

図 2.6.2.2.2 #2 FPP シンターゼのアレンドロネートによる阻害 [4.2.1.1.2]

FPP シンターゼ活性は、20µmol/L の $[1-^{14}\text{C}]$ IPP と 40µmol/L の GPP を用いて測定した。酵素添加 15 分後に GPP と IPP を加えることにより反応を開始した。ヒト遺伝子組換え型 FPP シンターゼは、Ding らの方法[4.3.18]により発現、精製した。

遺伝子組換え型の FPP シンターゼは、窒素原子含有ビスホスホネートであるパミドロネート及びリセドロネートによっても阻害された。一方、窒素原子を含まないエチドロネートでは非常に阻害活性は弱く、クロドロネートには阻害活性を認めなかった (表 2.6.2.2.2 #3)。

表 2.6.2.2.2 #3 FPP シンターゼに対するビスホスホネートの作用 [4.2.1.1.2]

ビスホスホネート	IC ₅₀ (nmol/L)
アレンドロネート	340
パミドロネート	500
エチドロネート	80,000
リセドロネート	3.9
クロドロネート	>350,000

加えて破骨細胞において、アレンドロネートは、 $[^3\text{H}]$ メバロラクトン (MVL) の蛋白への結合を 18kDa の蛋白を除き抑制した (図 2.6.2.2.2 #4)。加えて、ステロールを含む不飽和性脂質への結合も抑制した (図 2.6.2.2.2 #5)。これらのことから、アレンドロネートは破骨細胞において蛋白のプレニル化とステロール合成を抑制することが示された。

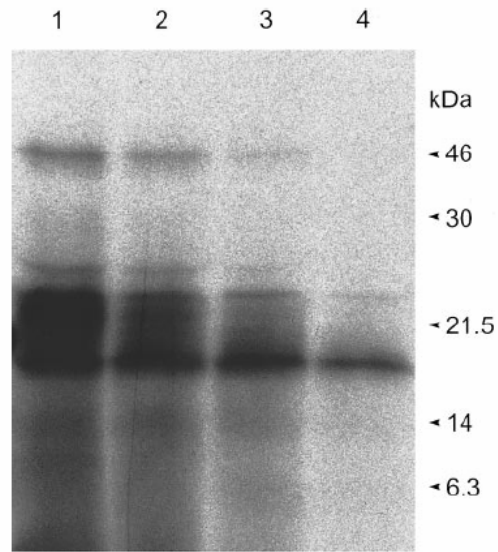


図 2.6.2.2.2 #4 破骨細胞のプレニル化蛋白の SDS-PAGE とアレンドロネートの影響
[4.2.1.1.2]

アレンドロネートの存在下あるいは非存在下で破骨細胞を ^3H MVL とインキュベートした後、蛋白を、15%のポリアクリルアミドゲルで分離した。アレンドロネートの処置濃度は、第1列: 0、第2列: $5\mu\text{mol/L}$ 、第3列: $15\mu\text{mol/L}$ 、第4列: $60\mu\text{mol/L}$ 。分子量のマーカーを右側に示した。

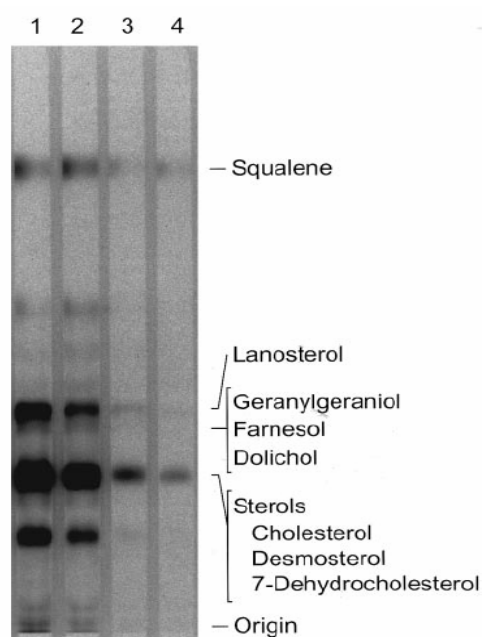


図 2.6.2.2.2 #5 破骨細胞の不鹸化性脂質の薄層クロマトグラフィーとアレンドロネートの影響 [4.2.1.1.2]

