



Stimulatory Effect of Growth Hormone on Bone Resorption and Osteoclast Differentiation

西山, 勝人

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-05-08

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2033

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002033>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	にし やま かつ ひと 西 山 勝 人	(高知県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)	
学位記番号	博ろ第1510号	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位授与の日付	平成8年5月8日	
学位論文題目	Stimulatory Effect of Growth Hormone on Bone Resorption and Osteoclast Differentiation (成長ホルモンの破骨細胞の分化及び活性化に対する促進作用とその機序)	
審査委員	主査 教授 千原 和 夫 教授 水野 耕作 教授 春日 雅 人	

論 文 内 容 の 要 旨

[緒言]

成長ホルモン (GH) が小児期の骨発育に重要である事は良く知られているが、近年成人における骨量維持にもGHが重要な働きを示すことが指摘され注目されている。臨床の場で遭遇する末端肥大症患者において皮質骨肥大が認められるが、骨形成のみならず骨吸収の亢進も認められる。一方、成人GH欠乏症において補充量のGH投与により、骨量の有意な増加ならびに骨形成、骨吸収活性の亢進が認められる。以上の臨床所見より、GHが骨形成ならびに骨吸収を共に活性化し、骨組織への同化作用を有する可能性が考えられる。骨組織の維持には破骨細胞 (Oc) による骨吸収と骨芽細胞 (Ob) による骨形成の平衡が重要である。近年、GHの骨形成促進作用の機序について幾つかの報告がなされているが、GHの骨吸収に対する作用及びその様式については未だ明らかではない。

Ocによる骨吸収には成熟Ocの活性化およびOc前駆細胞の成熟Ocへの分化の二つの要素が重要である。申請者は、GHが骨吸収促進作用を示すか否か、もしその作用を持つならば、それはGHが成熟OcおよびOc前駆細胞へ直接作用して発揮されるのか、それともObをはじめとする間質細胞 (Sc) を介した間接作用を通じてOcおよびOc前駆細胞が活性化され骨吸収促進作用が出現するのかという作業仮説の下に、以下の検討を行った。

[方法]

Sc存在下での既存の成熟Ocによる骨吸収活性は、マウス全骨細胞をGH存在下に象牙片上で4日間培養後の吸収窩の数と面積を計測する事により評価した。

単離成熟Ocの骨吸収活性は、ウサギ長管骨から得た全骨細胞より単離したOcの骨吸収能を、 $[^3\text{H}]$ 標識した骨片を用いた骨吸収アッセイにて検討した。

Sc存在下でのOc形成能は、マウス全骨細胞を96穴プレートで数日間培養し、既存のOcの消失を確認後GH存在下に7日間培養し、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ陽性多核細胞 (MNC) 数を算出する事で求めた。さらに同様の方法で得た全骨細胞を象牙片上で培養し、既存のOc消失後GH存在下に4日間培養し、吸収窩形成能を調べる事により新たに形成されたMNCが骨吸収活性を有する

か否かを検討した。

Sc非存在下でのOc形成能は、5-フルオロウラシル処理マウス脾細胞から得た造血幹細胞にインターロイキン-1、インターロイキン-3を添加し、未分化芽球コロニーを形成させ、これを顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)存在下で培養後、GH存在下に4日間培養し、MNC数を算出する事で求めた。

GM-CSFで支持した未分化芽球におけるGH受容体の有無は、マウスGH受容体の塩基配列より作成されたプライマーを用いたRT-PCR法により検討した。

上記の未分化芽球から形成されるMNCが骨吸収能を有するのにScの存在が必要か否かの検討は、象牙片上で未分化芽球とMC3T3-G2/PA-6細胞をGH存在下に共存培養し、9日後の吸収窩形成を計測する事により行った。

[結果]

ウシGH (bGH;1-100ng/ml)はSc存在下に既存のOcによる骨吸収活性を有意に促進した。これに対しbGHは単離Ocの骨吸収活性には影響を及ぼさなかった。

bGH (1-1000ng/ml)は、既存のOcが死滅後、Sc存在下でのMNC形成を濃度依存性に促進した。またbGHは 10^{-8} M $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ のMNC形成促進作用を有意に増強した。さらにbGHにより新たに形成されたMNCは象牙片上での吸収窩の数と面積を有意に増加させた。

bGH (1-1000ng/ml)で前処理したOb系MC3T3-E1細胞及びScであるMC3T3-G2/PA-6細胞より得られた培養上清は、未分化芽球からのMNC形成を濃度依存性に促進した。

bGH (1-1000ng/ml)は、Sc非存在下においても造血幹細胞由来未分化芽球からのMNC形成を濃度依存性に促進した。またbGHは 10^{-8} M $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ のMNC形成促進作用を有意に増強した。さらにRT-PCR法によりGH受容体の有無を調べたところ、対照として用いたマウス肝細胞由来のGH受容体PCR産物と同サイズのDNA断片が未分化芽球に検出された。しかしこの方法で得られたMNCは骨吸収活性を有しなかったのに対し、bGH存在下にMC3T3-G2/PA-6細胞と未分化芽球細胞の共存培養により得られたMNCは明らかに象牙片上で吸収窩を形成し、骨吸収活性を認めた。

[考察]

今回の研究より、GHがin vitroにおいて破骨細胞の分化および活性化を促進する事が初めて明らかとなった。

GHは、Sc存在下において成熟Ocによる骨吸収活性を有意に促進したが、単離Ocの骨吸収活性には影響を及ぼさなかったことより、GHの成熟Oc活性化に対する促進効果は直接作用ではなく、Sc等を介した間接作用によるものと考えられた。

