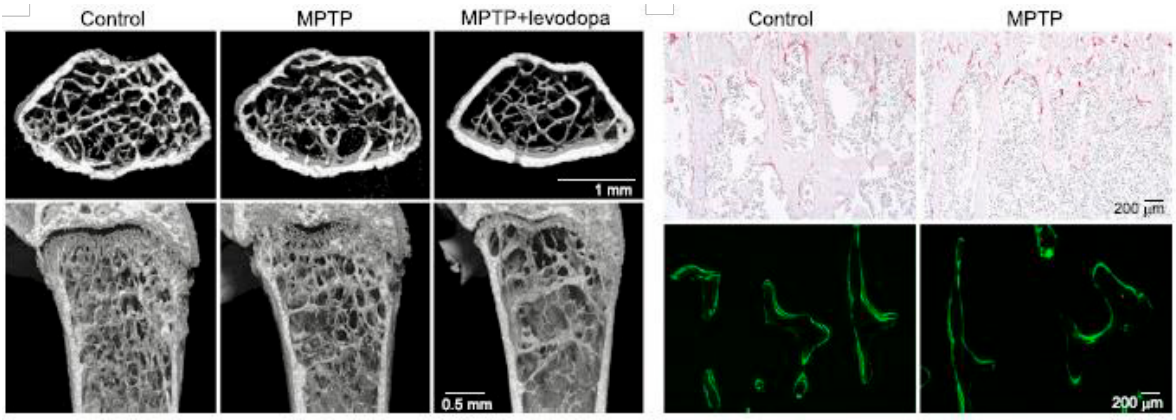
49　精神・神経疾患と骨粗鬆症の連関	根岸　貴子

【目的】本研究はパーキンソン病に伴う骨粗鬆症の病因解明を目的とした。パーキンソン病は脳線条体のドパミン神経が変性し、運動機能の低下を主症状とする疾患である。無動、静止時振戦、筋固縮、姿勢反射障害という特徴的な症状を示し、パーキンソン病に付随する骨粗鬆症は廃用性骨粗鬆症として捉えられがちであった。しかし、その連関や詳細な病因に関する研究は少ない。本研究ではパーキンソン病に使用される治療薬の骨代謝に対する影響と、パーキンソン病モデルマウスを用いた骨代謝の制御を明らかにすることを目的とした。

【方法】パーキンソン病モデルマウスは、脳線条体ドパミン神経の細胞死を誘導する神経毒 MPTP（1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6,-テトラヒドロピリジン）（20 mg/kg）をマウスの腹腔内に、2 時間おきに 4 回投与して作製した。また、パーキンソン病治療薬の骨代謝に及ぼす影響を検討するため、Levodopa（100 mg/kg）、Pramipexole（2 mg/kg）、Ropinirol（10 mg/kg）、Bromocriptine（4 mg/kg）を腹腔内投与した。このマウスの自発行動の異常は Open field test にて評価した。骨代謝についてはマイクロＣＴによる骨構造解析と骨組織切片を用いた組織学的解析を行った。

【結果】実臨床において使用されているパーキンソン病治療薬である Levodopa、Pramipexole、Ropinirol、Bromocriptine をマウスに投与し、骨組織を解析した結果、Levodopa は骨量を低下させることが明らかとなった。Levodopa は骨髄由来間葉系細胞からの骨芽細胞への分化と石灰化能を顕著に低下させた。末梢での Levodopa 代謝産物であるホモシステインが骨代謝に影響する可能性が示唆されていたが、確かに、血清中のホモシステインレベルが Levodopa 投与マウスで上昇していた。また、神経毒 MPTP を投与したパーキンソン病モデルマウスは、自発行動に異常を呈さなかったが、破骨細胞数が増加し、骨表面あたりの骨吸収面が増加し、同時に骨形成率が低下して骨量が減少することが明らかとなった。MPTP 投与マウスの骨髄細胞を RANKL 存在下で培養すると、過剰な破骨細胞を形成した。また、骨芽細胞培養条件下で培養すると、対照マウス由来の骨髄細胞に比べて骨芽細胞への分化と骨基質形成能が低下することが判明した。パーキンソン病患者でも血中プロラクチンレベルが亢進することが示されていた。ドパミン神経が変性したマウスでも、MPTP 投与 3 日目から 7 日目にかけて血清中のプロラクチン濃度が亢進することが確認された。MPTP 投与マウスでは、ドパミン神経が変性した結果、末梢のプロラクチン濃度が亢進し、骨芽細胞分化とその石灰化能を抑制するために、骨形成が低下して骨量低下を引き起こしたことを示唆していた。本研究は、パーキンソン病に付随する骨粗鬆症は、パーキンソン病の運動障害による廃用だけが原因ではなく、治療薬である Levodopa や、血中プロラクチン濃度の上昇が原因となりうることを提唱した。

