

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—

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

太 田 博 明

Estrogen in the Mechanism of Bone Metabolism: Estrogen Deficiency
and the Promotion of Bone Resorption

Hiroaki OHTA

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Keio University, Tokyo

Key words: Estrogen deficiency • Aging • Bone marrow • Hematopoiesis • Bone metabolism

緒 言

閉経や卵巣全摘出によりエストロゲンが低下すると、骨形成の亢進を上回る骨吸収の亢進により高回転型の骨量減少^{1)~3)}が生じ、エストロゲンを補充すると主に骨吸収が抑制され、骨量減少が防止される⁴⁾臨床事実はよく知られている。一方、加齢による低回転型の骨量減少は主に骨形成の低下によって生ずると考えられている。しかし、エストロゲン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。

我々はエストロゲン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、エストロゲン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。また、骨髓造血と骨リモデリングには密接な関係があり⁵⁾⁶⁾、破骨細胞は造血細胞由来であると考えられる骨髓から補充される⁶⁾⁷⁾。さらに、骨髓細胞から産生される各種局所因子が骨リモデリングに影響を及ぼしている^{5)~7)}ことも示唆されている。しかも、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。以上から、エストロゲン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週齢 ddy マウスおよび老化促進モデルマウス senescence accelerated mouse (SAM) を用いて、高回転型および低回転型の骨量減少機構の解明を試みた。すなわち、エストロゲンの低下による骨髓造血能と骨代謝の変化については ddy マウスの OVX により、また加齢による骨髓造血能と骨代謝の変化については各週齢 ddy マウスと SAM を用いて骨髓環境の変化を解析することにより、エストロゲンおよび加齢による骨代謝の変動に関する機序の解明を目指した。

研究方法

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、1.15%カルシウムと0.88%リンを含む普通食(オリエンタル酵母, 東京)を与え、手術後1週間, 2週間, 又は4週間で屠殺した。その際、経時的に子宮を摘出してその重量を秤量

した。血中エストロゲン濃度は、OVX および Sham のいずれも $n=5$ を一括し、HPLC で処理した後、 17β -estradiol (E_2) を RIA にて測定した。また、骨密度の測定は大腿骨を単離し、筋組織と結合織を除去したうえで、Aloka 社製 DCS-600 を用いて Single energy absorptiometry (SXA) により測定した。

2. エストロゲンの骨髄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 E_2 を投与した。手術時、術後2週時、術後4週時と経時的に骨髄細胞を採取し、特異的表面抗原マーカーの発現を B220 (B 細胞)⁸⁾、Gr-1 (顆粒球)⁹⁾、F4/80 (マクロファージ)、Mac-1 (骨髄球全般)¹⁰⁾、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。なお、骨髄細胞は、左右脛骨から Flushing out して採取し、Ammonium chrolide-Tris buffer で赤血球を除去し、PBS にて3回洗浄した。また、OVX への E_2 の投与は術後ただちに背部皮下へ E_2 10 μ g (Innovative Research of America, Toledo, OH) の Slow-releasing pellet を移植した。Flow cytometry は Cyto ACE-150 (Japan Spectroscopic Co. Ltd., Tokyo) を用いた。FITC-conjugated のモノクローナル抗体の B220、Gr-1 および IgM μ 鎖は PharMingen (San Diego, CA) から、F4/80 は Serotec (Oxford, England) から、Mac-1 は Boehringer Mannheim Biochemica (Indianapolis, IN) から各々入手した。

さらにエストロゲンの造血調節作用を *in vitro* で解析するために、Nishikawa et al.¹¹⁾ の方法により8週齢 ddy マウス骨髄細胞と骨髄間質細胞株 (ST2) を E_2 存在・非存在下で5% calf serum を加えた Phenol red-free の RRMI 1640 (GIBCO BRC, Gaithersburg, MD) にて14日間培養し、B細胞の分化を B220 抗体を用いて Flow cytometry 解析した。また、B細胞株 (DW) と ST2細胞を3日間共培養し、骨吸収性局所因子である IL-6 の産生を ELISA にて測定した。

3. 加齢に伴う骨代謝および骨髄造血の解析

8週から80週の各週齢マウス的大腿骨を摘出

し、HE 標本を作製のうえ、遠位骨幹端部 (Metaphysis) における骨梁の加齢変化を検討するために、Bone volume/Tissue volume (%) を算出した。また脛骨より骨髄細胞を採取し、有核細胞数を計測するとともに、OVX マウスと同様に各種表面抗原マーカーを用いて Flow cytometry による解析を行った。

さらに、大腿骨を用いて GMA 樹脂包埋非脱灰標本を作製のうえ、基質として Naphthol AS-MX phosphate、ジアゾニウム塩として Fast blue RR salt を用いる朝長法によって Alkaline phosphatase (ALP) 染色を行った。また同様の標本を作製し、基質として Naphthol AS-BI phosphate、ジアゾニウム塩として Fast garnet GMC を用いる Pararosanilin 法にて酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色を施行した。

また、大腿骨を EDTA で脱灰後切片を作製し、オスミウム酸で脂肪細胞を固定し、再度薄切のうえ、Oil red O 法にて脂肪染色を行った。さらに一部は超微形態学的観察にも供した。

