 vitamin D₃ の投与は、骨吸収を抑制して骨量減少を抑制するとの意見で一致している^{4),5),14),20)}。さらに、種々の vitamin D₃ 誘導体は vitamin D₃ の充足した正常ラット³³⁾、兎¹⁷⁾およびマウス²⁸⁾において骨形成を促進して骨量を増加させるが、卵巣摘除後のエストロゲンの不足した状態では骨形成を増加させることは出来ない^{11),12),16)}との報告がある。

Vitamin D₃ の新規誘導体の一つである 2β-(3-hydroxypropoxy)-1,25(OH)₂D₃(ED-71) は、既存の活性型 vitamin D₃ が有する骨吸収抑制作用のみならず骨形成促進作用を合わせ持ち、骨粗鬆症モデル動物に対して骨量の維持あるいは骨量の増加をもたらすという事実が蓄積されつつある^{9),22),31)}。また、ED-71 は、in vivo において腸管の vitamin D₃ レセプターとの親和性は 1,25(OH)₂D₃ の約 1/8 と少ないが、血中の vitamin D₃ 結合蛋白質との親和性は約 2 倍の強さを有し、その作用持続時間を非常に長く保ちうる新規の vitamin D₃ 誘導体であると考えられている¹⁹⁾。さらに、ED-71 による器官培養系における骨吸収活性は、10⁻¹⁰M、10⁻⁹M では、1,25(OH)₂D₃ の作用より有意に弱い、10⁻⁸M では、1,25(OH)₂D₃ と同等の効力を示すとの報告がある²⁷⁾。しかしながら、ED-71 の遺伝子レベルでの作用メカニズムは不明である。

ラット骨肉腫由来細胞株 ROS17/2.8 は、Majeska ら¹³⁾によってクローン化された細胞株であり骨芽細胞の特性を示し、骨芽細胞の研究に広く利用されている。一方、OC は、骨芽細胞により特異的に産生される主要な非コ

ラーゲン性骨基質蛋白であり骨代謝活性の指標と考えられている²³⁾。本研究の in vitro の実験において、10⁻¹⁰M ~ 10⁻⁸M の生理的濃度の ED-71 の添加でコントロールに比べて OC mRNA の発現を、濃度依存性に増加させ、10⁻⁸M 濃度の添加では 9 倍に増加させることが示された。すなわち、ED-71 は、OC mRNA の発現を、1,25(OH)₂D₃ と同等あるいはそれ以上に増加させる初めての活性型 vitamin D₃ アナログであることが明らかとなった。さらに、ED-71 は、ALP mRNA と osteopontin mRNA の発現も増加させることが明らかとなり骨芽細胞を直接刺激することにより骨芽細胞の機能を活性化すると考えられた。

卵巣摘除 (OVX) した骨粗鬆症モデル動物では、骨吸収および骨形成能がともに上昇し、いわゆる高代謝回転型の骨量減少が認められる³²⁾。また、坐骨神経切除 (NX) による不動化を OVX と併用すると、OVX 後の骨吸収を著しく増大させ、短期間に骨量を不可逆的レベルに減少させる³⁴⁾。OVX による骨粗鬆症モデルラットは過食状態となり体重が増加することはよく知られており、本研究においても vehicle 群は 8 週間で約 10% の体重増加を示したが、ED-71 0.2 μg 投与群では体重回復の遅延を認めた。また、高 Ca 血症および高 P 血症が見られた群があり、特に ED-71 0.2 μg 投与群は投与量がやや高濃度の薬理量であったと考えられる。

骨塩量の変動の検討で、ED-71 は、濃度依存的に骨塩量の減少を抑制し、骨塩量を維持させる効果を持つことが判明した。さらに、この骨塩量の維持作用は骨吸収の影響を受けやすい海綿骨の豊富な大腿骨の骨幹部に強く作用し、骨幹部の皮質骨への作用は少ないことが解った。また、1,25(OH)₂D₃ 0.2 μg 投与群では 2 週まで骨塩量を sham 群のレベルに維持するが、その後急激に骨塩量は減少した。このことにより、1,25(OH)₂D₃ と ED-71 の骨代謝過程における作用メカニズムは、異なることが示唆された。