MPTP 投与マウスは破骨細胞分化の亢進により骨量が低下する



49. 精神・神経疾患と骨粗鬆症の連関

根岸　貴子

*昭和大学 歯学部 歯科薬理学

Key words：精神・神経疾患，骨代謝，パーキンソン病，破骨細胞，骨芽細胞

緒　言

超高齢社会において、骨粗鬆症は国内罹患者数が 1,200 万人以上にも及ぶ。また、アルツハイマー病やパーキンソン病といった精神・神経疾患も加齢に伴って急増する代表的な疾患であり、その進行を止める治療法はない。パーキンソン病は無動、筋固縮、静止時振戦および姿勢反射障害などの特有の運動症状を引き起こし、進行すると転倒や寝たきりにつながることが多い。寝たきり状態は廃用性骨粗鬆症を誘発する。逆に、骨粗鬆症は容易に骨折を引き起こし、骨折は寝たきりに直結し、寝たきりは認知症や運動機能を増悪させる。事実、アルツハイマー病患者やパーキンソン病患者に骨粗鬆症発症率・骨折リスクは有意に高い［1，2］。このように加齢に伴う神経疾患と骨粗鬆症は連鎖的・相乗的に増悪し、さらには負のスパイラルとなって QOL の低下や社会的医療的負担を増大させる。アルツハイマーやパーキンソン病に付随する骨粗鬆症は、認知能力の低下や運動能の低下による廃用性、日光浴不足や低栄養などの様々な環境要因が原因と考えられてきたが、証明されていない。パーキンソン病の運動症状から、パーキンソン病に付随する骨粗鬆症は廃用性骨粗鬆症として捉えられがちであった。しかし、その連関や詳細な病因に関する研究は少ない。本研究では、マウスを用いてパーキンソン病に付随する骨粗鬆症の原因を明らかにした［3］。

方法および結果

1.　パーキンソン病治療薬の破骨細胞分化および骨芽細胞の分化と石灰化能に対する効果

ドパミン受容体は脳神経系に限らず、骨をはじめとする様々な組織の細胞に発現することを見出した。そこで、パーキンソン病治療薬として使用されている Lovodopa、Pramipexole、Ropinirole および Bromocriptine の破骨細胞と骨芽細胞に対する影響を検討した。破骨細胞は C57BL/6J マウスの骨髄細胞を破骨細胞前駆細胞の生存因子である 10 ng/ml の M-CSF（Macrophage colony stimulating factor）と 50 ng/ml の破骨細胞分化因子 RANKL（Receptor activator of nuclear factor-κB ligand）を用いて分化させ、破骨細胞マーカーである TRAP（Tartrate resistant acid phosphatase）陽性の 5 核以上の多核細胞を破骨細胞として評価した。この培養系に上記パーキンソン病治療薬を添加した結果、どのパーキンソン病治療薬も濃度依存的に破骨細胞分化を低下させた（図 1a）。また、胎児頭蓋冠由来細胞を骨芽細胞分化誘導培地（10％FCS を含むα-MEM＋50 μM ascorbic acid、10 nM dexamethasone、10 mM β-glycerophosphate）で分化させる系においても、上記パーキンソン病治療薬を添加してその効果を検討した。骨芽細胞分化は、骨芽細胞マーカーである Alkaline phosphatase の染色と、ミネラル沈着を Alizarine Red 染色にて検出する石灰化能とで評価した。その結果、Pramipexole、Ropinirole および Bromocriptine は骨芽細胞の分化と石灰化能を共に促進したが、これと対照的に Levodopa はこれらを抑制した（図 1b）

