

PTH／PTH アナログによる骨・カルシウム 代謝調節の解析

2016. 3

東京農工大学大学院
生物システム応用科学府
共同先進健康科学専攻

清水勝

指導教官名：宮浦千里

目次

頁

略語一覧	4
第1章 諸論	5
1-1. 本論文の目的	5
1-2. 副甲状腺ホルモン (PTH) と PTH 受容体	7
1-3. PTH 受容体の新たな活性化機構	11
1-4. PTH の骨代謝調節機構	15
1-5. PTH のカルシウム代謝調節機構	18
1-6. 副甲状腺機能低下症	22
1-7. 参考文献	26
第2章 PTH が骨形成促進作用を示す最適な間歇投与の時間とその骨量増加作用のメカニズム	35
2-1. 実験の目的	35
2-2. 実験方法	38
2-3. 実験結果	
2-3-1. ラットにおける PTH 持続投与での血中 PTH レベルの評価	41
2-3-2. 正常ラットでの PTH(1-34)単回インフュージョンによる骨での PTH 誘導遺伝子の反応	43
2-3-3. PTH(1-34)インフュージョンのラット大腿骨骨密度 (BMD) に対する効果	45
2-3-4. ラットにおける PTH(1-34)インフュージョンの骨代謝マーカーに対する効果	47
2-4. 考察	48
2-5. 参考文献	52
第3章 持続型 PTH アナログの副甲状腺機能低下症ラットにおける血中カルシウム上昇作用	55
3-1. 実験の目的	55
3-2. 実験方法	57
3-3. 実験結果	
3-3-1. PTH アナログのヒト PTH1 型受容体における受容体結合性と cAMP シグナル	61
3-3-2. TPTX ラットにおける PTH アナログの血清カルシウム及びリンに対する効果	63

3-3-3. PTH アナログの TPTX ラットにおける血中濃度推移	68
3-3-4. TPTX ラットにおける LA-PTH の単回皮下投与による 血清及び尿中カルシウムに対する効果	69
3-3-5. TPTX ラットにおける LA-PTH の 4 週間反復投与による 血清及び尿中カルシウムに対する効果	71
3-3-6. 正常カニクイザルにおける LA-PTH 単回投与による 血清カルシウムに対する効果	79
3-4. 考察	81
3-5. 参考文献	83
第4章 結論	85
謝辞	87

略語一覽

GDP : Guanosine diphosphate

GTP : Guanosine triphosphate

DEXA : Dual-energy X ray absorptiometry

RUNX2 : Runt-related transcription factor 2

ATF4 : Activating transcription factor 4

第1章 諸言

1-1. 本論文の目的

副甲状腺ホルモン (Parathyroid Hormone : PTH) は、副甲状腺より分泌され、生体におけるカルシウム代謝を調節するホルモンであることが知られている。PTH は、副甲状腺から分泌されると、骨に作用して骨吸収を促進し、骨から Ca を動員するとともに、腎臓に作用してカルシウム再吸収を促進する。また、腎臓では活性型ビタミン D3 の合成を促進して腸管での食事からのカルシウム再吸収を促進する。このように、PTH は骨、腎臓に作用することで、血中カルシウムを調節することが知られている。

また、PTH は骨代謝を調節することが知られている。骨代謝調節には、間葉系幹細胞から分化し骨を作る骨芽細胞と、造血系幹細胞から分化し骨を吸収する破骨細胞の間で、骨形成と骨吸収がバランスを取り、古い骨が新しい骨に置き換わることで、骨量が維持されている。PTH は、皮下投与などの間歇投与を行うと、骨芽前駆細胞の増殖と分化を促進し、骨芽細胞での骨基質産生を促進して骨量を増加させる。一方、PTH をインフュージョンなどの持続投与を行うと、むしろ破骨細胞形成を促進して骨吸収を亢進させ、血中カルシウムを上昇させることが知られている。

この PTH が持つ二面性を利用して、PTH は治療薬として臨床応用されている。PTH を間歇投与して骨量を増加させる作用を利用し、PTH は骨粗鬆症治療薬として使用されている。また、内因性 PTH が欠乏して起きる低カルシウム血症である、副甲状腺機能低下症 (Hypoparathyroidism) に対しては、PTH を投与して血中カルシウムを上昇させ、低カルシウム血症を治療する試みが進められている。

このように、PTH は骨代謝・及びカルシウム代謝を調節する重要なホルモンであることから、本論文では、PTH の骨代謝、及びカルシウム代謝調節機構の以下の点に着目して研究を行った。

1. 骨粗鬆症に対する治療効果

PTH が骨形成促進作用を示す最適な間歇投与の時間とその骨量増加作用のメカニズム

骨吸収因子である PTH は、臨床応用されている唯一の骨形成促進剤である。PTH(1-34) を間歇投与と持続投与では、骨量増加作用に対して異なる効果を示すものの、PTH(1-34) の骨量を増加させる最適な投与時間は明らかでない。このことから、PTH(1-34) を異なる時間で反復インフュージョンを行い、その骨量増加効果を検証することで、骨量増加に最適な投与時間とそのメカニズムの検討を行った。

2. 副甲状腺機能低下症に対する治療

持続型 PTH アナログの副甲状腺機能低下症モデルラットにおける血中カルシウム上昇作用

内因性 PTH を欠損し低カルシウム血症を引き起こす副甲状腺機能低下症は、現行治療は高用量の経口カルシウム剤と活性型ビタミン D 製剤であるが、ビタミン D は尿中カルシウム再吸収作用がなく、高カルシウム尿症を引き起こす。近年 PTH(1-84)注射剤が承認されたが、PTH(1-84)は血中カルシウム上昇作用が弱く、経口カルシウム剤と活性型ビタミン D 製剤との併用療法での治療であり、高カルシウム尿症を改善できていない。

一方、PTHを持続投与することで血中カルシウムが上昇する作用が知られていることから、PTH1 型受容体の R0 構造に特異的に結合し、PTH1 型受容体に持続的に作用する PTH アナログ (Long-Acting PTH) を使い、甲状腺・副甲状腺摘出モデルラットを用い、その血中カルシウム上昇作用、及び骨代謝への影響を検討した。

1-2. 副甲状腺ホルモン (PTH) と PTH 受容体

副甲状腺ホルモン

副甲状腺ホルモン (Parathyroid Hormone : PTH) は、副甲状腺より分泌される、アミノ酸 84 個で構成されるペプチドホルモンである。分子量は約 9400 ダルトンである。異なる種での PTH のアミノ酸配列が同定されているが (図 1)、その配列は N 末端側が特に種間で高い相同性を示す。

PTH は 84 個のアミノ酸で構成されているものの、その受容体である PTH1 型受容体に対しては、N 末端の 34 アミノ酸である PTH(1-34) で、PTH(1-84) と同程度の受容体結合能と cAMP 活性を示すことが知られており、生体においても、血中 Ca や骨に対する作用も PTH(1-34) で同様の作用を示すことが古くから知られている。

	1	
ヒト PTH (AAA30747)	SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNFVALGAPLAPRDAG	
ウシ PTH (AAH96144)	AVSEIQFMHNLGKHLSSMERVEWLRKKLQDVHNFVALGASIAIRDGS	
ブタ PTH (NP_999566)	SVSEIQLMHNLGKHLSSLERVEWLRKKLQDVHNFVALGASIVHRDGG	
イヌ PTH (AAA82584)	SVSEIQFMHNLGKHLSSMERVEWLRKKLQDVHNFVALGAPIAHRDGS	
ラット PTH (NP_058740)	AVSEIQLMHNLGKHLASVERMQWLRKKLQDVHNFVSLGVQMAAREGS	
マウス PTH (NP_065648)	AVSEIQLMHNLGKHLASMERMQWLRKKLQDMHNFVSLGVQMAARDGS	
チキン PTH (AAB02866)	SVSEMQLMHNLGHEHRHTVERQDWLQMKLQDVH--SALE-----DAR	
	-***-*-*-----**--**-----**--*-----*	
		84
ヒト PTH	SQRPRKKEDNVLVE-SHEKSLGEA-----DKADVNVLTKAKSQ	
ウシ PTH	SQRPRKKEDNVLVE-SHQKSLGEA-----DKADVVDVLIKAKPQ	
ブタ PTH	SQRPRKKEDNVLVE-SHQKSLGEA-----DKAAVDVLIKAKPQ	
イヌ PTH	SQRPLKKEDNVLVE-SYQKSLGEA-----DKADVVDVLTKAKSQ	
ラット PTH	YQRPTKKEENVLVD-GNSKSLGEG-----DKADVVDVLVKAKSQ	
マウス PTH	HQKPTKKEENVLVD-GNPKSLGEG-----DKADVVDVLVKSKSQ	
チキン PTH	TQRPRNKEDIVLGEIRNRRLPEHLRAAVQKKS IDLDKAYMNVLFKTKP	
	-*-*--**--**-----*-*-----***--**--*--	

図 1. 各種 (ヒト、ウシ、ブタ、イヌ、ラット、マウス、チキン) 副甲状腺ホルモンのアミノ酸配列の比較 * : 同一アミノ酸、- : 異なるアミノ酸、をを示す。

副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP)

副甲状腺ホルモン関連蛋白 (Parathyroid Hormone Related Protein : PTHrP) は、癌患者の高 Ca 血症の原因物質として同定された (1-3)。この PTHrP は、全長 141 アミノ酸であるが、PTHrP の N 末端 36 アミノ酸で PTH1 型受容体に対してアゴニストとして作用することが示されている。PTHrP (1-36) のアミノ酸配列は、PTH と N 末端 13 個中 8 個は同一であり、PTH と同様に PTH1 型受容体に作用することが示されている。

PTHrP は、軟骨や平滑筋、乳房、毛嚢、胎盤、など、様々な臓器から局所的に分泌され、近傍の臓器や細胞に作用する局所因子と考えられている。

またそのアミノ酸配列が PTH1 型受容体と 51% 同一である PTH2 型受容体が存在する。この PTH2 型受容体は、主に脳や脾臓で発現している。PTH(1-34) は PTH2 型受容体に対しても結合するが、PTHrP は PTH2 型受容体に対しては結合が非常に弱いことが知られている。PTH2 型受容体に対しては、脳から精製された Tuberoinfundibular peptide 39 (TIP39) が内因性のリガンドと考えられている (図 2)。TIP39 は PTH1 型受容体に対しては cAMP 活性をほとんど示さない。TIP39 と PTH2 型受容体の機能はまだ不明な点が多いが、痛みの伝達に関与することが示唆されている (4)。

	1	10	20	30	34
PTH(1-34)	SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF				
PTHrP(1-34)	AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRFFLHHLIAEIHATA				
TIP 39	SLALADDAAFRERARLLAALERRHWLNSYMHKLLVLDAP				

図 2. PTH、PTHrP 及び TIP39 のアミノ酸配列比較

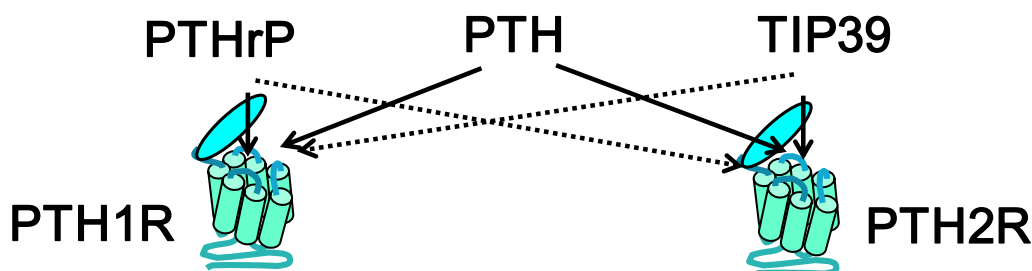


図 3. PTH、PTHrP 及び TIP39 の PTH1 型受容体、PTH2 型受容体に対する反応性の違い

(Pharmacol Rev. 2015; 67:310-37 から改変)

副甲状腺ホルモン受容体

PTH の受容体は、膜 7 回貫通型受容体であり、副甲状腺ホルモン 1 型受容体 (PTH1 型受容体) である (図 4) (5)。PTH1 型受容体は、G-protein 共役受容体 (G-protein coupled receptor : GPCR) のうち、Corticotrophin-releasing factor (CRF) 受容体や Glucagon-like peptide-1 受容体 (GLP-1) と同じ family B 受容体と呼ばれる、主に比較的アミノ酸が長いペプチドの受容体と同じ部類の GPCR に所属しており、細胞外ドメインが大きい (6)。アドレナリンなどの低分子がリガンドの Family A 受容体は、細胞外ドメインが小さく、グルタミンやカルシウムなどがリガンドの Family C 受容体は、細胞外ドメインが大きく、その細胞外ドメインにリガンドが結合する特性を持つ。

PTH1 型受容体は、ヒト第三染色体の 14 個のエクソンでコードされている (7)。PTH1 型受容体は 593 アミノ酸で構成されており、1 から 22 番までがシグナル配列と考えられている。細胞外ドメインが 23 番から 186 番付近までと予想されており、細胞外ドメインには、4 つの糖鎖付加を受ける可能性のあるアミノ酸が存在する。また Cys 同士の 4 つの S-S 結合が存在する。

PTH1 型受容体の細胞内の C 末端部位には、アゴニストの刺激によりリン酸化を受け、 β -arrestin と結合するために重要な 7 つの Ser リン酸化部位が存在する (8-10)。また C 末端には NHERF と結合してリンの輸送阻害に関係すると思われる ETVM 配列が存在する (11)。また、リガンド非依存的恒常的活性化変異の H223R、T410P、I458R が見つかっており、これらは PTH1 型受容体が恒常的に活性化して軟骨分化が促進され低身長をきたす Jansen 病の原因として見出されている (12-14)。

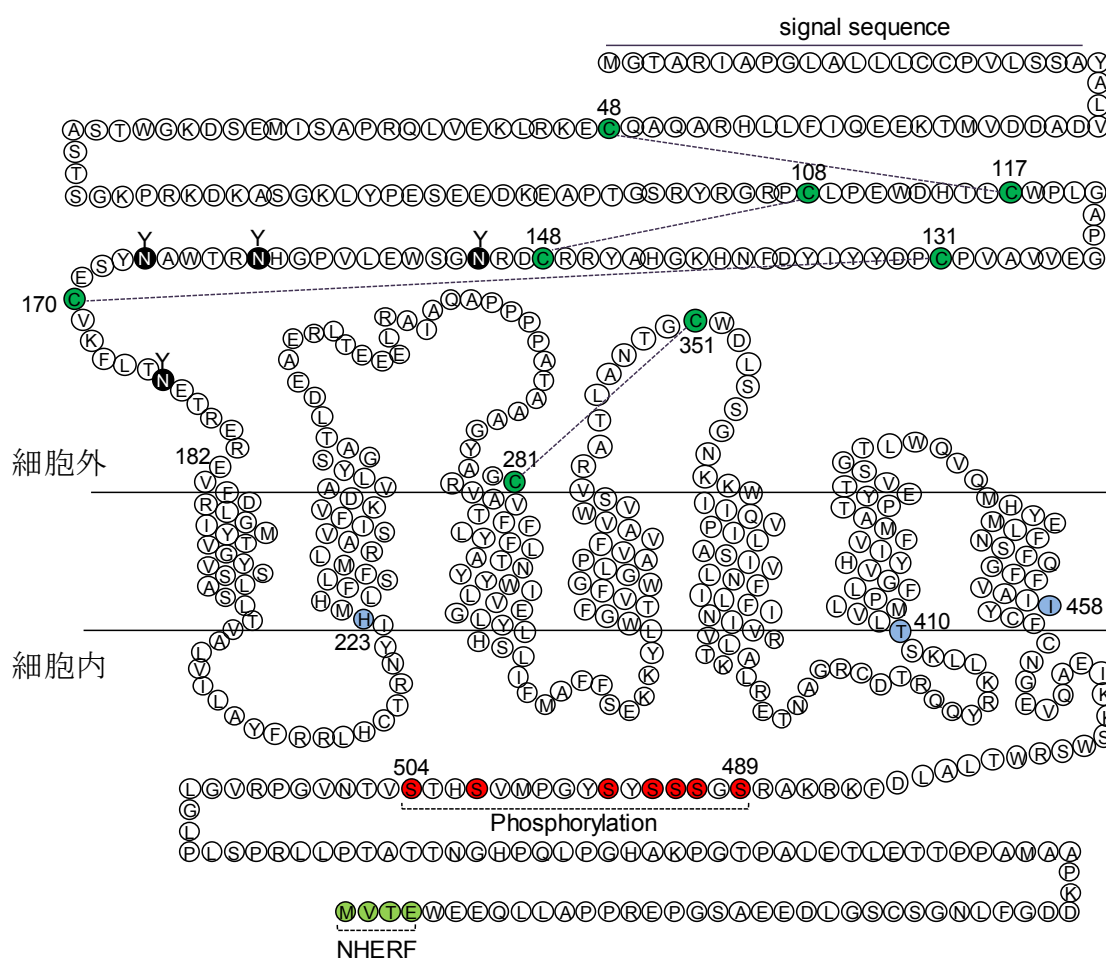


図 4. 副甲状腺ホルモン 1 型受容体 (PTH1 型受容体) の構造

1-22 番 : シグナル配列、● Cys : 48-117, 108-148, 131-170, 281-351 : ジスルフィド結合、● Asn : 糖鎖付加部位。● Ser : 489, 491-493, 495, 501, 504 : リン酸化部位。緑 590-593 : NHERF 結合部位。● H223R, T410P, I458R 変異 : リガンド非依存的恒常活性化変異 (Pharmacol Rev. 2015; 67;310-37 から改変)

PTH1 型受容体の下流シグナルとしては、cAMP/PKA を活性化させる Gs と、PLC/PKC を活性化させる Gq と共役し、標的臓器の細胞内に様々な作用を引き起こすことが知られている (5)。その他に、G $\alpha_{12/13}$ /RhoA/PLD 及び、 β -arrestin を介する ERK1/2 シグナルも報告されている。

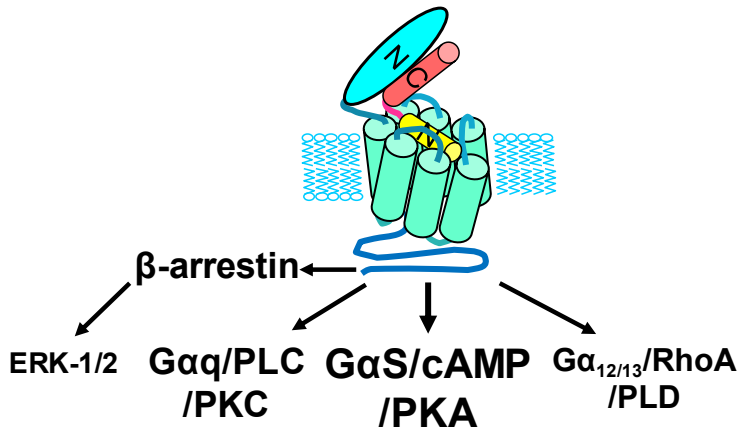


図 5. PTH1 型受容体のシグナル伝達 (Pharmacol Rev. 2015; 67;310-37 から改変)