アレンドロネートの存在下あるいは非存在下で破骨細胞を $[^3\text{H}]$ MVL とインキュベートした後、不鹸化脂質を、薄層クロマトグラフィーで分離した。アレンドロネートの処置濃度は、第1列: 0、第2列: 5 $\mu\text{mol/L}$ 、第3列: 15 $\mu\text{mol/L}$ 、第4列: 60 $\mu\text{mol/L}$ 。不鹸化性脂質の位置を、右側に示した。

これらの結果から、1) FPP シンターゼはアレンドロネートの MVA 経路における選択的な標的であり、2) この酵素はアレンドロネート及び他の窒素原子含有ビスホスホネートにより阻害されるが、窒素原子を含まないクロドロネートでは阻害されないことから、タイプの異なるビスホスホネートでは作用機序が異なることが示唆され、3) 精製した破骨細胞においてアレンドロネートは蛋白プレニル化とステロール合成を抑制することが示された。

2.6.2.2.3 アレンドロネートによる破骨細胞のアポトーシス [4.2.1.1.3]

ビスホスホネートは直接的あるいは間接的に骨吸収細胞である破骨細胞のアポトーシスを引き起こすことが示されていることから、このアポトーシスは、ビスホスホネートの骨吸収抑制作用に関連している可能性が示唆されている [4.3.19、4.3.20]。破骨細胞は培養することが困難であるため、アポトーシスを引き起こす過程は不明であった。そこで精製した破骨細胞を用いて、アレンドロネート、リセドロネート、パミドロネート、エチドロネート及びクロドロネートのアポトーシスとシグナル伝達キナーゼに対する影響を検討した。

すべてのビスホスホネートは、キャスパーゼに依存した核濃縮 (図 2.6.2.2.3 #1) と、シグナル伝達キナーゼである Mammalian Sterile 20-like kinase 1 (Mst1) のアポトーシスに関連した活性型 (34kDa 型) への切断を引き起こした (図 2.6.2.2.3 #2)。

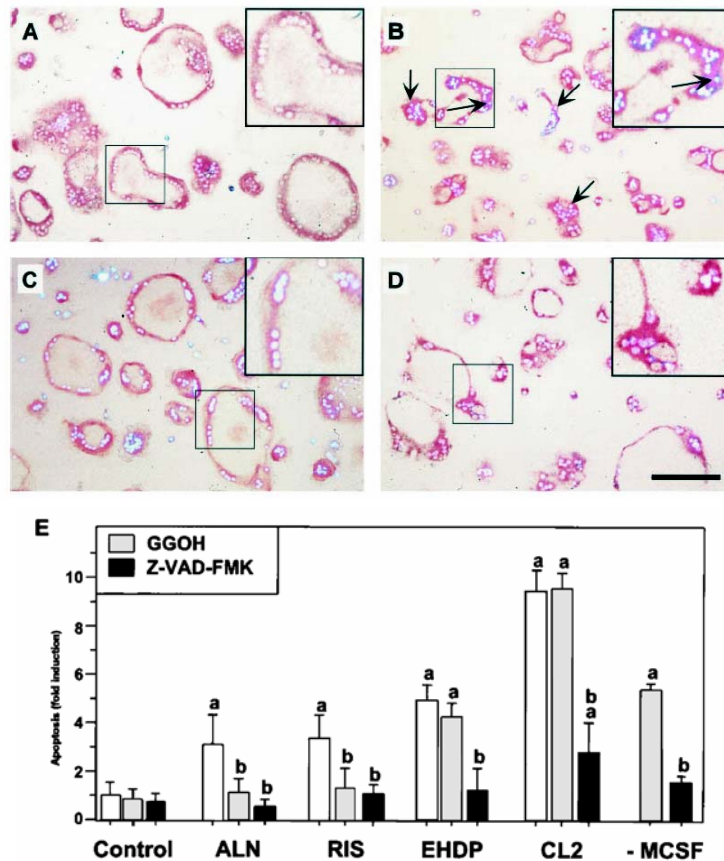


図 2.6.2.2.3 #1 ビスホスホネート誘発の破骨細胞アポトーシスに対する GGOH とカスパーゼ阻害剤による抑制 [4.2.1.1.3]