GHが既存のOcの死滅後、Sc存在下においてMNC形成を濃度依存性に促進した事、さらにGHにより新たに形成されたMNCが象牙片上での吸収窩の数と面積を有意に増加させた事より、GHがSc存在下において、Oc分化を最終段階まで促進する事が示された。しかしながら、GHのOc前駆細胞への直接作用、あるいはScを介した間接作用については尚不明であった。

MC3T3-E1細胞及びMC3T3-G2/PA-6細胞より得られた培養上清が、未分化芽球からのMNC形成を促進した事より、Obを含むScからの液性因子が、少なくとも一部、GHによるOc形成促進に関与していると考えられる。またGHが造血幹細胞由来未分化芽球からのMNC形成を濃度依存性に促進し、さらにRT-PCR法によりこの未分化芽球にGH受容体が検出された事より、GHが前駆細胞へ直

接作用し、Oc形成を促進する系も同時に存在すると考えられる。一方でこの方法でSc非存在下に得られたMNCが骨吸収活性を有さず、MC3T3-G2/PA-6細胞と未分化芽球細胞の共存培養により得られたMNCは骨吸収活性を認めた事より、GHで誘導されたMNCが骨吸収活性を有する成熟Ocに分化する段階にはScの存在が必要である事が明らかとなった。

[結語]

今回の研究によりGHがin vitroにおいて骨吸収促進作用を有することが初めて証明された。そしてGHは、Sc等を介した間接作用による成熟Ocの活性化と、Oc前駆細胞への直接作用およびScからの液性因子やScとの接触等の間接作用によるOc形成を通して、骨吸収を促進すると考えられた。

論文審査の結果の要旨

長寿社会を迎えて骨粗鬆症の問題が近年多方面より注目されている。老令化に伴い種々のホルモン分泌が変化するが、エストロゲンに加えて成長ホルモン（GH）の分泌低下と骨粗鬆症の関連に興味もたれている。成人GH欠乏症では骨量が低下しているが、補充量のGH投与によって骨形成、骨吸収が共に亢進し、骨量が有意に増加することが知られている。しかし、骨組織に対するGHの作用機序についてはまだ十分には明らかでない。骨組織の維持には、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成の平衡が重要であり、骨吸収と骨形成が連系する所謂骨リモデリング機構の活性化が重要な鍵をにぎっている。申請者は、骨吸収系に対するGHの作用に焦点を当て、研究を行った。骨吸収には、成熟破骨細胞の活性化および破骨細胞前駆細胞の成熟破骨細胞への分化の二つの要素が重要である。まず、骨芽細胞を含む間質細胞の存在下で既存の破骨細胞による骨吸収活性がGHで影響されるか否かを、マウス全骨細胞を象牙片上で4日間培養した後の吸収窩の数と面積で調べたところ、ウシGH（1～100ng/ml）によって骨吸収活性は有意に促進された。しかし、うさぎ長管骨から得た全骨細胞より単離した成熟破骨細胞の骨吸収能（ $[^3\text{H}]$ 標識骨片を用いる骨吸収アッセイ法で測定）にはGHは影響を及ぼさなかったことより、GHの成熟破骨細胞活性化に対する促進効果は直接作用ではなく間質細胞を介した間接作用によるものと考えられた。次に間質細胞存在下での破骨細胞形成能を、マウス全骨細胞を96穴プレートで数日間培養し既存の破骨細胞の消失を確認後ウシGH（1-1000 ng/ml）存在下に7日間培養し、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ陽性多核細胞（MNC）数を算出する事で求めた。さらに同様の方法で得た全骨細胞を象牙片上で培養し、既存の破骨細胞消失後GH存在下に4日間培養し、吸収窩形成能を調べることにより新たに形成されたMNCが骨吸収活性を有するか否かを検討した。ウシGH既存の破骨細胞死滅後、間質細胞存在下でMNC形成を濃度依存性に促進し、さらに新たに形成されたMNCは象牙片上での吸収窩の数と面積を増加させたことにより、GHは間質細胞存在下で破骨細胞分化を最終段階まで促進することが明らかとなった。またウシGHで前処理した骨芽細胞系MC3T3-E1細胞および間質細胞であるMC3T3-G2/PA-6細胞より得られた培養上清は、未分化芽球からのMNC形成を促進したことにより骨芽細胞を含む間質細胞からの液性因子がGHによる破骨細胞形成促進に関与していると考えられた。GHによる間質細胞非存在下での破骨細胞形成能を、造血幹細胞由来未分化芽球からのMNC形成で調べたところ、ウシGH 1-1000ng/mlで濃度依存性に促進された。さらにRT-PCR法によってこの造血幹細胞由来未分化芽球にGH受容体が検出されたことにより、GHが破骨細胞前駆細胞へ直接作用し破骨細胞形成を促進する機構も存在すると考えられた。しかし、間質細胞非存在下に得られたMNCは骨吸収活性を示さず、

MC3T3-G2/PA-6細胞と未分化芽球細胞の共存培養することによって始めて、出来たMNCが骨吸収活性を示したことにより、GHで誘導されたMNCが骨吸収活性を持つ成熟破骨細胞に分化する段階には間質細胞の存在が必須であることが明らかとなった。今回の研究によりGHがin vitroにおいて骨吸収促進作用を示すことが初めて明らかとなった。さらにGHは、間質細胞を介した間接作用による成熟破骨細胞の活性化に加えて、破骨細胞前駆細胞への直接作用および間質細胞からの液性因子や間質細胞との接触などの間接作用による破骨細胞形成促進を通して、骨吸収を促進することが明らかになった。以上、本研究は、成長ホルモンの骨組織に対する作用についてとくに成長ホルモンの骨吸収作用およびその機序を研究したものであるが、従来ほとんど知られていなかった成長ホルモンの破骨細胞前駆細胞および成熟破骨細胞への作用について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。