

# PTHrP産生腫瘍による高カルシウム血症に対する破骨細胞形成抑制因子(OCIF)の作用とその作用機序に関する検討

防衛医科大学校病院院長 永田直一

## 【緒言】

PTHrP(副甲状腺ホルモン関連ペプチド)はPTH(副甲状腺ホルモン)と受容体を共有し、Ca(カルシウム)代謝に対してPTHとほぼ同一の作用を発揮するペプチドである。PTHrP蛋白およびそのmRNAは、皮膚をはじめ多くの正常組織で検出されている。たとえば乳腺や子宮では妊娠・出産・授乳などの時期によって発現が変化し<sup>1)</sup>、胎児組織では発生段階に対応した発現パターンを示す。副甲状腺に限局した発現を示すPTHとは異なる広範な組織分布を示すことや正常動物の血中ではほとんど検出されないことから、PTHrPはautocrine/paracrine因子として種々の生理作用を有すると考えられている。とりわけ胎児の骨格系の発達には重要な機能を発揮していることが明らかにされている。

哺乳動物のミルク中にはPTHrPが高濃度に含まれており、ミルク中のPTHrP濃度が授乳期間後半に増加するのは多くの動物種に共通した所見である<sup>2)</sup>。この増加パターンはPTHrPに特徴的で、ミルク中総蛋白濃度やCa濃度の経時的変化とは平行せず、ミルク中の他のホルモンや成長因子とも異なることから、PTHrPに特異的な産生・分泌機序の存在が示唆されている。その生理作用に関しては、授乳中母体のCa代謝に対する影響<sup>3)</sup>やPTHrPがオキシトシンと拮抗的に射乳を調節している可能性も示唆されている。一方ミルク中のPTHrPが児に及ぼす影響については否定的見解が多い。私達も出産直後から授乳期間中のラットやマウスを用いて乳腺におけるPTHrPの生理的役割を研究してきたが、明確な結果を得ることはできなかった。すなわち現時点においては、乳腺またはミルク中のPTHrPの作用についてはいずれも仮説の域を出ない。

上述したように乳腺は正常組織においてPTHrPを産生しているだけでなく、腫瘍組織においても大量のPTHrP産生を認める場合がある。同様のことは扁平上皮細胞その他多くの細胞・組織で認められる。血中PTHrPの上昇を示す乳癌や扁平上皮癌の患者は、PTHrPがPTHと同様にホルモンとして全身的に作用する結果、高Ca血症を呈する<sup>4)</sup>。私達は以前PTHrP産生膵臓癌由来細胞株FA-6を樹立した<sup>5)</sup>。この癌細胞を移植されたヌードマウスは、患者と同様に高Ca血症を呈し、悪性腫瘍に伴う高Ca血症のよい動物モデルとなる。この動物モデルに骨作用物質を投与することにより、血清Ca値低下作用などのin vivo効果をヒトにおける治療効果に類似した形で評価できる。本研究では、日本の研究グループにより最近発見された強力な破骨細胞形成抑制因子(OCIFと略す)<sup>6)</sup>を用いて、この物質が悪性腫瘍に伴う高Ca血症を是正しうるかどうかを検討したので、in vitroの基礎的検討成績も含めて報告する。

## 【方法と結果】

[実験1] マウス骨髄細胞培養系での破骨細胞形成および破骨細胞の生存に対するOCIFの影響<sup>7)</sup>

①：強力な破骨細胞形成抑制作用を有するOCIF<sup>6)</sup>が破骨細胞形成過程のどのステップを抑制するかは明確になっていなかったため、この点を以下のような方法で検討した。活性型ビタミンD<sub>3</sub>である1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>とPGE<sub>2</sub>存在下でマウス骨髄細胞培養を行い、OCIFを添加する時期と期間を種々変更した。図1に示すように、OCIF無添加状態(コントロール)では培養4～8日の期間に形成される破骨細胞数が漸増し、8日目をピークに減少した。全培養期間中OCIFが存在する条件下では破骨細胞形成が全く認められなかった。培養初期3日間のみOCIFが添加された場合は、破骨細胞の形成が遅延した。しかし、8日目にはコントロールと同程度に破骨細胞数がピークに達した。培養5日

### 破骨細胞数

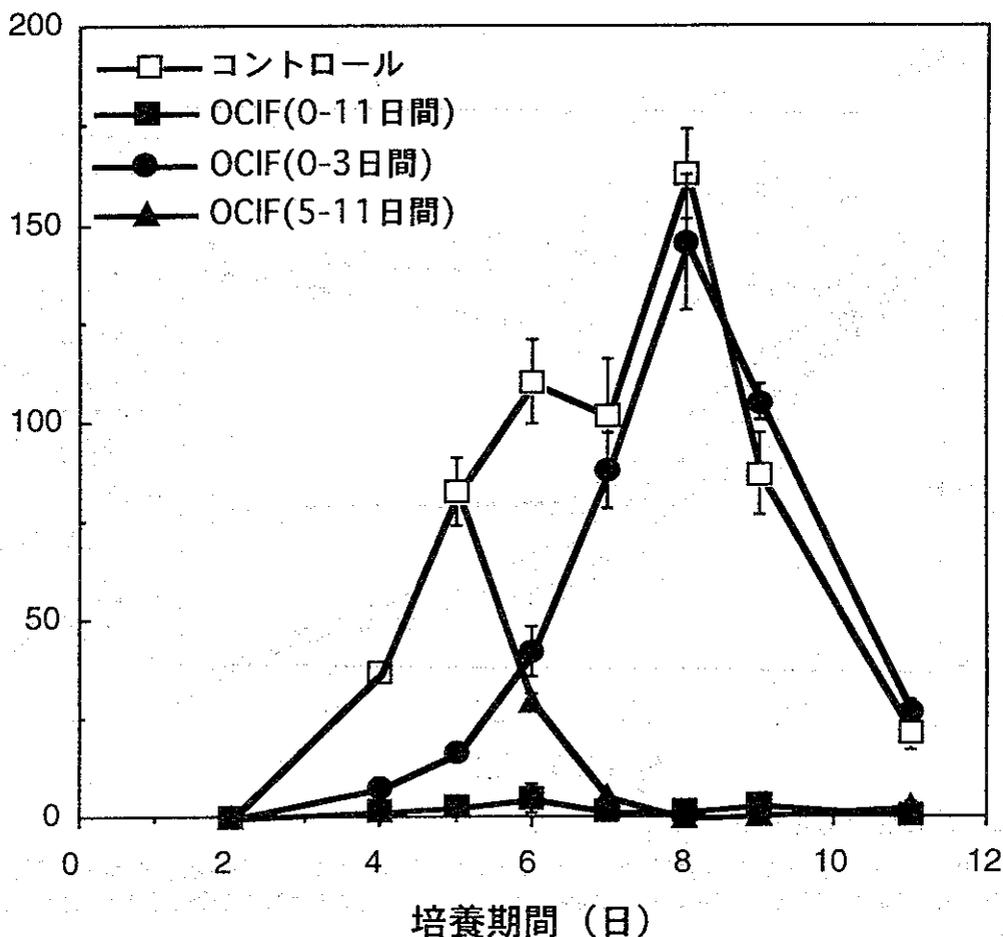


図1. マウス骨髄細胞培養系におけるOCIFの破骨細胞形成抑制作用のtimecourse.