本研究において、OC mRNA の発現レベルは、必ずしも血清中 OC 値および骨塩量と相関しないという興味深い知見が得られた。OC が骨芽細胞により特異的に産生されることは疑いのない事実であるが、その役割は未だ不明であり、破骨細胞前駆細胞を骨吸収を行う局所へ引き寄せる走化性 (chemotaxis) を介して、むしろ骨吸収との関連が示唆されている³⁾。また、骨組織より血清中に流出した OC の意義も未だ不明であり、骨基質に取り込まれた OC の余剰分であるのかもしれない。さらに、血清中 OC には、完全分子型の intact OC (I-OC) と破骨細胞による骨吸収過程で骨基質中の OC が分解されて生じる fragment OC (F-OC) が認められ、I-OC

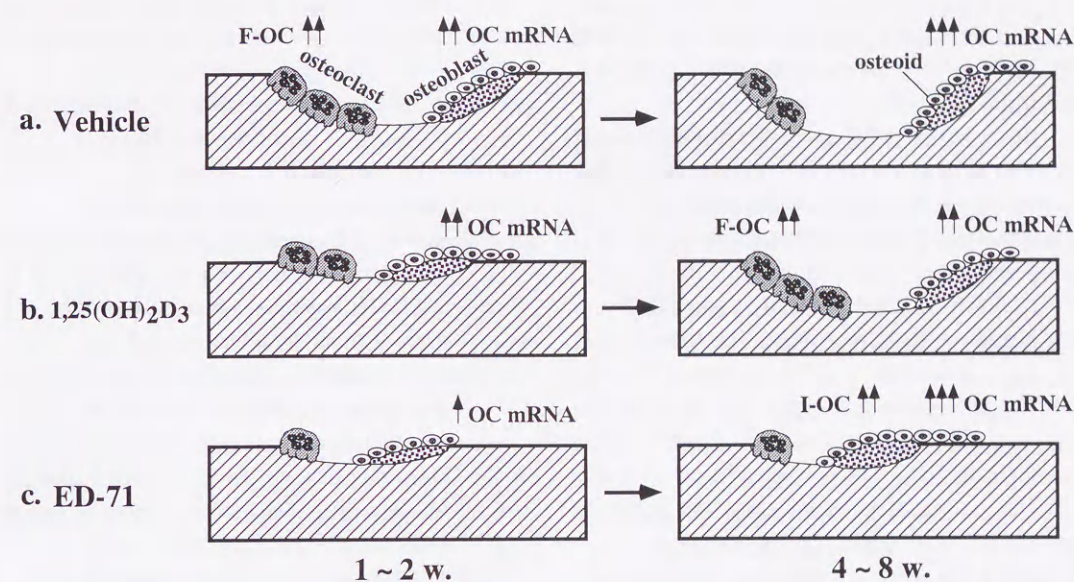


Fig. 10 Scheme of presumed mechanism on bone remodeling in this study.

は骨芽細胞機能 (骨形成能) を、F-OC は破骨細胞活性 (骨吸収能) を反映しているとも考えられている⁸⁾。

最近、池田らは、活性型ビタミン D₃ 投与後の正常ラットの脛骨における OC mRNA の発現は薬剤投与後 6 時間後にピークに達すること⁶⁾、OVX による骨粗鬆症モデルラットの脛骨における OC mRNA の発現は 2 週目より増加し 4 週でピークに達した後 plateau となること⁷⁾を初めて報告した。本研究においても、vehicle 群の OC mRNA の発現は 4 週目まではしだいに増加して、その後に plateau となった。また、vehicle 群の血清中 OC 値は、1 週目に急激に上昇した後に減少した。骨リモデリングは骨形成と骨吸収のカップリングによって行われ、骨形成と骨吸収を切り離して考えることは出来ない。すなわち、破骨細胞による骨吸収面に対して骨芽細胞によって新生骨が添加される。従って、vehicle 群における OC mRNA の発現の増加は、OVX と NX により異常に亢進した高代謝回転型の骨粗鬆症による骨芽細胞総数の増加あるいは骨芽細胞個々の機能が高まったことを反映しているものと推察される。しかし、骨吸収活性が骨形成活性よりも遙かに優位なために骨塩量が減少してしまう。さらに、本研究で用いた血清中 OC 値の測定方法は OC の C 末端を測定しており I-OC と F-OC の両方を測定しているため、血清中の OC 値の上昇は、骨組織より分解された F-OC によるものと考えられる (Fig. 10a)。また、1,25(OH)₂D₃ 0.2 μg 投与群では、