精製したマウス破骨細胞を 30μmol/L のアレンドロネートの存在下 (B~D) あるいは非存在下 (A) で 18 時間インキュベートした。同時に、10μmol/L の GGOH (C) 又は 50μmol/L の Z-VAD-FMK (Z-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone) (D) で処置後、細胞を酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ染色 (赤色) とヘキスト 33342 核染色 (明青白色) を行った。矢印は濃縮した核を示す。D の横棒 (—) は、200μm を示す。挿入枠内は、点線囲み部分の強拡大像である。E はアレンドロネート (ALN: 30μmol/L)、リセドロネート (RIS: 30μmol/L)、エチドロネート (EHDP: 300μmol/L)、クロドロネート (CL2: 100μmol/L) を、それぞれ無処置 (□)、10μmol/L GGOH (◻)、50μmol/L Z-VAD-FMK (■) 存在下で 18 時間処置した時の濃縮した核を持つ細胞の定量結果を示す。MCSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) を除き (-MCSF) 18 時間培養した時の Z-VAD-FMK (50μmol/L) 存在下 (■) 又は非存在下 (◻) をアポトーシスの陽性対照として示す。コントロール群におけるアポトーシスは 9%であった。3 回の実験を行い、各実験においてはトリプレケートで測定した。

a: 対照群 (Control) に比較して統計学的に有意 ($p < 0.05$)。

b: GGOH 及び Z-VAD-FMK の非存在下でのビスホスホネート処置群に比較して統計学的に有意 ($p < 0.05$)。

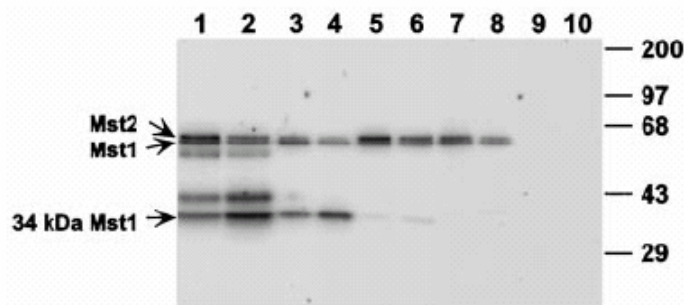


図 2.6.2.2.3 #2 アレンドロネートにより活性化されたキナーゼの抗 Mst1 キナーゼ抗体による免疫沈降 [4.2.1.1.3]

破骨細胞は、骨髄細胞と MB1.8 マウス頭骸骨骨芽細胞を同時に培養することにより作成した。細胞の溶解 21 時間前に、破骨細胞をアレンドロネート 30 μ mol/L 処置した結果が第 2、4、6、8、10 列であり、無処置のものが第 1、3、5、7、9 列である。第 1 列と 2 列は、ゲル内キナーゼ活性測定法を用いて溶解液のキナーゼ活性を示している。第 3 列と 4 列は抗 Mst1 アミノ基末端、第 5 列と 6 列は抗 Mst2 アミノ基末端、第 7 列と 8 列は、抗 Mst1 及び抗 Mst2 カルボキシル基末端に対する抗体との沈降物を示す。第 9 列と 10 列は、ウサギ抗ヤギ IgG 抗体を用いた対照である。分子量マーカー (kDa) を右側に、Mst1 (59kDa)、Mst2 (60kDa) 及び切断された Mst1 (34kDa) の位置を左側に示した。