10<sup>-8</sup>Mの1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>と10<sup>-7</sup>MのPGE<sub>2</sub>存在下でマウス骨髄細胞培養を行い、OCIF(20ng/ml)を添加する時期と期間を種々変更した。すなわちOCIF無添加状態をコントロール(□)とし、全培養期間中OCIFが存在する条件(■)と、培養開始後3日間のみOCIFが添加された場合(●)、培養5日目以降OCIFを添加した場合(▲)をそれぞれ比較した。全培養期間中OCIFが存在する条件下では破骨細胞形成が全く認められなかった。培養初期3日間のみOCIFが添加された場合は破骨細胞の形成が遅延したものの、8日目にはコントロールと同程度に破骨細胞数がピークに達した。破骨細胞数が増加しつつあった培養5日目以降OCIFを添加した場合は、破骨細胞数が急激に減少した。

目以降OCIFを添加した場合は、増加しつつあった破骨細胞数が急激に減少した。以上の結果より、骨髄細胞から破骨細胞が形成される過程のすべてのステップをOCIFが抑制すること、その抑制効果は可逆的であることが明らかとなった。

②：本研究開始時には、破骨細胞の生存に対するOCIFの影響は明確になっていなかったので、以下のような実験をおこなった。①と同様に1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>とPGE<sub>2</sub>存在下でマウス骨髄細胞培養を7日間行い、破骨細胞を形成した。図2に示すように、その後2日間は破骨細胞数が有意に減少しないことを確認した。培養7日目以降種々の濃度のOCIFを添加すると、濃度依存性に経時的に破骨細胞が減少した。なおOCIFによる破骨細胞数減少作用は、アポトーシスに参与する酵素であるCaspase-3のinhibitorを同時添加することにより阻害された。これらの所見から、OCIFは破骨細胞形成を抑制することによって破骨細胞数を減少させるだけでなく、破骨細胞のアポトーシスを誘導することによっても破骨細胞数を減少させることが示唆された。成熟破骨細胞の生存期間を短縮させることは、破骨細胞機能を抑制する機序のひとつにもなりうると思われた。

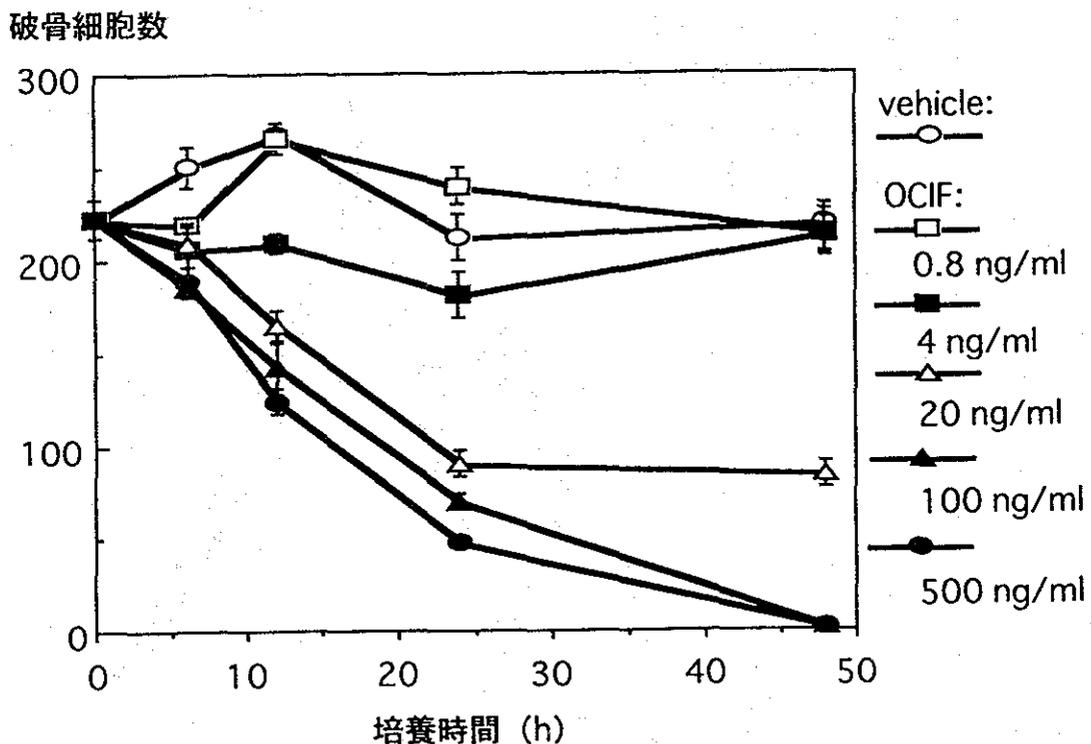


図2. 破骨細胞の生存に対するOCIFの作用。

1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>とPGE<sub>2</sub>存在下で7日間培養後形成された破骨細胞は、コントロール状態では48時間後も崩壊せずに生存している。しかし0.8~500ng/mlのOCIFを添加すると、濃度依存性に経時的に破骨細胞数が減少した。

[実験2] 各種ホルモン・サイトカインのOCIF mRNAレベルに対する影響<sup>8)</sup>

OCIFが強力な破骨細胞形成抑制作用をもつことから、既知の破骨細胞形成促進物質はOCIFの産生を抑制し、破骨細胞形成抑制物質はOCIFの産生を増加させる可能性が考えられた。この仮説を検証するために、マウス初代培養骨芽細胞を10%FCSを含有するαMEMで培養し、confluentになった