PTH1 型受容体とリガンドの相互作用機構は、Two-site model が提唱されている。すなわち、GPCR の比較的大きい細胞外ドメインと、リガンドの C 末端側が結合にし、受容体の細胞膜ドメイン (Transmembrane Domain: TMD region) とリガンドの N 末端側が相互作用し、シグナルを伝達する。PTH の N 端フラグメントである PTH(1-14)、もしくはそのアナログでの cAMP 活性と PLC 活性を示すことが報告されている (15-18)。

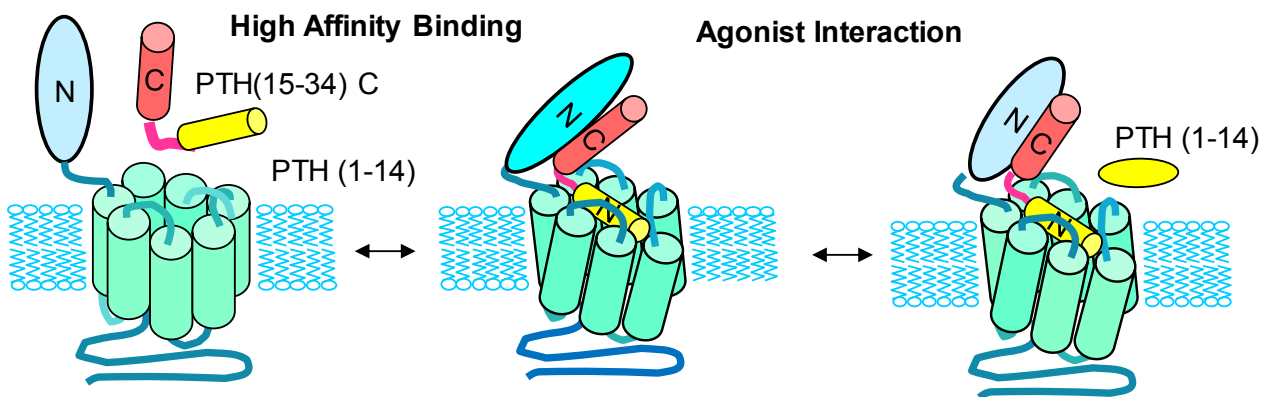


図 6. PTH1 型受容体のリガンドと受容体相互作用における two-site モデル (Pharmacol Rev. 2015; 67;310-37 から改変)

また、この PTH(1-14) アナログで最も活性が強い [Aib^{1,3}, A¹², Q¹⁰, Har¹¹, W¹⁴]-PTH(1-14) は、PTH1 型受容体の TMD region に特異的なトレーサーとして、PTH1 型受容体の TMD region に特異的に結合する低分子化合物の特性評価に利用できることが報告されている (19-20)。

1-3. PTH1 型受容体の新たな活性化機構

Endosomal Signaling

近年、PTH1 型受容体の活性化機構、すなわち Endosomal Signaling が報告されている。G 蛋白共役型膜受容体 (G-protein Coupled Receptor : GPCR) は、不活性化状態の受容体が一分子と結合すると立体構造変化を起こし、G 蛋白と会合した状態での活性化構造である RG 構造となる。3 量体を形成している G 蛋白 ($G\alpha\beta\gamma$) は、通常はその α サブユニットに GDP が結合しているが、GPCR が一分子と結合して活性化すると、 $G\alpha$ サブユニットにおける GDP から GTP への交換反応が起こり、 $G\alpha$ 、 $G\beta$ 、 $G\gamma$ サブユニットが GPCR から解離し、それらが細胞内のエフェクター分子 (Adenyl cyclase など) に結合してシグナルを伝達する。この際、GPCR は G 蛋白が解離した立体構造 (RO 構造) になると考えられている。 $G\alpha$ サブユニットは GTP 分解活性を持つことにより、GTP を加水分解して GDP に変換し、不活性化型となる。以上により、GPCR は膜上に存在し、G 蛋白サブユニットが GPCR から解離して細胞内シグナルを活性化することが classical な GPCR のシグナルメカニズムと考えられている。しかし、近年は Endosome で G 蛋白のシグナルが活性化するメカニズム (Endosomal Signaling) が明らかになりつつあり、PTH1 型受容体でこの Endosomal Signaling が報告されている (21)。

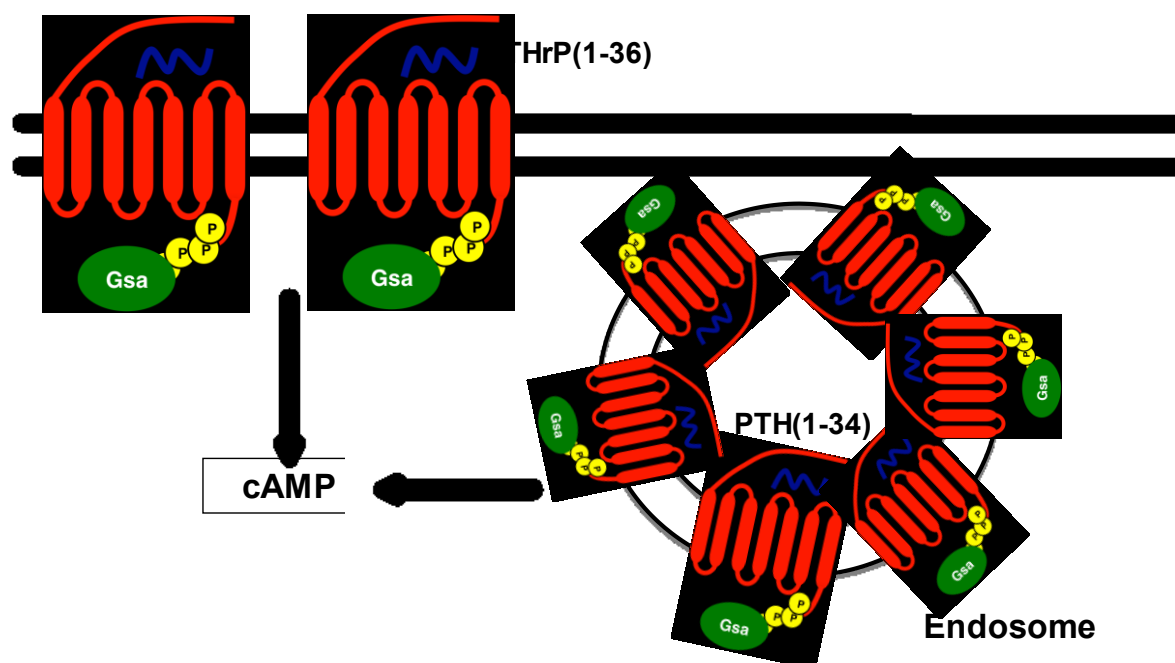


図 7. PTH1 型受容体の Endosomal Signaling の提唱モデル

(Nat Chem Biol. 2014;10:707-9 から改変)

このメカニズムの発見は、PTH(1-34) と PTHrP(1-36) の作用の違いから明らかとなった。PTH(1-34) と PTHrP(1-36) は、PTH1 型受容体の膜画分を使った binding assay においては、PTH1 型受容体

の RG 構造 (G 蛋白結合型活性化構造) に対する結合性はほぼ同じであるが、GTP γ S を大過剰に加えることで、PTH1 型受容体から G 蛋白を解離させた構造である R0 構造に対しては、PTHrP(1-36) は PTH(1-34) よりも数倍弱いことが示されていた (22)。このことから、PTH(1-34) は R0 結合型リガンド、PTHrP(1-36) は RG 結合型リガンドと考えられる。Ferrandon らは、この PTH(1-34) と PTHrP(1-36) について、生きた細胞系における作用の違いを PTH1 型受容体の FRET を使った *in vitro* 評価系で検討した (23)。その結果、PTH(1-34) と PTHrP(1-36) は、PTH1 型受容体に同程度のスピードで結合するが、リガンドを wash-out した状態では、PTHrP(1-36) は PTH1 型受容体から速やかに離れ、PTH(1-34) は wash-out したのちでも PTH1 型受容体に持続的に結合している、という違いが明らかとなった。そこで更に、細胞内の G 蛋白の活性化と cAMP 産生のスピードを FRET を使い評価したところ、PTH(1-34) は持続的に G 蛋白の活性化と cAMP 産生を誘導する一方、PTHrP(1-36) はこれらシグナルを一過性に活性化して速やかに不活化させることが明らかとなった。

更に、G α s と PTH(1-34)、もしくは PTHrP(1-36) に蛍光を結合させた FRET の検討では、PTH(1-34) は細胞内に internalization して G α s と endosome で共局在していたが、PTHrP(1-36) は細胞膜上に存在して G α s と共局在する違いが見いだされた。そこで、cAMP により活性化する FRET の系を使い、PTH(1-34) と PTHrP(1-36) の cAMP 活性化の時間と PTH1 型受容体と各リガンドとの結合時間を比較したところ、PTH(1-34) が PTH1 型受容体と endosome で結合している時間、と PTHrP(1-36) が細胞膜上で PTH1 型受容体と結合している時間が、細胞内の cAMP の活性化時間がほぼ一致することが明らかとなった。このことから、PTH(1-34) は、PTH1 型受容体、G 蛋白と結合した状態で endosome に internalization し、endosome 内で cAMP シグナルを伝達している、すなわち endosomal signaling の存在が想定された。

また、これまでの GPCR のシグナル伝達機構においては、GPCR が活性化すると GPCR の細胞内 C 末端が GPCR-receptor kinase (GRK) によりリン酸化され、 β -Arrestin が結合して G 蛋白の再カップリングを阻害し、GPCR のシグナルを阻害すると考えられている。このことから、Feinstein らは、PTH1 型受容体における β -Arrestin と Endosomal Signaling の関係を調べた (24)。PTH1 型受容体を stable に発現する HEK293 細胞に、 β -Arrestin1/2 の siRNA を導入したところ、細胞内 Ca²⁺ の上昇は β -Arrestin siRNA で増加したが、FRET を使った細胞内 cAMP 産生はむしろ低下した。また、PTH(1-34) による cAMP の持続的な産生は、 β -Arrestin1 を過剰発現細胞においても変化がなく、PTH(1-34) の刺激により、 β -Arrestin と PTH1 型受容体が Endosome に共局在していることが確認された。そこで、endosome に存在する retromer の関与を検討したところ、PTH リガンド刺激の早期では、PTH1 型受容体と β -Arrestin が endosome で共局在し、その後 retromer と PTH1 型受容体が共局在することが明らかとなった。また、PTH1 型受容体の PTH(1-34) による cAMP

の持続的な産生は、retromer を過剰発現させることにより減弱することも明らかとなり、PTH リガンド刺激による PTH1 型受容体の cAMP 産生の持続を抑制する因子は、 β -arrestin ではなく retromer であることが示された。以上のように、近年の研究では、PTH1 型受容体における活性化構造と cAMP シグナルの持続性、及び Endosomal Signaling の研究が進んでいる。

R0 結合性が高い持続型 PTH アナログ (Long-acting PTH : LA-PTH)

前述したように、RG 結合型リガンドである PTHrP(1-36)は、PTH1 型受容体に対して細胞膜上で cAMP/PKA シグナルを伝達するが、R0 結合型リガンドである PTH(1-34)は、endosomal signaling を誘導し、cAMP/PKA シグナルを持続的に作用させることが判明している。このことから、Okazaki らは、PTH(1-34) よりも R0 結合性を更に高めた PTH アナログである M-PTH(1-34)をデザインし、in vivo での作用を検討した (25)。その結果、in vitro でも R0 結合性が高く、cAMP 産生の持続性も高い M-PTH(1-34)は、in vivo においては血中カルシウム上昇作用が PTH(1-34) よりも持続していた。この M-PTH(1-34)は、マウスの血中からは PTH(1-34)と同様に速やかに消失しており、M-PTH(1-34)の持続的な血中カルシウム上昇作用は、血中動態が持続したことではなく、PTH1 型受容体に持続的に作用することによるものと考えられた。

更に、R0 構造への結合性が M-PTH(1-34) よりも高い持続型 PTH アナログ (Long-Acting PTH : LA-PTH) [A^{1, 12, 18, 19, 22}, Q¹⁰, R¹¹, W¹⁴, K²⁶]-PTH(1-14)/PTHrP(15-36)は、in vitro での cAMP wash-out assay では、細胞内 cAMP 産生の持続時間が M-PTH(1-34) よりも高く、マウスにおいて M-PTH(1-34) より持続的に血中 Ca 上昇作用を示すことが報告されており、LA-PTH は現在最も持続性が高い PTH アナログと考えられている (26)。

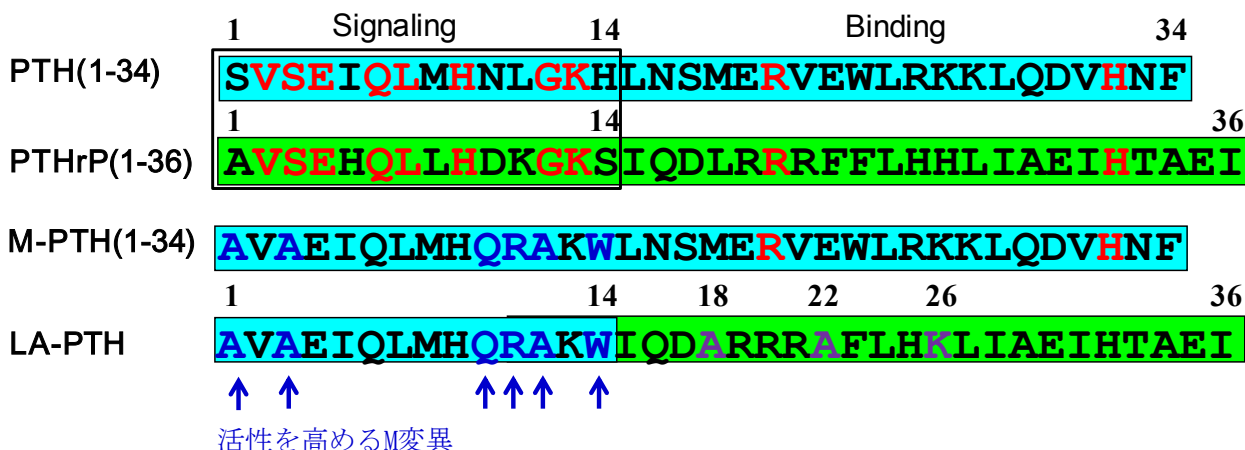


図 7. PTH(1-34)、PTHrP(1-36)、M-PTH(1-34)及びLA-PTHのアミノ酸配列

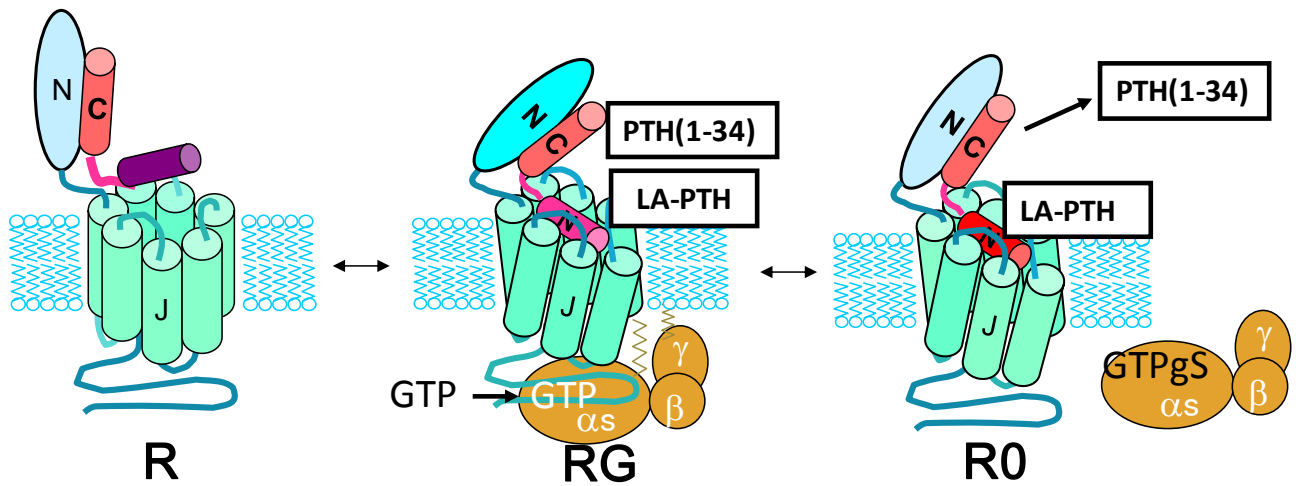


図 8. PTH1 型受容体活性化構造における G 蛋白結合型活性化構造 (RG) と G 蛋白非結合型活性化構造 (R0) と、PTH(1-34)、及び LA-PTH の R0/RG 結合性

後述するが、本検討ではこの LA-PTH を副甲状腺機能低下症モデルラットに投与して、その血中カルシウム上昇作用と骨代謝に対する効果を検討した。

1-4. PTH の骨代謝調節機構

PTH の骨形成促進作用

生体における骨代謝調節には、間葉系幹細胞から分化し骨を作る骨芽細胞 (Osteoblasts) と、造血系幹細胞から分化し骨を吸収する破骨細胞 (Osteoclasts) の間で、骨形成と骨吸収がバランスを取り、古い骨が新しい骨に置き換わることで、骨量が維持されている。骨芽細胞は、間葉系幹細胞から分化するが、分化段階に応じて発現しているマーカーが異なることが知られている。分化早期の骨芽細胞前駆細胞では Runx2、その後 Osterix が発現し、骨を積極的に作る骨芽細胞においては、その分化段階の初期では Type I コラーゲン、後期ではオステオカルシンが発現する。骨芽細胞の一部は骨の表面で休止する細胞 (Lining cell) となるが、骨芽細胞の分化が更に進むと、骨の内部に入り込んで、樹状突起を伸ばしてネットワークを形成する骨細胞 (Osteocytes) (DMP1 が発現) に分化する。

PTH は、生体に間歇的に作用させると、骨形成を促進して骨量を増加させる一方、持続的に作用させると、骨形成よりも骨吸収が上回り、むしろ骨量が低下する現象が知られている (27)。

PTH を間歇投与して骨形成が上昇する際に骨で認められる現象としては、1) 骨芽細胞の分化促進、2) Type I コラーゲンなどの骨基質の産生促進、3) 休止細胞の骨芽細胞への活性化、4) 骨芽細胞のアポトーシスの抑制、があげられる (図 9)。

一方で、PTH を持続投与すると、骨芽細胞で骨吸収を促進する Receptor Activator of NF- κ B Ligand : RANKL を強力に誘導し、骨芽細胞が破骨細胞の分化を促進して、骨吸収を亢進することも知られている (28)。