*現在の所属：東京大学 医科学研究所 国際粘膜ワクチン開発研究センター

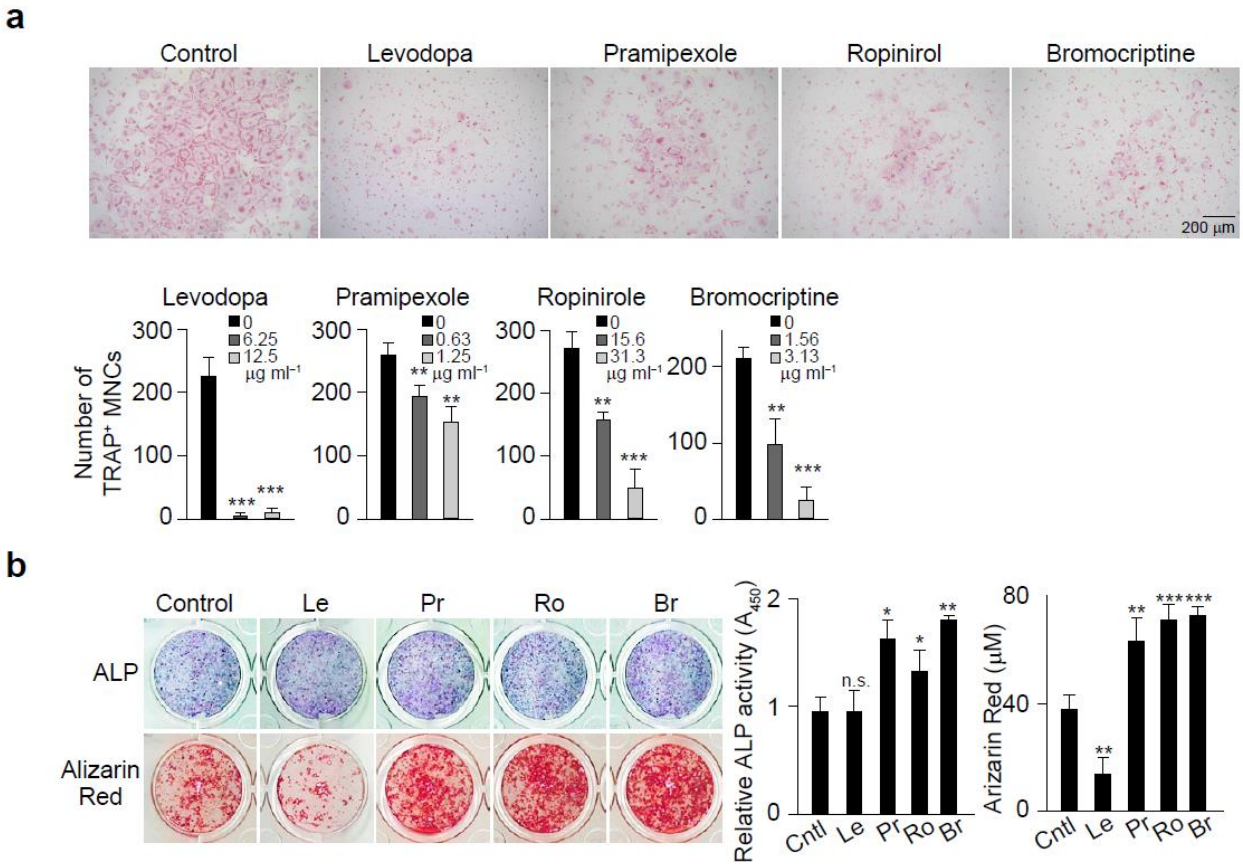


図 1. パーキンソン病治療薬の破骨細胞分化および骨芽細胞分化に対する効果

a) マウス骨髄細胞からの破骨細胞分化に対するパーキンソン病治療薬 Levodopa（Le）、Pramipexole（Pr）、Ropinirole（Ro）および Bromocriptine（Br）の効果。

b) マウス胎児頭蓋冠細胞からの骨芽細胞分化および石灰化能に対するパーキンソン病治療薬の効果。

ALP：Alkaline phosphatase、統計処理：one-way ANOVA、$*P < 0.05$、$**P < 0.01$、$***P < 0.001$。

2. Levodopa の骨量減少効果

パーキンソン病治療薬の骨量に対する影響を解析するために、8 週令の雄性 C57BL/6J マウスに Levodopa（100 mg/kg）、Pramipexole（2 mg/kg）、Ropinirol（10 mg/kg）、Bromocriptine（4 mg/kg）を腹腔内投与し、マウス右下腿大腿骨の骨構造をマイクロ CT にて解析した。これらの内、Levodopa は骨量減少を引き起こすことを見出した（図 2）。Levodopa 代謝産物であるホモシステインが骨代謝に影響する可能性が示唆されていたが［4］、確かに、血清中のホモシステインレベルが Levodopa 投与マウスで上昇していた。