4. 老化促進マウスの骨代謝および骨髄造血の解析

SAM の老化は各種病態がある¹²⁾が、老年期より骨量の低下を自然発症し、老年性骨粗鬆症の病態を呈する P6 と、コントロールとして高齢になるまで骨代謝上、正常の老化を示す R1 の各7週齢から36週齢を用い、骨髄細胞の Flow cytometry 解析を行うと同時に骨密度の測定を行った。また、屠殺8日前と2日前に Oxytetracycline 30mg/kg と Calcein 5mg/kg を各々標識し、大腿骨を摘出したうえで非脱灰標本を作製し、海綿骨組織形態計測を行った。すなわち、骨形成能としては Bone surface 当たりの Bone formation rate である骨形成率¹³⁾¹⁴⁾を、また骨吸収能としては Bone surface 当たりの Eroded surface である骨吸収面¹³⁾¹⁴⁾を計測した。さらに血液・尿生化学検査として骨形成マーカーの血清オステオカルシン値を Biomedical Technology 社製キットにて RIA により、骨吸収マーカーの尿中ピリジノリン値を Metra 社製キットを用いて EIA により各々測定

した。

さらに骨芽細胞前駆細胞の同定は、P6およびR1から採取した骨髓細胞を7日間培養し、コロニー形成法 Colony forming unit in fibroblasts (CFU-F)¹⁵⁾¹⁶⁾によるALP染色により、また骨芽細胞前駆細胞の脂肪細胞への分化はIndomethacinおよびHydrocortisonの添加にて骨髓細胞を8日間培養して脂肪細胞の誘導¹⁷⁾を行い、Oil red O法による脂肪染色により各々解析した。

成績および考察

1. OVX マウスにおける骨代謝機構

OVX 群ではコントロールである偽手術を行った Sham 群同様、体重の経時的増加を認めたが、両群間には有意差がなかった(図1)。

一方、子宮重量は Sham 群ではほとんど変動がないのに比べ、OVX 群では1週目より約1/4に有意($p<0.01$)に低下し、それは4週目まで持続した(図1)。また OVX ないし Sham 後2週時の血清 E_2 値は、OVX 群が7.8pg/ml, Sham 群が17.8 pg/ml と、OVX 群で有意に低値であった。

Sham 群および OVX 群の術後4週目の大腿骨遠位骨幹端部の HE 標本を観察すると、Sham 群では成長軟骨板に接する豊富な1次海綿骨とそれに続く2次海綿骨の発達が認められた。しかし OVX 群では1次海綿骨は狭小化し、発達に乏しく、2次海綿骨はほとんど消失し、明らかな骨梁の減少を認めた。そこで、大腿骨骨密度をSXAにて実際に測定してみると、術後1週時には差異を認めなかったが、2週時から OVX 群では Sham 群に比べ骨密度の有意な減少が認められた(図

2)。また、OVX 直後から0.01 μ g/日の E_2 を背部皮下から Infusion pump にて4週間補充すると、骨密度は減少せず、Sham 群とほぼ同じ骨密度を呈した(図3)。

以上から、OVX マウスでは子宮重量の低下と血清 E_2 値の低下が生じており、さらに骨梁の減少、骨密度の減少など、骨量の低下が認められた。また、エストロゲンの補充により骨量は維持され、OVX マウスは高回転型の閉経後骨粗鬆症モデルとして有用であり、他の動物に比して造血系や免疫系の解析により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

次にエストロゲンの低下の際にどのような骨髓造血の変化があるのか、OVX マウスの *in vivo* 実験にて解析を試みた。骨髓の有核細胞数は術後1週時には両群ともほぼ同じであったが、2週時、4週時には OVX 群が Sham 群に比し、有意($p<0.05$ および $p<0.01$)に増加し、特に4週時には約2倍の増加を認めた(図4)。OVX により骨髓有核細胞数の増加が認められたが、どのような造血

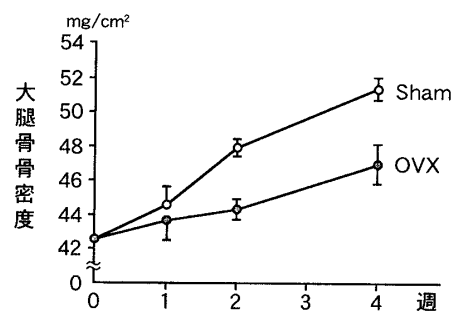


図2 OVX による大腿骨骨密度の経時変化

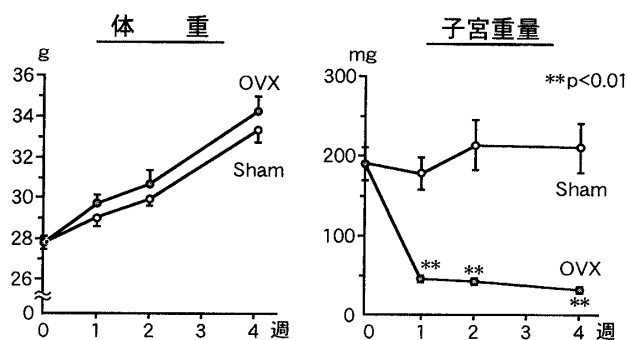


図1 OVX による体重および子宮重量の経時変化

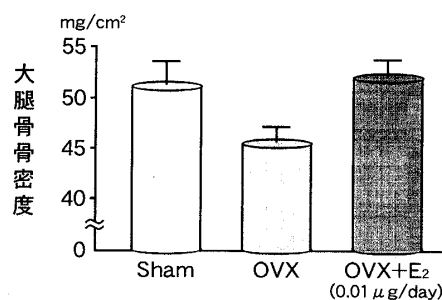


図3 OVX による大腿骨骨密度減少に対するエストロゲンの補充効果(4週時)