PTH を間歇投与した際の骨での変化については、Dobnig らが解析を行った (29)。PTH(1-34) をラットに 1 週間間歇投与すると、Type I コラーゲンなどの骨基質の産生が促進すると共に、骨芽細胞ではなく骨芽細胞前駆細胞での [3 H]-チミジンの取り込みが増加することを確認した。PTH 投与により、骨表面上の骨芽細胞の数も増加していたが、チミジン取り込みの検討結果から、PTH は骨表面で休止している lining cell を骨芽細胞に分化させた、との仮説が提唱された。休止細胞を LacZ でラベルし PTH(1-34) を短期投与したところ、LacZ ラベルされた骨芽細胞が増加したことから、PTH は lining cell を成熟骨芽細胞に分化させる、との仮説が検証された (30)。

PTH の骨芽細胞に対する効果を調べるため、PTH(1-34) を 1 週間持続投与し休薬させた骨の解析が行われた (31)。PTH(1-34) を 1 週間持続投与した場合には、骨髄中に [3 H]-チミジンの取り込み増加を伴った線維芽細胞の増加が確認され、その後の休薬で [3 H]-チミジンラベルされた骨芽細胞と骨細胞の増加が認められた。このことから、PTH の刺激は、骨髄中の線維芽細胞を増殖させ、PTH 刺

激が切れると、増殖した線維芽細胞が骨芽細胞や骨細胞に分化する、という作用機序が提唱されている。他にも、PTH(1-34)は骨芽細胞のアポトーシスを抑制し、骨芽細胞の survival を延長させる結果も報告されている (32)。

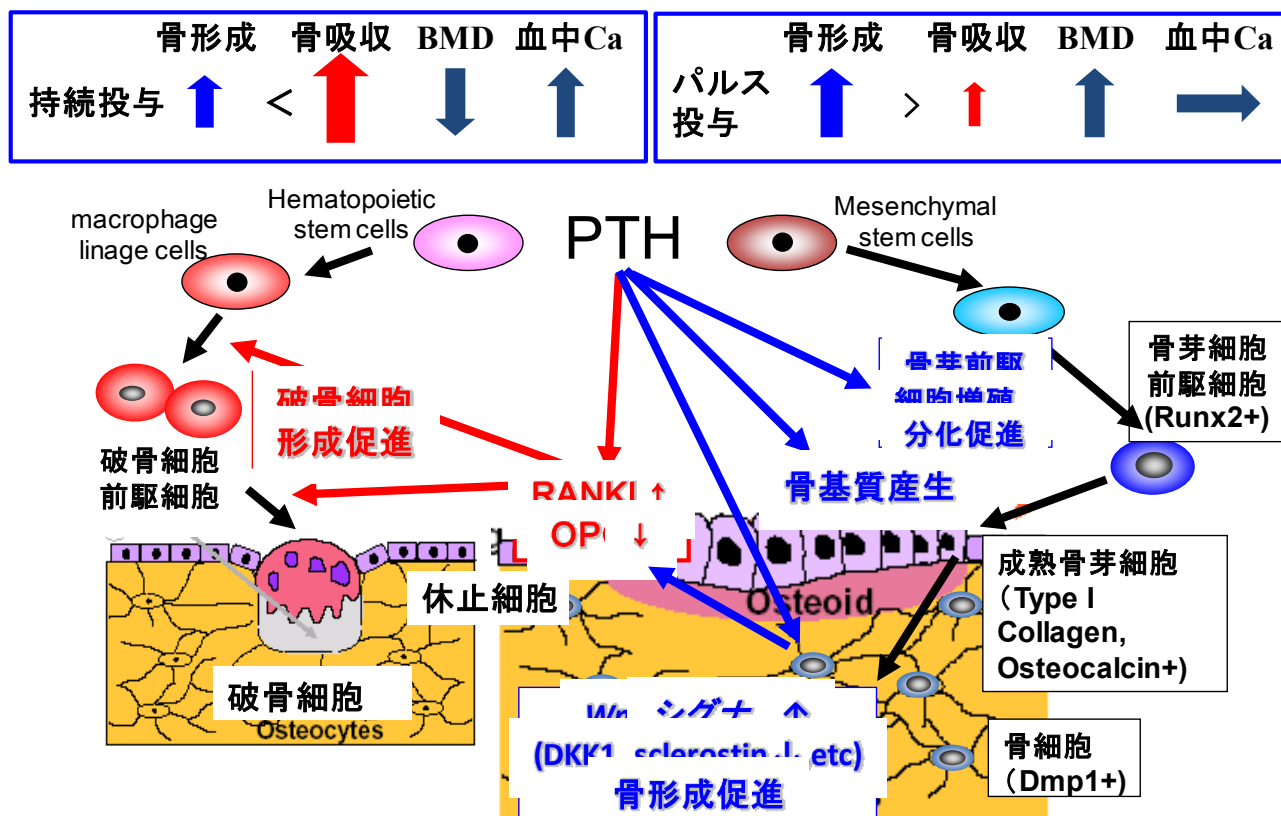


図 9. PTH の骨形成と骨吸収の提唱メカニズム (Bone 2007; 40:1434-46 から改変)

PTH で誘導される骨形成/骨吸収関連遺伝子

PTH により骨で誘導される遺伝子が報告されている。最初の報告は、PTH(1-34)を投与するとラット大腿骨成長板直下の海綿骨部位で、c-fos、c-jun、c-myc、IL-6 の遺伝子、及び蛋白が一過性に誘導される、という報告であった (33、34)。AP-1 family としては、c-fos、c-jun、c-myc、Fra-2、ATF4 の遺伝子が PTH(1-34)により誘導されることが報告されている (35、36)。これらの因子は、PTH の骨形成促進作用に関わることが報告されている (37、38)。

近年 Wnt シグナルが骨形成を促進に関わることが報告されており、PTH の骨形成への関与が示唆されている (39)。この Wnt シグナルに関わる分子としては、リガンドである Wnt と、G タンパクと共役する受容体である Frizzled、及びその共受容体である LRP5、6 がある。また、Wnt シグナルを阻害する蛋白として、Wnt に結合してシグナルを抑制する sFRP、また LRP5、6 に結合して Wnt の結合を阻害する Dickkopf : DKK や sclerostin、が存在する。Wnt シグナルが活性化する際には、Wnt リガンドが Frizzled と LRP5 または LRP6 の複合体に結合し、Axin と Disheveled : Dsh を介して

細胞内の Glycogen Kinase Synthase 3 β Kinase : GSK3 β を阻害し、 β catenin が活性化して細胞内に移行、骨形成に関与する遺伝子の発現を誘導することで、骨形成が促進すると考えられている。

これまでの報告により、PTH(1-34)を投与すると、骨中において Wnt シグナル阻害蛋白である DKK1、sclerostin の発現が低下することが報告されている (40-42)。骨で DKK1 を高発現させたマウスでは、PTH(1-34)による海綿骨の増加や骨形成マーカー PINP の上昇が認められないことから、DKK1 が PTH(1-34)の骨形成に関与していることが示唆されている (43)。また、sclerostin を骨細胞に特異的に発現させると PTH(1-34)の骨形成が減弱すること、sclerostin KO マウスでは、PTH(1-34)による骨量増加作用は認められなかったことから、sclerostin の発現抑制も、PTH の骨形成に関与していることが示唆されている (44)。また、PTH(1-34)を投与して骨で遺伝子発現解析を行ったところ、骨において Wnt4 の発現が高く誘導されることも報告されている (45、46)。

破骨細胞から誘導され、骨芽細胞の分化を促進することが示唆される因子として、EphrinB2/EphB4 の関与が報告されている (47)。この EphrinB2 は骨芽細胞前駆細胞でも発現しており、PTH(1-34)により骨芽細胞前駆細胞で誘導されることが報告されている (48)。EphrinB2 は、PTH による骨形成と骨吸収に関わっていることが報告されている (49)。

また、PTH による骨吸収促進作用は、骨芽細胞を介した破骨細胞へのシグナルで制御されていると考えられている。PTH1 型受容体は、主には骨芽細胞と骨細胞に多く発現する。PTH は骨芽細胞に作用して PTH1 型受容体のシグナルを伝達し、骨芽細胞において RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) を誘導する (50、51)。RANKL は TNF α と相同性を持つ膜蛋白であり、細胞間同士の相互作用により、シグナルを伝達する (52-54)。RANKL の受容体は RANK

(receptor activator of NF- κ B) であり、TNF α 受容体と相同性を持つ。RANK は破骨細胞前駆細胞にも発現しており、RANKL は M-CSF 存在下で破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化を促進することが報告されている (55)。以上のことから、PTH は骨芽細胞において RANKL を誘導し、破骨細胞を介した骨吸収により、骨から血中にカルシウムを動員すると考えられている。

1-5. PTH のカルシウム代謝調節機構

人間は体内に約 1kg のカルシウムを蓄えていると考えられており、そのうち 99%は骨でのハイドロキシアパタイトの形で存在しており、1%は細胞内、0.1%が細胞外液に存在していると考えられている。通常は、1日に 500~1000 mg のカルシウムを食事として摂取し、腸管からは約 300 mg 程度が腸管から体内に吸収されているが、腸管へも約 100~150 mg が分泌されており、正味は約 150 mg が食事から体内に吸収するカルシウム量と考えられている。

腎臓の糸球体では、1日に約 10,000 mg のカルシウムが濾過され、そのうち 9850 mg が尿細管で再吸収され、150 mg が尿中に排泄されると考えられている。濾過されたカルシウムの約 70%は近位尿細管で、20%はヘンレ上行脚で、残り 10%程度は遠位尿細管と集合管で再吸収される。

骨は生体のカルシウム貯蔵庫であり、カルシウムのバッファーとしての役割があると考えられている。日常的に骨からのカルシウムの出入りがあり、カルシウムの骨への流入と骨からのカルシウム放出のバランスがあると考えられている。

カルシウム代謝における PTH の標的臓器は骨と腎臓、と考えられている。血中カルシウムが低下すると、副甲状腺のカルシウム感知受容体の感知により、副甲状腺から PTH が分泌される。PTH は骨では骨吸収などによりカルシウムを血中へ動員し、また腎臓の主に遠位尿細管で尿からのカルシウム再吸収を促進するとともに、近位尿細管で活性型ビタミン D₃ を誘導しては、その活性型ビタミン D₃ が腸管に作用して、食事からのカルシウムの吸収を促進させ、血中カルシウムを一定にコントロールする。

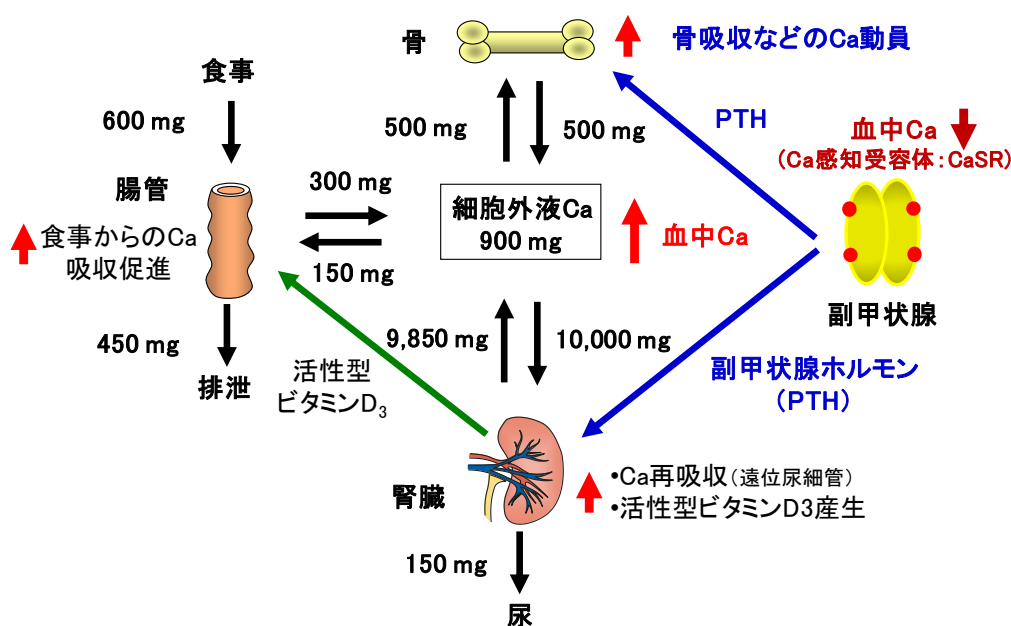


図 10 . PTH による血中カルシウム調節機構

(PTH/PTHrP の基礎と臨床、医薬ジャーナル 2002、から改変)

PTHの骨からのCa動員作用

前述したとおり、PTHは骨芽細胞においてRANKL、等の骨吸収因子を誘導し、破骨細胞を介した骨吸収により、骨から血中にカルシウムを動員すると考えられている。

近年、RANKLの主要なソースは骨芽細胞よりも骨細胞であるという説が提唱されており、またPTHによる骨吸収は骨細胞でのPTH1型受容体を介したRANKLの誘導が主要な役割を担っているのではないかと、という報告がなされている(56-60)。骨細胞は、骨の内部に埋まった細胞で、骨において90-95%を占めるとされ、最も大量に存在する細胞である(61)。骨細胞同士、互いに樹状突起により結合している。この樹状突起は骨細管(canaliculae)と呼ばれるトンネル様構造により、骨組織内部にnetworkを形成しており、骨の表面の骨芽細胞や破骨細胞とも何等かの相互作用をしていると推察されている。

また、授乳期においては、骨細胞自身が骨融解作用(osteocytic osteolysis)を引き起こして骨から血中にカルシウムを動員して供給しており、それが骨細胞でのPTH1型受容体を介している、という報告もある(62、63)。今後、骨細胞でのPTHとPTH1型受容体による血中カルシウム調節機構の研究が更に発展すると思われる。

PTH の腎臓でのカルシウム、リン調節作用

腎臓においては、糸球体で濾過されたカルシウムは腎臓の尿細管で再吸収される。そのうち、約65%が受動的に細胞間隙を通過することによる再吸収であり、腎臓の尿細管では近位尿細管で主に再吸収され、ヘンレ上行脚、及び遠位尿細管でも再吸収される。

PTH は腎臓でカルシウムの再吸収を促進するが、そのほとんどは遠位尿細管での再吸収の促進である。ヘンレループにおいては、PTH は管腔側の電位を上昇させ、カルシウムの受動的な細胞間隙を介した再吸収を促進する一方、遠位尿細管では細胞内を介したカルシウム輸送を促進する。遠位尿細管において、PTH は管腔側の膜上にカルシウムポンプを translocation させ、細胞内へのカルシウム取り込みを促進し、一方で基底外膜側の Na/Ca exchanger の活性を高め、カルシウムの輸送を高めることで、細胞内を介したカルシウム輸送を促進し、腎臓でのカルシウム再吸収を促進させる。

また、PTH は、腎臓の近位尿細管で、 $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を活性型ビタミン D3 : $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}^3$ に変換して、活性型ビタミン D3 を誘導し、その活性型ビタミン D3 が腸管に作用して、食事からのカルシウム吸収を促進することで、間接的に血中カルシウムを制御することが知られている。 1α 位を水酸化させる 1α 水酸化酵素は、腎臓の近位尿細管のミトコンドリア内膜に存在する P-450 酵素であり、PTH と PTH1 型受容体を介して腎臓でその発現が誘導される (62-63)。

PTH のリン排泄と調節に関する作用

リンは生体に約 600 g 存在すると考えられており、そのうち 85%はハイドロキシアパタイトとして骨に蓄積されている。それ以外の多くは、ATP などの構成成分として細胞内に存在し、細胞外液には約 500 mg 程度と考えられている。

食事には通常リンが約 800～2000 mg 含まれており、約 65%が腸管から吸収される。また、腸管から吸収された量とほぼ同程度の量が腎臓から排泄されると考えられている。血清中リン濃度はは 3.0～4.5mg/dL に調節されており、そのほとんどが腎臓の糸球体で濾過される。そのうち 80～90 %程度は尿細管で、また主に近位尿細管で再吸収される。PTH は、近位尿細管でのリン再吸収を抑制し、尿中へのリン排泄を促進させる。

近位尿細管でリンの再吸収に関する分子は、ナトリウム依存性リン共輸送体 (NPT) であり、腎臓には I 型と II 型が存在する (64)。IIa 型 NPT の欠損マウスでは大半のリンの再吸収が抑制されことから、IIa 型 NPT がリン再吸収の主たる役割を担っていると考えられている (65)。この II 型 NPT は尿細管管腔側刷子縁膜 (Brush Border Membrane) に存在する。PTH は、その cAMP シグナルと PKC シグナルを介して、この IIa 型 NPT を刷子縁膜から細胞内に移動させて膜上の発現量を低下させ、その結果リン輸送を抑制することで尿中リン排泄を促進させることが明らかとなっている (66、67)。IIc 型 NPT も、近位尿細管において PTH の cAMP/PKC シグナルの刺激により、細胞内に移動することが報告されている (68)。

このように、PTH は腎臓に作用して尿中へのリン排泄を促進して血中リンを低下させ、調節する作用が示されている。

1-6. 副甲状腺機能低下症

PTHに関連する疾患の一つとして、副甲状腺機能低下症（Hypoparathyroidism：HP）がある（69、70）。この疾患は、内因性PTHの分泌不全による低Ca血症をきたす病態である。低Ca血症により、全身の震え、手足の感覚異常、痙攣などのテタニー症状が発症し、気管支痙攣、喉頭痙攣、心拍数異常、などが起きる。

HPの発症原因としては、主には甲状腺がんなどの治療で甲状腺を摘出する際に、副甲状腺を摘出、もしくはダメージを受けることが主な原因である、続発性副甲状腺機能低下症である。他には、遺伝性疾患によってもHPを発症するケースがある。遺伝性疾患とは、具体的には、DiGerogeシンドロームや副甲状腺の形成に関与する遺伝子（TBX1, GATA3, TBCE, GCM2）、もしくはPTH遺伝子そのものの変異、ミトコンドリア機能不全、血中Caを感知するCa感知受容体（Ca Sensing Receptor）の恒常的活性化変異、などにより、内因性PTHの分泌不全が起き、HPを発症するケースがある。また、自己免疫疾患により副甲状腺機能が低下することによっても、HPを発症するケースもあり、これらの原因を診断することにより、HPの診断がなされる。