精製した破骨細胞の生存に必須の血清とマクロファージコロニー刺激因子 (MCSF) の除去や、プロテインキナーゼ阻害剤のスタウロsporin 処置によっても、アポトーシスと Mst1 キナーゼの切断が誘導された。ビスホスホネートの MVA 経路の抑制作用に対する GGOH の拮抗作用と同様に、アレンドロネート、リセドロネート及び HMG-CoA 還元酵素阻害剤のロバスタチンにより誘発されるアポトーシスと Mst1 キナーゼの切断は GGOH 及びキャスパーゼ阻害剤の Z-VAD-FMK により拮抗されたが、クロドロネートにより引き起こされたそれらの作用は GGOH では拮抗されなかった (図 2.6.2.2.3 #1、#3)。

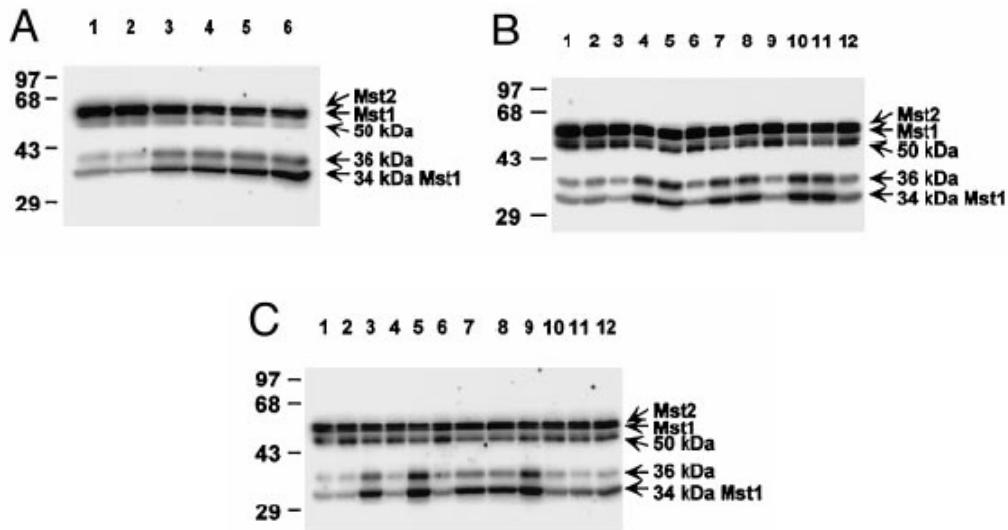


図 2.6.2.2.3 #3 MVA 経路の抑制により引き起こされる Mst1 キナーゼの切断の誘導に対する GGOH の阻害 [4.2.1.1.3]

破骨細胞は、骨髓細胞と MB1.8 マウス頭骸骨骨芽細胞を同時に培養することにより作製した。ゲル内キナーゼ活性測定法を用いて細胞溶解液のキナーゼ活性を示した。破骨細胞は、MCSF (5ng/mL) の存在下で以下の処置を行った。

A: 破骨細胞を精製し、細胞融解 24 時間前から培養を開始した。ロバスタチン (LOV: HMG-CoA 還元酵素阻害剤:10 μ mol/L) を細胞溶解 0 時間前 (第 1 列)、1 時間前 (第 2 列)、12 時間前 (第 3 列)、16 時間前 (第 4 列)、20 時間前 (第 5 列)、24 時間前 (第 6 列) に加えた。

B: 破骨細胞を FOH 存在下 (10 μ mol/L: 第 2、5、8、11 列)、GGOH 存在下 (10 μ mol/L: 第 3、6、9、12 列)、あるいは非存在下 (第 1、4、7、10 列) に、無処置 (第 1~3 列)、あるいはアレンドロネート (30 μ mol/L: 第 4~6 列)、リセドロネート (30 μ mol/L: 第 7~9 列)、LOV (10 μ mol/L: 第 10~12 列) を 19 時間処置した。

C: 破骨細胞を GGOH 存在下 (10 μ mol/L: 第 2、4、6、8、10、12 列) あるいは非存在下 (第 1、3、5、7、9、11 列) に、無処置 (第 1 及び 2 列)、あるいはアレンドロネート (30 μ mol/L: 第 3 及び 4 列)、リセドロネート (30 μ mol/L: 第 5 及び 6 列)、クロドロネード (100 μ mol/L: 第 7 及び 8 列)、LOV (10 μ mol/L: 第 9 及び 10 列)、Na₃VO₄ (100 μ mol/L: 第 11 及び 12 列) を 20 時間処置した。