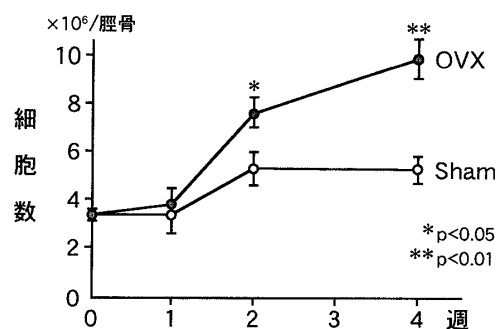


図4 OVXによる骨髓有核細胞数の経時変化

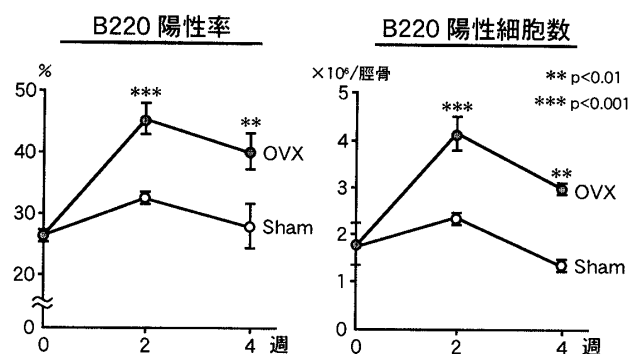


図6 OVXによる骨髓B細胞の経時変化

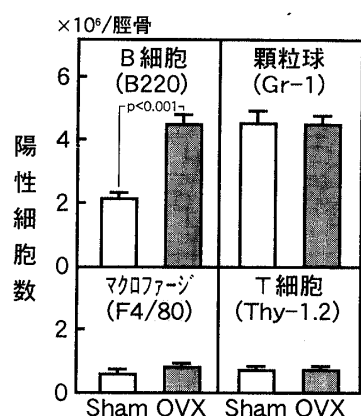


図5 OVXによる骨髓の造血細胞の変化(2週時)

細胞が増加したのかを検討するために、OVX ないし Sham 後 2 週時の骨髓細胞を B 細胞系および顆粒球系造血細胞を認識するモノクローナル抗体である B220 や Gr-1 など 4 種類の表面抗原マーカーを用いて Flow cytometry により解析した。その結果、他の細胞数は OVX および Sham にて変化がなかったが、B220 陽性の B 細胞数だけが、OVX 群では Sham 群に比べ、約 2 倍と有意 ($p < 0.001$) に増加していることが判明した (図 5)。そこで、経時的に B 細胞を検索したところ、陽性率および陽性細胞数はともに OVX 群で Sham 群よりも 2 週時ばかりでなく、4 週時においても有意 ($p < 0.01$) に高率かつ数の増加を認めた (図 6)。

次に陽性率および陽性細胞数の増加が認められた B 細胞はどのような分化過程のものか、Flow cytometry によるヒストグラムから解析した。図 7 に示すごとく、Sham 群では未熟 B 細胞であることを示唆する蛍光強度の弱い Low peak の I と成熟 B 細胞であることを示唆する蛍光強度の強

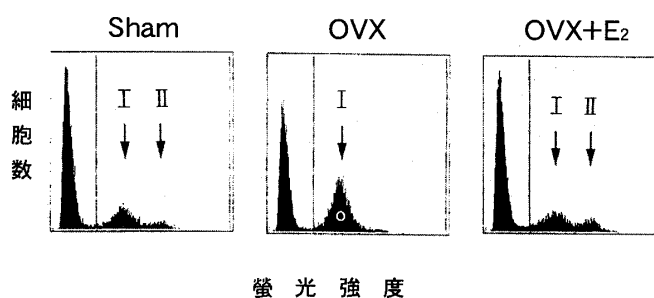


図7 OVXによるB220陽性細胞のパターンの変化とエストロゲンの補充効果(2週時)

い High peak の II の二つの Subpopulation に分かれた。ところが、OVX 群では B220 陽性の細胞数は Sham 群よりも増加していたが、そのほとんどは未熟 B 細胞を示唆する Peak I であった。また OVX 直後から E_2 を補充すると、そのパターンは Sham 群のそれとほとんど同じであった。以上のごとく、OVX により増加した B 細胞は未熟な B 細胞であることが示唆された。

それをさらに確認するために行った成熟 B 細胞の細胞表面に特異的に出現する IgM μ 鎖と B220 抗体による二重染色 Flow cytometry では、図 8 のごとく、Sham 群と OVX 群のドットパターンに違いを認めた。すなわち右下、つまり B220 陽性、 μ 陰性であることを示すものが、Sham 群では 16.5% であったのが OVX 群では 33.0% と、未熟 B 細胞が OVX によりちょうど 2 倍に増加することが明らかとなった。