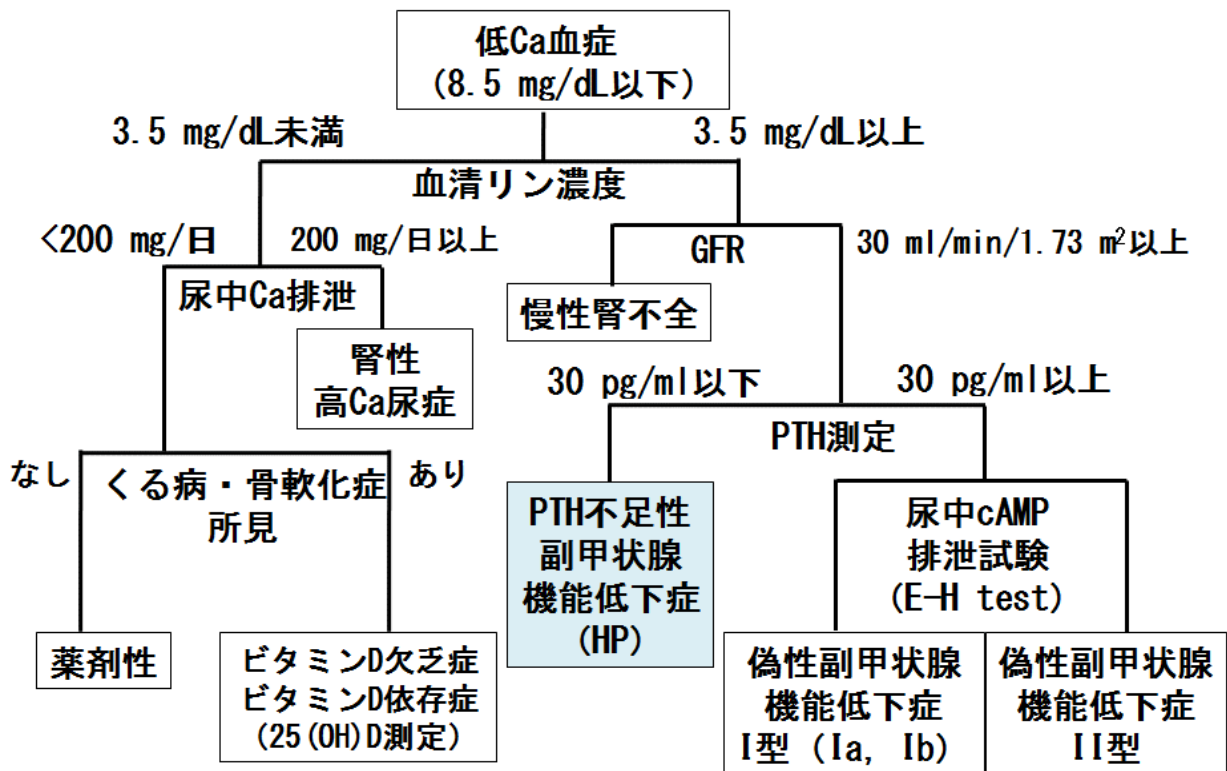


図 11. 低カルシウム血症の識別診断指針

(厚生省難治性疾患克服研究事業ホルモン受容体機構異常調査研究班)

副甲状腺機能低下症は、国内では低カルシウム血症の診断フローを経て、副甲状腺機能低下症の条件に当てはまる場合に副甲状腺機能低下症と診断される。

すなわち、血中 Ca を測定し、血中 Ca が 8.5 mg/dL 以下の場合は、低カルシウム血症と判断し、次に血清リンを測定する。血清リンが 3.5 mg/dL 以上の場合は、糸球体濾過量 Glomerular Filtration Rate (GFR) を測定し、GFR が 30 ml/min/1.73 m² 以上であれば、血中の intact PTH の量を測定し、その値が 30 pg/ml 以下であれば内因性 PTH レベルが低いことによる低 Ca 血症、すなわち副甲状腺機能低下症、と診断される。

HP 患者は、米国では約 6 万人が存在することが報告されている (71)。2007 年から 2008 年までの 12 カ月分の調査では、頸部手術を行った患者のうち約 7.6 %が HP と診断され、そのうち約 25% が慢性的な副甲状腺機能低下症と診断され、その総計は米国では約 6 万人であることが報告されている。また 75%の HP 患者は女性であり、65 歳以上の HP 患者は全体の約 37%であった。

現状の HP の標準療法は、高用量 (約 1-2 g) の経口カルシウム剤と主には活性型ビタミン D 製剤 (400-1000IU) を投与して、食事からの Ca 吸収を促進して低 Ca 血症を治療する方法が行われている。

しかしながら、経口カルシウム剤とビタミン D 製剤を併用する標準療法は、食事からのカルシウム吸収を促進して血中カルシウムを上昇させるのみであり、副甲状腺ホルモンによる厳密な血中カルシウムの制御が難しいと考えられている。実際、HP 患者に対する経口カルシウム剤とビタミン D 製剤の治療は、血中 Ca を厳密に制御することができずに高 Ca 尿症をきたし、長期の投与では腎臓の石灰化と腎結石、及び眼底や脳の Ca 沈着をきたすことが報告されている (72、73)。

この問題は、経口カルシウム剤とビタミン D 製剤の治療を受けている患者の追跡調査により明らかとなっている。Mittchel らは、HP の患者で経口カルシウム剤とビタミン D 製剤の標準治療を受けている HP 患者、約 120 人の治療成績 (平均 7.4 年間) を調査した (74)。HP 患者を標準療法で治療する目標血中カルシウム値を 7.5-9.5 mg/dL とし、HP 患者の血中カルシウム値を調査したところ、血中カルシウムが治療域に維持されていた患者は約 86%、通院したもっとも近い時間での血中カルシウム値では、約 71%は患者が目標治療域の血中カルシウムを維持していた。一方で、16%の患者は血中カルシウムが目標治療域を下回っており、また高 Ca 尿症 (1 日の尿中カルシウム排泄量が 300 mg 以上) を呈している患者が約 38%存在していた。腎臓のイメージングによる診断では、38%が腎臓の石灰化が起きており、また脳のイメージングでは 52%が大脳基底核の石灰化が認められた。これらの疾患は高カルシウム尿症、及び高カルシウム血症によるものと考えられることから、HP 患者において、経口カルシウム剤とビタミン D 製剤では十分に治療ができない患者層が一定の割合で存在しており、その多くが腎疾患などを有することが明らかとなった。

近年、HP の治療を行う新たな治療選択肢として、副甲状腺ホルモンそのものを投与する方法が検

討されている。HP は内因性 PTH が不足することが原因であることから、ホルモン補充療法が有効と考えられている。実際に臨床応用が進められているものとしては、PTH(1-84)、及びその N 末フラグメントである PTH(1-34)がある。

Winner らは、標準療法の Ca 剤とビタミン D 製剤で治療されている HP 患者 10 人に、標準療法の経口カルシウム剤とビタミン D 製剤の継続、もしくは 1 日 1 回 PTH(1-34)を約 10 週間投与する臨床研究を行った (75)。その結果、2 週後、及び 10 週後において、PTH(1-34)の投与群と標準療法の投与群の HP 患者の血中カルシウム濃度は、ともに治療ターゲットと考えられる 7.6 mg/dL~8.8 mg/dL (テタニーなどの自覚症状を発症しないとされる、正常レベルの下限) を維持した。一方、尿中カルシウムにおいては、投与 2 週後、及び 10 週後において、PTH(1-34)投与群では平均の尿中 Ca レベルは、標準療法の Ca/VD 剤よりも有意に低い値を示したが、Ca/ビタミン D3 製剤の平均尿中 Ca は、2 週後では正常レベル (本報告では約 240 mg/day) よりも高く、また 10 週後においても正常レベルの上限であった。

また、PTH(1-34)を皮下投与した場合、血中半減期が短く (76、77)、血中カルシウム上昇作用は一過性に上昇してその後低下する血中カルシウムの上下変動があることから、HP 患者での PTH(1-34)による血中カルシウム上昇作用を持続的に維持するため、12 時間ごとの 1 日 2 回の皮下投与 (78、79)、更にインスリンポンプを利用した PTH(1-34)の持続的なインフュージョンによる HP 治療の検討も実施されている (80、81)。HP 患者への PTH(1-34)の 1 日 2 回の皮下投与は、1 日 1 回の皮下投与よりも血中カルシウムを高いレベルに維持できており、また PTH(1-34)のインフュージョンでは、PTH(1-34)の 1 日 2 回の皮下投与よりも血中カルシウムを正常範囲のレベルに維持できていることが報告されている。

PTH(1-84)を使った HP 患者への治療も報告されている (82)。Rubin らは、経口カルシウム剤と活性型ビタミン D3 製剤の標準療法を受けている HP 患者に、PTH(1-84)、100 μ g を 2 日に 1 回、24 カ月間、皮下投与を上乗せする併用療法 (Add-on therapy) を行った。プロトコールとしては、血中カルシウムを定期的にモニターし、PTH(1-84)を投与して 1-2 週間後の血中カルシウムが維持、もしくは投与前値よりも高ければ、経口カルシウム剤を 500 mg ずつ減量し、最終的に投与量が 1500 mg になるまで減量した。その後、ビタミン D 製剤も同様に 0.25 μ g ずつ減量を行った。低カルシウム血症が起きた場合には、減量を行わずにその治療効果を検討した。その結果、血中カルシウムは正常範囲の下限レベル (2.1 mM) 以上を維持しながら、経口カルシウム剤を約 3000 mg/日から 1660 mg/日、活性型ビタミン D3 製剤は 0.68 μ g/日を 0.40 μ g/日まで減量することが可能となった。

更に近年、PTH(1-84)について、1 日 1 回 25 から 100 μ g までを 24 週間、経口カルシウム剤と活性型ビタミン D3 製剤の標準療法への Add-on 療法の大規模臨床試験が実施された (83)。血中カル

シウムは正常の下限レベル（1.87 mM）以上に維持しながら、経口カルシウム剤と活性型ビタミン D3 製剤の用量を 50%以上減量することを目標とした Placebo 比較試験である。その結果、治療終了の 24 週間時点において、PTH(1-84)を投与した HP 患者のうち、約 53%が経口カルシウム剤と活性型ビタミン D3 製剤の用量を 50%以上減量することが可能となった。しかしながら、尿中カルシウム排泄量は Placebo 群と違いは認められず、本臨床試験において尿中カルシウムの低減を示すことはできなかった。

PTH(1-84)を HP 患者に皮下投与した場合、PTH(1-34)に比較するとその血中半減期は比較的持続するものの、血中カルシウム上昇作用は 7 時間でピークとなりその後低下する血中カルシウムの上下動が存在することから、PTH(1-84)による HP に対する治療は、1 日 2 回の皮下投与を行って血中カルシウムを高いレベルに安定的に維持することが望ましい、という報告がなされている (84)。

以上のことから、HP の治療においては、現在の標準療法である経口カルシウム剤とビタミン D 製剤の併用療法や、PTH(1-34)及び PTH(1-84)を使ったホルモン補充療法でも満たされないアンメットニーズが未だ存在している。また、HP の治療において最も望ましい治療法は、PTH を持続的にインフュージョンする方法であることも示されている。このことから、HP の治療においては、PTH1 型受容体に持続的に作用し、血中カルシウムを高いレベルに維持することができる持続型 PTH アナログの開発が望まれる。

1-7. 参考文献

1. Suva LJ, Winslow GA, Wettenhall RE, Hammonds RG, Moseley JM, Diefenbach-Jagger H, Rodda CP, Kemp BE, Rodriguez H, Chen EY, et al. A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression. *Science*. 1987; 237:893-6.
2. Moseley JM, Kubota M, Diefenbach-Jagger H, Wettenhall RE, Kemp BE, Suva LJ, Rodda CP, Ebeling PR, Hudson PJ, Zajac JD, et al. A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84:5048-52.
3. McCauley LK, Martin TJ. Twenty-five years of PTHrP progress: from cancer hormone to multifunctional cytokine. *J Bone Miner Res*. 2012; 27:1231-9.
4. Dobolyi A, Palkovits M, Usdin TB. The TIP39-PTH2 receptor system: unique peptidergic cell groups in the brainstem and their interactions with central regulatory mechanisms. *Prog Neurobiol*. 2010; 90:29-59
5. Gardella TJ, Vilardaga JP. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIII. The parathyroid hormone receptors--family B G protein-coupled receptors. *Pharmacol Rev*. 2015; 67:310-37
6. Congreve M, Langmead CJ, Mason JS, Marshall FH. Progress in structure based drug design for G protein-coupled receptors. *J Med Chem*. 2011; 54:4283-311
7. Kong XF, Schipani E, Lanske B, Joun H, Karperien M, Defize LH, Jüppner H, Potts JT Jr, Segre GV, Kronenberg HM, et al. The rat, mouse and human genes encoding the receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide are highly homologous. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994; 200:1290-9.
8. Qian F, Leung A, Abou-Samra A. Agonist-dependent phosphorylation of the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor. *Biochemistry*. 1998 37:6240-6.
9. Malecz N, Bambino T, Bencsik M, Nissenson RA. Identification of phosphorylation sites in the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone. Receptor phosphorylation is not required for agonist-induced internalization. *Mol Endocrinol*. 1998; 12:1846-56.
10. Tawfeek HA, Qian F, Abou-Samra AB. Phosphorylation of the receptor for PTH and PTHrP is required for internalization and regulates receptor signaling. *Mol Endocrinol*. 2002; 16:1-13.

11. Mahon MJ, Donowitz M, Yun CC, Segre GV. Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor 2 directs parathyroid hormone 1 receptor signalling. *Nature*. 2002; 417:858-61.
12. Schipani E, Kruse K, Jüppner H. A constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia. *Science*. 1995; 268:98-100.
13. Schipani E, Langman CB, Parfitt AM, Jensen GS, Kikuchi S, Kooh SW, Cole WG, Jüppner H. Constitutively activated receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia. *N Engl J Med*. 1996; 335:708-14.
14. Schipani E, Langman C, Hunzelman J, Le Merrer M, Loke KY, Dillon MJ, Silve C, Jüppner H. A novel parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor mutation in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84:3052-7.
15. Luck MD, Carter PH, Gardella TJ. The (1-14) fragment of parathyroid hormone (PTH) activates intact and amino-terminally truncated PTH-1 receptors. *Mol Endocrinol*. 1999; 13:670-80.
16. Shimizu M, Potts JT Jr, Gardella TJ. Minimization of parathyroid hormone. Novel amino-terminal parathyroid hormone fragments with enhanced potency in activating the type-1 parathyroid hormone receptor. *J Biol Chem*. 2000; 275:21836-43.
17. Shimizu M, Carter PH, Khatri A, Potts JT Jr, Gardella TJ. Enhanced activity in parathyroid hormone-(1-14) and -(1-11): novel peptides for probing ligand-receptor interactions. *Endocrinology*. 2001; 142:3068-74.
18. Shimizu N, Guo J, Gardella TJ. Parathyroid hormone (PTH)-(1-14) and -(1-11) analogs conformationally constrained by alpha-aminoisobutyric acid mediate full agonist responses via the juxtamembrane region of the PTH-1 receptor. *J Biol Chem*. 2001; 276:49003-12
19. Carter PH, Liu RQ, Foster WR, Tamasi JA, Tebben AJ, Favata M, Staal A, Cvijic ME, French MH, Dell V, Apanovitch D, Lei M, Zhao Q, Cunningham M, Decicco CP, Trzaskos JM, Feyen JH. Discovery of a small molecule antagonist of the parathyroid hormone receptor by using an N-terminal parathyroid hormone peptide probe. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:6846-51
20. Carter PH, Dean T, Bhayana B, Khatri A, Rajur R, Gardella TJ. Actions of the small molecule ligands SW106 and AH-3960 on the type-1 parathyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol*. 2015; 29:307-21

21. Vilardaga JP, Jean-Alphonse FG, Gardella TJ. Endosomal generation of cAMP in GPCR signaling. *Nat Chem Biol.* 2014; 10:700-6
22. Dean T, Vilardaga JP, Potts JT Jr, Gardella TJ. Altered selectivity of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) for distinct conformations of the PTH/PTHrP receptor. *Mol Endocrinol.* 2008; 22:156-66
23. Ferrandon S, Feinstein TN, Castro M, Wang B, Bouley R, Potts JT Jr, Gardella TJ, Vilardaga JP. Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nat Chem Biol.* 2009; 5: 734 - 742
24. Feinstein TN, Wehbi VL, Ardura JA, Wheeler DS, Ferrandon S, Gardella TJ, Vilardaga JP. Retromer terminates the generation of cAMP by internalized PTH receptors. *Nat Chem Biol.* 2011; 7:278-84
25. Okazaki M, Ferrandon S, Vilardaga JP, Bouxsein ML, Potts JT Jr, Gardella TJ. Prolonged signaling at the parathyroid hormone receptor by peptide ligands targeted to a specific receptor conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:16525-30
26. Maeda A, Okazaki M, Baron DM, Dean T, Khatri A, Mahon M, Segawa H, Abou-Samra AB, Jüppner H, Bloch KD, Potts JT Jr, Gardella TJ. Critical role of parathyroid hormone (PTH) receptor-1 phosphorylation in regulating acute responses to PTH. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110:5864-9
27. Hock JM, Gera I. Effects of continuous and intermittent administration and inhibition of resorption on the anabolic response of bone to parathyroid hormone. *J Bone Miner Res.* 1992; 7:65-72.
28. Ma YL, Cain RL, Halladay DL, Yang X, Zeng Q, Miles RR, Chandrasekhar S, Martin TJ, Onyia JE, Catabolic effects of continuous human PTH (1--38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation, *Endocrinology* 2001; 142:4047-4054
29. Dobnig H, Turner RT, Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells, *Endocrinology* 1995; 136: 3632-3638
30. Kim SW, Pajevic PD, Selig M, Barry KJ, Yang JY, Shin CS, Baek WY, Kim JE, Kronenberg HM. Intermittent parathyroid hormone administration converts quiescent lining cells to active osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 2012; 27:2075-84.
31. Lotinun S, Sibonga JD, Turner RT, Evidence that the cells responsible for Marrow fibrosis in a rat model for hyperparathyroidism are preosteoblasts, *Endocrinology*

- 2005; 146:4074-4081
32. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest.* 1999; 104:439-46.
 33. Onyia JE, Bidwell J, Herring J, Hulman J, Hock JM. In vivo, human parathyroid hormone fragment (hPTH 1-34) transiently stimulates immediate early response gene expression, but not proliferation, in trabecular bone cells of young rats. *Bone.* 1995; 17:479-84.
 34. Liang JD, Hock JM, Sandusky GE, Santerre RF, Onyia JE. Immunohistochemical localization of selected early response genes expressed in trabecular bone of young rats given hPTH 1-34. *Calcif Tissue Int.* 1999; 65:369-73.
 35. Stanislaus D, Devanarayan V, Hock JM. In vivo comparison of activated protein-1 gene activation in response to human parathyroid hormone (hPTH) (1-34) and hPTH(1-84) in the distal femur metaphyses of young mice. *Bone.* 2000; 27:819-26.
 36. Yu S, Franceschi RT, Luo M, Zhang X, Jiang D, Lai Y, Jiang Y, Zhang J, Xiao G. Parathyroid hormone increases activating transcription factor 4 expression and activity in osteoblasts: requirement for osteocalcin gene expression. *Endocrinology.* 2008; 149:1960-8
 37. B. Demiralp, H. Chen, A. J. Koh, E. T. Keller, and L. K. McCauley, Anabolic actions of parathyroid hormone during bone growth are dependent on c-fos, *Endocrinology* 2002; 143:4038-4047
 38. Freitas LDP, Li M, Ninomiya T, Nakamura TM, Ubaidus S, Oda K, Udagawa N, Maeda T, Takagi R, Amizuka N. Intermittent PTH administration stimulates pre-osteoblastic proliferation without leading to enhanced bone formation in osteoclast-less c-fos/ Mice, *J Bone Miner Res.* 2009; 24:1586-1597
 39. Venkatesh K, Bryant HU, MacDougald OA, Regulation of bone mass by Wnt signaling, *J. Clin. Invest.* 2006; 116:1202-1209
 40. Kulkarni NH, Halladay DL, Miles RR, Gilbert LM, Frolik CA, Galvin RJS, Martin TJ, Gillespie MT, Onyia JE, Effects of parathyroid hormone on Wnt signaling pathway in bone, *J. Cell. Biochem.* 2005; 95:1178-1190
 41. Keller H, and Kneissel M, SOST is a target gene for PTH in bone, *Bone* 2005; 37: 148-158
 42. Bellido T, Ali AA, Gubrij I, Plotkin LI, Fu Q, O'Brien CA, Manolagas SC, Jilka RL,

- Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis, *Endocrinology* 2005; 246:4577-4583
43. Guo J, Liu M, Yang D, Bouxsein ML, Saito H, Galvin RJS, Kuhtstoss SA, Thomas CC, Schipani E, Baron R, Bringuhrst FR, Kronenberg HM, Suppression of Wnt signaling by DKK1 attenuates PTH-mediated stromal cell response and new bone formation, *Cell Metabolism* 2010; 11:161-171
 44. Kramer I, Loots GG, Studer A, Keller H, Kneissel M, Parathyroid hormone (PTH)-induced bone gain is blunted in SOST overexpressing and deficient mice, *J Bone Miner Res.* 2010; 25:178-189
 45. Li X, Liu H, Qin L, Tamasi J, Bergenstock M, Shapses MS, Feyen JH, Notterman DA, Partridge NC, Determination of dual effects of parathyroid hormone on skeletal gene expression in vivo by microarray and network analysis. *J. Biol. Chem.* 2007; 282:33086-33097
 46. Lee M, Partridge NC. Parathyroid hormone signaling in bone and kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2009; 18:298-302
 47. Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, Suda T, Matsuo K. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab.* 2006 ;4:111-21
 48. Allan EH, Häusler KD, Wei T, Gooi JH, Quinn JM, Crimeen-Irwin B, Pompolo S, Sims NA, Gillespie MT, Onyia JE, Martin TJ. EphrinB2 regulation by PTH and PTHrP revealed by molecular profiling in differentiating osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 2008; 23:1170-81
 49. Takyar FM, Tonna S, Ho PW, Crimeen-Irwin B, Baker EK, Martin TJ, Sims NA. EphrinB2/EphB4 inhibition in the osteoblast lineage modifies the anabolic response to parathyroid hormone. *J Bone Miner Res.* 2013; 28:912-25
 50. Lee SK, Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology.* 1999; 140:3552-61.
 51. Ma YL, Cain RL, Halladay DL, Yang X, Zeng Q, Miles RR, Chandrasekhar S, Martin TJ, Onyia JE. Catabolic effects of continuous human PTH (1-38) in vivo is

- associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology*. 2001; 142:4047-54.
52. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinoshita M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:3597-602.
53. Quinn JM, Elliott J, Gillespie MT, Martin TJ. A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro. *Endocrinology*. 1998; 139:4424-7.
54. Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med*. 1998; 188:997-1001.
55. Itoh K, Udagawa N, Matsuzaki K, Takami M, Amano H, Shinki T, Ueno Y, Takahashi N, Suda T. Importance of membrane- or matrix-associated forms of M-CSF and RANKL/ODF in osteoclastogenesis supported by SaOS-4/3 cells expressing recombinant PTH/PTHrP receptors. *J Bone Miner Res*. 2000; 15:1766-75.
56. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, Penninger JM, Takayanagi H. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med*. 2011; 17:1231-4
57. Saini V, Marengi DA, Barry KJ, Fulzele KS, Heiden E, Liu X, Dedic C, Maeda A, Lotinun S, Baron R, Pajevic PD. Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide type 1 receptor (PPR) signaling in osteocytes regulates anabolic and catabolic skeletal responses to PTH. *J Biol Chem*. 2013; Jul 288:20122-34
58. Rhee Y, Lee EY, Lezcano V, Ronda AC, Condon KW, Allen MR, Plotkin LI, Bellido T. Resorption controls bone anabolism driven by parathyroid hormone (PTH) receptor signaling in osteocytes. *J Biol Chem*. 2013; 288:29809-20
59. Ben-awadh AN, Delgado-Calle J, Tu X, Kuhlenschmidt K, Allen MR, Plotkin LI, Bellido T. Parathyroid hormone receptor signaling induces bone resorption in the adult skeleton by directly regulating the RANKL gene in osteocytes. *Endocrinology*. 2014; 155:2797-809
60. Xiong J, Piemontese M, Thostenson JD2, Weinstein RS1, Manolagas SC1, O'Brien CA3.

- Osteocyte-derived RANKL is a critical mediator of the increased bone resorption caused by dietary calcium deficiency. *Bone*. 2014; 66:146-54
61. Schaffler MB, Cheung WY, Majeska R, Kennedy O. Osteocytes: master orchestrators of bone. *Calcif Tissue Int*. 2014; 94:5-24
 62. Takeyama K, Kitanaka S, Sato T, Kobori M, Yanagisawa J, Kato S. 25-Hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase and vitamin D synthesis. *Science*. 1997; 277:1827-30.
 63. Shinki T, Shimada H, Wakino S, Anazawa H, Hayashi M, Saruta T, DeLuca HF, Suda T. Cloning and expression of rat 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94:12920-5.
 64. Busch AE, Biber J, Murer H, Lang F. Electrophysiological insights of type I and II Na/Pi transporters. *Kidney Int*. 1996; 49:986-7
 65. Beck L, Karaplis AC, Amizuka N, Hewson AS, Ozawa H, Tenenhouse HS. Targeted inactivation of *Npt2* in mice leads to severe renal phosphate wasting, hypercalciuria, and skeletal abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:5372-7.
 66. Keusch I, Traebert M, Löttscher M, Kaissling B, Murer H, Biber J. Parathyroid hormone and dietary phosphate provoke a lysosomal routing of the proximal tubular Na/Pi-cotransporter type II. *Kidney Int*. 1998; 54:1224-32.
 67. Traebert M, Roth J, Biber J, Murer H, Kaissling B. Internalization of proximal tubular type II Na-P(i) cotransporter by PTH: immunogold electron microscopy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000; 278:F148-54
 68. Segawa H, Yamanaka S, Onitsuka A, Tomoe Y, Kuwahata M, Ito M, Taketani Y, Miyamoto K. Parathyroid hormone-dependent endocytosis of renal type IIc Na-Pi cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 292:F395-403
 69. Bilezikian JP, Khan A, Potts JT Jr, Brandi ML, Clarke BL, Shoback D, Jüppner H, D'Amour P, Fox J, Rejnmark L, Mosekilde L, Rubin MR, Dempster D, Gafni R, Collins MT, Sliney J, Sanders J. Hypoparathyroidism in the adult: epidemiology, diagnosis, pathophysiology, target-organ involvement, treatment, and challenges for future research. *J Bone Miner Res*. 2011; 26:2317-37
 70. Shoback D. Clinical practice. Hypoparathyroidism. *N Engl J Med*. 2008 359:391-403
 71. Powers J, Joy K, Ruscio A, Lagast H. Prevalence and incidence of hypoparathyroidism in the United States using a large claims database. *J Bone Miner Res*. 2013; 28:2570-

72. Underbjerg L, Sikjaer T, Mosekilde L, Rejnmark L. Cardiovascular and renal complications to postsurgical hypoparathyroidism: a Danish nationwide controlled historic follow-up study. *J Bone Miner Res.* 2013; 28:2277-85
73. Goswami R, Sharma R, Sreenivas V, Gupta N, Ganapathy A, Das S. Prevalence and progression of basal ganglia calcification and its pathogenic mechanism in patients with idiopathic hypoparathyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2012; 77:200-6
74. Mitchell DM, Regan S, Cooley MR, Lauter KB, Vrla MC, Becker CB, Burnett-Bowie SA, Mannstadt M. Long-term follow-up of patients with hypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97:4507-14
75. Winer KK, Yanovski JA, Cutler GB Jr. Synthetic human parathyroid hormone 1-34 vs calcitriol and calcium in the treatment of hypoparathyroidism. *JAMA.* 1996; 276:631-6.
76. Lindsay R, Nieves J, Henneman E, Shen V, Cosman F. Subcutaneous administration of the amino-terminal fragment of human parathyroid hormone-(1-34): kinetics and biochemical response in estrogenized osteoporotic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 77:1535-9.
77. Satterwhite J, Heathman M, Miller PD, Marin F, Glass EV, Dobnig H. Pharmacokinetics of teriparatide (rhPTH[1-34]) and calcium pharmacodynamics in postmenopausal women with osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 2010; 87:485-92
78. Winer KK, Yanovski JA, Sarani B, Cutler GB Jr. A randomized, cross-over trial of once-daily versus twice-daily parathyroid hormone 1-34 in treatment of hypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83:3480-6.
79. Winer KK, Sinaii N, Peterson D, Sainz B Jr, Cutler GB Jr. Effects of once versus twice-daily parathyroid hormone 1-34 therapy in children with hypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93:3389-95
80. Winer KK, Zhang B, Shrader JA, Peterson D, Smith M, Albert PS, Cutler GB Jr. Synthetic human parathyroid hormone 1-34 replacement therapy: a randomized crossover trial comparing pump versus injections in the treatment of chronic hypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97:391-9
81. Winer KK, Fulton KA, Albert PS, Cutler GB Jr. Effects of pump versus twice-daily injection delivery of synthetic parathyroid hormone 1-34 in children with severe congenital hypoparathyroidism. *J Pediatr.* 2014; 165:556-63
82. Rubin MR, Sliney J Jr, McMahon DJ, Silverberg SJ, Bilezikian JP. Therapy of

hypoparathyroidism with intact parathyroid hormone. *Osteoporos Int.* 2010; 21:1927-34

83. Mannstadt M, Clarke BL, Vokes T, Brandi ML, Ranganath L, Fraser WD, Lakatos P, Bajnok L, Garceau R, Mosekilde L, Lagast H, Shoback D, Bilezikian JP. Efficacy and safety of recombinant human parathyroid hormone (1-84) in hypoparathyroidism (REPLACE): a double-blind, placebo-controlled, randomised, phase 3 study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2013; 1:275-83
84. Sikjaer T, Amstrup AK, Rolighed L, Kjaer SG, Mosekilde L, Rejnmark L. PTH(1-84) replacement therapy in hypoparathyroidism: a randomized controlled trial on pharmacokinetic and dynamic effects after 6 months of treatment. *J Bone Miner Res.* 2013; 28:2232-43

第 2 章 PTH が骨形成促進作用を示す最適な間歇投与の時間とその骨量増加作用のメカニズム

2-1. 実験の目的

PTH の骨代謝調節機構

前述したように、PTH を皮下投与などの間歇投与を行うと、骨形成を促進して骨量を増加させるが、インフュージョンなどの持続投与を行うと、むしろ骨吸収を亢進して骨量を低下させ、血中 Ca を上昇させることが明らかとなっている (1)。

このことから、どの程度の PTH 間歇投与を行うと骨形成を促進して骨量を増加させ、どの程度の PTH 持続投与を行うと骨吸収を促進して骨量を増加させないのか、いくつかの検討が実施されている。Dobnig らは、埋め込み型アルゼットポンプを使い、異なる時間間隔 (1 時間、2 時間、6 時間) で PTH(1-34) を反復的に 6 日間放出できるように調整し、骨代謝に対する影響を検討した結果が報告されている (2)。また、PTH(1-34) を異なる時間間隔と投与頻度で複数回、ラットに反復投与して BMD 増加を検討した結果も報告されている (3)。しかしながら、これらの試験においては、PTH(1-34) の投与量は $80 \mu\text{g}/\text{kg}$ と非常に高い投与量での検討であり、その際の PTH の血中レベルは約 $3800\text{--}18,000 \text{ pg}/\text{mL}$ である。一方、臨床において PTH(1-34) を骨粗鬆症治療薬として適応されている投与量は、体重換算で約 $0.3\text{--}0.4 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($20 \mu\text{g}\text{--}25 \mu\text{g}/$ 体重約 60 kg 前後) であり、その際の PTH の血中レベルは $160\text{--}360 \text{ pg}/\text{mL}$ である (4, 5)。以上のことから、過去の PTH(1-34) を使った骨形成に関する最適時間の検討は、臨床に外挿することは難しいことが想定される。

また、ラットでの PTH(1-34) の血中濃度推移は、臨床での PTH(1-34) の血中濃度推移と比較して短いこと (ラットでの T_{max} 、 $T_{1/2}$: 約 15 分、30 分、臨床での T_{max} 、 $T_{1/2}$: 約 30 分、1 時間前後) が明らかとなっている (6)。これらの問題点から、PTH(1-34) が骨組織において選択的に骨形成を促進し、骨量を増加させる最適暴露時間については、動物実験での検討が臨床への相関性を持って、十分に検討されている状況ではないと考えられる。

このことを解決するために、ラットインフュージョンフリームービングを使った in vivo 評価系を利用することを計画した (図 1) (7, 8)。このシステムは、カテーテルが外部からラットの大腿静脈に直接カニューレーションされているが、ラットはケージの中を自由に動くことができる。薬剤は、外部からインフュージョンポンプを使って反復投与でき、ラットを固定せずに薬剤の反復投与による効果を検討できるシステムである。ラットを固定して不動化させてしまうと、骨量が

低下することも知られており、本システムを使うことにより骨に対する影響を十分に排除できると考えられる。

我々は、このラットフリームービングインフュージョンシステムを使って、PTH(1-34)の骨形成促進作用と骨量増加作用を発揮する最適暴露時間の検討を行った。このシステムを用いて、PTH(1-34)を、その血中濃度が臨床投与量に近いレベルの約 300 pg/mL 前後となる投与量で、ラットに 1 日 1、2、4 時間の 4 週間の反復インフュージョン投与を行い、BMD 増加作用と骨代謝マーカーに対する効果を検討した。また、同システムを使い、PTH(1-34)の 4 時間までの単回インフュージョンを行い、骨において PTH で誘導される骨形成/骨吸収関連遺伝子の経時的な変化の検討を行い、PTH(1-34)のインフュージョンにより、PTH 誘導骨関連遺伝子がどのように変化するのか、検討を行った。PTH 投与で骨で誘導される遺伝子としては既に報告されている代表例、すなわち、AP-1 関連遺伝子である *c-fos*、*ATF4*、*Fra-1*、骨形成関連遺伝子として *Jagged-1*、*Runx2*、*Wnt4*、*SOST*、*EphrinB2*、骨吸収関連遺伝子としては *tnfsf11* (RANKL)、及び *tnfsf11b* (OPG) を評価した (9-19)。

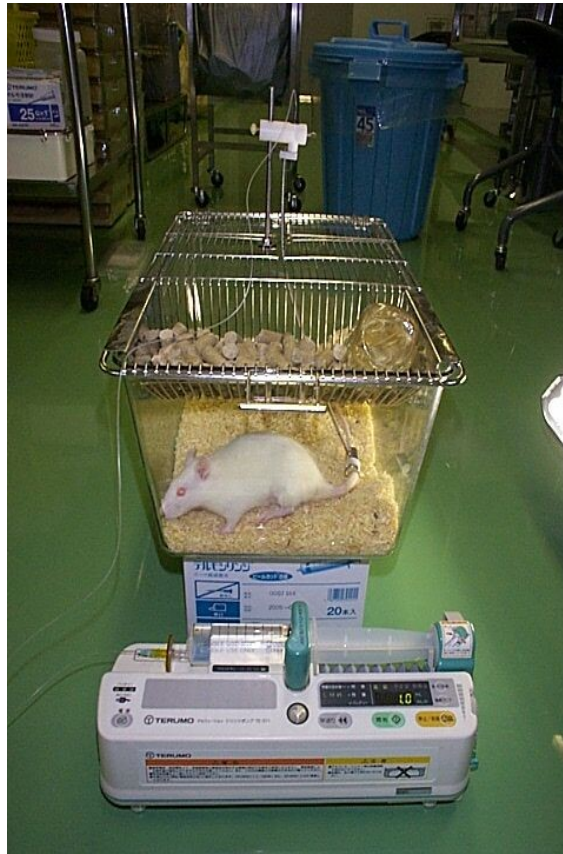


図 1. ラットフリームービングインフュージョンシステム

2-2. 実験方法

使用材料

ヒト PTH(1-34) : hPTH(1-34) はペプチド研より購入した。試験開始前に hPTH(1-34) を 0.05% Tween 80 / リン酸-クエン酸 buffer (23 mM クエン酸/25 mM リン酸ナトリウム/100 mM NaCl、pH5.0) に溶解した後分注し、使用時まで-80℃設定のフリーザーにて保存した。投与日にリン酸-クエン酸 buffer (23 mM クエン酸/25 mM リン酸ナトリウム/100 mM NaCl、pH5.0) を用いて各用量の投与剤を希釈調製し、ディスポーザブルシリンジ (テルモ株) に充填した。薬剤非投与時のモデル維持用に、市販されている生理食塩液 (テルモ株) を注射針 (テルモ株) を用いディスポーザブルシリンジ (テルモ株) に充填し、ディスポーザブルシリンジに充填した薬剤及び生理食塩液は、調製後から使用時まで室温で保存した。

動物実験

動物は、日本チャールズリバー株より、8 週齢 SD-IGS (crj:CD) ラット、雌を入手した。馴化後、個体の識別ため、入荷時に実施した耳パンチ法による個体番号の付与により、ケージの識別はケージカードによる個体番号の添付により実施した。持続静脈内投与モデル作製までは、金網製吊りケージ (ステンレススチール製、幅 660×奥行 310 ×高さ 200 mm) を使用し、1 ケージあたり 10 匹で飼育した。持続静脈内投与モデル作製後は、ラットインフュージョン用個別ケージ (220×380×180 mm、本体：ポリカーボネート製、蓋：ステンレススチール製) を使用し、1 ケージ当たり 1 匹で飼育した。

飼料：持続静脈内投与モデル作製までは、固型飼料 CE-2 (日本クレア株) を、自由摂取させた。モデル作製後はステンレススチール製の給餌器を用いて不断給与を行った。飲料水はポリサルホン製給水瓶を用いて水道水を不断給与した。

動物実験を実施した中外製薬は、AALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) International) 認証施設であり、実施した動物実験については、中外製薬の動物倫理規定により実験が承認されている。

持続静脈内投与モデルの作製

持続静脈内投与モデルの作製は、浅沼らの方法に準じて実施した (7, 8)。手術は、投与開始の約 1 週間前に行った。動物に、塩酸ケタミン (80 mg/kg、ケタラール®50、三共株) および塩酸キシラ

ジン (8 mg/kg、セラクター®2%注射液、バイエル株) を腹腔内投与し全身麻酔を行った。左側大腿部内側の皮膚を切開し大腿静脈を剥離した。ポリウレタン製のカテーテルを大腿静脈から挿入し、カテーテルの先端が後大静脈に位置するように固定した。カテーテルの他端は、皮下を通して尾部より体外へ導出し、テールカフおよびテサーを装着後、シーベル、フィルター (0.22 μm、日本ミリポア株) およびシリンジポンプ (テルモ株) を介してシリンジに接続した。動物には、カテーテル内の凝血予防のため、生理食塩液 (テルモ株) を 4 mL/kg/hr の速度で持続静脈内投与を行った。