後(最後のmedium交換から36時間後)に骨に作用する各種ホルモン・サイトカインを添加した。添加後経時的に培養細胞からRNAを抽出し、Northern blot法でOCIF mRNAレベルを検出した。図3に示すようにコントロール状態では24時間後までOCIFのmRNAレベルに変化は認められなかった。予想した通り、破骨細胞形成を促進する1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>(10<sup>-8</sup>M)、PGE<sub>2</sub>(10<sup>-6</sup>M)、インターロイキン-1α(10ng/ml)、PTH(10<sup>-8</sup>M)の添加後には、一過性もしくは持続的にOCIFのmRNAレベルが低下した。反対に、破骨細胞形成を抑制するTGF-β1(4ng/ml)では、OCIFのmRNAレベルが一過性に上昇した。デキサメサゾン(10<sup>-7</sup>M)の効果は、初期抑制のあと増加傾向を示した。

TGF-β1によるOCIF mRNA増加作用が著明であったので、さらに詳細な検討を行った。濃度効果としては1-10ng/mlで最大となり、時間変化として効果は一過性で、12時間前後をピークにOCIF mRNAレベルの低下を認めた。TGF-β1の作用を各種の骨由来細胞株でも検討したところ、MC3T3-E1やKS483のような骨芽細胞系細胞株でも、またST2のようなストローマ細胞においても、初代培養骨芽細胞と同じように、濃度依存性にOCIFのmRNAレベルを上昇させた。調べたすべての細胞種

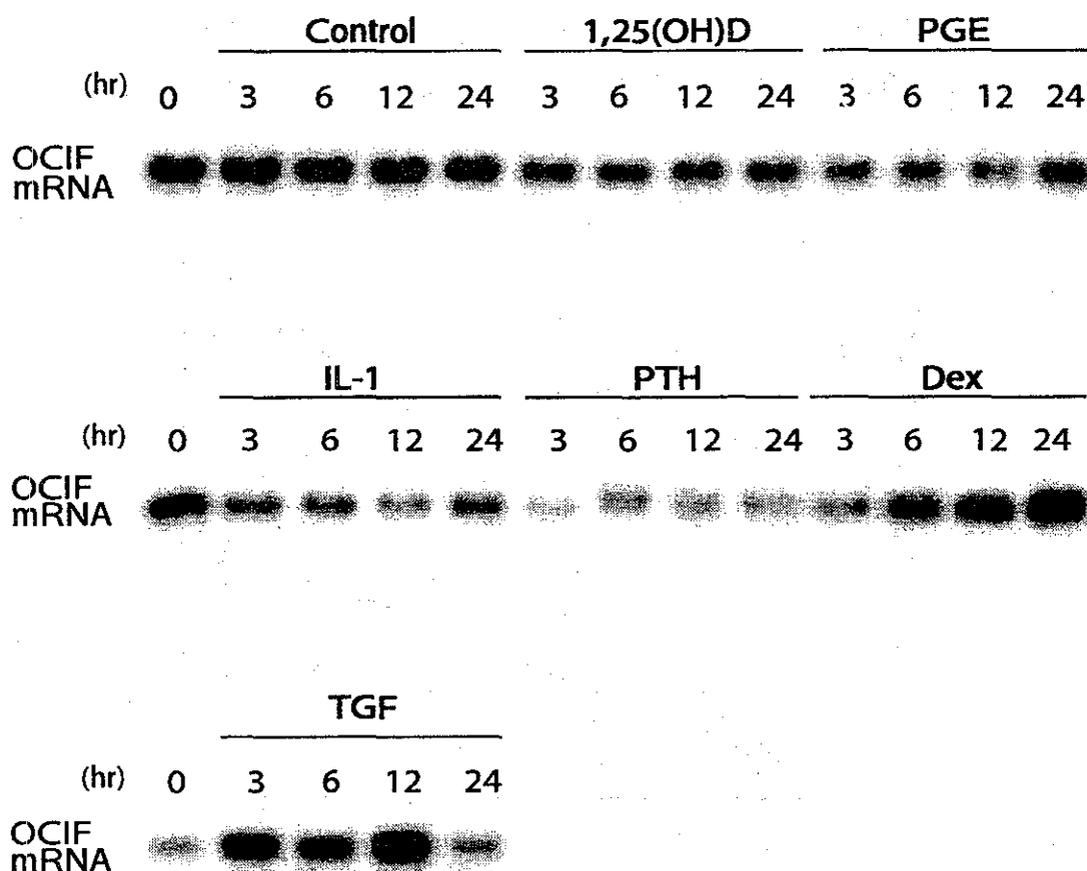


図3. 骨に作用する各種ホルモン・サイトカインのOCIF mRNAレベルに対する影響。

マウス初代培養骨芽細胞を10%FCSを含有するαMEMで培養し、confluentになった後で活性型ビタミンD<sub>3</sub>、PGE<sub>2</sub>、インターロイキン1α、PTH、デキサメサゾン、TGF-β1を添加した。添加後経時的に培養細胞からRNAを抽出し、Northern blot法でOCIF mRNAレベルを検出した。コントロール状態では24時間後までmRNAレベルに変化は認められなかった。破骨細胞形成を促進する活性型ビタミンD<sub>3</sub>、PGE<sub>2</sub>、インターロイキン1α、およびPTHの添加後には、一過性もしくは持続的にOCIFのmRNAレベルが低下した。反対に、破骨細胞形成を抑制するTGF-β1では、OCIFのmRNAレベルが一過性に上昇した。デキサメサゾン添加後は一過性の低下後に上昇を認めた。

においてOCIF mRNA増加の時間変化は類似しており、ピーク時のOCIF mRNAレベルは基礎値の3～4倍であった。

TGF- $\beta$ 1によるOCIF mRNAの著明な増加作用は実験1の②の効果との関連で興味深い。TGF- $\beta$ は破骨細胞のアポトーシスを引き起こすと報告されている。また私達の実験からOCIFが破骨細胞のアポトーシスを誘導する可能性が示された。これらの所見をまとめると、TGF- $\beta$ による破骨細胞のアポトーシス誘導が、OCIFの産生増加を介して発揮されている可能性が示唆される。

