

学位論文題名

閉経後骨粗鬆症発症における
マクロファージ遊走阻止因子の役割

学位論文内容の要旨

閉経後骨粗鬆症は、高齢女性における重要な疾患のひとつとして広く認識されている。閉経後のエストロゲン欠乏状態は骨代謝を高回転状態へ導くことで骨代謝バランスを骨吸収へと傾け、その結果骨粗鬆化につながる。骨粗鬆症に伴う脆弱性骨折は患者の QOL を著しく低下させ、さらに医療費の増大にもつながる重要な問題として注目が高まっている。

エストロゲン欠乏による骨粗鬆症の発症においては、interleukin (IL)-1、IL-6、tumor necrosis factor (TNF)- α などの炎症性サイトカインの産生が増大し、これらが破骨細胞の分化や活性化を促すことで骨吸収をもたらすことが、近年報告されている。加えて動物実験ではこれらサイトカインのうちのいずれかの欠損または阻害によって、卵巣摘出術 (OVX) 後の骨量低下を防ぐことが可能であることが明らかにされている。

マクロファージ遊走阻止因子 (Macrophage migration inhibitory factor; MIF) は活性化 T-cell の培養上清から分離同定された最初のサイトカインであり、その機能は長く不明なままとされていたが、近年 MIF cDNA のクローニングがなされて以来機能解明が進んできた。MIF は様々な炎症刺激によって放出され、ステロイド拮抗作用を有する。詳細なメカニズムは不明であるが、MIF はエストロゲンとの間に相互作用を有することも明らかにされている。OVX によるエストロゲン欠乏状態のマウスでは、創傷治癒過程において創傷部位の MIF の発現上昇が認められたり、また *in vitro* ではエストロゲンがマクロファージによる MIF の産生を抑制することが報告されている。

本研究の目的は、OVX マウスを閉経後骨粗鬆症のモデルとして用い、野生型マウス (WT) と MIF ノックアウトマウス (MIF KO) における OVX による骨粗鬆症の発症効果を比較することで、閉経後骨粗鬆症の発症における MIF の役割を検討することである。

本実験では Balb/c マウスの 8 週齢・雌の MIF KO および WT を、各群 N=5 で OVX または sham 手術し、これを 4 週後に評価した。各群についてマウスの大腿骨の遠位海綿骨における bone volume/tissue volume (BV/TV)、骨梁数、骨梁間の平均距離を μ CT にて算出し、比較した。また組織学的評価として、マウスの脛骨近位において hematoxylin/eosin (HE) 染色および tartarate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色を施行した。骨梁表面の TRAP-positive の多核細胞を破骨細胞とし、骨形態計測を行った。マウス血清中の IL-1 β 、IL-6、TNF- α および MIF 濃度を ELISA にて測定した。統計学的処理は one-way ANOVA で Fisher's test を post hoc test とし、有意差 5% 未満を統計学的有意差ありとした。

大腿骨遠位の海綿骨では、WT マウスでは OVX による明らかな減少が認められたが、MIF KO マウスで

は OVX による骨粗鬆症性変化は全く観察されなかった。BV/TV 値の比較では、WT 群では BV/TV 値は OVX により sham 群の 53%と著明な低下 ($P<0.05$) を示したが、MIF KO 群では両群間で有意差はなかった。骨梁数、骨梁間の平均距離についても同様の結果が得られた。組織学的評価においても、H-E 染色では WT マウスに OVX を行うと明らかに海綿骨量が減少したが、MIF KO マウスではこのような変化は観察されなかった。TRAP 染色による骨梁表面積当たりの破骨細胞数 (N.Oc/BS) の比較では、WT マウスの OVX 群では sham 群より有意に増加しており、骨吸収の亢進を示すものと考えられた。これに対して MIF KO マウスの OVX 群では、N.Oc/BS の増加は認めず、骨代謝の高回転化は起きないことを示唆するものと考えられた。血清サイトカインの比較では、WT マウスでは OVX 後 4 週の時点において IL-1 β 濃度の sham 群比 96%の増加が認められたが ($P<0.05$)、MIF WT マウスではこのような有意差は認めなかった。エストロゲン減少が MIF 産生におよぼす影響を調べるため、WT マウスを OVX し経時的に血中 MIF 濃度を測定したところ、OVX 後 24 時間では MIF 濃度は有意に上昇していたが ($P<0.05$)、このような変化は 1 週の時点では消失していた。