なお、性腺低形成マウスにおいても未熟 B 細胞が OVX 同様、著明に増加しており、この B 細胞の増加は E_2 の投与で正常マウスレベルに戻ると

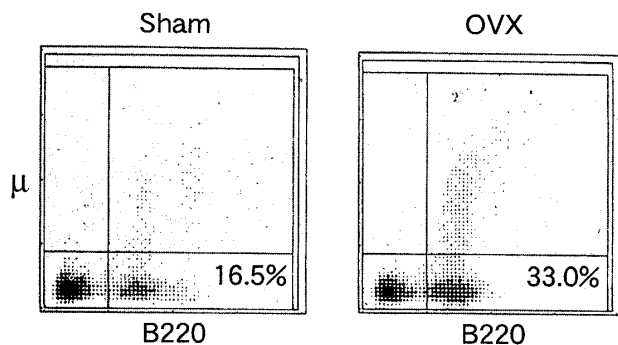


図8 B220およびIgM μ 鎖による二重染色パターン (2週時)

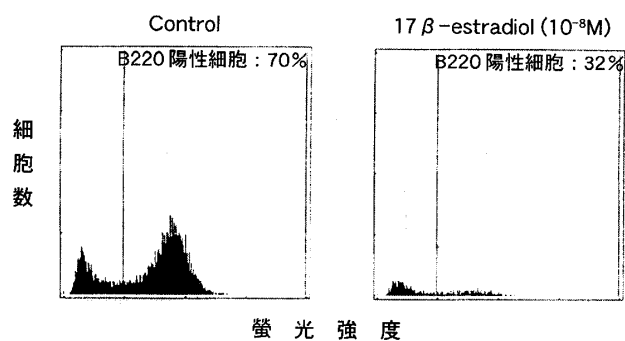


図9 エストロゲンのB細胞造血抑制作用 (ST2と骨髄細胞の共存培養) (1)

いう報告¹⁸⁾がある。一方、正常マウスにE₂を過剰投与すると未熟B細胞の著しい減少が認められるが、高エストロゲン状態である妊娠マウスでも未熟B細胞の著しい減少が観察される¹⁹⁾といわれており、高エストロゲン状態ではOVXマウスと逆の現象が認められる。エストロゲンレベルの変動は骨髄造血に影響を与え、B細胞の変動を促すものとする。

以上から、エストロゲンの存在下で生じているB細胞の増殖・分化がOVXなどのエストロゲンの欠乏時には抑制され、未熟B細胞の選択的蓄積が生じている可能性が示唆される。またB細胞の分化過程は、造血幹細胞由来のB前駆細胞が骨髄間質細胞に接着依存して増殖する初期分化過程と、間質細胞が産生するIL-7に依存して増殖・分化する後期の分化過程に大別される。上記の *in vivo* の実験にてエストロゲン欠乏時には未熟なB細胞の選択蓄積があったことから、B細胞の初期分化過程にエストロゲンが関与していることが示唆されるが、エストロゲンのB細胞分化に対する作用の解析には *in vitro* での検討が必要となる。

そこで添加したE₂の効果を調べるために、骨髄間質細胞株ST2と8週齢ddyマウスの骨髄細胞の共存培養を行い、E₂添加の有無で検討した。その結果、図9のごとく、左のE₂無添加のコントロールではB220陽性細胞数は70%であったのに比し、右の10⁻⁸MのE₂添加ではB220陽性細胞は32%と半減した。さらにE₂添加、無添加でB220陽性細胞数をカウントすると、E₂はB細胞陽性細胞

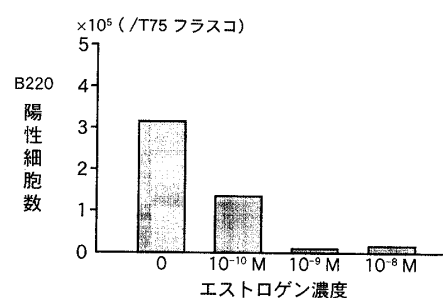


図10 エストロゲンのB細胞造血抑制作用 (ST2と骨髄細胞の共存培養) (2)

数をほぼ用量依存的に抑制した(図10)。

E₂はB細胞へ直接作用して増殖・分化を抑制するのではなく、骨髄間質細胞を介した間接的な機序によりB細胞系の増殖・分化を抑制していると考えている。その機序としては、骨髄間質細胞上に発現しているVCAM-1を主とする接着分子やIL-7を代表とする各種の局所因子の関与が考えられる。VCAM-1はB細胞の分化に必須の接着分子であるが、破骨細胞の形成にも関与し、骨吸収促進因子が骨髄間質細胞のVCAM-1を上昇させ、その中和抗体によりVCAM-1を阻害すると破骨細胞形成が抑制される²⁰⁾ことが最近見出されている。したがって、エストロゲンが骨髄間質細胞に作用して、これらの接着分子や局所因子の発現・産生を調節し、B細胞や破骨細胞の分化を抑制している可能性が考えられる。また最近、Tanaka et al.²¹⁾は活性化T細胞が骨芽細胞に接着するとIL-1やIL-6の産生を誘導することを報告しているが、リンパ球が骨髄間質細胞や骨芽細胞に接着すると骨吸収促進因子の産生が促されることも明ら