放射活性のあるバンドをフォスファイメージにより可視化した。分子量マーカー (kDa) を左側に、キナーゼ名を右側に示した。

これらの結果は、ビスホスホネートは直接的に破骨細胞のアポトーシスを誘発し、カスパーゼによる Mst1 キナーゼの切断が、アポトーシスの過程の一部であることが示唆された。アレンドロネートやリセドロネートでは、このアポトーシスの過程はグラニルグラニル化に対する抑制より、下流にあると考えられた。

2.6.2.2.4 アレンドロネートによる破骨細胞アポトーシスと骨吸収抑制との関係 [4.2.1.1.4]

窒素原子含有ビスホスホネートであるアレンドロネートとリセドロネードを用いて、ビスホスホネートにより引き起こされる破骨細胞のアポトーシスが、骨吸収抑制の主たる原因であるのか

どうか検討した。2.6.2.2.1 及び 2.6.2.2.2 の結果から、アレンドロネートを含む窒素原子含有ビスホスホネートは、FPP シンターゼを阻害することにより蛋白のプレニル化を抑制することを示唆した。一方、窒素原子を含まないビスホスホネートであるエチドロネートやクロドロネートでは、細胞毒性をもつアデノシン 3 リン酸の類縁体に代謝されることが報告されている [4.3.21]。

そこでアレンドロネートとリセドロネートを用いて、骨吸収と破骨細胞数に対する用量反応性を検討した。両薬剤とも、破骨細胞数を減少させる濃度の 10 分の 1 以下の濃度で骨吸収の抑制が認められた (図 2.6.2.2.4 #1)。

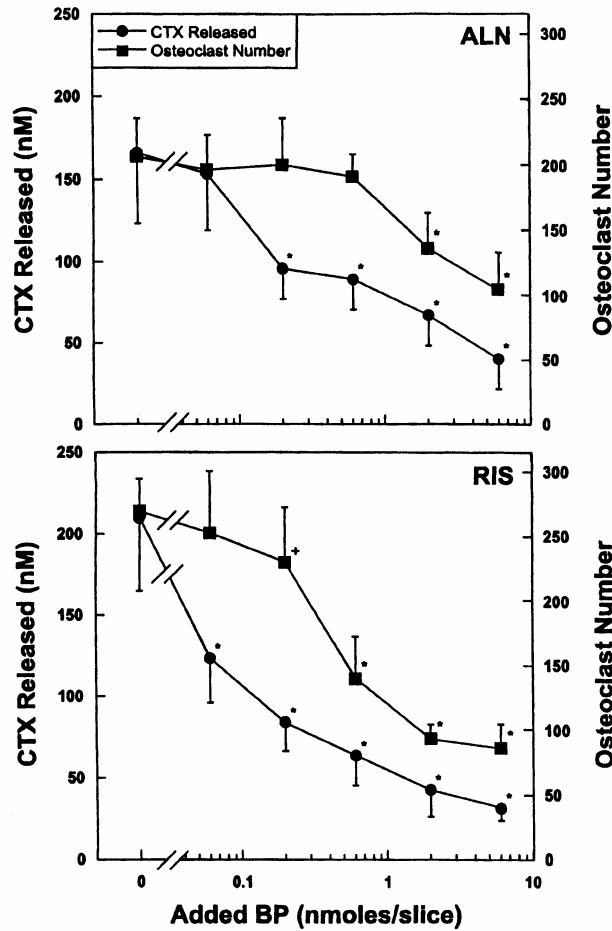


図 2.6.2.2.4 #1 窒素原子含有ビスホスホネートの骨吸収と破骨細胞数に対する影響 [4.2.1.1.4]

ウサギ破骨細胞による骨吸収活性を、アレンドロネートあるいはリセドロネートの図中に示した濃度で 72 時間インキュベートすることにより検討した。I 型コラーゲン架橋 C-テロペプチド断片 (CTX) の放出量測定による骨吸収活性を左軸に、破骨細胞数を右軸で示した。データは 3 回の実験 (各実験においてはトリPLICATEで測定) の平均値±標準偏差で示した。

