

2. ビタミンDによる骨代謝調節

Regulation of bone metabolism by vitamin D

高橋 直之・中道 裕子・宇田川信之

Naoyuki Takahashi(所長), Yuko Nakamichi(講師) / 松本歯科大学総合歯科医学研究所,
Nobuyuki Udagawa(教授) / 同 歯学部口腔生化学講座

key words

ビタミンD欠乏はくる病・骨軟化症を発症する。さまざまな遺伝子改変動物の解析は、小腸におけるカルシウム(Ca)吸収の抑制がくる病・骨軟化症の発症にかかわることを示す。一方、 $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ やエルデカルシトールの薬量を長期間投与すると、骨吸収抑制を伴う骨量増加作用を示す。この骨作用において、活性型ビタミンDが破骨細胞・破骨細胞前駆細胞に作用し骨吸収を抑制する可能性と、骨芽細胞に作用し破骨細胞形成支持環境を抑制する可能性が指摘される。

破骨細胞
骨芽細胞
ビタミンD受容体
 $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$
エルデカルシトール

はじめに

ビタミンD₃は紫外線照射によって皮膚で作られる抗くる病因子である。皮膚で作られたビタミンD₃は血流を介して肝臓に運ばれ、肝臓の25水酸化酵素によって25ヒドロキシビタミンD₃ [$25(\text{OH})\text{D}_3$]となる。 $25(\text{OH})\text{D}_3$ はさらに腎臓に運ばれ、 1α 位が水酸化されて活性型ビタミンD₃である $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (カルシトリオール)に代謝される。腎臓から分泌された $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は、核内受容体であるビタミンD受容体(VDR)を介しその作用を発揮する¹⁾²⁾。ビタミンD欠乏やVDRの異常は低Ca血症およびくる病・骨軟化症をもたらす。VDRは小腸、腎臓、副甲状腺、骨などCa代謝を担う組織をはじめ

めとして、皮膚、リンパ球、単球、筋、乳房や下垂体前葉など広範な組織・細胞に発現する。最近、さまざまな組織特異的なVDR欠損マウスが作製され、活性型ビタミンD₃の生理的作用と薬理的作用が明らかになってきた¹⁾。本稿では、骨代謝制御にかかわるビタミンD作用に焦点をあて、ビタミンDが骨組織で何を行っているかを論じた。

骨におけるVDRの分布

造血系細胞をはじめ、さまざまな細胞がVDRを発現している。骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞、軟骨細胞、血管内皮細胞、造血系細胞など、多種類の細胞が骨組織に存在するが、これらの細

胞にVDRが発現することは報告されている¹⁾。実際に、これらの細胞は、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に反応して24水酸化酵素を発現する。すなわち、活性型ビタミンDの標的組織では、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が作用すると $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を分解しようという準備がなされる。これまで、VDR発現細胞を免疫染色で調べる試みはなされてきたが、我々はCell Signaling社の抗体(α VDRmAb, Clone D2K6W)がVDRの免疫染色に極めて有用であることを突き止めた。この抗体を用いた免疫染色は、十二指腸上皮細胞、皮膚毛嚢角化細胞、腎臓尿細管細胞など、活性型ビタミンDの標的細胞で強く発現していること示し、一方、VDR欠損マウスのこれらの組織では結合反応が認められないことより、こ

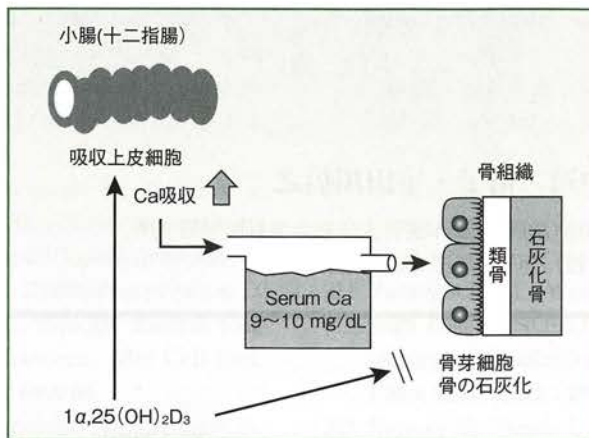


図1 活性型ビタミンD₃の骨組織の石灰化促進作用
 活性型ビタミンDは小腸のCa吸収を促進する。この小腸Ca吸収促進効果を介して骨組織の石灰化が進行する。骨芽細胞に発現するVDRは骨組織の石灰化にはかかわらないと考えられる。