かになっている。

次にエストロゲン欠乏時の未熟 B 細胞の蓄積が骨代謝にどのような影響を与えるか検討すべく行った ST2 と未熟 B 細胞株 DW34 の共存培養結果は、ST2 細胞のみの培養では IL-6 の産生は認められなかったが、DW34 細胞の存在下では、その細胞数に応じて IL-6 の産生は抑制された (図11)。IL-6 の過剰産生は骨吸収の亢進を来することが知られている。したがって、骨髄での造血細胞である B 細胞の変化が骨吸収亢進に関与する可能性が示唆されると同時に、エストロゲンの造血調節作用と骨代謝調節作用との関連性が示唆される。

3. 各種週齢 ddy マウスの加齢に伴う骨代謝および骨髄造血の変化

正常 ddy マウスの大腿骨遠位骨幹端部における骨梁の加齢変化を Bone volume/Tissue volume (%) で計測し、検討した。その結果、27 週齢では 7 週齢の約 1/3 となり、38 週齢では約 1/9 と明らかな加齢変化を認めた (図12)。

骨芽細胞はその表現形質の一つとして ALP 活

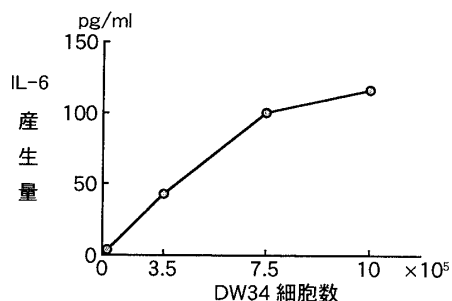


図11 B 細胞数による IL-6 産生量の変化 (ST2 と DW34 の共存培養)

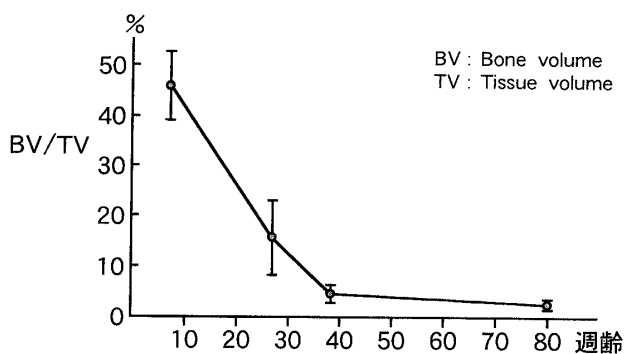


図12 正常 ddy マウスの大腿骨遠位骨幹端部における骨梁の加齢変化

性を有しているので、ddy マウス大腿骨切片に ALP 染色を行い、骨芽細胞を観察した。8 週齢では 1 次海綿骨表面に紫色の ALP 活性が陽性に染色され、これらの細胞は骨芽細胞と同定された。38 週齢においても同様に ALP 陽性に染色されているが、1 次海綿骨の減少に伴い、切片上の ALP 陽性部位は減少を認めた。すなわち、加齢により ALP 陽性を呈する部位は減少し、骨芽細胞数の減少が示唆された。

同様に 8 週齢および 38 週齢の ddy マウス大腿骨切片に破骨細胞の表現形質の一つである TRAP を染色し、破骨細胞を観察した。その結果、8 週齢では 1 次海綿骨ばかりでなく、2 次海綿骨にも赤色の TRAP 陽性細胞、すなわち破骨細胞が観察された。ところが 38 週齢では、海綿骨も著明に欠落しているが、TRAP 陽性細胞も著明に減少しており、加齢により破骨細胞も減少を認めた。

次に、Oil red O 法にて脂肪染色を行うと、7 週齢では茶褐色に染色される脂肪細胞は皆無であった。しかし、27 週齢では骨髄内の至るところに茶褐色に染色された脂肪細胞が散見され、加齢によって骨髄内に脂肪細胞が出現し、それが増加することが判明した。これらの脂肪細胞を電顕的に観察してみると、加齢が進むと増加した脂肪細胞は骨基質に直接接触し、骨代謝を営む細胞の接着を阻止するがごとき像が認められた。

以上の正常 ddy マウスの加齢に伴う形態および組織化学的観察結果をまとめてみると、加齢により骨梁の減少が認められ、その背景には ALP 陽性細胞と TRAP 陽性細胞の減少および脂肪細胞の増加が認められた。これらのことは造血においては骨芽細胞数の減少が、骨代謝においては骨芽細胞および破骨細胞の機能の低下が各々示唆され、加齢による骨代謝の低下が示唆された。

4. 老化促進モデルマウスにおける骨代謝および骨髄造血の変化

加齢による骨代謝と骨髄造血の変化をさらに解析するために、老化促進モデルマウス SAM を用いた。SAM マウスの大腿骨骨密度は、若年期より老年性骨粗鬆症の病態を呈する P6 の骨密度は骨代謝上、正常の老化を示す R1 に比べ、18 週齢から