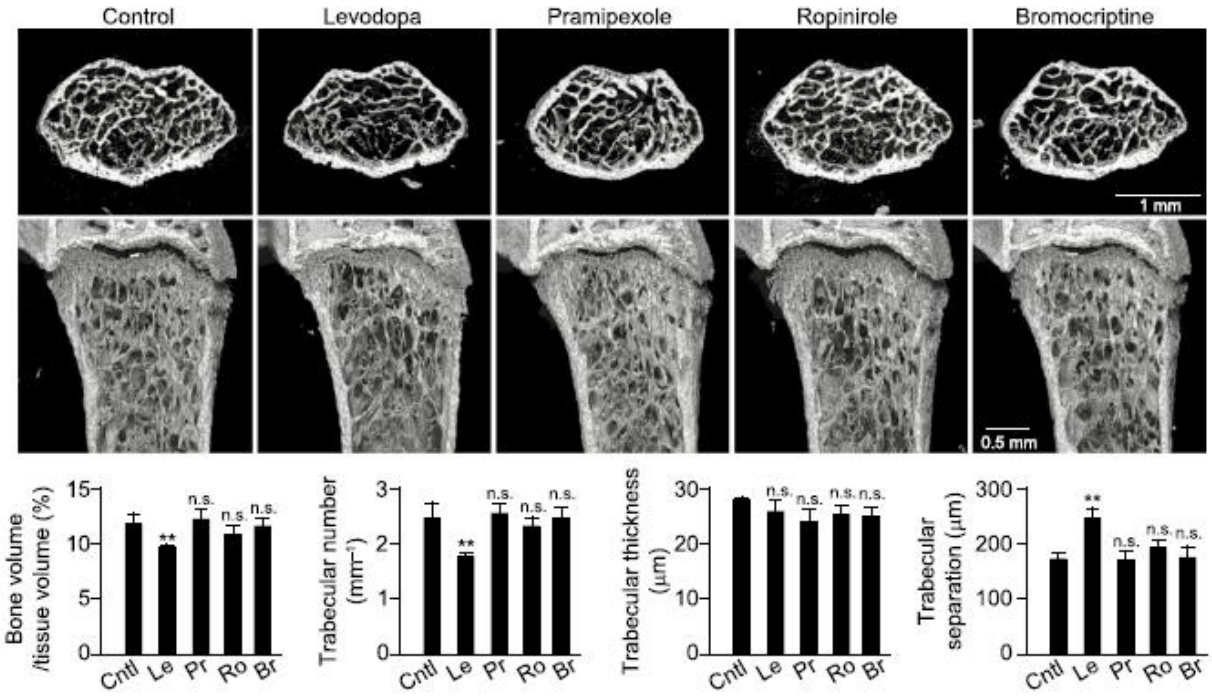


図 2. パーキンソン病治療薬の骨組織に対する影響

画像：パーキンソン病治療薬 Levodopa（Le）、Pramipexole（Pr）、Ropinirole（Ro）および Bromocriptine（Br）を投与したマウスの大腿骨のμCT 画像（上：管状断面。下：矢状断面）。

グラフ：μCT 解析による骨量構造のパラメータ。統計処理：one-way ANOVA、$^{**}P < 0.01$、n.s.：not significant。

3. MPTP 投与パーキンソン病モデルマウスは自発運動の異常を介さずに骨量減少を呈する

パーキンソン病患者の骨量低下とドパミン神経変性の関連を明らかにするために、脳線条体ドパミン神経の細胞死を誘導する神経毒 MPTP（1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6,-テトラヒドロピリジン）（20 mg/kg）を 8 週令の C57BL/6J マウスの腹腔内に投与してパーキンソン病モデルマウスを作製した。パーキンソン病症状を検討するために、MPTP 投与マウスの自発運動を評価した。自発運動は、40×40 cm の箱にマウスを入れて自由に行動させ、運動の軌跡と、全運動距離、全運動時間、平均運動速度を計測した。その結果、MPTP 投与によるドパミン神経の細胞死は自発運動に影響を与えなかった（図 3a）。これにより、運動症状による廃用制骨粗鬆症の可能性を除外して解析することが可能となった。