#### [実験3] 甲状腺・副甲状腺摘除ラットを用いたOCIF作用の検討<sup>9)</sup>

強力な骨吸収抑制作用をもつ物質、例えばカルシトニン、ビスフォスフォネートなどをin vivoで投与すると、骨量を増加させ破骨細胞数を減少させるだけでなく、血清Ca値低下作用をもつことが知られている。OCIFに関しては骨量を増加させ破骨細胞数を減少させることは報告されていたが、血清Ca値低下作用の有無は不明であった。そこで、以下のような検討を行った。動物モデルとしては実験前日に甲状腺・副甲状腺を摘除したラットを用い、内因性PTHとカルシトニン作用の無い状態で評価した。血清CaとリンはそれぞれOCPC法(カルシウムC-テストワコー、和光純薬)とp-メチルアミノフェノール還元法(ホスファC-テストワコー、和光純薬)により測定した。

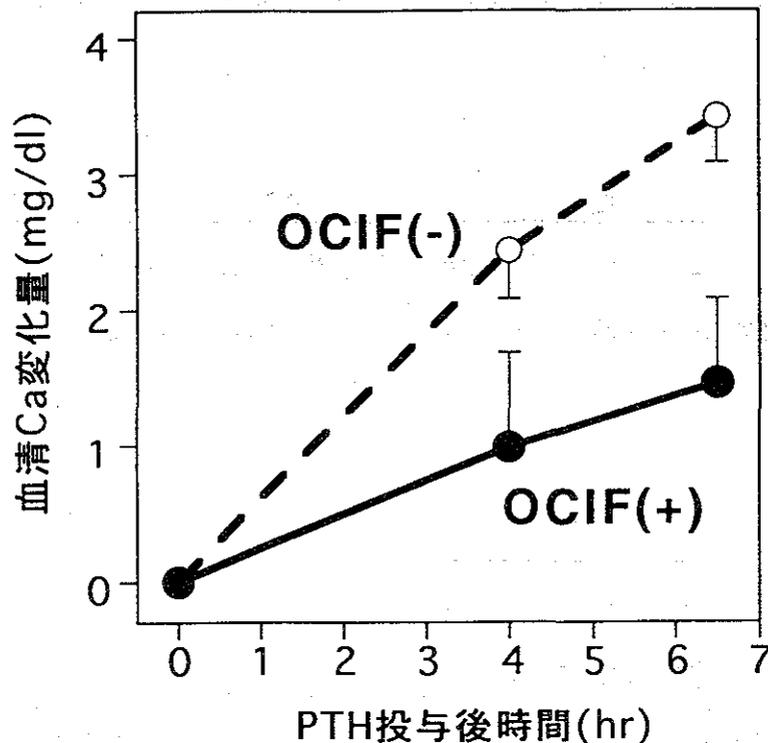


図4. PTHによる血清Ca値上昇作用に対するOCIFの阻害効果。

前日に甲状腺・副甲状腺摘除を施行したラットは実験日に低Ca血症を呈した。浸透圧ミニポンプを用いて外因性PTHを40pmol/hの速度で皮下に持続注入すると血清Ca値は7mg/dl前後から10mg/dl前後にまで上昇した。血清Ca値の基礎値からの変化量を計算すると、コントロールラット(n=4)では6～7時間後に約3mg/dlの増加がみられた。PTHの注入開始時にOCIF(15～20mg/kg)を静脈内投与されたラット(n=10)の血清Ca値上昇はコントロールラットの50%以下に低下していた。\* ; P<0.05、\*\* ; P<0.01

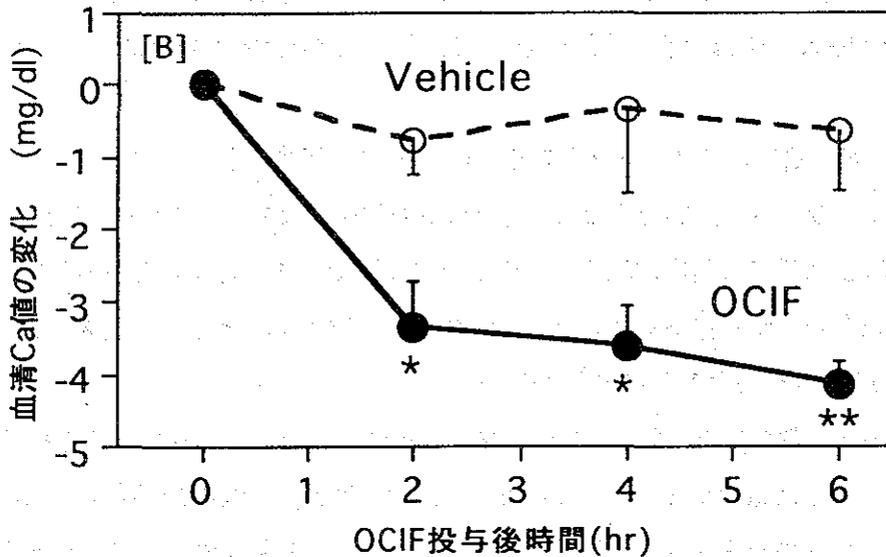
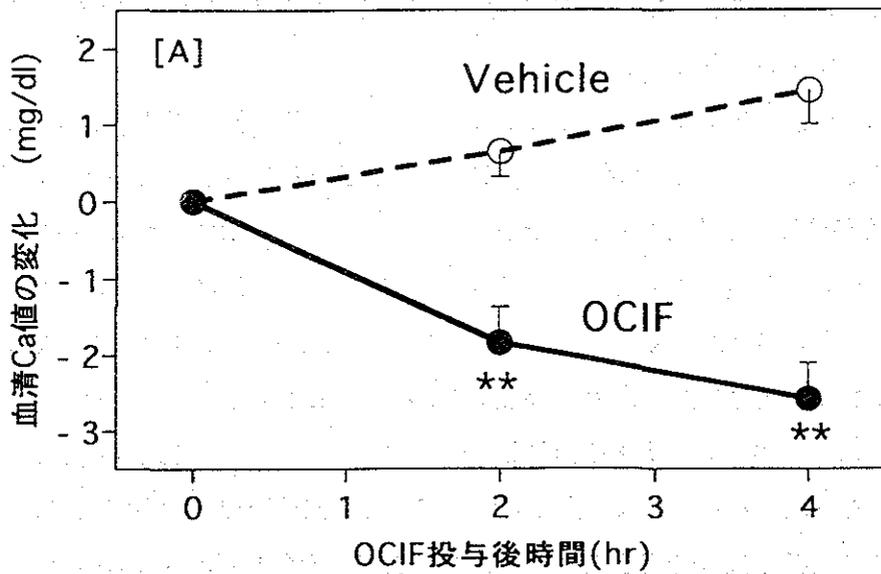


図5. 高Ca血症に対するOCIFの作用.