⁺ $p < 0.01$, * $p < 0.0001$: 対照群との比較において統計学的に有意。

窒素原子含有ビスホスホネートであるアレンドロネートやリセドロネートは、骨吸収を抑制しアポトーシスを誘発する濃度においてカスパーゼ阻害剤の Z-VAD-FMK により破骨細胞数は保持されたが、骨吸収の抑制は拮抗されなかった (図 2.6.2.2.4 #2)。一方、窒素原子を含まないビスホスホネートであるエチドロネートやクロドロネートによる骨吸収抑制は、Z-VAD-FMK により拮抗された。

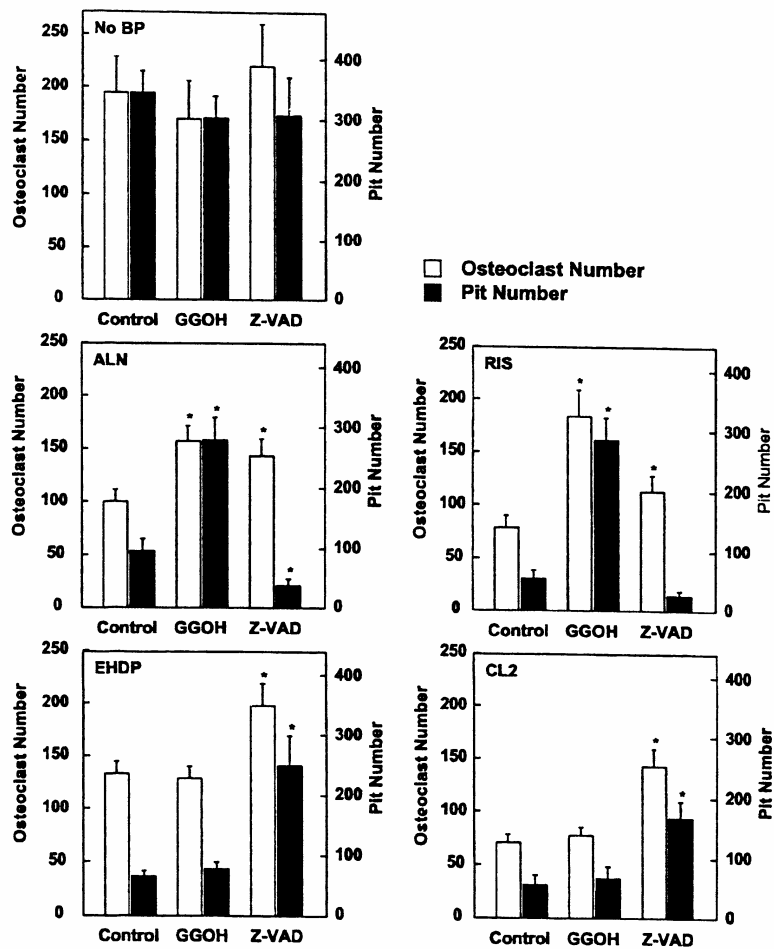


図 2.6.2.2.4 #2 窒素原子含有ビスホスホネート及び窒素原子を含有しないビスホスホネートによる骨吸収抑制に対するカスパーゼ阻害剤の拮抗作用 [4.2.1.1.4]

ウサギ破骨細胞をアレンドロネート (ALN: 3nmol/slice)、リセドロネート (RIS: 3nmol/slice)、エチドロネート (EHPD: 30nmol/slice)、クロドロネート (CL2: 5nmol/slice) の存在下あるいは非存在下で、ウシ骨片とインキュベートした。インキュベーションは、GGOH (20 μ mol/L) あるいは Z-VAD-FMK (50 μ mol/L) を添加、又は非添加で実施した。破骨細胞数 (左軸) と骨吸収窩数 (右軸) は、72 時間の処置後の値を示した。図中、値は 3 回の実験 (各実験ではトリプレケートで測定) の平均値+標準偏差で示した。