μCT 解析から、MPTP 投与マウスは骨量が減少することを見出した。また骨切片を用いた組織解析の結果、MPTP 投与マウスの骨組織には TRAP 陽性の破骨細胞が有意に増加し、骨表面あたりの骨吸収面積が増加することが明らかになった（図 3c、d）。また、蛍光色素カルセインを 4 日間隔でマウスに投与し、カルセインラベル間隔（4 日間に形成された骨幅を意味する）を計測した結果、骨形成率が減少していることが明らかになった（図 3c、d）。

ドパミンは下垂体からのプロラクチンの産生を抑制する。そのため、パーキンソン病患者では血中プロラクチンレベルが亢進する。また、Levodopa による治療はドパミンの補充療法であり、プロラクチンレベルの亢進を抑えることが知られている。我々の MPTP 投与マウスでも、MPTP 投与 3 日目から 7 日目にかけて血清中のプロラクチン濃度が亢進することが確認された（図 3e）。MPTP の投与後 7 日目から Levodopa を毎日投与して治療を施したマウスでは、血清プロラクチンレベルは正常レベルにまで減少したが、骨量は MPTP 投与マウスよりもさらに減少させた（図 3b、e）。

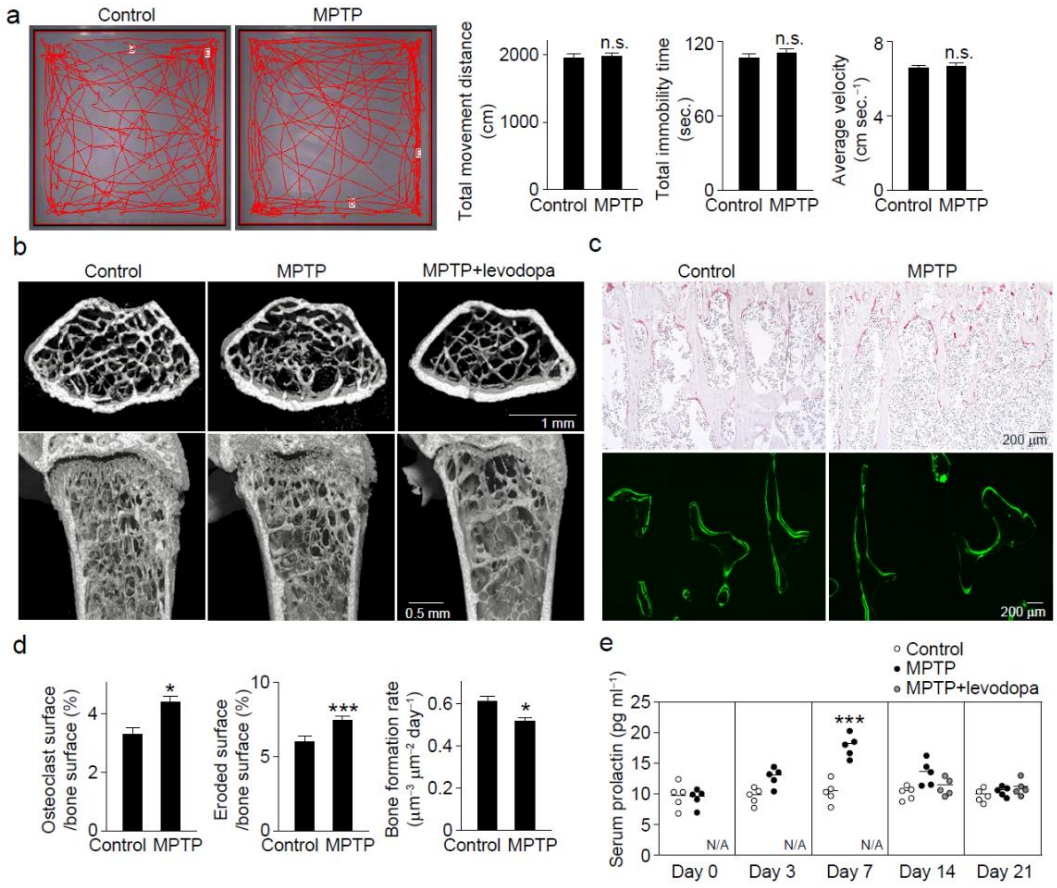


図 3. MPTP 投与マウスの自発運動と骨代謝の変動

a) Open field test による自発運動の軌跡（赤線）と運動量パラメータ。

b) μCT 画像（上：骨幹端領域の管状断面、下：矢状断面）。

c) 骨組織解析（上：TRAP 染色画像、下：カルセインダブルラベル）。

d) 骨組織解析 c）により得られた骨吸収および骨形成率に関するパラメータ。

e) 血中 prolactin 濃度の変動。

統計処理：one-way ANOVA、$*P < 0.05$、$***P < 0.001$、n.s.：not significant、N.A.：not applicable。