[A]甲状腺・副甲状腺摘除ラットに図4と同様の方法で外因性PTHを8~12時間持続注入し、高Ca血症状態でOCIF(15~20mg/kg)を静脈内投与した。OCIF投与ラット(n=6)の血清Ca値はコントロール(n=4)と比べ2時間後に有意な低下を示した。

[B]甲状腺・副甲状腺摘除ラットに4~5μg/kgの1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>を12時間間隔で2回皮下注射して高Ca血症状態とし、OCIF(15~20mg/kg)を静脈内投与した。OCIF投与ラット(n=3)の血清Ca値はコントロール(n=3)と比べ2時間後に有意な低下を示した。\* ; P<0.05、\*\* ; P<0.01

① : PTHによる初期の血清Ca値上昇作用が、OCIF投与により阻害されるかどうかを調べるために、浸透圧ミニポンプを用いて外因性PTHを40pmol/hの速度で皮下に持続注入した。2~3時間間隔で採血を行い、この量のPTHが数時間後には血清Ca値を7mg/dl前後から10mg/dl前後にまで上昇させることを確認した。図4に示すように、PTHの注入開始時にOCIFを静脈内投与されたラットの血清Ca値上昇はコントロールラットに比べて明らかに低下していた。すなわちOCIFがPTHによる血清Ca値上昇作用に拮抗することが明らかになった。なおPTHによる血清リン値低下作用はOCIFにより阻

害されなかった。以上より、OCIFはPTH作用全般に拮抗するのではなく、血清Ca値上昇作用を特異的に阻害することが示唆された。

②：外因性PTHを①と同様の方法で持続注入した。8～12時間後、高Ca血症状態(平均血清Ca値 $10.3 \pm 0.7$ mg/dl標準誤差、 $n=12$ )になった時点でOCIFを静脈内投与し、血清Ca値の変化を経時的に調べた。OCIF投与前後の血清Caの変化量を計算すると、図5Aに示すように、投与後2時間の時点で有意な血清Ca値低下作用を認めた。この間外因性PTHの持続注入が続いているため、コントロールラットの血清Ca値は増加傾向を示した。この結果より、OCIFはPTH作用による高Ca血症の出現を防止するだけでなく、既存の高Ca血症の治療効果もあることが明らかになった。

③：実験前日に甲状腺・副甲状腺を摘除した低Ca血症のラットに $4-5\mu\text{g}/\text{kg}$ の $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ を12時間間隔で2回皮下注すると、Ca欠乏食で飼育していても24時間後には血清Ca値が $10.7\text{mg}/\text{dl}$ 以上に上昇した。この状態でOCIFを静脈内投与し、血清Ca値の変化を経時的に調べた。図5Bに示すように、OCIF投与後2時間の時点で有意な血清Ca値低下作用を認めた。6時間後も血清Ca値低下作用は持続していた。このとき同時に尿中Ca排泄量も調べたが、尿中Ca排泄量の増加はみられなかった。すなわちOCIFの血清Ca値低下作用は尿中Ca排泄の促進を介するのではないことが判明した。

#### [実験4] PTHrP産生腫瘍担癌ヌードマウスを用いたOCIF作用の検討<sup>10)</sup>

上述のように、ラットを用いた比較的短時間の実験成績ではOCIFの血清Ca値低下作用が明確に認められた。血清Ca値低下の程度は私達の予想以上に著明で、また効果発現の早さも想像以上であった。そこで、臨床的な悪性腫瘍にともなう高Ca血症の動物モデルとして担癌ヌードマウスを用い、より慢性的な高Ca血症状態でのOCIF作用を検討した。

実験には5～8週齢のBalb/c系雄性ヌードマウスを使用した。慢性的な高Ca血症を惹起するために、高Ca血症を呈した患者から得られたPTHrP産生腫瘍由来細胞株FA-6を用いた。腫瘍塊として冷凍保存していたものを2～3mm角に細切し、ヌードマウス背部の皮下に3～5個埋め込んだ。採血は眼窩静脈叢より行い、Caとリンは実験3と同じ方法で測定し、血清総蛋白はLowry法の変法で測定した。

腫瘍を移植されたヌードマウスの血清Ca濃度は腫瘍サイズの増大とともに上昇し、逆に血中リン濃度は低下した。これはPTHrP産生腫瘍に特徴的な血液生化学所見である。慢性的な高Ca血症状態で実験を行う場合には脱水状態や腎機能を考慮する必要があると思われたが、ヒトと同様の血清Ca値の補正式をヌードマウスに適用できるかどうか不明なため、血清総Ca値を指標に検討を行った。これを補足するために血清総蛋白濃度とクレアチニンも測定し、実験群間で差のないことを確認した。

腫瘍細胞移植2～3週後に、著明な高Ca血症が持続している状態で、OCIFまたはvehicleを腹腔内に投与した。採血は経時的に24時間後まで行った。図6に示すように、OCIF投与後2時間の時点で有意な血清Ca値低下作用を認め、有意差は24時間後まで維持された。血清Ca値が最も低下した時点でも値は $11\text{mg}/\text{dl}$ 以上で正常化はしなかったが、vehicle投与群との血清Ca値の差は最大 $4\text{mg}/\text{dl}$ にお

よんだ。ヌードマウスがあまり飲水せず脱水状態にあったことを考慮すると、OCIFの血清Ca値低下作用は発現が迅速で、しかも非常に強力であると言える。なおOCIF投与後一過性に血清リン値の低下もみられた。これはOCIFにより骨吸収が抑制され、骨からのリン負荷がCa負荷と同様に減少したためと思われる。これはまた、OCIFがPTHrPの血清リン値低下作用を阻害しないことを示す所見でもある。