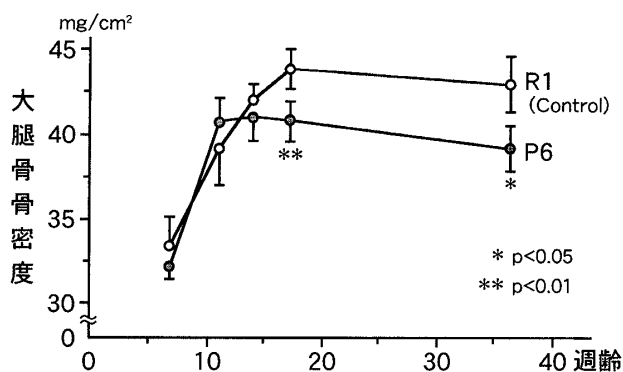


図13 SAM マウスにおける大腿骨骨密度の加齢変化

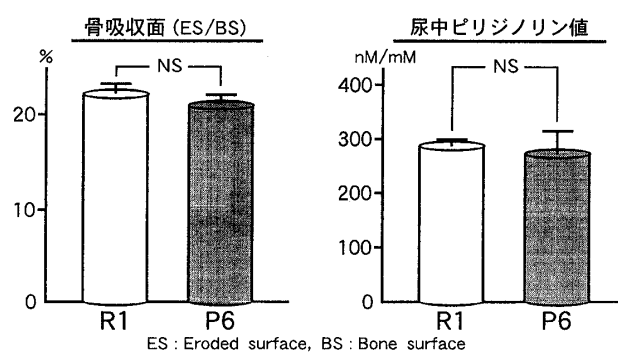


図15 SAM マウスにおける骨吸収能(18週齢)

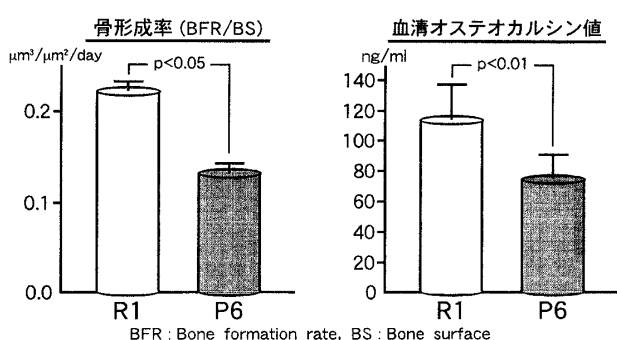


図14 SAM マウスにおける骨形成能(18週齢)

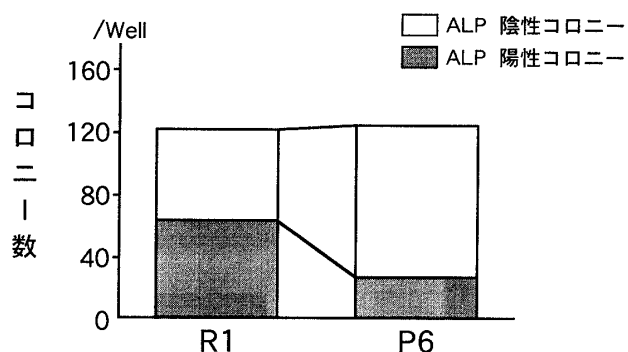


図16 SAM マウスの骨髄培養における CFU-F コロニー数

有意な減少が認められた(図13). 次にこれらの18週齢 SAM マウスの骨代謝にはどのような変化が起きているか, 検索を行った. その結果, 骨表面当たりの骨形成率と骨形成マーカーである血清オステオカルシン値は P6では R1に比べて, ともに有意な低下を認めた(図14). すなわち, 骨密度の有意な減少を認める18週齢では, P6はコントロールの R1よりも骨形成能が低下していることが示唆された. また骨表面当たりの骨吸収面と骨吸収マーカーである尿中ピリジノリン値は P6と R1の間で有意差は認められなかった(図15). このことは骨密度の減少を来している18週齢の P6では骨吸収の亢進は認められないということを示唆するものである.

次に骨密度に差を認める18週齢の P6と R1から骨髄細胞を採取し, ALP 染色を施し, ALP 陽性コロニーと陰性コロニーをカウントした.

なお, 本実験のように骨髄細胞を低密度で培養すると, 線維芽細胞様細胞からなるコロニーが形成される. これらは CFU-F と呼ばれ, この中に

ALP 陽性の骨芽細胞前駆細胞が含まれる. 結果として, ALP 陽性コロニー数, すなわち骨芽細胞前駆細胞に匹敵するものが, コントロールの R1に比べ P6では著明に減少していた(図16). しかし, ALP 陰性コロニー数は P6では逆に著明に増加しており(図16), 骨芽細胞前駆細胞以外の細胞が増加しているということになる.

加齢による骨芽細胞機能の低下のメカニズムとしては, 骨髄内では加齢により間葉系幹細胞由来の脂肪細胞の割合が増加し, 骨芽細胞の増殖能・分化能は低下するため, 骨形成が低下すると考えられている.

そこで, P6で増加を認めた ALP 陰性の骨芽細胞前駆細胞以外の細胞は何かということを検索する目的で, 脂肪細胞の誘導培養実験を試みた. その結果, R1では Oil red O 法にて茶褐色に染まる脂肪細胞の出現はほとんどなかったが, P6では脂肪細胞が顕著に出現していた. このことから P6の骨髄では骨芽細胞前駆細胞の減少とともに脂肪細胞

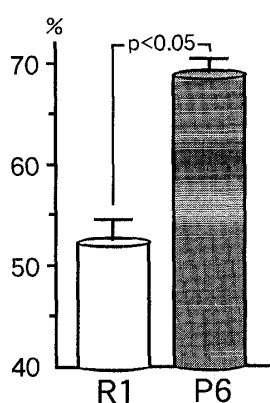


図17 SAM マウスの Gr-1陽性率(18週齢)