骨代謝回転の抑制による BMC の維持は 2 週目までしか持続せず、その後に骨吸収活性が上昇した結果、血清中の F-OC 値を上昇させたものと考えられる (Fig. 10b)。一方、ED-71 0.2 μg 投与群では、亢進した骨代謝回転を正常化したために OC mRNA 発現は 4 週まで vehicle 群よりも低値となり、8 週では骨形成が促進されて、I-OC の増加によって血清中の OC 値を上昇させたと考えられる。すなわち、1,25(OH)₂D₃ は比較的短時間に代謝されるのに対し、ED-71 は長い半減期により長時間にわたりその作用を持続することから、骨吸収を 1,25(OH)₂D₃ に比して強く抑制して骨代謝回転を正常化させるとともに骨芽細胞の機能を活性化して骨塩量を維持したと推察された (Fig. 10c)。

以上の結果により、ED-71 は、骨粗鬆症に対する新しい治療薬として今後期待されるものと考えられた。

【結 論】

ラット骨肉腫由来細胞株 (ROS17/2.8) および骨粗鬆化モデルラットにおける活性型 vitamin D₃ の作用効果を比較検討して、以下の結論を得た。

1. 2β-(3-hydroxypropoxy)-1,25-dihydroxy vitamin D₃(ED-71) は、ラット骨肉腫由来細胞株 (ROS17/2.8) における osteocalcin, ALP, osteopontin の mRNA の発現を増加させ、特に osteocalcin mRNA の発現を 1,25(OH)₂D₃ と同等あるいはそれ以上に増加さ

せる初めての活性型 vitamin D₃ アナログであることが明らかとなった。このことから、ED-71 は、骨芽細胞を直接刺激することにより骨芽細胞の機能を活性化すると考えられた。

2. ED-71 は、卵巣摘出術と坐骨神経切除術の併用手術による骨粗鬆症モデルラットにおける急激な骨塩量の減少を、濃度依存的に抑制して骨塩量を維持させ、それは海綿骨の豊富な大腿骨の骨幹端部に強く作用していることが判明した。

3. 1,25(OH)₂D₃ と ED-71 は、0.2 μg/kg 投与群において骨粗鬆症モデルラットの血清中 osteocalcin 値を高めた。

4. 骨粗鬆化ラットの骨組織における osteocalcin mRNA の発現は、1,25(OH)₂D₃ により、4 週で vehicle と差がなかったが、8 週では有意に低下した。一方、ED-71 により、2 週から 4 週で vehicle に比し有意に低かったが、8 週では vehicle のレベルに増加した。

5. 本研究の結果により、ED-71 は、1,25(OH)₂D₃ に比して骨吸収を強く抑制して骨代謝回転を正常化させるとともに骨芽細胞の機能を活性化して骨粗鬆化を抑制すると考えられた。

【謝 辞】

稿を終えるに当たり、御指導、御校閲を賜りました愛媛大学整形外科学教室柴田大法教授に深甚なる謝意を捧げます。また終始適切な御指導をいただきました奥村秀雄助教授をはじめ整形外科学教室の皆様から心から感謝いたします。また、分子生物学的手法を直接御教示いただきました京都大学ウイルス研究所畑中 正一教授ならびに野阪哲哉助手に心から感謝いたします。

なお、本研究の一部は厚生省科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）と財団法人愛媛県保険医療財団の補助金の御援助をいただきました。

引用文献

1. Abe E, Miyaura C, Sakagami H, Takeda M, Konno K, Yamazaki T, Toshiki S, Suda T: Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. Proc Natl Acad Sci USA 1981; **78**: 4990-4994.
2. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987; **162**: 156-159.
3. DeFranco DJ, Glowacki J, Cox KA, Lian JB: Normal bone particles are preferentially resorbed

in the presence of osteocalcin-deficient bone particles *in vivo*. Calcif Tissue Int 1991; **49**: 43-50.