解剖時に麻酔下で下腔大動脈より全採血してラットを安楽死させた後、剖検を行い、大腿骨を採取した。尿および血液はチューブにとり、遠心分離により上清を採取し、パラメーター測定まで設定温度-20°Cに保存した。右大腿骨は 70%エタノール中に保存した。

PTH(1-34) 血中濃度推移の評価

PTH(1-34) のインフュージョン実験では、ラット大腿動脈にカニューレションを行ってボールマンケージに固定し、ディスプレイザブルシリンジに充填した静脈内に PTH(1-34) を 1.28、7.69、23.2 μg/kg/h で 4 時間まで持続的インフュージョンを行い、継時的に (投与前、15 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間)、採血を行うとともに、インフュージョン終了後も 1 時間まで経時的 (5 分、15 分、30 分、60 分) に採血を行い、血漿中 PTH(1-34) レベルを測定した。

PTH(1-34) 皮下投与 (Sc、2nmol/kg) では、ラットに PTH(1-34) を投与前、投与後 5 分、15 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間まで、頸静脈から経時的に採血を行った。

各種測定

BMD を評価する実験は、hPTH(1-34) を週 5 回、4 週間の反復インフュージョンを行った。骨代謝マーカーを評価する実験においては、14 日間 hPTH(1-34) を反復インフュージョンした。hPTH(1-34) のインフュージョンによる血中濃度を評価する実験においては、ラット大腿動脈にカニューレを挿入し、ボールマンケージに固定して、一定時間経時的に採血を行い、EDTA 血漿を採取した。

BMD 測定は、DCS-600EX (アロカ社製) を用いて右大腿骨の骨密度を測定した。大腿骨 BMD を測定度、長軸方向に骨部位を 10 等分し、体に近い部位から 3 部位の BMD 平均値を近位 (1-3)、中間の 4 部位の BMD 平均値を中間部位 (4-7)、最後の 3 部位の BMD 平均値 (8-10) を遠位の BMD として算出した。

血清中 PINP は Rat/Mouse PINP EIA (Immunodiagnostic System Ltd.)、血清中オステオカルシンは、Osteocalcin rat ELISA system (アマシャム ファルマシア バイオテック) を用いて測定

した。尿中 CTx は RatLaps ELISA (Immunodiagnostic System Ltd.) で測定した。血漿中 PTH(1-34) の測定は、PTH(1-34) ELISA (Immutopics Inc.) を使用した。

PCR による骨での遺伝子発現評価

PTH(1-34) をインフュージョン、もしくは皮下投与後、各時間においてイソフルラン麻酔下でラット大腿動脈から全採血を行い、右大腿骨を速やかに採取した。大腿骨採取後、成長板直下の 1 次海綿骨部位を速やかに採取して液体窒素に浸し凍結した。凍結したサンプルを乳鉢に入れて乳棒で細かく粉碎し、TRizol (Life Technologies) を使って total RNA を抽出し、RNeasy ミニカラム (Qiagen) で RNA の精製を行った。200 ng の total RNA を用いて、逆転写酵素により complementary DNA (cDNA) を合成した。cDNA は、各遺伝子の TaqMan プライマーセット、及び Taqman (UPMM) を用い、リアルタイム PCR を用いて定量した。

PCR 条件

初期変性：95°C、10 分、変性：95°C、15 秒、アニーリング/伸長反応：60°C、1 分

40 サイクル反応、結果は 18S で補正後、投与前の値に対する fold increase で表示した。

使用したプローブ

c-fos : Rn02396759_m1

ATF-4 : Rn00824644_g1

Fra-1 : Rn00564119_m1

Jagged-1 : Rn00569647_m1

Runx2 : Rn01512296_m1

Wnt4 : Rn00584577_m1

SOST : Rn00577971_m1

EphrinB2 : Rn01756899_m1

TNFSF11 (RANKL) : Rn00589289_m1

TNFSF11b (OPG) : Rn00563499_m1

統計学的解析

SAS (Ver. 5.00., SAS Institute Japan) を用いて解析を行った。データは遺伝子変化、BMD 増加試験、及び骨代謝マーカーの試験は平均値±標準誤差、PTH(1-34) インフュージョン試験での血中

濃度推移は平均値±標準偏差で表示した。PTH(1-34)インフュージョン群について、溶媒投与群に対する Dunnet 多重検定を行った。PTH(1-34)皮下投与群は、溶媒投与群に対する 2 群の検定を行った。有意水準は両側 5%とした。

2-3. 実験結果

2-3-1. ラットにおける PTH 持続投与での血中 PTH レベルの評価

PTH(1-34)をラットに持続的にインフュージョンし、血清 PTH(1-34) レベルがどの程度持続的に維持されるのかを検討するために、PTH(1-34)を 1.28、7.69、23.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ で4時間まで持続的インフュージョンを行い、投与中継時的に（投与前、15分、30分、1時間、2時間、4時間）、採血を行うとともに、インフュージョン終了後も1時間まで経時的（5分、15分、30分、60分）に採血を行い、血漿中 PTH(1-34) レベルを測定した（Fig. 1）。

その結果、血漿中 PTH(1-34) レベルは持続的インフュージョンにより一定の血中レベルを維持し、PTH(1-34)の 1.28、7.69、23.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{時間}$ での速度による持続インフュージョンにより、血漿中 PTH(1-34) レベルはそれぞれ約 327、2048、and 9837 pg/mL を維持した。また、インフュージョン投与を終了すると、血漿中 PTH(1-34) レベルは速やかに低下した（Fig. 1-A）。

PTH(1-34)の臨床投与量での血中濃度の最大値（Cmax）はおよそ 180 pg/mL から 300 pg/mL 前後であることから、ラットインフュージョンモデルにおいて、血漿中 PTH(1-34) レベルは約 300 pg/mL を維持できる濃度とし、その際のインフュージョン速度を約 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{時間}$ とすることとした。

過去の文献報告により、PTH(1-34)を皮下投与して骨量を増加させる場合、5 から 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を間歇皮下投与すると大腿骨の骨量が増加する報告（6）があり、またその際の PTH(1-34)の最大血中濃度（Cmax）が約 180、及び 500 pg/mL 前後であったことから、比較対照として PTH(1-34)の 8.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ （2 nmol/kg）を皮下投与群の投与量とし、確実に骨量増加させる positive control として設定した。

実際にこの PTH(1-34)皮下投与での血中濃度を確認するため、ラットに PTH(1-34)を 2nmol/kg 皮下投与を行い、経時的に採血を行って PTH(1-34)の血漿中濃度推移を評価した。その結果、PTH(1-34)の血漿中濃度は、投与5分後に 428 pg/mL、30分で 124 pg/mL、投与後60分ではほぼベースラインまで低下しており、予想に近い血中濃度推移が得られた（Fig. 1-B）。

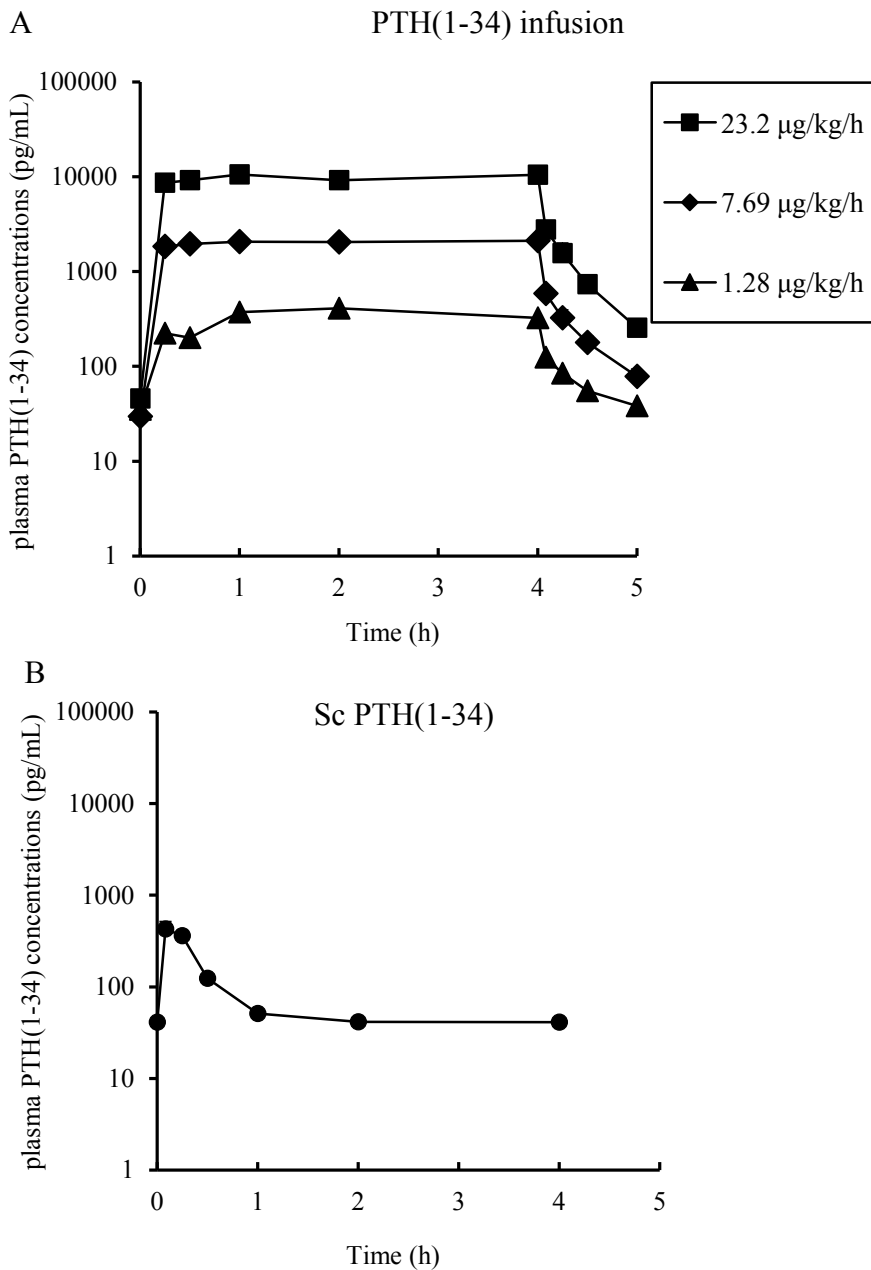


Fig. 1 ラットに PTH(1-34) を持続投与、もしくは皮下投与 (SC) した際の PTH(1-34) 血中濃度推移

- A. PTH(1-34) をカテーテルをカニューレションしたラットに、異なる速度 (1.28、7.69、及び 23.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{時間}$) で 4 時間、持続的なインフュージョンをおこなった。血液は、投与前、15 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間時で採血を行うとともに、インフュージョンを止めた後、5 分、15 分、30 分、1 時間まで採血を行った。平均値 \pm 標準誤差での表示 (n=3)、1.28 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{時間}$ は n=2。
- B. PTH(1-34) 皮下投与 (Sc, 2nmol/kg) では、投与前、投与後 5 分、15 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間まで採血を行った。血中 PTH(1-34) レベルは ELISA で測定を行った (n=4)。

2-3-2. 正常ラットでの PTH(1-34)単回インフュージョンによる骨での PTH 誘導遺伝子の反応

ラットのフリームービングインフュージョンモデルに、PTH(1-34)を $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{時間}$ で 1、2、4 時間で単回インフュージョンを行い、それぞれの時間で解剖して骨を採取し、1 次海綿骨から mRNA を採取して、RT-PCR により PTH で誘導される遺伝子の発現変化を測定した。 $8.6\mu\text{g}/\text{kg}$ の PTH(1-34) の皮下投与については、投与後 0.5、1、2、4 時間で大腿骨を採取した。RT-PCR で評価した遺伝子としては、AP-1 family の *c-fos*、*ATF4*、*fra-1*、骨形成関連遺伝子として *Jagged-1*、*Runx2*、*Wnt4*、*SOST*、*EphrinB2*、骨吸収関連遺伝子として *tnfsf11* (RANKL)、及び *tnfsf11b* (OPG)、を対照とした。

PTH(1-34)の4時間までのインフュージョンでは、明らかに上昇、もしくは低下した遺伝子(4倍以上の上昇、もしくは0.5倍以下の低下)としては *c-fos* が最も高かった(約40倍)(Fig. 2-左)。骨形成関連遺伝子としては、*Wn4* (23倍)、*EphrinB2* (25倍)も明らかに上昇し、*SOST* (0.3倍)も4時間で低下した。また骨吸収関連遺伝子の RANKL (5.2倍)も上昇、OPG (0.4倍)は低下し、RANKL/OPG 比 (12.5倍)も明らかに上昇した。

PTH(1-34)の皮下投与では、*c-fos* が 0.5 時間で一過性に上昇 (13.5 倍) し、*Wnt4* (4.8 倍)、及び *EphrinB2* (18.6 倍) も投与後 1 時間で誘導され、*SOST* (0.4 倍) は投与後 2 時間で一過性に低下した (Fig. 2-右)。RANKL (3.7 倍) は投与後 1 時間、RANKL/OPG 比 (7.7 倍) は 1 時間で一過性に上昇し、2 時間後には元のレベルまで低下した。

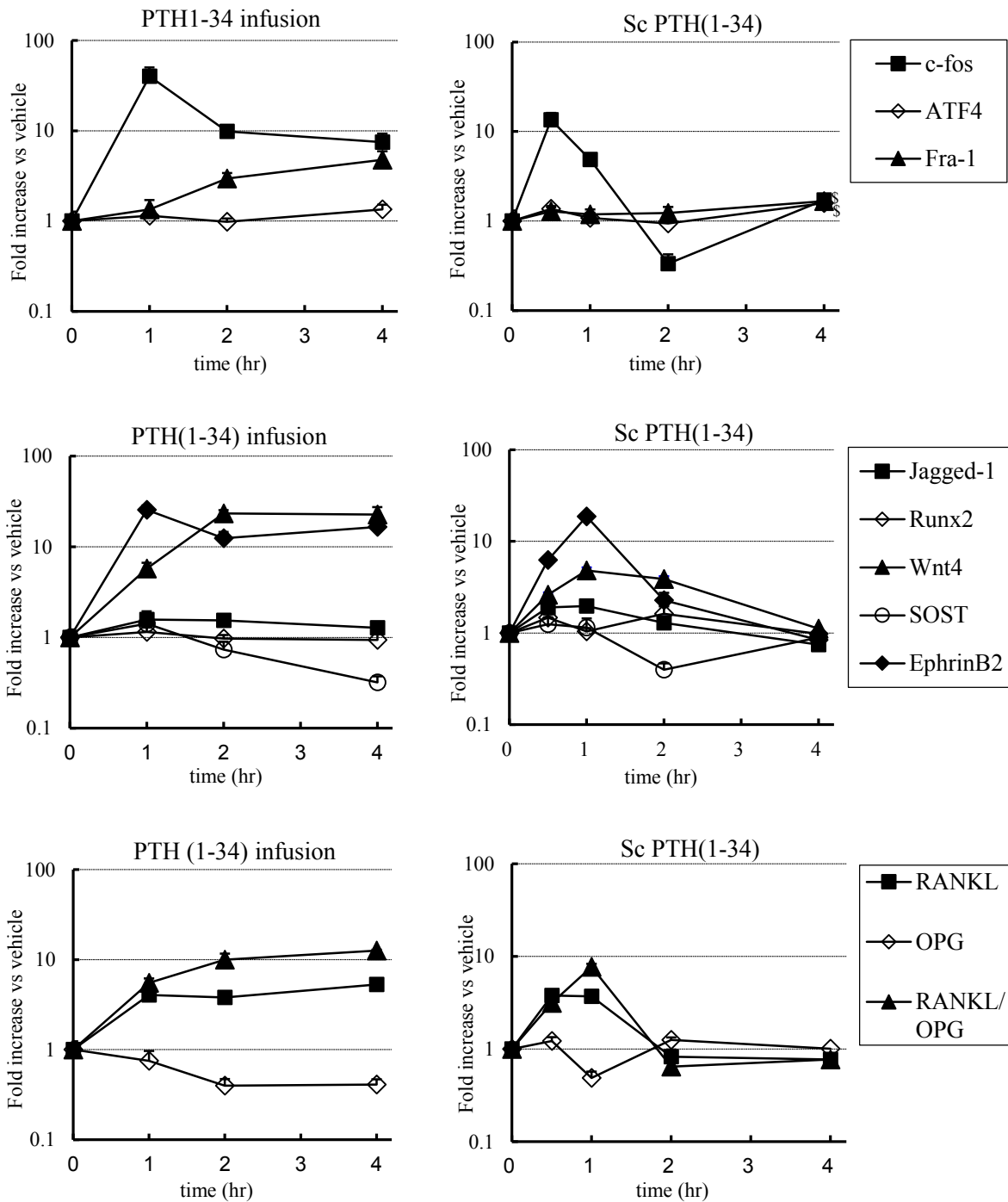


Fig 2. PTH(1-34)インフュージョン、及びPTH(1-34)皮下投与によるPTH誘導骨骨関連遺伝子の変化

(A) AP-1 関連遺伝子 (*c-fos*, *Fra-1*, *ATF4*)、(B) 骨形成関連遺伝子 (*Jagged-1*, *Runx2*, *Wnt4*, *SOST*, *EphrinB2*)、(C) 骨吸収関連遺伝子 (RANKL, OPG, RANKL/OPG)、平均±標準偏差 (n=3)

2-3-3. PTH(1-34)インフュージョンのラット大腿骨骨密度 (BMD) に対する効果

PTH(1-34)の骨量を増加させるために最適な暴露時間を検討するため、ラットインフュージョンシステムを使い、PTH(1-34)を1 μ g/kg/時間で1日1回、1時間、2時間、4時間の週5回の4週間反復インフュージョン投与を行った (Fig. 3)。その結果、4週間後にPTH(1-34)の1日1時間投与により、大腿骨全体 (Whole)、及び大腿骨の近位部 (proximal)、中位部 (middle)、遠位部 (Distal)、の全ての部位でBMDの増加が認められた。これにより、PTH(1-34)の1日1時間インフュージョン投与により、大腿骨の海綿骨と皮質骨の両方が増加することが明らかとなった。一方、PTH(1-34)の1日2時間、及び4時間投与では、大腿骨BMDはどの部位でも有意には増加しなかった。比較対照のPTH(1-34)皮下投与では、大腿骨のどの部位もBMDを有意に増加させた。また、4週間の投与期間では、動物の状態に変化はなく、動物の体重、血清カルシウム、血清クレアチニンに群間で大きな変化は認められなかった (Table)。

以上のことから、PTHの血中濃度を1日に1時間一過性に増加させることが、PTHの骨量増加に必須であることが示された。

	血清カルシウム		血清クレアチニン		体重 (4週後)	
	(mg/dL)		(mg/dL)		(g)	
溶媒	9.6	± 0.4	0.55	± 0.05	272.6	± 13.6
1時間インフュージョン	9.6	± 0.3	0.57	± 0.04	281.7	± 18.3
2時間インフュージョン	9.4	± 0.3	0.52	± 0.04	271.2	± 10.2
4時間インフュージョン	9.2	± 0.5	0.54	± 0.05	273.1	± 18.0
PTH(1-34)皮下投与	9.6	± 0.2	0.57	± 0.05	273.5	± 20.5