(文献4)5)より引用)

の抗体はVDRの組織レベルでの検出に用いることのできることを確認した。この抗体を用いて骨組織のVDRの分布を解析した。その結果、骨組織において、骨芽細胞と骨細胞がVDRをとりわけ強く発現していることが確認された³⁾。一方、破骨細胞、造血系細胞、肥大軟骨細胞を含む軟骨細胞におけるVDR発現は、この抗体では検出できなかった。以上より、骨表面に存在する骨芽細胞と骨組織内に存在する骨細胞が高くVDRを発現しており、これらの細胞が活性型ビタミンDの骨作用を担っていることが示唆された。

骨芽細胞特異的 VDR欠損マウスの骨所見

骨芽細胞の発現するVDRの役割を明らかにするために、Osterix-Creマウ

スを用いて、骨芽細胞特異的VDR欠損(OB-VDR cOK)マウスを作製した³⁾。このマウスでは、骨芽細胞と骨細胞のVDRのみが特異的に欠失していることを、VDR抗体を用いた免疫染色と、PCR法で確認した。OB-VDR cOKマウスは正常に発育し、骨組織に異常は認められなかった。また、血清のCa、リン、副甲状腺ホルモンおよびfibroblast growth factor 23の値に大きな差異は認められなかった。ビタミンD欠乏は、小児の場合くる病を、成人の場合は骨軟化症を発症する。ともに石灰化不全を呈する。そのため、活性型ビタミンDは骨芽細胞が担う骨の石灰化を直接促進する可能性が指摘されてきた。しかし、OB-VDR cOKマウスの骨の石灰化に異常は認められず、ビタミンD欠乏による骨の石灰化抑制は、ビタミンDの小腸作用(Ca吸収促進作用)に依存

したものであることが示唆された(図1)。VDR欠損マウスは離乳前(3週齢)には異常を示さず、離乳後にくる病・骨軟化症を発症する。VDR欠損マウスに高Ca食を与えると、くる病・骨軟化症は治癒する⁴⁾。また、VDR欠損マウスに腸管でのみVDRを発現するように遺伝子導入すると腸管のCa吸収は回復し、骨の石灰化も正常化する⁵⁾。これらの知見は、小腸のCa吸収が維持されれば、骨の石灰化は正常に行われることを意味する。さらに我々は、cathepsin K Creマウスを用いて破骨細胞特異的VDR欠損(OC-VDR cKO)マウスを作製し、その骨組織を解析した³⁾。OC-VDR cKOも正常に発育し、骨組織に際立った変化を認めなかった。以上の知見は、骨芽細胞系細胞と破骨細胞に発現するVDRは、生理的な石灰化および骨改造にはかかわらないと推定された。一方、軟骨細胞特異的にVDRを欠損させると、胎生期における軟骨組織への血管侵入の遅延と破骨細胞の出現低下し、新生仔期および幼少期の骨量が増加すると報告された⁶⁾。発達期における軟骨細胞のVDRは、破骨細胞形成に重要な役割をもつ可能性が指摘される。

活性型ビタミンDの骨吸収促進作用

低Ca食で飼育したラットにビタミンD₃を投与すると血中Ca濃度が上昇する。また、骨器官培養系に活性型ビタミンD₃を添加すると、骨からCaが放出される。さらに、骨芽細胞と造血系細胞の共存培養系で、活性型ビタミン