MIF の骨代謝領域における役割については、骨芽細胞のマトリックスメタルプロテアーゼ産生を促すなどの報告がある。本研究において我々は、閉経後骨粗鬆症のモデルとして MIF KO マウスの OVX モデルを用い、本症の発症において MIF が必須であることを初めて示した。閉経後のエストロゲン欠乏状態においては骨代謝が高回転にシフトして、バランスが骨吸収へと傾いた結果骨粗鬆症化にいたることが広く知られている。本研究でも WT マウスの OVX による骨吸収は骨代謝の高回転化に伴うものであることが示されたが、MIF KO マウスでは OVX しても骨代謝の高回転化は起きず、この結果骨吸収が亢進しないことが明らかになった。

我々はまた OVX により血清 MIF が早期に上昇することを示したが、何らかの刺激に対して早期に MIF 上昇が起こることは文献的にも多数報告されている。MIF そのものが骨吸収因子として作用するという報告はないが、TNF など他の骨吸収因子の上流に存在し、これらの産生を調節するという報告は多数ある。サイトカイン・カスケードにおける MIF の役割は、免疫や炎症反応における‘セットポイント’やこの大きさをコントロールしている可能性が示唆されているが、OVX 後におこる骨吸収因子の上昇は、血清 MIF の急激な増加によって誘発されているという可能性がある。

転写調節因子の nuclear factor-kappa B (NF- κ B)は核内に移行した後骨吸収性サイトカインの各遺伝子のプロモーター領域にある NF- κ B binding site に結合することでそれらサイトカインの転写を亢進させる。エストロゲンレセプターとサイトカインの‘クロストーク’については多くの研究がなされているが、MIF 遺伝子の 5' 領域にも NF- κ B 結合領域が存在することが明らかにされ、また MIF の転写は NF- κ B inhibitor により抑制されることも報告された。これらの報告より、MIF は他の炎症性サイトカイン同様、エストロゲンによる NF- κ B を介した negative regulation を受けており、エストロゲン欠乏に続発する NF- κ B の活性化により転写が亢進することが推測される。

閉経後骨粗鬆症の発症における MIF の真の役割はいまだ解明されていないが、本研究の結果より MIF は本症の発症において重要な位置を占めることが明らかになり、今後 MIF は本症の治療における新たなターゲットになりうるものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 浪 明 男
副 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 教 授 櫻 木 範 明

学 位 論 文 題 名

閉経後骨粗鬆症発症における

マクロファージ遊走阻止因子の役割

閉経後骨粗鬆症は、高齢女性における重要な疾患のひとつとして広く認識されている。閉経後のエストロゲン欠乏状態は骨代謝を高回転状態へ導くことで骨代謝バランスを骨吸収へと傾け、その結果骨粗鬆化につながる。骨粗鬆症に伴う脆弱性骨折は患者のQOLを著しく低下させ、さらに医療費の増大にもつながる重要な問題として注目が高まっている。

エストロゲン欠乏による骨粗鬆症の発症においては、interleukin (IL)-1, IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α などの炎症性サイトカインの産生が増大し、これらが破骨細胞の分化や活性化を促すことで骨吸収をもたらすことが、近年報告されている。加えて動物実験ではこれらサイトカインのうちのいずれかの欠損または阻害によって、卵巣摘出術 (OVX) 後の骨量低下を防ぐことが可能であることが明らかにされている。

マクロファージ遊走阻止因子 (Macrophage migration inhibitory factor; MIF) は活性化 T-cell の培養上清から分離同定された最初のサイトカインである。MIF は様々な炎症刺激によって放出され、ステロイド拮抗作用を有する。詳細なメカニズムは不明であるが、MIF はエストロゲンとの間に相互作用を有することも明らかにされている。OVX によるエストロゲン欠乏状態のマウスでは、創傷治癒過程において創傷部位の MIF の発現上昇が認められたり、また *in-vitro* ではエストロゲンがマクロファージによる MIF の産生を抑制することが報告されている。