4. Erben RG, Weiser H, Sinowatz F, Rambeck WA, Zucker H: Vitamin D metabolites prevent vertebral osteopenia in ovariectomized rats. Calcif Tissue Int 1992; **50**: 228-236.
5. Faugere MC, Okamoto S, DeLuca HF, Malluche HH: Calcitriol corrects bone loss induced by oophorectomy in rats. Am J Physiol 1986; **250**: E35-E38.
6. Ikeda T, Kohno H, Yamamuro T, Kasai R, Ohta S, Okumura H, Konishi J, Kikuchi H, Shigeno C: The effect of active vitamin D₃ analogs and dexamethasone on the expression of osteocalcin gene in rat tibiae *in vivo*. Biochem Biophys Res Commun 1992; **189**: 1231-1235.
7. Ikeda T, Shigeno C, Kasai R, Kohno H, Ohta S, Okumura H, Konishi J, Yamamuro T: Ovariectomy decreases the mRNA levels of transforming growth factor- β 1 and increases the mRNA levels of osteocalcin in rat bone *in vivo*. Biochem Biophys Res Commun 1993; **194**: 1228-1233.
8. Kanzaki S, Hosoda K, Moriwake T, Tanaka H, Kubo T, Inoue M, Higuchi J, Yamaji T, Seino Y: Serum propeptide and intact molecular osteocalcin in normal children and children with growth hormone (GH) deficiency: A potential marker of bone growth and response to GH therapy. J Clin Endocrinol Metab 1992; **75**: 1104-1109.
9. Kobayashi T, Okano T, Tsugawa N, Murano M, Masuda S, Takeuchi A, Sato K, Nishii Y: 2 β -(3-Hydroxypropoxy)-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (ED-71), preventive and therapeutic effects on bone mineral loss in ovariectomized rats. Bioorg Med Chem Lett 1993; **3**: 1815-1819.
10. Kurihara N, Suda T, Miura Y, Nakauchi H, Kodama H, Hiura K, Hakeda Y, Kumegawa M: Generation of osteoclasts from isolated hematopoietic progenitor cells. Blood 1989; **74**: 1295-1302.
11. Lindgren U, Deluca HF: Role of parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the development of osteopenia in oophorectomized