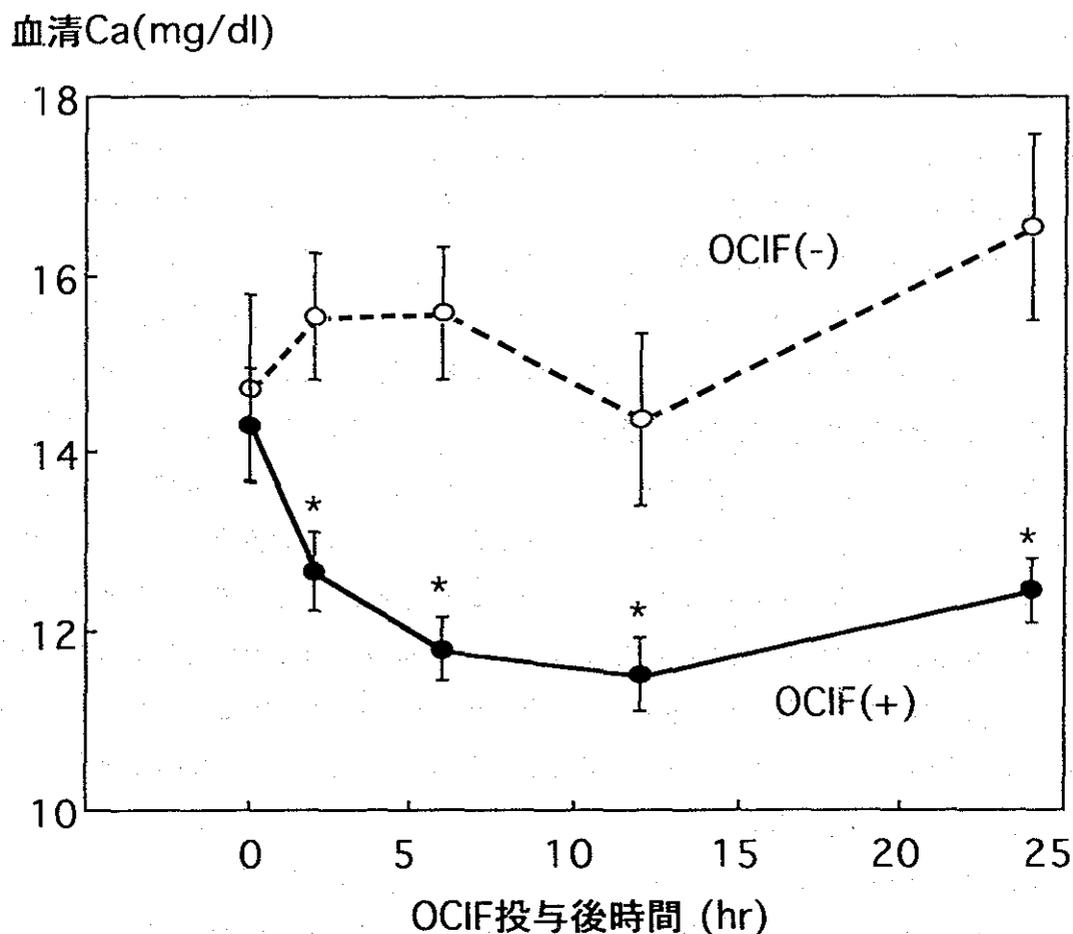


図6. 担癌ヌードマウスの慢性的な高Ca血症に対するOCIFの作用。

Balb/c系雄性ヌードマウスの背部皮下に、PTHrP産生脾臓癌由来細胞株FA-6の腫瘍塊を2～3mm角に細切し3～5個埋め込んだ。腫瘍細胞移植2～3週後に、著明な高Ca血症が出現していることを確認したうえで、OCIF, 20mg/kg (n=11) またはvehicle (n=6) をマウスの腹腔内に投与した。採血は眼窩静脈叢より経時的に24時間後まで行った。OCIF投与後2時間から24時間後まで有意な血清Ca値低下作用を認めた。\* ; P<0.01

## 【考 察】

骨組織では常に骨吸収と骨形成が調和を保ちながら進行し、発育期の骨の形態変化、骨量と骨強度の維持、血清Ca値の恒常性維持などを行っている。骨形成を担う骨芽細胞と骨吸収を行う破骨細胞の機能は微妙に調節されて平衡状態を保っている。骨芽細胞と破骨細胞の密接な関連性は、破骨細胞の形成と機能発現に骨芽細胞系細胞の存在が不可欠であるという所見からも明らかである<sup>11)</sup>。その機序

は以下のように考えられてきた。骨芽細胞系細胞は細胞表面に破骨細胞系細胞に作用する調節因子を発現しており、細胞間の接触を介して破骨細胞の形成と機能を調節している。これまで破骨細胞形成を促進する因子として活性型ビタミンD<sub>3</sub>、PTH、PGE<sub>2</sub>、インターロイキン1など多くのホルモン・サイトカインが知られているが、いずれも骨芽細胞系細胞を介して作用する。すなわち、これら骨に作用する生理活性物質は破骨細胞分化因子(osteoclast differentiation factor; ODF)という仮想因子を誘導することによって破骨細胞系細胞に作用する。多数の研究者の努力にもかかわらず、この仮想因子はごく最近まで同定されていなかった。

1997年Tsudaら<sup>6)</sup>はヒト胎児肺線維芽細胞由来細胞株の培養上清中から骨髓細胞培養系における破骨細胞形成を抑制する蛋白質を精製し、OCIFと命名して報告した。日本の研究グループとは別個に、アメリカのSimonetらも強力な破骨細胞形成抑制物質を見だし、osteoprotegerin(OPG)と名付けて報告した<sup>12)</sup>。全く異なるルートではほぼ同じ時期に同定されたOCIFとOPGは同一物質であった。OCIF/OPG(以下OCIFと略)は380アミノ酸からなる蛋白質で、TNFレセプターファミリーに属する可溶性のメンバーである。これをラットやマウスに投与したり内因性に強発現させると、骨量が著明に増加し破骨細胞数が減少することが示され、破骨細胞形成抑制効果がin vitroのみでなくin vivoでも確認された<sup>12)</sup>。OCIF研究の延長として1998年には、OCIF結合分子であるODF(OPGLともいう)がついに同定された。ODFは316アミノ酸からなるTNFリガンドファミリーに属する膜結合型の蛋白質で、想定されていたように骨芽細胞系細胞の非存在下でも作用する強力な破骨細胞形成誘導因子であることが証明された。

本報告書に述べた私達のOCIFに関する研究は、OCIF作用の詳細がまだ十分明らかにされる以前に始められ、ODFの同定に関する論文が発表される以前にほとんどのデータが出揃ったものである。私達の実験結果の意義づけを明確にするために、本研究終了以降に明らかにされたOCIFとODFに関する知見も含めて以下に考察を考える。