本研究の目的は、OVX マウスを閉経後骨粗鬆症のモデルとして用い、野生型マウス (WT) と MIF ノックアウトマウス (MIF KO) における OVX による骨粗鬆症の発症効果を比較することで、閉経後骨粗鬆症の発症における MIF の役割を検討することである。

本実験では Balb/c マウスの 8 週齢・雌の MIF KO および WT を、各群 N=5 で OVX または sham 手術し、これを 4 週後に評価した。各群についてマウスの大腿骨の遠位海綿骨を μ CT にて比較した。また組織学的評価は、マウスの脛骨近位における hematoxylin/eosin (HE) 染色および tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色を施行した。骨梁表面の TRAP-positive の多核細胞を破骨細胞とし、骨形態計測を行った。マウス血清中の IL-1 β , IL-6, TNF- α および MIF 濃度を ELISA にて測定した。

大腿骨遠位では、WT マウスでは OVX による明らかな骨梁の減少が認められたが、MIF KO マウスでは OVX による骨粗鬆症性変化は全く観察されなかった。bone volume/tissue volume (BV/TV) 値の比較では、WT 群では OVX により著明な低下 ($P < 0.05$) を示したが、MIF KO 群では両群間で有意差はなかった。骨梁数、骨梁間の平均距離についても同様の結果が得られた。組織学的評価においても、H-E 染色では WT マウスに OVX を行うと明らか

に海綿骨量が減少したが、MIF KO マウスではこのような変化は観察されなかった。TRAP 染色による骨梁表面積当たりの破骨細胞数 (N.Oc/BS) は、WT マウスの OVX 群で有意に増加しており、骨吸収の亢進を示すものと考えられた。これに対して MIF KO マウスの OVX 群では、N.Oc/BS の増加は認めず、骨代謝の高回転化は起きないことを示唆するものであった。血清サイトカインの比較では、WT マウスでは OVX 後 4 週の時点において IL-1 β 濃度の増加が認められたが ($P < 0.05$)、MIF KO マウスではこのような有意差は認めなかった。エストロゲン減少が MIF 産生におよぼす影響を調べるため、WT マウスを OVX し血中 MIF 濃度を測定したところ、OVX 後 24 時間では MIF 濃度は有意に上昇していたが ($P < 0.05$)、このような変化は 1 週の時点では消失していた。

今回の実験結果により申請者は、閉経後骨粗鬆症のモデルとして MIF KO マウスの OVX モデルを用い、本症の発症において MIF が必須であることを初めて示した。閉経後のエストロゲン欠乏状態においては骨代謝が高回転にシフトして、バランスが骨吸収へと傾いた結果骨粗鬆症化にいたることが広く知られている。本研究でも WT マウスの OVX による骨吸収は骨代謝の高回転化に伴うものであることが示されたが、MIF KO マウスでは OVX しても骨代謝の高回転化は起きず、この結果骨吸収が亢進しないことが明らかになった。申請者はまた OVX により血清 MIF が早期に上昇することを示したが、何らかの刺激に対して早期に MIF 上昇が起こることは文献的にも多数報告されている。MIF そのものが骨吸収因子として作用するという報告はないが、TNF など他の骨吸収因子の上流に存在し、これらの産生を調節するという報告は多数ある。サイトカイン・カスケードにおける MIF の役割は、免疫や炎症反応における‘セットポイント’やこの大きさをコントロールしている可能性が示唆されているが、OVX 後におこる骨吸収因子の上昇は、血清 MIF の急激な増加によって誘発されているという可能性があることが申請者より発表があった。

審査にあたり、副査畠山鎮次教授よりエストロゲンによる骨吸収性サイトカインの抑制のメカニズムに関して、副査櫻木範明教授より OVX による骨代謝マーカーの変化について、および主査三浪明男教授から臨床的見地からの本研究結果の骨粗鬆症治療への応用の可能性についての質問があり、申請者からはこれらの質問に対して文献的報告および実験結果から適切に回答がなされた。

この論文は、MIF KO マウスの OVX モデルを用いて、閉経後骨粗鬆症の発症には MIF が必須であることに関して述べた独創的な研究であり、今後の骨粗鬆症発症のメカニズムの解明および新規治療法の開発にも貢献することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院博士課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。