- rats. Calcif Tissue Int 1982; **34**: 510-514.
12. Lindgren JU, Lindholm TS: Effect of 1-alpha-hydroxyvitamin D₃ on osteoporosis in rats induced by oophorectomy. Calcif Tissue Int 1979; **27**: 161-164.
13. Majeska RJ, Rodan SB, Rodan GA: Parathyroid hormone-responsive clonal cell lines from rat osteosarcoma. Endocrinology 1980; **107**: 1494-1498.
14. Malluche HH, Faugere MC, Friedler RM, Fanti P: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ corrects bone loss but suppresses bone remodeling in ovariectomized beagle dogs. Endocrinology 1988; **122**: 1998-2006.
15. Matsumoto T, Igarashi C, Takeuchi Y, Harada S, Kikuchi T, Yamato H, Ogata E: Stimulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ of *in vitro* mineralization induced by osteoblast-like MC3T3-E1 cells. Bone 1991; **12**: 27-32.
16. Nakamura T, Nagai Y, Yamato H, Suzuki K, Ori-mo H: Regulation of bone turnover and prevention of bone atrophy in ovariectomized beagle dogs by the administration of 24R,25(OH)₂D₃. Calcif Tissue Int 1992; **50**: 221-227.
17. Nakamura T, Suzuki K, Hirai T, Kurokawa T, Ori-mo H: Increased bone volume and reduced bone turnover in vitamin D-replete rabbits by the administration of 24R,25-dihydroxyvitamin D₃. Bone 1992; **13**: 229-236.
18. Ohta S, Yamamuro T, Lee K, Okumura H, Kasai R, Hiraki Y, Ikeda T, Iwasaki R, Kikuchi H, Konishi J, Shigeno C: Fracture healing induces expression of the proto-oncogene c-fos *in vivo*. FEBS Lett 1991; **284**: 42-45.
19. Okano T, Tsugawa N, Masuda S, Takeuchi A, Kobayashi T, Takita Y, Nishii Y: Regulatory activities of 2 β -(3-hydroxypropoxy)-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ derivative, on calcium metabolism. Biochem Biophys Res Commun 1989; **163**: 1444-1449.
20. Okumura H, Yamamuro T, Kasai R, Hayashi T, Tada K, Nishii Y: Effect of 1 α -dihydroxyvitamin D₃ on osteoporosis induced by immobilization combined with ovariectomy in rats. Bone 1988; **8**: 351-355.
21. Okumura H, Yamamuro T, Kasai R, Ichisaka A, Hayashi T, Matsushita M: The effect of immobilization on osteoporosis in rats. J Bone Miner Metab 1986; **4**: 75-81.
22. Okumura H, Yamamuro T, Kasai R, Iwashita Y, Ikeda T: Immobilization combined with ovariectomy and effect of active vitamin D₃ analogues in the rat. Cells and Materials 1991; Supple 1: 125-130.
23. Price PA, Baukol SA: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. J Biol Chem 1980; **255**: 11660-11663.
24. Price PA, Parthemore JG, Deftos LJ: New biochemical marker for bone metabolism. J Clin Invest 1980; **66**: 878-883.
25. Roodman GD, Ibbotson KJ, MacDonald BR, Kuehl TJ, Mundy GR: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ causes formation of multinucleated cells with several osteoclast characteristics in cultures of primate marrow. Proc Natl Acad Sci USA 1985; **82**: 8213-8217.
26. 佐藤克彦, 樋口義信, 武田聡, 磯谷敏美, 南条正季, 西井易徳: 1 α -OH D₃ およびビタミン D 誘導体 (ED-71) の正常ラットにおける骨塩量増加作用および骨形成促進作用について. Osteoporosis Japan 1993; **1**: 22-28.
27. Sato K, Nishii Y, Woodiel FN, Raisz LG: Effects of two new vitamin D₃ derivatives, 22-oxa-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (OCT) and 2 β -(3-hydroxypropoxy)-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (ED-71), on bone metabolism in organ culture. Bone 1993; **14**: 47-51.
28. Shima M, Tanaka H, Norman AW, Yamaoka K, Yoshikawa H, Takaoka K, Ishizuka S, Seino Y: 23(S),25(R)-1,25-Dihydroxyvitamin D₃-26,23-lactone stimulates murine bone formation *in vivo*. Endocrinology 1990; **126**: 832-836.
29. Spiess YH, Price PA, Deftos JL, Manolagas SC: Phenotype-associated changes in the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on alkaline phosphatase and bone GLA-protein of rat osteoblastic cells. Endocrinology 1986; **118**: 1340-1346.
30. Tsoukas CD, Provvedini DM, Manolagas SC: 1,25-

Dihydroxyvitamin D₃: A novel immunoregulatory hormone. *Science* 1984; **224**: 1438-1440.

31. Tsurukami H, Nakamura T, Suzaki K, Sato K, Higuchi Y, Nishii Y: A novel synthetic vitamin D analogue, 2 β -(3-hydroxypropoxy)-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃(ED-71), increases bone mass by stimulating the bone formation in normal and ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1994; **54**: 142-149.
32. Wronski TJ, Cintron M, Dann LM: Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1988; **43**: 179-183.
33. Wronski TJ, Halloran BP, Bikle DD, Globus RK, Morey-Holton ER: Chronic administration of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ increased bone but impaired mineralization. *Endocrinology* 1986; **119**: 2580-2585.
34. Yoshida S, Yamamuro T, Okumura H, Takahashi H: Microstructural changes of osteopenic trabeculae in the rat. *Bone* 1991; **12**: 185-194.