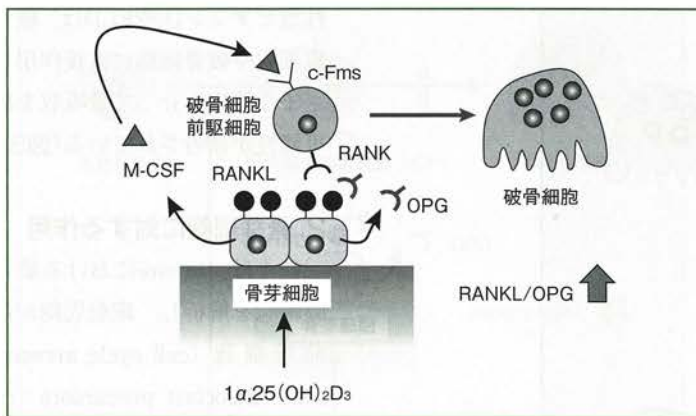


図2 活性型ビタミンD₃の骨吸収促進作用

活性型ビタミンD₃は骨芽細胞が発現するVDRを介して、RANKLの発現を誘導する。また、OPGの発現を抑制する。RANKL/OPG比を増大させ破骨細胞形成を促進する。活性型ビタミンD₃を生体に大量に投与すると、このシステムが作動して骨吸収を誘導する。

(文献2)7)より引用)

D₃は破骨細胞の形成を促進する。これらの知見は、活性型ビタミンDは骨吸収を促進し血清Ca値を上昇させるホルモンであることを示す。1998年、骨芽細胞系細胞（骨髄間質細胞、骨芽細胞、骨細胞など、本稿では骨芽細胞と記す）が発現する破骨細胞分化因子RANKL (receptor activator of NF-κB ligand)が同定され、活性型ビタミンD₃による骨吸収促進機構が明らかとなった²⁷⁾。単球・マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞はRANKLの受容体であるRANKとmacrophage colony-stimulating factor (M-CSF)受容体であるc-Fmsを発現する。破骨細胞前駆細胞は、骨芽細胞が発現するRANKLとM-CSFを認識して破骨細胞に分化する。また、骨芽細胞はRANKLのデコイ(おとり)受容体であるosteoprotegerin (OPG)を分泌する。OPGはRANKLに結合して、RANKL-RANK

相互作用を阻害し、破骨細胞形成を抑制する。活性型ビタミンD₃は、骨芽細胞に作用してRANKLの発現を誘導し、OPGの発現を抑制する。そのため、活性型ビタミンD₃は破骨細胞形成を強く促進する因子として認知されている。c-Fosは破骨細胞前駆細胞が破骨細胞に分化するために必須な転写因子である。c-Fos欠損マウスは、破骨細胞の存在しない重篤な大理石骨病を呈する。このマウスに大量の活性型ビタミンD₃を投与しても高Ca血症は誘導されないため、活性型ビタミンD₃による血清Ca上昇作用の一部は、破骨細胞の形成と活性化を伴う骨吸収誘導であると推定される⁸⁾。また、OB-VDR cOKマウスに活性型ビタミンDを大量に投与しても高Ca血症は誘導されにくい³⁾。活性型ビタミンD₃投与による高Ca血症誘導には骨芽細胞が発現するVDRが重要な役割を担っていると推

定される(図2)。

活性型ビタミンDの骨吸収抑制作用

前述したように活性型ビタミンD₃は骨吸収を促進する因子である。しかしその一方、活性型ビタミンD₃のプロドラッグであるアルファカルシドール[1α(OH)D₃]や活性型ビタミンD₃の類縁体であるエルデカルシトール(ELD)の薬量を長期間投与すると、骨吸収は抑制されその結果骨量は増加する⁹⁾。そのため、1α(OH)D₃やELDが骨粗鬆症治療薬として承認され使用されている¹⁰⁾。1α(OH)D₃やELDの骨量増加作用は、人のみならずマウスやラットでも再現される。この骨吸収抑制を伴う骨量増加作用は、VDR欠損マウスでは認められないため、1α(OH)D₃とELDの骨量増加作用はVDRを介すると考えられる。その機序に関しては、破骨細胞/破骨細胞前駆細胞のVDRに作用し骨吸収を抑制するという説と、骨芽細胞のVDRに作用し骨吸収を抑制するという説が提唱されている。