* $p < 0.001$: ビスホスホネート処置対照群との比較において統計的に有意。

骨吸収窩数と破骨細胞数については、 $p < 0.0001$ で、ビスホスホネート処置対照群とビスホスホネート非処置対照群の間に統計的に有意差あり。

更に、アレンドロネート単独もしくは Z-VAD-FMK の共存下で 24 時間又は 48 時間処置された破骨細胞において、ガラニルガラニル化を回復させる GGOH 処置により、骨吸収はコントロールレベルまで回復した (図 2.6.2.2.4 #3)。

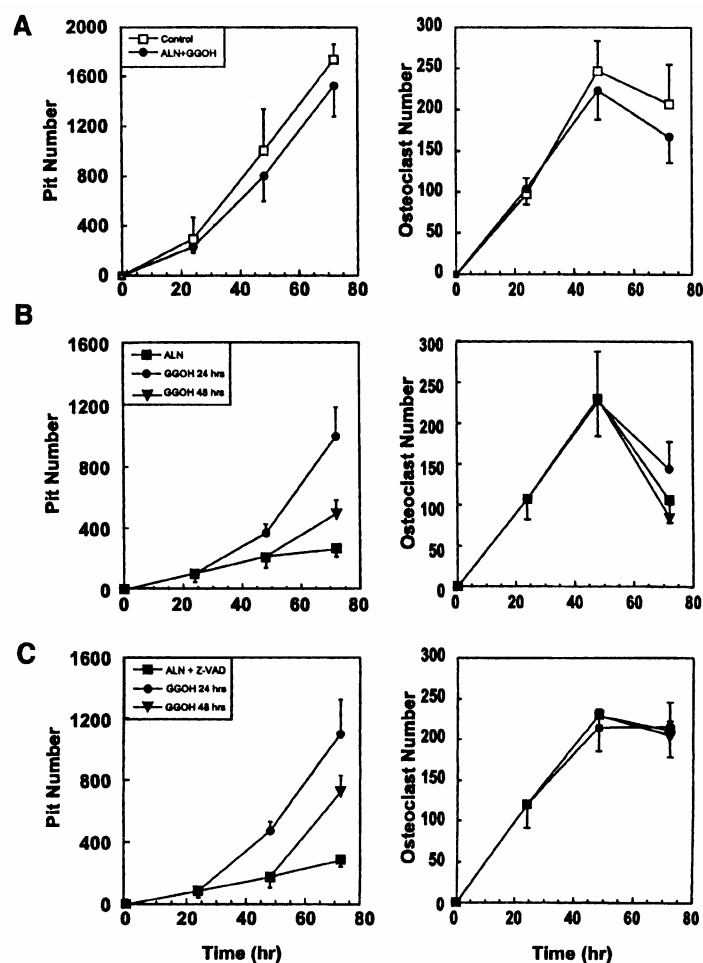


図 2.6.2.2.4 #3 アレンドロネートによる骨吸収抑制確立後に GGOH を処置した場合の骨吸収と破骨細胞数に対する影響 [4.2.1.1.4]

骨吸収測定を、24、48、72 時間実施した。左パネルには骨吸収を示す骨吸収窩数を、右パネルには破骨細胞数を示した。

A: アレンドロネート (3nmol/slice) と GGOH (20 μ mol/L) 存在下 (●) あるいは両薬剤非存在下 (□)。

B 及び C: アレンドロネート (3nmol/slice) (■) とキャスパーゼ阻害剤, Z-VAD-FMK (50 μ mol/L) 存在下 (C) あるいは非存在下 (B) で GGOH (20 μ mol/L) を 24 時間 (●)、48 時間 (▼) 後に添加。

結果は 3 回の実験 (各実験ではトリPLICATEで測定) の平均値 \pm 標準偏差で示した。

これらの結果から、エチドロネートやクロドロネート誘発のアポトーシスはこれらのビスホスホネートの骨吸収抑制の主たる機序であるが、窒素原子含有のビスホスホネートであるアレンドロネートやリセドロネートによる骨吸収抑制作用は、アポトーシス誘発作用には依存していないことが示唆された。