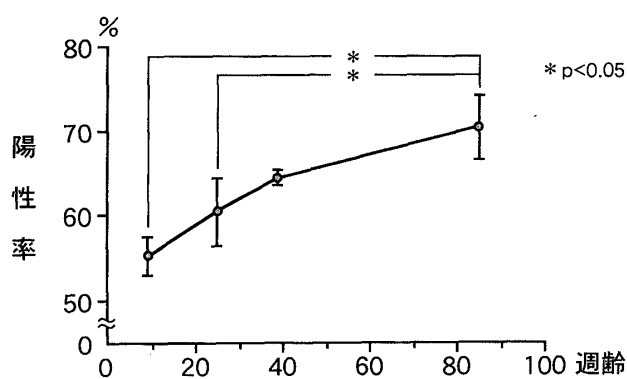


図18 正常 ddy マウスにおける Gr-1陽性率の加齢変化

胞が増加しており、骨髄環境に変化が生じていることが明らかとなった。

P6においてこのような骨代謝および骨髄環境に変化を来している時、骨髄造血はどのような変化を来しているかが次の問題となる。そこで、SAM マウスの5週齢、18週齢、36週齢の骨髄細胞数をカウントしてみた。いずれの週齢においても、コントロールの R1に比べて P6の細胞数は増加していた。さらに増加した骨髄細胞の内訳を調べるために、SAM マウスの骨髄細胞を特異的表面抗原マーカーを用いて Flow cytometry 解析を行った。その結果、P6では R1に比べて骨髄細胞数はやはり増加しており、中でも Gr-1陽性である顆粒球の増加が著明であり、その陽性率は R1よりも有意に高値で、約70%を占めた(図17)。この Gr-1陽性細胞、すなわち顆粒球をさらに詳細に検討するために、R1と P6でヒストグラムを比較してみると、

P6ではコントロールの R1よりも全体として細胞数の増加があり、さらに蛍光強度の弱い未熟な顆粒球を示唆する細胞の増加が特徴的であった。

これらの P6における加齢による骨髄造血の変化についてまとめてみると、骨髄細胞数の増加が認められ、それは Gr-1陽性の顆粒球であり、なおかつその陽性率も増加が認められ、しかもそれは未熟な顆粒球であることが示唆された。

以上は老化促進モデルマウスにおける実験結果であったが、P6同様、ddy マウスの自然な加齢によっても Gr-1陽性率は有意な上昇を認め、その陽性率も80週齢を超えると P6同様、70%まで上昇し、骨髄造血に同じような変化が生じていることが明らかとなった(図18)。

結 論

エストロゲンの低下と加齢による骨量の低下は、いずれも骨髄微小環境における骨髄造血の変化を契機として骨代謝の変化を来すために生じると考える。つまり、エストロゲンが低下すると骨髄内に未熟 B 細胞が増加し、それが骨髄間質細胞に接着すると、骨吸収促進性のサイトカインである IL-6の産生が亢進するなど、骨吸収カスケードが促進され、高回転型の骨代謝動態を呈するために骨量の低下を来す。

また加齢の場合には、骨髄内に顆粒球の増加、骨芽細胞前駆細胞の減少、また骨芽細胞の分化抑制につながる脂肪細胞の増加等が生じ、骨芽細胞機能が低下するので骨形成の低下を来し、低回転型の骨代謝動態を呈するために骨量の低下を来すと考えられる。

以上のごとく、エストロゲンの低下によっても、加齢によっても、骨髄造血の変動により骨代謝に変動を来し、どちらも骨形成を上回る骨吸収があるため骨量の低下を来すが、その骨量低下機構には異なりがある。すなわち、エストロゲンの低下では骨吸収が増大するために、加齢では骨形成が低下するために、各々骨量の低下を来すことが明らかとなった。これらのメカニズムの差の解明は、臨床の現場で病態別の治療を可能にすると考えられる。

具体的には、骨量低下の主因がエストロゲンの

低下にある場合には増大した骨吸収を是正・抑制する骨吸収抑制治療を First choice に、また主因が加齢にある場合には低下した骨形成を是正・促進する骨形成促進治療、すなわち蛋白同化治療を First choice にすべきであることを明らかにした。

謝 辞

第49回日本産科婦人科学会学術講演会においてシンポジウムの講演の機会を与えていただきました武田佳彦日本産科婦人科学会会長をはじめ関係の諸先生方ならびに座長の労をおとりいただいた麻生武志教授および矢内原巧教授に深甚なる謝意を表します。

研究指導者

野澤志朗, 吉村泰典(慶應義塾大学医学部産婦人科学教室), 須田立雄, 宮浦千里(昭和大学歯学部口腔生化学教室)

研究協力者

堀口 文, 宇田川康博, 塚崎克己, 青木大輔, 久布白兼行, 三上幹男, 高松 潔, 牧田和也, 隅田能雄, 増沢利秀, 池田俊之, 小武海成之, 増田あさ子, 杉本 到, 冬城高久, 春日美智子, 岡本雅嗣(慶應義塾大学医学部産婦人科学教室), 長島義男, 照井仁美, 齋藤深雪(慶應義塾大学医学部婦人科病理検査室), 榎本康弘(慶應義塾大学医学部病理学教室)