1. 破骨細胞/破骨細胞前駆細胞に対する作用

活性型ビタミンD₃は破骨細胞の前駆細胞のc-Fosの発現を抑制することが示されている¹¹⁾。interferon βは破骨細胞の分化を抑制する因子である。活性型ビタミンD₃は骨髄マクロファージのinterferon β産生を促進することも報告された¹²⁾。低酸素応答性転写因子であるhypoxia inducible factor 1α

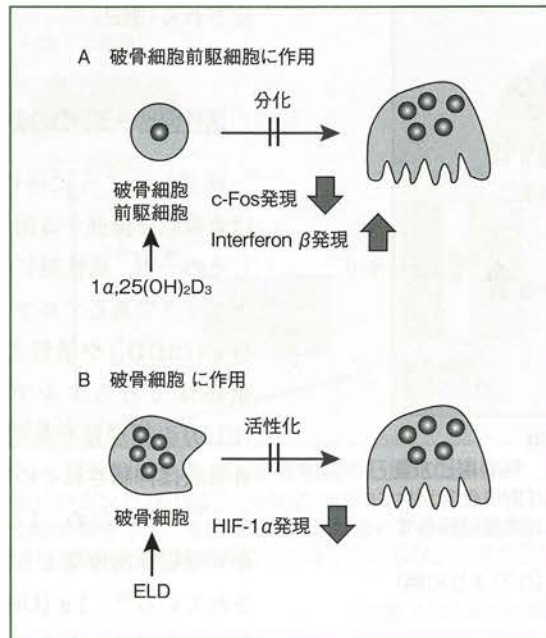


図3 活性型ビタミンD₃の破骨細胞系細胞に対する作用を介する骨吸収抑制作用

- A: 活性型ビタミンD₃は破骨細胞前駆細胞に作用し、c-Fosの発現を抑制する。また、インターフェロンβの発現を促進する。これらの作用を介して、活性型ビタミンD₃は破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化を抑制する可能性が示された。
- B: ELDは破骨細胞に作用し破骨細胞活性化因子であるHIF-1α発現を抑制する。HIF-1α発現抑制を介してELDは破骨細胞の活性化を抑制する可能性が示された。

(文献11)12)14)より引用)

(HIF-1α)は破骨細胞の活性を促進する因子であることが示されている。エストロゲンは、破骨細胞のHIF-1α誘導を抑制して破骨細胞の活性を抑えている。エストロゲンが欠乏すると破骨細胞にHIF-1αが誘導され、破骨細胞は活性化される¹³⁾。最近、ELDは破骨細胞のHIF-1α発現を抑制し、破骨細胞の骨吸収活性を抑制する可能性が示された。このHIF-1α発現抑制作用は、活性型ビタミンD₃は認められない

ED-71に特異的なものであると報告された¹⁴⁾。一方、sphingosine-1-phosphate (S1P)は破骨細胞前駆細胞の遊走因子である。活性型ビタミンD₃とELDは破骨細胞前駆細胞のS1Pに対する反発作用を示す受容体S1PR2の発現を抑制することが報告された¹⁵⁾。そのため、活性型ビタミンD₃とELDは破骨細胞前駆細胞の骨表面からSIP濃度が高い血中への遊走を促進し、骨吸収を抑制する可能性が示された。このように、活