#### (1) 破骨細胞の形成と生存に対するOCIFに作用について：

最近の研究でODFは破骨細胞の形成誘導だけでなく、破骨細胞の活性化や破骨細胞の生存にも不可欠の因子であることが明らかにされている。OCIFはODFと結合することによりODFの作用を阻害するので、OCIFが破骨細胞形成、破骨細胞活性化、破骨細胞の生存のすべてを抑制することは容易に推定される。私達が実験1で示した結果は、OCIFが破骨細胞形成過程のすべてのステップを抑制すること、そして破骨細胞のアポトーシスを誘導することによってその生存期間を短くし破骨細胞数を減少させるということである。他の研究者によってOCIFが破骨細胞の活性化を抑制することも既に報告されている。いずれの知見も、現在のODF-OCIFシステムの理解によく合致する。今後の研究で明らかにされるべき点のひとつは、これら多彩なOCIFの作用のいずれがin vivoにおける骨吸収抑制作用の主要機序であるかということである。この疑問に答えるには、in vitroでの詳細な用量-反応性実験やin vivoでの破骨細胞の形態学的研究が必要と思われる。

#### (2) 骨に作用するホルモン・サイトカインのOCIF mRNAレベルに対する影響：

OCIFの結合相手であるODFは破骨細胞形成を支持するストローマ細胞や骨芽細胞系細胞表面に

発現している。一方OCIFのmRNAもストローマ細胞や骨芽細胞系細胞に発現している。OCIFとODFは相互に作用を打ち消し合う関係にあるので、骨に作用する種々の因子がOCIFまたはODFのいずれか一方のみを調節しているのか、あるいは両方を調節しているのかは興味ある点である。ODFのmRNAレベルは1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>、PTH、PGF<sub>2</sub>、インターロイキン11などin vitroで破骨細胞形成を誘導する因子の添加によって増加することが示されている。そこで実験2において、破骨細胞形成促進物質はOCIFの産生を抑制し破骨細胞形成抑制物質はOCIFの産生を増加させるかどうか検討した。破骨細胞形成を促進するホルモン・サイトカインとしては、1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>、PGE<sub>2</sub>、インターロイキン1α、PTHを、破骨細胞形成抑制物質としてはTGF-βを選んだ。前4者の添加後にOCIFのmRNAレベルが低下したことにより、破骨細胞形成の誘導はODFの発現増加とOCIFの発現低下の相加作用で行われていることが示唆された。破骨細胞形成の抑制についても、ODFの発現低下とOCIFの発現増加の両者が寄与している可能性が高い。しかし生理的状态で、より鋭敏に産生を調節され破骨細胞形成を制御しているのがOCIFとODFのいずれであるかは、今後検討を要する課題である。またOCIFとODFの発現が相反的に制御されているとすれば、それを調節している共通の機序が何であるのか興味をもたれる。

### (3) 骨吸収因子による血清Ca値上昇に対するOCIFの抑制作用：

PTHや1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>をin vivoでラットやマウスに投与すると高Ca血症が惹起される。PTHや1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>はODFの発現を増加させるので、ODF自体に血清Ca値上昇作用があるかどうか興味のある点であった。マウスに可溶性のODFを投与した最近の報告によれば、ODFの用量依存性に血清Ca値を上昇させた。これらを総合すると以下のような推論が成立する。すなわちPTHや1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>による血清Ca値上昇効果のすべて、またはその一部がODF作用を介して発現しているとすれば、それに対応した部分はOCIFによって阻害されるはずである。実験3では甲状腺・副甲状腺摘除ラットを用いてこの仮説を検証した。甲状腺・副甲状腺摘除動物を用いる利点は、①血清Ca値の変化に応じて分泌される内因性PTHとカルシトニンの代償作用を排除できること、②骨代謝回転が低下した状態で実験を開始できることなどである。

PTH持続注入開始後数時間以内にみられる初期の血清Ca値上昇作用は主に破骨細胞の活性化とPTHの腎作用によるとされている。PTHの注入開始と同時にOCIFを静脈内投与されたラットの血清Ca値上昇はコントロールラットに比べて明らかに低下していたことから、OCIFがPTHによる血清Ca値上昇作用に拮抗することは明らかである。またその主要な機序は破骨細胞の活性化抑制と思われる。OCIFの腎作用についてはこれまで検討がなされていないため確定的なことは言えない。

PTHの持続注入によって血清Ca値を上昇させ、高Ca血症状態にした後でOCIFを投与した場合も、血清Ca値は有意に低下した。生理量以上のPTHが持続的に作用して高Ca血症を呈している状態においては、骨代謝回転亢進だけでなくPTHの腎作用も高Ca血症維持に関与している。したがってOCIFによる血清Ca値低下作用の機序としては、破骨細胞の形成、破骨細胞の活性化、破骨細胞の生存のすべてを抑制した可能性とともに、OCIFが腎に作用した可能性もある。このうちの

どれが主要な機序かは私達の実験結果からは決められない。しかし、OCIF投与後2時間以内に有意な血清Ca値低下作用を認めたことは、短時間で変化しうる過程、おそらく破骨細胞の不活性化にOCIFが作用したことを示唆する。

PTH作用による高Ca血症では骨作用に限定した評価が困難なので、次に1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>投与による高Ca血症状態でのOCIF作用を検討した。PTHと異なり、1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>による高Ca血症では腎作用の関与が少ない、また高Ca血症の維持に腸管からのCa吸収増加がほとんど寄与しないように、甲状腺・副甲状腺摘除ラットを実験期間中Ca欠乏食で飼育した。このような条件下でも、OCIFは投与後2時間の時点で有意な血清Ca値低下作用を示した。したがってOCIFが抑制したのは、PTHと1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>に共通した作用である破骨細胞の活性化過程である可能性が最も高いといえる。OCIFが腎作用を有する可能性については、十分な検討は行っていない。しかしOCIF投与後尿中Ca排泄量の増加がみられなかったことより、OCIFが尿中Ca排泄を増加させることで血清Ca値を低下させている機序は否定できる。

#### (4) PTHrP産生腫瘍担癌ヌードマウスの高Ca血症に対するOCIFの治療効果：

ラットを用いた比較的短時間の実験で見られたOCIFの血清Ca値低下作用が、より慢性的な高Ca血症状態でも認められるかどうか、PTHrP産生腫瘍担癌ヌードマウスを用いて検討した。PTHrP産生腫瘍による高Ca血症は、ヒトの悪性腫瘍にともなう高Ca血症の中で最も頻度の高いものである。PTHrPはPTHと同じ機序、すなわち骨作用と腎作用の両方で血清Ca値を上昇させるので、この治療にはPTHrP/PTHの骨作用と腎作用の両方を抑制できる物質が理想的である。しかし、ビスフォスフォネートのように腎作用はないが強力な骨吸収抑制作用を有する薬物の有効性が、動物実験でも臨床的にも確立している。