文 献

1. Ohta H, Makita K, Suda Y, Ikeda T, Masuzawa T, Nozawa S. Influence of oophorectomy on serum levels of sex steroids and bone metabolism and assessment of bone mineral density in lumbar trabecular bone by QCT-C value. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 659-665
2. Ohta H, Masuzawa T, Ikeda T, Suda Y, Makita K, Nozawa S. Which is more osteoporosis-inducing, menopause or oophorectomy? *Bone Miner* 1992; 19: 273-285
3. Ohta H, Ikeda T, Masuzawa T, Makita K, Suda Y, Nozawa S. Differences in axial bone mineral density, serum levels of sex steroids, and bone metabolism between postmenopausal and age- and body size-matched premenopausal subjects. *Bone* 1993; 14: 111-116
4. 太田博明, 野澤志朗. 骨代謝マーカー—その意義・特性と HRT 施行時の有用性—. 麻生武志 編 ホルモン補充療法 Hormone Replacement Therapy: HRT 大阪: 医薬ジャーナル社(in press)
5. Mundy GR, Roodman GD. Osteoclast ontogeny and function. *Bone Miner Res* 1987; 5: 209-281
6. Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* 1992; 13: 66-80
7. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, Koga T, Martin TJ, Suda T. Origin of osteoclast: mature monocytes and macrophages are capable of differentiation into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7260-7264
8. Coffman RL. Surface antigen expression and immunoglobulin gene rearrangement during mouse pre-B cell development. *Immunol Rev* 1986; 69: 5-23
9. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988; 241: 58-62
10. Springer T, Galfre G, Secher DS, Milstein C. Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *Eur J Immunol* 1979; 9: 301-306
11. Nishikawa SI, Ogawa M, Nishikawa S, Kunisada T, Kodama H. B lymphopoiesis on stromal cell clone: stromal cell clones acting on different stages of B cell differentiation. *Eur J Immunol* 1988; 18: 1767-1771
12. 竹田俊男. 老化促進モデルマウス (SAM) の開発. *日病会誌* 1990; 70: 39-43
13. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. *J Bone Miner Res* 1987; 2: 595-610
14. 乗松尋道, 中村利孝, 大野敦也. 骨の組織学的形態計測法(bone histomorphometry)における日本語用語の作成. *日骨形態誌* 1993; 3: 1-6
15. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasyk AF, Rudakova SF, Luria EA, Rudakova TA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 1974; 2: 83-92
16. Friedenstein AJ. Osteogenic stem cells in the bone marrow. *Bone Miner Res* 1990; 7: 243-272
17. Gimble JM, Dorheim M-A, Cheng Q, Medina K, Wang C-S, Jones R, Koren E, Pietrangeli C, Kincade PW. Adipogenesis in a murine bone marrow stromal cell line capable of supporting B lineage lymphocyte growth and proliferation.

- tion: biochemical and molecular characterization. *Eur J Immunol* 1990; 20: 379—387
18. *Smithson G, Beamer WG, Shultz KL, Christianson SW, Shultz LD, Kincade PW.* Increased B lymphopoiesis in genetically sex steroid-deficient hypogonadal (*hpg*) mice. *J Exp Med* 1994; 180: 717—720
19. *Medina KL, Smithson G, Kincade PW.* Suppression of B lymphopoiesis during normal pregnancy. *J Exp Med* 1993; 178: 1507—1515
20. *Feuerbach D, Feyen JHM.* Expression of the cell-adhesion molecule VCAM-1 by stromal cells is necessary for osteoclastogenesis. *FEBS Letters* 1997; 402: 21—24
21. *Tanaka Y, Morimoto I, Nakano Y, Okada Y, Hirota S, Nomura S, Nakamura T, Eto S.* Osteoblasts are regulated by the cellular adhesion through ICAM-1 and VCAM-1. *J Bone Miner Res* 1995; 10: 1462—1469

Synopsis

Primary osteoporosis includes two major disease categories: postmenopausal osteoporosis, caused mainly by decreased levels of estrogen, and senile osteoporosis, caused primarily by the effects of aging. Decreased bone mass is thought to result from high metabolic turnover in the former and low metabolic turnover in the latter. However, the results of our studies using animal models and culture systems suggest that in both types of osteoporosis decreased bone mass is caused by changes in bone metabolism, triggered by altered hematopoiesis in the hematopoietic microenvironment. Decreased levels of estrogen increase the number of immature B-cells in marrow, which adhere to stromal cells and stimulate production of interleukin-6, a cytokine that promotes bone resorption. This series of events stimulates the bone resorption cascade, resulting in high metabolic turnover of bone and consequent loss of bone mass.

Aging is associated with increased granulopoiesis in marrow, decreased numbers of osteoblast precursor cells, and increased numbers of adipocytes, which inhibit osteoblast differentiation. These factors reduce osteoblast activity, causing decreased bone formation, and bone mass decreases because of low-turnover bone metabolism.

Estrogen deficiency and aging can thus lead to a situation where the rate of bone resorption surpasses that of bone formation, resulting in decreased bone mass. However, the causes underlying the decrease in bone mass differ for estrogen deficiency and aging: the former reduces bone mass by increasing bone resorption, whereas the latter reduces bone mass by decreasing bone formation. An understanding of these different mechanisms can lead to disease-specific therapy in clinical practice.

When reduction in bone mass osteoporosis is caused mainly by decreased levels of estrogen, correction and inhibition of increased bone resorption is the therapy of choice, whereas when aging is the primary cause, it should be treated by anabolic therapy designed to correct and promote bone formation.