性型ビタミンD₃やELDは、破骨細胞前駆細胞や破骨細胞に直接作用し、さまざまな機序を介して骨吸収を抑制する可能性が報告されている(図3)。

2. 骨芽細胞に対する作用

我々は、*in vivo*における破骨細胞前駆細胞を解析し、細胞周期が停止した前駆細胞 (cell cycle arrested-quiescent osteoclast precursors: qOPs) から破骨細胞が形成されることを報告した¹⁶⁾。長期間にわたる活性型ビタミンD₃の曝露は、qOPの枯渇させる可能性がある。そこで、ELDをマウスに連日経口投与し、骨組織とqOPの動態を詳細に解析した。ELDにより、骨吸収は抑制され、骨量は増加したが、qOPの動態には全く影響を与えなかった⁹⁾。しかし、骨組織のRANKL/OPG比は有意の低下を示したことから、ELD投与は破骨細胞形成の支持環境を抑制する可能性が示された⁹⁾(図4)。さらに、活性型ビタミンD₃の骨吸収抑制作用を明らかにするために、OB-VDR cOKマウスとOC-VDR cOKマウスにELDを連日投与し、その骨組織を解析した。OC-VDR cOKマウスにELDを投与した場合、WTマウスに投与した場合と同様に破骨細胞数の減少を伴う骨量増加が認められた。一方、OB-VDR cOKマウスにELDを投与した場合、骨吸収は抑制されず骨量増加も認められなかった³⁾(図4)。以上の知見は、ELD投与による骨量増加作用は骨芽細胞が発現するVDRが担う可能性を示す。長期間にわたる薬理量の活性型ビタミンD₃の暴露は、活性型ビタミンD₃の大量

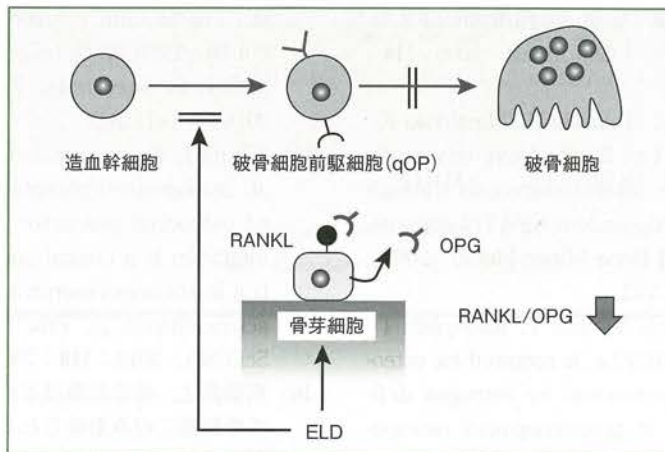


図3 活性型ビタミンD₃の骨芽細胞に対する作用を介した骨吸収抑制作用

活性型ビタミンDあるいはELDの薬量の連日投与は、破骨細胞形成の低下を伴う骨量増加を誘導する。ELDの連日経口投与したところ、破骨細胞前駆細胞qOPの動態には影響を与えなかった。また、ELDの破骨細胞形成の低下を伴う骨量増加はOC-VDR cOKマウスでは再現されたが、OB-VDR cOKマウスでは再現されなかった。このように、ELDは骨芽細胞が発現するVDRを介してRANKL/OPG比を低下させ、破骨細胞形成を抑制する可能性が示された。

(文献3)9)より引用)

投与とは異なり、骨芽細胞のVDRを介して骨芽細胞が供給する破骨細胞形成支持環境を抑制するものと考えられる。

おわりに

ビタミンDは抗くる病因子として発見されたが、さまざまな遺伝子改変動物の解析より、ビタミンDによる小腸でのCa吸収促進作用がくる病・骨軟化症に深くかかわることが明らかにされた。一方、骨芽細胞特異的VDR欠損マウスおよび破骨細胞特異的VDR欠損マウスの解析より、骨芽細胞と破骨細胞の発現するVDRは、骨組織の石灰化および生理的骨改造にはかかわらない

可能性が示された。活性型ビタミンD₃を大量に投与すると骨芽細胞のRANKL発現が誘導され、破骨細胞形成を伴う骨吸収が惹起される。その一方で、1 α (OH)D₃やELDの薬量の長期間投与は、骨吸収抑制を伴う骨量増加作用を示す。この骨吸収抑制作用に関して、活性型ビタミンD₃やELDは破骨細胞/破骨細胞前駆細胞に作用し、破骨細胞の分化と骨吸収機能を抑制することが報告されている。一方、ELDの長期間投与は骨芽細胞のVDRを介して、破骨細胞形成支持環境を抑制することも報告されている。