Table PTH(1-34)インフュージョン及びPTH(1-34)皮下投与でのラット血清生化学値、体重変化
平均±標準偏差 (n=6)

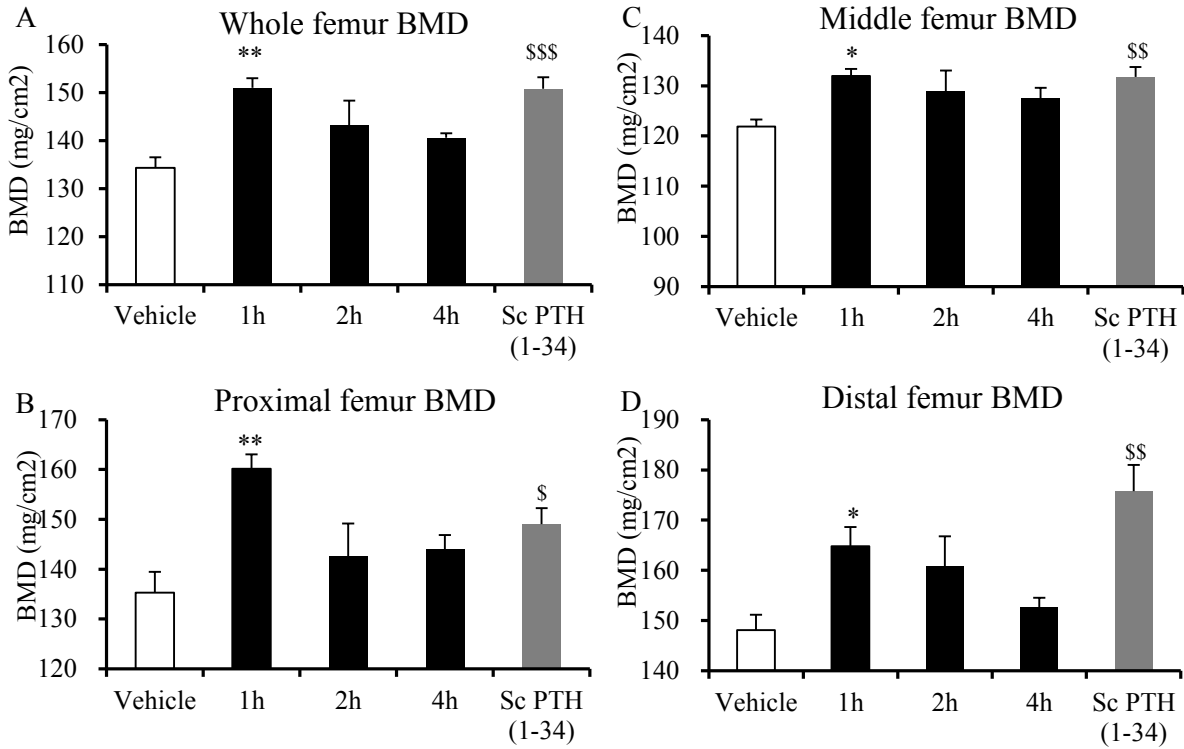
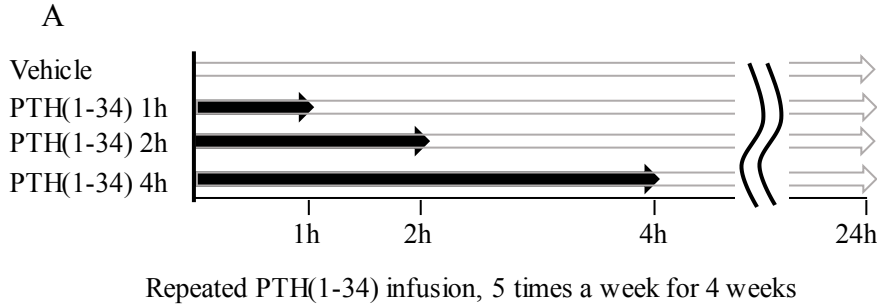


Fig 3. PTH(1-34)インフュージョン、及びPTH(1-34)皮下投与のラット大腿骨に対する効果

(A). 反復インフュージョンのスケジュール

大腿骨各部位のBMD (B)大腿骨全体 (whole)、(C) 近位部 (proximal) (D) 骨幹部 (middle) (E) 遠位部 (distal)、平均±標準偏差 (n=6)

溶媒群とPTH(1-34)インフュージョン群の比較：* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$

溶媒群とPTH(1-34)皮下投与群の比較：\$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$, \$\$\$ $p < 0.005$

2-3-4. ラットにおける PTH(1-34)インフュージョンの骨代謝マーカーに対する効果

PTH(1-34)の1時間と4時間のインフュージョン投与の骨代謝に対する効果の違いを明らかにするために、ラットインフュージョンモデルにおいて、PTH(1-34)を1日1時間と4時間のインフュージョンを14日間反復投与を行い、骨代謝マーカーの変化を評価した (Fig. 4)。

その結果、骨形成マーカーである血中 PINP、及びオステオカルシンは、PTH(1-34)の1時間、及び4時間投与でも14日間の間に上昇を示した一方、骨吸収マーカーである尿中 CTx は、PTH(1-34)の1日1時間投与では増加は認められなかったものの、4時間インフュージョン投与では有意に増加した。

最終投与後にラットを解剖し、大腿骨 BMD を測定したところ、PTH(1-34)の1日1時間投与群では、大腿骨の近位部 (proximal) で BMD の有意な増加が確認された (Fig. 5)。一方、PTH(1-34)の1日4時間インフュージョン投与では、いずれの部位でも BMD の増加は認められなかった。

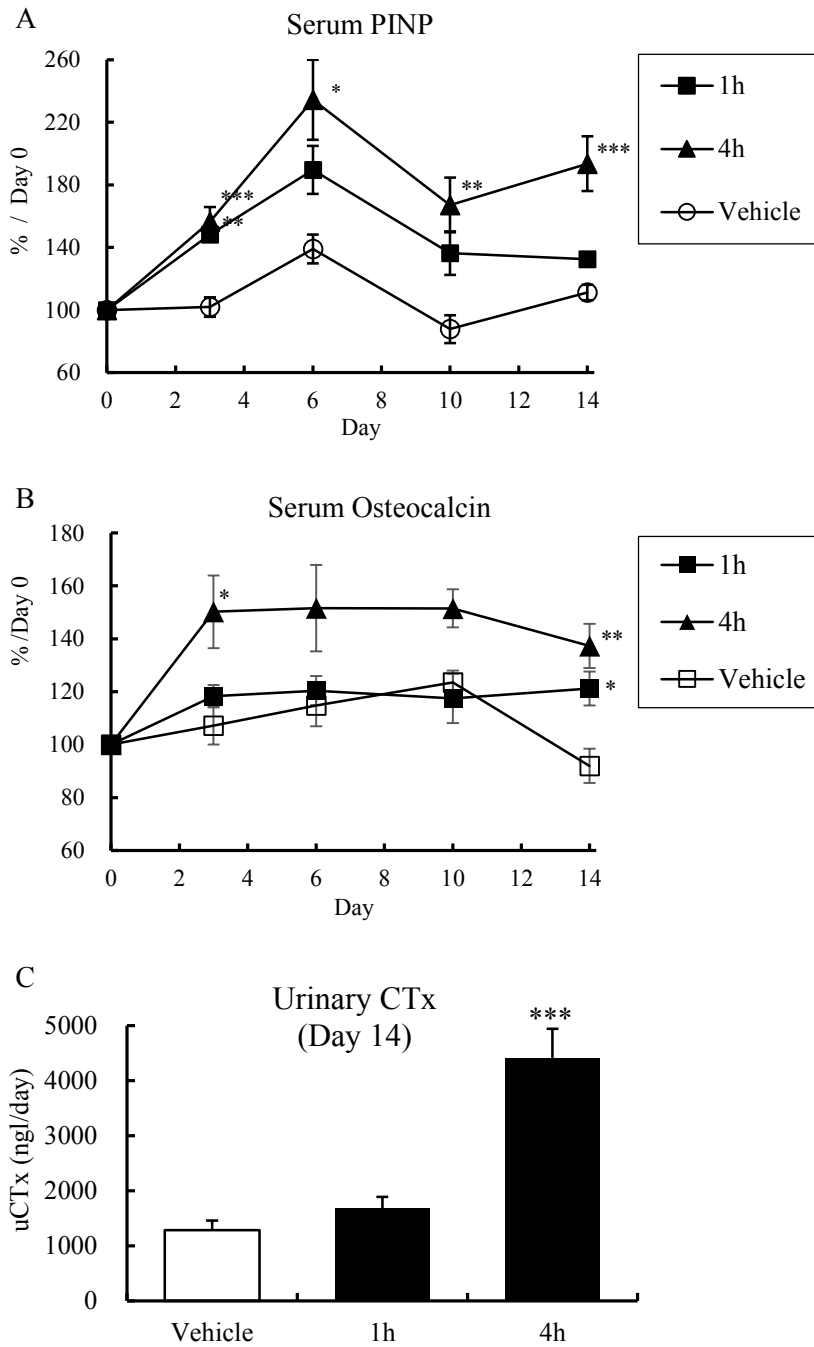


Fig 4. ラットにおける PTH(1-34)インフュージョンの骨代謝マーカーに対する効果

(A) 血清 PINP、(B) オステオカルシン、(C) 尿中 CTx

血清中 PINP とオステオカルシンは、day0、3、6、10、14 に頸静脈より採血を行って血清中レベルを測定した。尿中 CTx は、day14 に採尿を行って測定した。平均±標準誤差 (n=6)

溶媒群 (n=5)、PTH(1-34) 1 時間インフュージョン (n=7)、4 時間インフュージョン (n=6)

溶媒群と PTH(1-34)インフュージョン群の比較 : *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005

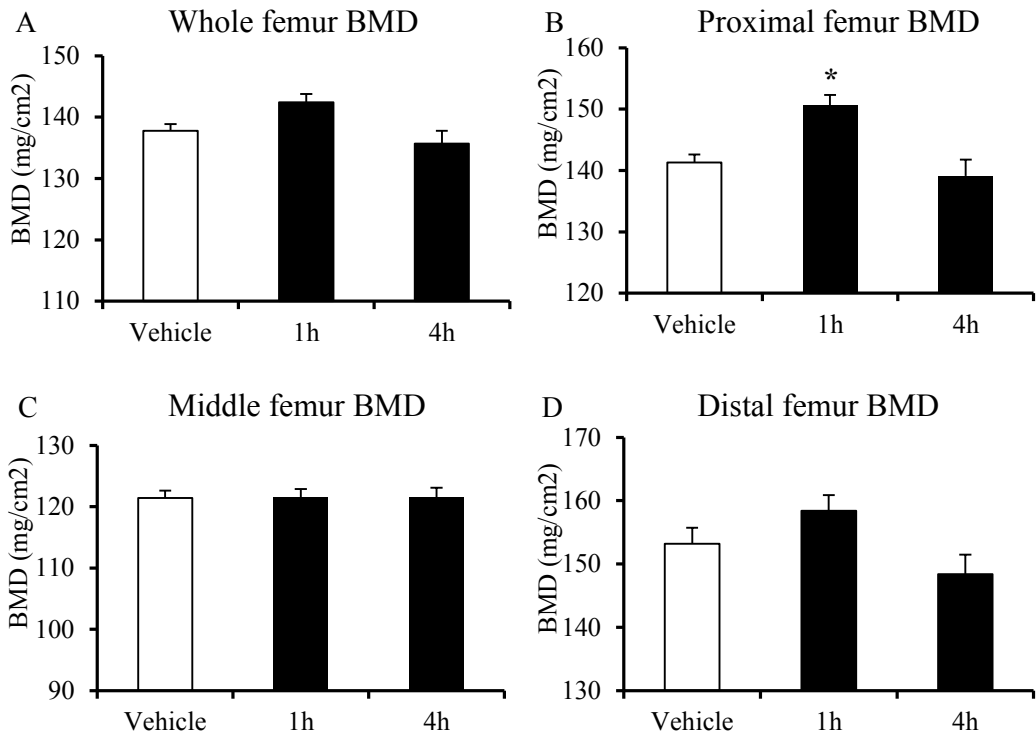


Fig 5. 14日間のPTH(1-34)インフュージョンのラット大腿骨BMDに対する効果

大腿骨各部位のBMD (A)大腿骨全体 (whole)、(B) 近位部 (proximal) (C) 骨幹部 (middle) (D) 遠位部 (distal)、平均±標準偏差

溶媒群 (n=5)、PTH(1-34) 1時間インフュージョン (n=7)、4時間インフュージョン (n=6)

溶媒群とPTH(1-34)インフュージョン群の比較：*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005

2-4. 考察

PTH は間歇投与では骨形成促進作用を示し、持続投与では骨形成のみならず骨吸収も同時促進する作用が報告されている。このことから、骨量を増加させるためには、骨形成を選択的に刺激することが必要である。今回の研究において、我々はラットインフュージョンモデルを用い、PTH(1-34)の骨形成作用、並びに骨量増加作用を示すための最適暴露時間の検討を行った。

その結果、PTH(1-34)を1、2、4時間と、異なるインフュージョン時間で反復投与した場合、1時間の反復インフュージョンを行うことにより、骨吸収を促進することなく選択的に骨形成を促進して骨量を増加させることが明らかとなった。

また、遺伝子発現解析の検討結果では、骨形成を促進して骨量を増加させる PTH(1-34)の間歇皮下投与においては、骨形成に関係する Wnt4 や EphrinB2 が投与後 30 分から 1 時間で上昇し、また 2 時間でも投与前値よりも高かった (Figure 2)。一方、骨吸収に関わる RANKL の遺伝子発現は、PTH(1-34)の間歇皮下投与では、投与後 1 時間では一過性に高かったものの、2 時間後には投与前置まで低下しており、PTH のシグナルが切れると RANKL の発現は速やかに低下することが示唆された。実際、PTH(1-34)の 1 時間インフュージョン、及び間歇皮下投与では骨吸収が増加しなかったが、4 時間のインフュージョンでは骨吸収マーカーの尿中 CTx が増加したことから、この RANKL の厳密な制御が PTH による骨吸収の調節に関わっている可能性がある。

Dobnig らは、正常ラットに PTH(1-34)の $80 \mu\text{g}/\text{kg}$ を皮下投与、もしくは 1 日 1 時間、または 2 時間の間、放出するように設定したアルゼットポンプをラットの皮下に埋め込み、6 日間の反復投与を実施してラット頸骨近位部の骨形態計測を行った (2)。その結果、PTH(1-34)の間歇投与、及び 1 日 1 時間の放出群においては、骨面積 (Bone Area/Tissue area) が増加し、骨形成パラメーター (Label perimeter、Mineral Apposition Rate、Bone formation Rate) が有意に増加した。また、1 日 2 時間の放出群では骨形成の有意な上昇は認められず、持続投与群では骨吸収パラメーター (Osteoclast Perimeter) が増加した。しかしながら、この試験では BMD に対する効果は報告されていない。おそらく投与期間が 6 日間と短いことにより、BMD を増加させるまでの効果は検討できていないものと思われる。

また、Frolick らは、正常ラットに PTH(1-34)の $80 \mu\text{g}/\text{kg}$ を 1 日で 1 時間に 6 回、もしくは 6 時間に 6 回、と分割して皮下投与を行い、脛骨 BMD を評価した (3)。その結果、1 時間で PTH(1-34)を 6 回投与した群は頸骨 BMD が増加したものの、6 時間で 6 回投与した群は頸骨 BMD が増加しなかった。しかし、この検討結果においては、1 時間で PTH(1-34)を 6 回投与した場合の PTH の最大血

中濃度は約 5600 pg/mL、6 時間で 6 回投与した場合は約 3800 pg/mL であり、PTH(1-34)の臨床用量での最大血中濃度（約 160 - 360 pg/mL）よりもはるかに高い投与量での検討であった。

今回の検討で、我々はラットフリームービングのインフュージョンモデルを使い、PTH(1-34)の臨床投与量の血中濃度に近い約 300 pg/mL を達成しうる PTH(1-34)の投与量にて、反復投与を実施して骨代謝に対する検討を行った。PTH(1-34)インフュージョンの検討においては、骨吸収を上昇させずに骨形成のみを誘導し、骨量を増加させる PTH(1-34)の最適暴露時間は 1 時間であることが明らかとなった。

前述したとおり、PTH(1-34)を皮下投与した場合、げっ歯類ではヒトよりも PTH(1-34)の血中濃度推移が短いことが知られている（4-6）。PTH(1-34)を皮下した場合、皮下のプロテアーゼで分解されることで、血中に移行する前に速やかに分解されることから、PTH(1-34)とプロテアーゼ阻害剤と同時に皮下投与すると、血中カルシウム上昇作用が増大することが報告されている（24）。PTH(1-34)の血中濃度推移が短い理由としては、ラットでの皮下での分解がヒトよりも高く、臨床では PTH(1-34)が皮下から緩やかに血中に移行するため、その血中濃度推移がより持続的なプロファイルを示すものと考えられる。皮下投与によるインフュージョンでは、これらのげっ歯類とヒトでの違いが起きてしまうことから、ラットインフュージョンモデルを用いて、PTH(1-34)を直接静脈内にインフュージョンし、骨量増加作用の最適な投与時間を検討した今回の結果は重要と思われる。

骨芽細胞は、PTH の骨形成を誘導する主要なターゲット細胞であると考えられている。しかしながら、近年では骨細胞が骨吸収に関わる RANKL の主なソースである一方、PTH の骨形成促進作用を示すターゲット細胞は骨細胞であることが報告されている（20-23）。骨細胞は、骨組織で最もその数が多い細胞であることが知られており、また PTH 受容体を介して骨細胞から分泌される RANKL によって骨吸収が促進されることが報告されている。また、骨細胞は骨形成を負に調節しているスクレロスチンを分泌している細胞であり、PTH の骨細胞でのシグナルは、骨細胞において sclerostin の発現を低下させることが報告されている（21）。実際、我々の検討結果においても、PTH(1-34)の 4 時間インフュージョンでは骨での *SOST* の発現が低下している。それゆえ、骨細胞は PTH による RANKL を介した骨吸収、及び sclerostin の発現を抑制することによる骨形成、を調節しているターゲット細胞である可能性がある。今後、動物や臨床での検討において、PTH の骨形成作用と骨細胞での役割の重要性の更なる検討が期待される。

以上、PTH の血中濃度を 300 pg/mL 程度を維持する場合の 1 日 1 時間の暴露が、骨吸収を促進せずに選択的に骨形成を促進し、骨量を増加させることが明らかとなった。

