

シンポジウム2 中高年女性の加齢による変化

エストロゲンの骨代謝における作用機序の解析
—エストロゲンの低下と骨吸収の亢進との関わり—

慶應義塾大学助教授 太田 博 明

目 的

我々はエストロゲン(E)が低下すると骨吸収の亢進により高回転型の骨量減少が生じ、Eを補充すると骨吸収が抑制され、骨量減少が防止される臨床的事実を報告してきた。一方、加齢による低回転型の骨量減少は骨形成の低下によると考えられている。しかし、Eの変動や加齢現象がどのような機序により骨代謝に影響を及ぼすかは解明されていない。

我々はEの骨代謝調節作用に関する基礎的な研究を進める過程で、Eの低下した卵巣摘出(OVX)マウスでは、骨吸収の亢進に起因した骨量減少に先立ち、骨髓造血が刺激され、骨髓の有核細胞数が著しく増加することを見出した。骨髓造血は骨髓間質細胞から分泌される局所因子(IL-1, IL-6, IL-7等)により調節されているが、これら因子は骨吸収調節因子でもあることから、Eは骨髓環境に影響を与え、造血とともに骨代謝をも調節している可能性が考えられる。一方、骨髓中に存在する骨芽細胞前駆細胞は多分化能を有し、骨芽細胞のみならず脂肪細胞へも分化するが、加齢に伴って骨芽細胞への分化が抑制され脂肪細胞への分化が亢進するため、骨形成の低下を来すと考えられている。したがって、加齢による低回転型骨量減少の解明においても骨髓環境の解析は不可欠である。

そこで我々は、骨髓環境内の造血と骨芽細胞および脂肪細胞の相互関係に着目し、若年期から老年期の各種週齢 ddy マウスおよび老化促進モデルマウス SAMP6(P6)を用いて、高回転型および低回転型骨量減少機構の解明を試みた。すなわち、骨髓環境の変化を解析することにより、Eおよび加齢による骨代謝の変動に関する以下の項目の達

成を目指した。

① OVX マウスを用いてEの骨髓造血調節作用および骨代謝作用を解析し、高回転型骨量減少機構を解明する。

② 各種週齢 ddy マウスおよびP6を用い、加齢による骨髓造血の変化と骨芽細胞前駆細胞の分化を解析し、低回転型の骨量減少機構を解明する。

③ E欠乏と加齢変化との関係を解析し、骨量減少に至る機序の差異およびE欠乏と加齢変化との相互関係を明らかにする。

方 法

① OVX マウスにおける骨代謝機構の解析：8週齢雌性マウスにOVXあるいは偽手術(Sham)を施し、経時的に子宮重量、血中E₂濃度、骨密度の測定と骨形態計測(海綿骨領域面積および破骨細胞数など)を行った。

② エストロゲンの骨髓造血調節作用と骨代謝調節作用との関連性の解明：OVXあるいはShamを施し、OVX群の一部に17 β -estradiol(E₂)を投与した。経時的に骨髓細胞を採取し、特異的表面抗原マーカーの発現をB220(B細胞)、Gr-1(顆粒球)、CD3(T細胞)、F4/80(マクロファージ)、Mac-1(骨髓球全般)、IgM μ 鎖に対するモノクローナル抗体を用いてFlow Cytometryにより解析した。さらにEの造血調節作用を*in vitro*で解析するために、骨髓細胞と骨髓間質細胞株(ST2)をE₂存在・非存在下で8日間培養し、B細胞の分化を解析した。また、B細胞株(DW)とST2細胞を共培養し、骨吸収性局所因子の産生を測定した。

③ 加齢に伴う骨髓造血の解析：4週から40週の各種週齢マウスより骨髓細胞を採取し、有核細胞数を計測するとともにFlow Cytometryによ

る解析を行った。また、大腿骨の薄切切片を作製し、骨および骨髓を形態学的に観察した。

④ 老化促進マウス SAMP6の解析：3週齢から36週齢の P6と正常な老化を示す同系のコントロールマウス(R1)を用い、骨髓細胞の Flow Cytometry 解析を行うと同時に骨密度の測定を行った。P6および R1から採取した骨髓細胞を培養し、骨芽細胞前駆細胞はコロニー形成法 CFU-F により、また脂肪細胞への分化は Oil red-O 染色により解析した。