文献

- 1) Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev.* 2008; **29**: 726-76.
- 2) Takahashi N, Udagawa N, Suda T. Vitamin D endocrine system and osteoclasts. *Bonekey Rep.* 2014; **3**: 495.
- 3) Nakamichi Y, Udagawa N, Horibe K, et al. VDR in osteoblast-lineage cells primary mediates vitamin D treatment-induced increase in bone mass by suppressing bone resorption. in revision
- 4) Amling M, Priemel M, Holzmann T, et al. Rescue of the skeletal phenotype of vitamin D receptor-ablated mice in the setting of normal mineral ion homeostasis: formal histomorphometric and biomechanical analyses. *Endocrinology.* 2009; **140**: 4982-7.
- 5) Xue Y, Fleet JC. Intestinal vitamin D receptor is required for normal calcium and bone metabolism in mice. *Gastroenterology.* 2009; **136**: 1317-27.
- 6) Masuyama R, Stockmans I, Torrekens S, et al. Vitamin D receptor in chondrocytes promotes osteoclastogenesis and regulates FGF23 production in osteoblasts. *J Clin Invest.* 2006; **116**: 3150-9.
- 7) Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; **95**: 3597-602.
- 8) Sato M, Nakamichi Y, Nakamura M, et al. New 19-nor-(20S)-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ analogs

- strongly stimulate osteoclast formation both in vivo and in vitro. *Bone*. 2007 ; **40** : 293-304.
- 9) Harada S, Mizoguchi T, Kobayashi Y, et al. Daily administration of eldcalcitol (ED-71), an active vitamin D analog, increases bone mineral density by suppressing RANKL expression in mouse trabecular bone. *J Bone Miner Res* 2012 ; **27** : 461-73.
- 10) 竹内靖博. 活性型ビタミンD₃の骨量増加作用. *THE BONE*. 2013 ; **27** : 461-6.
- 11) Takasu H, Sugita A, Uchiyama Y, et al. c-Fos protein as a target of anti-osteoclastogenic action of vitamin D, and synthesis of new analogs. *J Clin Invest*. 2006 ; **116** : 528-35.
- 12) Sakai S, Takaishi H, Matsuzaki K, et al. 1 α , 25-dihydroxy vitamin D₃ inhibits osteoclastogenesis through IFN β -dependent NFATc1 suppression. *J Bone Miner Metab*. 2009 ; **27** : 643-52.
- 13) Miyauchi Y, Sato Y, Kobayashi T, et al. HIF1 α is required for osteoclast activation by estrogen deficiency in postmenopausal osteoporosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013 ; **110** : 16568-73.
- 14) Sato Y, Miyauchi Y, Yoshida S, et al. The vitamin D analogue ED71 but Not 1,25(OH)₂D₃ targets HIF1 α protein in osteoclasts. *PLoS One*. 2014 ; **9** : e111845.
- 15) Kikuta J, Kawamura S, Okiji F, et al. Sphingosine-1-phosphate-mediated osteoclast precursor monocyte migration is a critical point of control in antbone-resorptive action of active vitamin D. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013 ; **110** : 7009-13.
- 16) 高橋直之. 破骨細胞はどのようにして骨組織にのみ形成されるか. *実験医学(増刊号)*. 2014 ; **23** : 1031-7.

高橋 直之(Naoyuki Takahashi)

1978年 岩手大学農学研究科(修士課程)

1978年 昭和大学歯学部助手

1985年～1986年 Texas大学San Antonio校 ポスドク

1986年～2001年 昭和大学歯学部講師, 助教授

2001年 松本歯科大学教授

2016年 松本歯科大学特任教授

破骨細胞研究をライフワークとする