OCIFはラットにおいてPTH過剰による高Ca血症に対して有効だったので、PTHrP作用過剰によるマウスの高Ca血症に対しても有効性が期待された。ただし問題点として、担癌ヌードマウスの慢性的高Ca血症では、ヒトの悪性腫瘍による高Ca血症と同様に、全身状態の悪化傾向、脱水状態、腎機能低下などを伴う。このような状態では薬物による血清Ca値低下作用が出にくいおそれがあった。しかし実験結果は明確で、血清Ca値低下効果はOCIF投与後2時間以内の早さで発現し、24時間以上効果が持続した。脱水状態を改善しないまま、しかもPTHrPによる腎でのCa再吸収促進作用が持続していると想定される状況下で認められた血清Ca値の著明な低下は、OCIFの強力な骨吸収抑制作用を立証するものである。

蛋白質であるOCIFの血中半減期は非常に短い。悪性腫瘍による高Ca血症の治療に用いられる既知の骨吸収抑制物質の中では薬物動態などがカルシトニンに近いと思われる。OCIFの効果発現が早い点も、既知の骨吸収抑制物質の中ではカルシトニンに似ている。カルシトニンの主要な作用は、破骨細胞の機能制御(不活化)なので、OCIF作用の時間経過がカルシトニンに類似していれば、OCIFが血清Ca値を低下させる主要な作用機序も破骨細胞の機能制御といえる。一方、OCIF効果の持続時間がカルシトニンより長いとすれば、OCIFが破骨細胞の機能だけでなくその形成過程や

生存を制御する機序も関与していることを示唆する。この点を明確にするためにはカルシトニンとOCIFの効果の比較実験が今後必要と思われる。

## 【結 語】

- (1) PTHrP産生膵臓癌由来細胞株FA-6を移植されたヌードマウスを悪性腫瘍に伴う高Ca血症の動物モデルとして、最近発見された強力な破骨細胞形成抑制因子OCIFが高Ca血症を是正しうるかどうか検討し、その有効性を確認した。
- (2) (1)の実験のための基礎的検討として、甲状腺・副甲状腺摘除ラットを用いた比較的短時間の高Ca血症に対するOCIFの血清Ca値低下作用も検討し、その作用発現が2時間以内と非常に早いことを認めた。
- (3) *in vitro*においてOCIFは破骨細胞形成過程のすべてのステップを抑制し、また破骨細胞の生存期間を短くした。
- (4) 骨に作用するホルモン・サイトカインのOCIFm RNAレベルに対する影響を調べた結果、破骨細胞形成促進物質はOCIF産生を抑制し、破骨細胞形成抑制物質はOCIFの産生を増加させることが示唆された。

なお本研究は共同研究によって行われ、ここで述べた研究成果は参考文献中の7～10の論文としてまとめた。

## 【参考文献】

- 1) 山本通子：PTHrPの生物学的作用。内分泌・糖尿病科 1: 124-131, 1995.
- 2) Yamamoto M, Fisher JE, Thiede M, Caulfield M, Rosenblatt M, Duong LT: Concentrations of parathyroid hormone-related protein in rat milk change with duration of lactation and interval from previous suckling, but not with milk calcium. *Endocrinology* 130: 741-747, 1992.
- 3) Yamamoto M, Duong LT, Fisher JE, Thiede M, Caulfield M, Rosenblatt M: Suckling-mediated increases in urinary phosphate and 3', 5'-cyclic AMP excretion in lactating rats: Possible systemic effects of parathyroid hormone-related protein. *Endocrinology* 129: 2614-2622, 1991.
- 4) 赤津拓彦、永田直一：悪性腫瘍による高カルシウム血症の発症メカニズム。  
*CLINICAL CALCIUM* 7: 462-467, 1997.
- 5) Nagata, N., Akatsu, T., Kugai, N., Yasutomo, Y., Kinoshita, T., Kosano, H., Shimauchi, T., Takatani, O., Ueyama, Y.: The tumor cells (FA-6) established from a pancreatic cancer associated with humoral hypercalcemia of malignancy: a simultaneous production of parathyroid hormone-like activity and trans-

- forming growth factor activity. *Endocrinologica Japonica* 36 : 75-85 ; 1989.
- 6) Tsuda, E., Goto, M., Mochizuki, S., Yano, K., Kobayashi, F., Morinaga, T., Higashio, K. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 234 : 137-142 ; 1997.
  - 7) Akatsu T, Murakami T, Nishikawa M, Ono K, Shimomiya N, Tsuda E, Mochizuki S, Yamaguchi K, Kinoshita M, Higashio K, Yamamoto M, Motoyoshi K, Nagata N : Osteoclastogenesis inhibitory factor suppresses osteoclast survival by interfering the interaction of stromal cells with osteoclast. *BBRC* 250 : 229-234, 1998.
  - 8) Murakami T, Yamamoto M, Ono K, Nishikawa M, Nagata N, Motoyoshi K, Akatsu T : Transforming growth factor- $\beta$ 1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic stromal cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells. *BBRC* 252 : 747-752, 1998.
  - 9) Yamamoto M, Murakami T, Nishikawa M, Tsuda E, Mochizuki S, Higashio K, Akatsu T, Motoyoshi K, Nagata N : Hypocalcemic effect of osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin in the thyroparathyroidectomized rat. *Endocrinology* 139 : 4012-4015, 1998.
  - 10) Akatsu T, Murakami T, Ono K, Nishikawa M, Tsuda E, Mochizuki S, Fujise N, Higashio K, Motoyoshi K, Yamamoto M, Nagata N : Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) exhibits hypocalcemic effects in normal mice and in hypercalcemic nude mice carrying tumors associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *Bone* 23 : 495-498, 1998.
  - 11) Suda T, Takahashi N, Martin TJ : Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* 13 : 66-80, 1992.
  - 12) Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Luthy, R., Nguyen, H. Q., Woodson, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R., Amgen EST program, Boyle, W. J. Osteoprotegerin : a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89 : 309-319 ; 1997.