4. ドパミン神経細胞死による破骨細胞・骨芽細胞の変化

ドパミン低下によるプロラクチンレベルの上昇が骨量減少を引き起こすことを証明するために、MPTP 投与マウスの骨髄由来細胞を用いた破骨細胞分化と骨芽細胞分化を解析した。まず、MPTP 投与マウスから採取した骨髄由来細胞を *in vitro* で破骨細胞に分化させると、対照細胞よりも有意に多くの破骨細胞を形成した。このことは、MPTP 投与マウスの破骨細胞前駆細胞は、血清中のプロラクチンレベルの変化に依存せず、細胞内在性に分化能が亢進していることを示唆した。続いて、MPTP 投与マウスの血清を、破骨細胞分化培養系に添加したところ、対照マウス由来の細胞も MPTP 投与由来の細胞も、どちらにおいても破骨細胞分化が亢進した。また、抗プロラクチン中和抗体を上記分化培養系に添加してみたが、MPTP マウス由来の血清による破骨細胞分化促進効果に変化は見られなかった（図 4a）。

一方、MPTP 投与マウスの骨形成能についても、骨髄細胞からの骨芽細胞分化培養系を用いて検証した。MPTP 投与マウスの骨髄中には対照マウスよりも多くの骨芽細胞前駆細胞が含まれていた。それにもかかわらず、MPTP 投与マウス由来の血清は、対照マウス由来の細胞と同等レベルまで骨芽細胞分化と石灰化能を低下させた。MPTP 投与マウス由来血清に加えて抗プロラクチン中和抗体を添加すると、骨芽細胞分化と石灰化に対する抑制効果はキャンセルされた。このことは、骨芽細胞分化／骨形成能についてはドパミン神経細胞死による血中プロラクチンレベルの上昇が影響していることを示唆していた。