成 績

① OVX マウスにおける骨代謝機構：OVX 群は Sham 群に比して子宮重量と血中 E_2 値の低下が術後1週目から認められ、2週目に破骨細胞数の増加と骨吸収亢進に起因した海綿骨領域面積の減少が観察された。また骨密度は術後4週目に有意に低下した。以上より、OVX マウスは高回転型の閉経後骨粗鬆症モデル動物として有用であり、他の動物に比して造血系や免疫系の解析に適することが明らかとなった。

② エストロゲンの骨髓造血調節作用と骨代謝調節作用との関連性：OVX 群では術後2週目より骨髓有核細胞数が増加し、著しい造血亢進を認めた。Flow Cytometry による解析にて、OVX 群の骨髓細胞は B220陽性の B 細胞が特異的に増大しており、他の細胞数は変動を認めなかった。B 細胞を IgM μ 鎖および B220抗体を用いた Two-color Flow Cytometry により解析したところ、OVX により増加した細胞は μ 鎖陰性で B220弱陽性の pre B 細胞であった。これら E_2 欠乏による pre B 細胞の増大と骨吸収亢進による骨量減少は E_2 の補充投与により Sham レベルに回復した。また、正常マウスに E_2 を過剰投与すると、OVX と反対に B 細胞は著しく減少するとともに骨吸収が抑制された。そこで、 E の B 細胞造血に対する作用を骨髓細胞と ST2の共培養系で検討すると、 E_2 は間質細胞に依存した B 細胞の増殖・分化を用量依存的に抑制した。すなわち、 E は B 細胞の分化において負の調節因子であり、その欠乏は pre B 細胞の異常増加を招く。OVX により増加する pre B 細胞は間質細胞への接着依存性が強いことか

ら、pre B 細胞 DW と ST2細胞を共培養し、局所因子の産生を検討した。その結果、DW 細胞が ST2細胞に接着すると、骨吸収促進因子である IL-6の産生が著しく亢進することが判明した。以上の結果は E の造血調節作用と骨吸収抑制作用との関連性を示唆する。

③ 加齢に伴う骨髓造血の変化：4～6週齢の若年期では B 細胞が優位で顆粒球が少なかったが、7週齢以降では顆粒球が優位となって一定のバランスを保った。30～40週齢の老年期では顆粒球数が著しく高値を示した。若年期より低回転型骨量減少を示す P6は R1に比して骨髓の骨芽細胞前駆細胞が減少しており、18週齢において骨密度の有意な低下を認めた。P6の骨髓細胞は若年期より顆粒球造血が優位であり、老年期の造血環境が示唆された。また、これら加齢に伴う骨髓環境の変化は脂肪細胞への分化亢進を伴っていた。

④ エストロゲン欠乏と加齢との関係：若年マウスに OVX や精巣摘出を施して性ホルモン欠乏とすると、術後2週において骨髓 B 細胞造血と骨吸収の亢進を呈するが、24～36週齢のマウスあるいは老化が発現した P6では性ホルモン欠乏に対する反応性が緩慢であった。すなわち、高回転型の骨量減少には骨芽細胞の機能亢進を伴っており、骨芽細胞の機能が低下した老年期では E 欠乏による造血と骨吸収のカスケードが進行しにくいと考察される。

結 論

我々は E の低下による骨吸収亢進および加齢による骨形成低下と骨髓環境との関係を検索し、骨代謝に及ぼす性ホルモンと加齢の影響を明らかにした。すなわち、① E の低下は骨髓 B 細胞造血を特異的に亢進させ、この変化は骨髓間質細胞による骨吸収性局所因子の産生増大を促し、骨吸収の亢進につながることを、② E の低下に起因する造血と骨代謝の変動は、 E の補充によりすべて改善されることを、③加齢に伴う骨髓環境の変動は、骨髓顆粒球の増加、B 細胞の減少、脂肪細胞の増加、骨芽細胞前駆細胞の減少を来し、この変動は性ホルモン欠乏による骨量減少と密接な関係があることを、の3点を明らかにした。