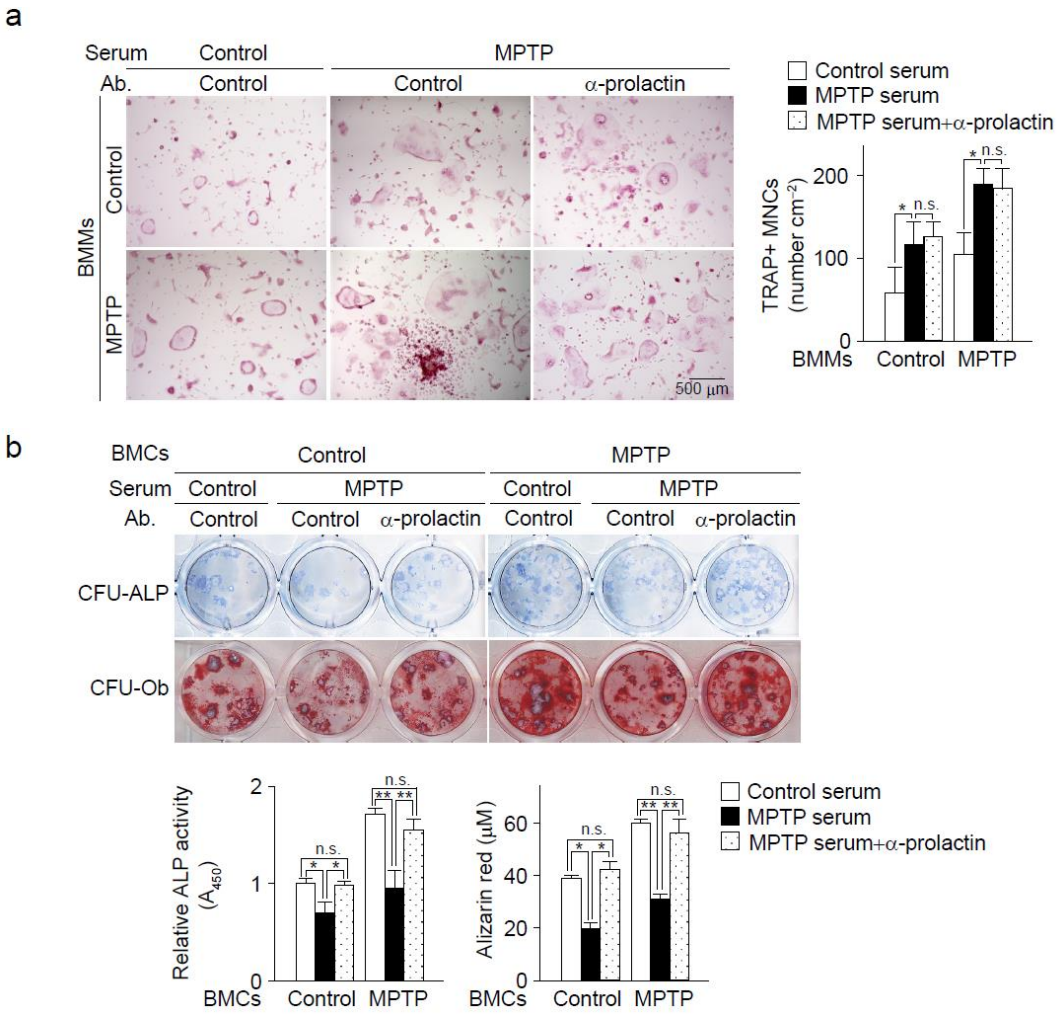


図 4. MPTP 投与マウスの破骨細胞分化と骨芽細胞分化／石灰化能

a) 対照マウスおよび MPTP 投与マウスの骨髄細胞からの破骨細胞分化、それに対する各マウス由来血清の効果、および抗プロラクチン中和抗体の効果。BMM : Bone marrow-derived monocyte／macrophage cells。

b) 対照マウスおよび MPTP 投与マウスの骨髄細胞からの骨芽細胞分化と石灰化能、それに対する各マウス由来血清の効果、および抗プロラクチン中和抗体の効果。BMC : Bone marrow cells、CFU-ALP : colony formation unit positive for ALP、CFU-Ob : CFU-osteoblasts positive for alizarin red。

統計処理 : one-way ANOVA、$*P < 0.05$、$**P < 0.01$、n.s. : not significant。

考　察

本研究は、パーキンソン病に付随する骨粗鬆症は、パーキンソン病の運動障害による廃用だけが原因ではなく、治療薬である levodopa や、血中プロラクチン濃度の上昇が原因となりうることを提唱した［3］。ドパミン神経細胞死によるプロラクチンの上昇は骨形成を減少させるが、MPTP 投与マウスの血清に存在する破骨細胞分化促進因子の正体については今後の解析が必要となる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、昭和大学医学部整形外科学の飯田和章大学院生をはじめとする学生諸氏、稲垣克記教授、昭和大学医学部薬理学教室の辻まゆみ教授、木内祐二教授、昭和大学歯学部薬理学教室の高見正道教授の協力のもと実施された。ここに記載して感謝の意を表す。

文　献

1) Roos PM. Osteoporosis in neurodegeneration. J. Trace Elem. Med. Biol. 2014 Oct 28(4):418-421. PMID:25220531 DOI: 10.1016/j.jtemb.2014.08.010.

2) Malochet-Guinamand, Durif F, Thomas T. Parkinson's disease: a risk factor for osteoporosis. Joint Bone Spine. 2015 Dec 82(6):406-410. PMID: 2643100 DOI: 10.1016/j/jbspin.2015.03.009.

3) Handa K, Kiyohara S, Yamakawa T, Ishikawa K, Hosonuma M, Sakai N, Karakawa A, Chatani M, Tsuji M, Inagaki K, Kiuchi Y, Takami M, Negishi-Koga T. Bone loss caused by domaminergic degeneration and levodopa treatment in Parkinson's disease model mice. Sci. Rep. 2019 Sep 24; 9(1): 13678. PMID: 31551490 DOI: 10.1038/s41598-019-50336-4.

4) Van Meurs JB, Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, van der Klift M, de Jonge R, Lindemans J, de Groot LC, Hofman A, Witteman JC, van Leeuwen JP, Breteler MM, Lips P, Pols HA, Uitterlinden AG. N Engl J Med. 2004 May 13;350(20):2033-2041. PMID: 15141041 DOI: 10.1056/NEJMoa032546.