2-5. 参考文献

1. Hock JM, Gera I. Effects of continuous and intermittent administration and inhibition of resorption on the anabolic response of bone to parathyroid hormone. *J Bone Miner Res.* 1992; 7:65-72.
2. Dobnig H, Turner RT. The effects of programmed administration of human parathyroid hormone fragment (1-34) on bone histomorphometry and serum chemistry in rats. *Endocrinology.* 1997; 138:4607-12.
3. Frolik CA, Black EC, Cain RL, Satterwhite JH, Brown-Augsburger PL, Sato M, Hock JM. Anabolic and catabolic bone effects of human parathyroid hormone (1-34) are predicted by duration of hormone exposure. *Bone.* 2003; 33:372-9.
4. Lindsay R, Nieves J, Henneman E, Shen V, Cosman F. Subcutaneous administration of the amino-terminal fragment of human parathyroid hormone-(1-34): kinetics and biochemical response in estrogenized osteoporotic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 77:1535-9.
5. Satterwhite J, Heathman M, Miller PD, Marin F, Glass EV, Dobnig H. Pharmacokinetics of teriparatide (rhPTH[1-34]) and calcium pharmacodynamics in postmenopausal women with osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 2010; 87:485-92
6. Fox J, Miller MA, Stroup GB, Nemeth EF, Miller SC. Plasma levels of parathyroid hormone that induce anabolic effects in bone of ovariectomized rats can be achieved by stimulation of endogenous hormone secretion. *Bone.* 1997; 21:163-9.
7. Asanuma K, Komatsu S, Sakurai T, Takai R, Chiba S. Contribution of intestinal calcium absorption to 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced calcium action in the total parenteral nutrition rat. *J Toxicol Sci.* 2006; 31:325-44
8. Asanuma K, Komatsu S, Sakurai T, Takai R, Chiba S. Total parenteral nutrition using continuous intravenous infusion via the posterior vena cava in rats. *J Toxicol Sci.* 2006; 31:139-47.
9. Onyia JE, Bidwell J, Herring J, Hulman J, Hock JM. In vivo, human parathyroid hormone fragment (hPTH 1-34) transiently stimulates immediate early response gene expression, but not proliferation, in trabecular bone cells of young rats. *Bone.* 1995; 17:479-84

10. Yu S, Franceschi RT, Luo M, Zhang X, Jiang D, Lai Y, Jiang Y, Zhang J, Xiao G. Parathyroid hormone increases activating transcription factor 4 expression and activity in osteoblasts: requirement for osteocalcin gene expression. *Endocrinology*. 2008; 149:1960-8
11. Weber JM, Forsythe SR, Christianson CA, Frisch BJ, Gigliotti BJ, Jordan CT, Milner LA, Guzman ML, Calvi LM. Parathyroid hormone stimulates expression of the Notch ligand Jagged1 in osteoblastic cells. *Bone*. 2006; 39:485-93
12. Krishnan V, Moore TL, Ma YL, Helvering LM, Frolik CA, Valasek KM, Ducy P, Geiser AG. Parathyroid hormone bone anabolic action requires Cbfa1/Runx2-dependent signaling. *Mol Endocrinol*. 2003; 17:423-35
13. Li X, Liu H, Qin L, Tamasi J, Bergenstock M, Shapses S, Feyen JH, Notterman DA, Partridge NC. Determination of dual effects of parathyroid hormone on skeletal gene expression in vivo by microarray and network analysis. *J Biol Chem*. 2007; 282:33086-97
14. Bergenstock MK, Partridge NC. Parathyroid hormone stimulation of noncanonical Wnt signaling in bone. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1116:354-9.
15. Keller H, Kneissel M. SOST is a target gene for PTH in bone. *Bone*. 2005; 37:148-58.
16. Bellido T, Ali AA, Gubrij I, Plotkin LI, Fu Q, O'Brien CA, Manolagas SC, Jilka RL. Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology*. 2005; 146:4577-83
17. Allan EH, Häusler KD, Wei T, Gooi JH, Quinn JM, Crimeen-Irwin B, Pompolo S, Sims NA, Gillespie MT, Onyia JE, Martin TJ. EphrinB2 regulation by PTH and PTHrP revealed by molecular profiling in differentiating osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2008; 23:1170-81
18. Ma YL, Cain RL, Halladay DL, Yang X, Zeng Q, Miles RR, Chandrasekhar S, Martin TJ, Onyia JE. Catabolic effects of continuous human PTH (1-38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology*. 2001; 142:4047-54.
19. Onyia JE, Helvering LM, Gelbert L, Wei T, Huang S, Chen P, Dow ER, Maran A, Zhang M, Lotinun S, Lin X, Halladay DL, Miles RR, Kulkarni NH, Ambrose EM, Ma YL, Frolik CA, Sato M, Bryant HU, Turner RT. Molecular profile of catabolic versus

- anabolic treatment regimens of parathyroid hormone (PTH) in rat bone: an analysis by DNA microarray. *J Cell Biochem.* 2005; 95:403-18.
20. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, Penninger JM, Takayanagi H. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med.* 2011; 17:1231-4
 21. Saini V, Marengi DA, Barry KJ, Fulzele KS, Heiden E, Liu X, Dedic C, Maeda A, Lotinun S, Baron R, Pajevic PD. Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide type 1 receptor (PPR) signaling in osteocytes regulates anabolic and catabolic skeletal responses to PTH. *J Biol Chem.* 2013; 288:20122-34
 22. Rhee Y, Lee EY, Lezcano V, Ronda AC, Condon KW, Allen MR, Plotkin LI, Bellido T. Resorption controls bone anabolism driven by parathyroid hormone (PTH) receptor signaling in osteocytes. *J Biol Chem.* 2013; 11:29809-20
 23. Ben-awadh AN, Delgado-Calle J, Tu X, Kuhlenschmidt K, Allen MR, Plotkin LI, Bellido T. Parathyroid hormone receptor signaling induces bone resorption in the adult skeleton by directly regulating the RANKL gene in osteocytes. *Endocrinology.* 2014; 155:2797-809
 24. Parsons JA, Rafferty B, Stevenson RW, Zanelli JM. Evidence that protease inhibitors reduce the degradation of parathyroid hormone and calcitonin injected subcutaneously. *Br J Pharmacol.* 1979;66:25-32

第3章 持続型 PTH アナログによる血中 Ca 上昇作用の解析

3-1. 実験の目的

PTH は間歇投与により骨形成を促進して骨量を増加させるが、持続投与するとむしろ骨吸収を促進し、また腎臓に作用して、血中カルシウムを増加させる。前述したように、PTH 関連疾患としては、内因性 PTH レベルが低下し低カルシウム血症を示す、副甲状腺機能低下症

(Hypoparathyroidism : HP) が存在する。この HP を治療するには、欠損した PTH を持続的に補充し、それによって起きるカルシウム上昇作用により、低カルシウム血症を改善させることが望ましい。しかしながら、PTH を持続的に投与することは臨床的には難しく、インフュージョンポンプなどの特殊な機器を使用することが必要となる。

一方で、PTH1 型受容体の R0 構造に結合し、PTH1 型受容体に持続的に作用するユニークな PTH アナログ (Long-Acting PTH : LA-PTH) が報告されている (1)。この LA-PTH は、その持続的な血中カルシウム上昇作用から、HP の治療に有用であることが想定される。

このことから、本内容の目的は、前述した HP の動物モデルである、副甲状腺摘出

(Thyroparathyroidectomized : TPTX) ラットでの LA-PTH の血中カルシウム上昇作用を検討し、その治療効果を検証することとした。

LA-PTH は、PTH1 型受容体の R0 構造への結合性が高く、正常マウスにおいて、類似の R0 構造への高い結合性を持つ [A^{1,3,10,12}, Q¹⁰, R^{11,19}]-PTH(1-34) (Modified PTH(1-34) : M-PTH(1-34)) よりも強力かつ持続的な血中カルシウム上昇作用を示している (2)。しかしながら、M-PTH(1-34) などの R0 結合型 PTH アナログについて、HP のモデル動物である TPTX ラットにおいて、その血中カルシウム上昇作用などの薬理的な詳細な検討は実施されていない。

前述したとおり、副甲状腺機能低下症 (Hypoparathyroidism : HP) は、内因性 PTH が欠損して低カルシウム血症を引き起こす希少疾患であり、現行の HP に対する標準療法である、大量の経口カルシウム剤と活性型ビタミン D 製剤、及びホルモン補充療法となる、開発中の PTH 製剤においても、未だ十分には HP の治療を満たすことはできていない。

また、PTH の性質としては、持続投与では血中カルシウム上昇作用が十分に発揮されることから、HP 患者に PTH をインフュージョンポンプにより持続投与する治療が、血中カルシウムを安定的に維持させ、また骨代謝回転も正常化することが報告されている (3, 4)。以上のことから、持続型 PTH アナログであれば、HP の治療としては理想的であることが想定される。

本研究では、HP の動物モデルである副甲状腺摘出 (Thyroparathyroidectomized : TPTX)

ラットを用いて、LA-PTHの血中カルシウム上昇作用を検討した。これまでTPTXラットでPTHアナログを複数回投与して、血中カルシウムを正常化させた場合の治療効果については報告がないことから、LA-PTHをTPTXラットに連日投与した場合の骨代謝に対する影響、も併せて検討を行った。

また、LA-PTHの血中カルシウム上昇作用について、ラット以外の大動物でもその作用を発揮できるのかどうか、を検証するために、併せてLA-PTHをカニクイザルに投与して、血中カルシウム上昇作用を評価した。

3-2. 実験方法

使用材料

PTH(1-34)はヒト PTH(1-34) : PTH(1-34) (ペプチド研究所) を購入し使用した。ヒト PTH(1-84) : PTH(1-84)は、Gardella らの方法 (5) により大腸菌で大量調整し、中外製薬の-80°C冷凍庫に保存していたものを、使用前に HPLC にて 95%以上の純度を保有することを確認し、実験に使用した。LA-PTH : [Ala^{1,3,12}, Gln¹⁰, Arg¹¹, Trp¹⁴]PTH(1-14)/[Ala^{18,22}, Lys²⁶]PTHrP(15-36)COOH)は、ILS 株式会社に委託合成をしたペプチド (純度 95%以上確認) を実験に使用した。

受容体結合試験に使用した M-PTH(1-15) : [Ala^{1,12}, Aib³, Nle⁸, Gln¹⁰, Har¹¹, Trp¹⁴, Tyr¹⁵]-PTH(1-15)NH₂、[Nle^{8,21}, Tyr³⁴]-ラット PTH(1-34)NH₂は、MGH Biopolymer Synthesis Facility で合成を行った (Aib : alpha-aminoisobutyric acid, Har : homoarginine, Nle : norleucine)。受容体結合試験用の ¹²⁵I ラベルトレーサーである、¹²⁵I-PTH(1-34) (¹²⁵I-[Nle^{8,21}, Tyr³⁴]-ratPTH(1-34)NH₂)、及び ¹²⁵I-M-PTH(1-15)は、クロラミン T 法により ¹²⁵I ヨードラベルを行い、HPLC により精製して受容体結合試験に使用した。

In vitro 実験

細胞培養

HEK293 細胞に、ヒト PTH1 型受容体、及び Glosensor-22F-cAMP ルシフェラーゼレポータープラスミド (Promega) を安定的に導入した細胞である GP-2.3 細胞を使用した (6)。GP-2.3 細胞を 10%FBS を含む DMEM で培養を行った。細胞膜調整については、GP-2.3 細胞を 10 cm² ディッシュに撒きこみ、confluent になるまで 2-4 日間培養を行った。cAMP アッセイには、GP-2.3 細胞を 96 穴プレートで confluent になるまで 3 日間培養を行った。

受容体結合試験

10 cm² ディッシュに撒きこんだ GP-2.3 細胞からヒト PTH1 型受容体を含む膜面分を調整した。GP-2.3 細胞を撒きこんだ 10 cm² ディッシュを氷上に置き、培地を吸引後に氷冷しておいた 5mL の Buffer A (10mM Tris-HCl/4mM EDTA/6mM MgCl₂/1X Proteinase 阻害剤カクテル(Roche)) で 1 回洗浄した。その後、0.75 mL の Membrane Buffer (20 mM HEPES/100 mM NaCl/3 mM MgSO₄/20% Glycerol/1X Proteinase 阻害剤カクテル/0.3% BSA) を添加してセルスクレイパーで細胞を採取した。その後、ガラスホモジナイザー (AGC テクノガラス) に細胞を添加し、30 回程度細胞懸濁液

をホモジナイズした。ホモジナイズした細胞懸濁液を 400 ×g, 10 min, 4°Cで遠心して、膜画分の上清を採取した。上清を 15300 ×g, 30 min, 4°Cで遠心、上清を除去して Membrane buffer(+PI)を加え懸濁し、ヒト PTH1 型受容体を含む膜画分とした。プロテインアッセイキット (バイオラッド) を用いて蛋白濃度を定量し、使用まで-80°Cで保存した。

ヒト PTH1 型受容体を含む膜画分を使った、RG 構造、及び R0 構造に対する受容体結合試験は、Dean らの方法の通り、以下のように実施した (7)。

96 well プレートにヒト PTH1 型受容体を含む膜画分に、各種 PTH アナログを異なる濃度 (約 $1.0 \times 10^{-6}M$ から $1 \times 10^{-12}M$ 程度) で添加し、また ^{125}I ラベルしたトレーサーを添加し、室温で 90 分インキュベート (最終 Volume : 200 μ l) を行った。RG 構造に対する結合性評価には、RG 構造に特異的に結合する ^{125}I -M-PTH(1-15)、R0 構造に対する結合性評価には、 ^{125}I -PTH(1-34) と GTP γ S (最終濃度 $1 \times 10^{-5}M$) を添加した。その後、96 穴フィルタープレート (Millipore) に添加し、バキュームしながら Membrane buffer 200 μ L で 3 回洗浄した。フィルターを乾燥後、フィルターのカウントを γ カウンターで測定した。非特異的結合は、コントロールの PTH(1-34) の $5 \times 10^{-7}M$ を添加して決定した。4 パラメーターのシグモイドカーブフィットを行って IC50 値を算出した。

cAMP アッセイ

cAMP シグナルアッセイは、Ferrandon らの方法に従い (8)、GP-2.3 細胞の cAMP レポーターアッセイ (Glosensor) を使って評価した。96 ウェルプレートに GP-2.3 細胞を前日に撒きこみ、ルシフェリンを各ウェルに添加し、20 分インキュベートした。その後、各種リガンドを異なる濃度で添加し、Envision プレートリーダー (PerkinElmer) で 2 分間隔で 60 分間蛍光シグナルを測定した。リガンド依存的蛍光シグナルを、ピークの蛍光強度を指標に評価した (リガンド添加後 10 から 15 分程度でピークとなる)。4 パラメーターのシグモイドカーブフィットを行って IC50 値を算出した。

動物実験

TPTX ラットでの試験

動物は、日本チャールズリバー(株)より、SD-IGS (crj:CD) ラット、6 週齢 (入荷時) SD-IGS (crj:CD) ラット、雄を入手した。

粘液産出による気道閉塞を防止するため、アトロピン (0.05 mg/kg) の術前投与を行い、また鎮痛のためにフルニキシム (2.5 mg/kg) を術前に投与した。イソフルラン (3 %前後に維持) 麻酔下においてラット咽喉部皮膚を切開し、気管表面に貼り付いている甲状腺・副甲状腺をピンセットで

引き剥がすように摘出した。ゼルフォームで止血したのち、切開した皮膚をミヘル針で止めて手術終了とした。TPTX 術後、水分を含ませた餌をケージに入れ、5 日間個別飼育して回復を促した。鎮痛ケアのため、術後 2 日間、フルニキシシ (2.5 mg/kg) を投与した。

投与開始前日に頸静脈採血を実施し、血清 Ca 濃度を測定し、血清カルシウムが 8.0 mg/dL 未満の個体を TPTX オペ成功例として選択し、その中から体重が低い個体、及び血清 Ca 濃度が平均から離れている個体を除外し、必要な個体数を選抜した。一般状態が悪く試験続行が難しいと判断される個体は実験から除外した。採血開始前に、血清 Ca 濃度と体重が各群均等になるように割り付けを行った。

28 日間の連日投与試験においては、L-thyroxine を週 2 回皮下投与を行った。L-thyroxine (Sigma-Aldrich Japan K. K.) を、5 mg/mL となるように 100 mmol/L 水酸化ナトリウム水溶液へ溶解させ、更に 50 μ g/mL となるように生理食塩水で希釈し、孔径 0.22 μ m の滅菌フィルターでろ過して 4 $^{\circ}$ C 設定の冷蔵庫に遮光下で保存、投与日に必要量を生理食塩水で希釈して 6 μ g/mL に調製した。調製した L-thyroxine を週 2 回 TPTX ラットへ 6 μ g/kg の用量で皮下投与した。

薬剤の投与直前に頸静脈採血 (Pre 採血) を行った後、リン酸-クエン酸 buffer (23 mM クエン酸/25 mM リン酸ナトリウム/100 mM NaCl, pH5.0) に溶解した各種濃度の LA-PTH、PTH(1-34)、及び PTH(1-84) を、1.0 mL/kg にて静脈内、もしくは皮下投与を行い、その後は経時的に頸静脈採血を行い、経時的に血清を採取した。

血中濃度測定試験については、ペプチドの分解を抑えるために、プロテアーゼ阻害剤 (Aprotinin、Leupeptin、EDTA) を含むシリンジで血液を採取し、速やかに血漿を分離した。PTH(1-84) の濃度測定には ELISA キット (Human BioActive PTH(1-84) ELISA kit, Immunotopics Inc.) を使用した。PTH(1-34)、及び LA-PTH は LC-MS/MS を使用して濃度測定を行った。

各ペプチドの血漿中半減期は、WnNonlin (Pharsight) のノンコンパートメントモデルを使用して算出した。

LA-PTH、もしくは PTH(1-84) の 28 日間連日皮下投与試験の場合、継時的に採血を行うとともに、最終投与後 24 時間の間、代謝ケージに収容して蓄尿による採尿を行った。最終投与 24 時間後の最終頸静脈採血後、麻酔下で全採血を行って安楽死処置を行い、剖検を実施して、腰椎、及び右大腿骨を採取した。

血清、及び尿中カルシウム、リン、クレアチニンは自動分析装置 (7170E、日立製作所) を用いて測定した。血清中 PINP は Rat/Mouse PINP EIA (Immunodiagnostic System Ltd.) を用いて測定し、尿中 CTx は RatLaps ELISA kit (Immunodiagnostic System Ltd.) を用いて測定した。血清中

1,25(OH)₂ ビタミン D₃ は、RIA (Immunodiagnostic System Ltd.)を用いて測定した。腰椎、及び右大腿骨の BMD 測定は、DCS-600EX (アロカ社製) を用いて骨密度を測定した。

μCT による骨構造解析は、R_mCT2 system (理学社製) を用い、JBMR の μCT ガイドラインを参考に解析を行った (9)。大腿骨海綿骨部位は、voxel サイズを 40 μm、90Kv、160 μA の条件で測定し、成長板下限から 20 スライス (800 μm) 以下、幅 100 スライス (4000 μm) 分を海綿骨解析部位として、海綿骨を抽出して骨構造パラメータの解析を行った。大腿骨骨幹部皮質骨部位は、voxel サイズを 20 μm、90Kv、160 μA の条件で測定し、骨幹部中間部を中心として幅 50 スライス分を皮質骨解析部位とし、皮質骨部位を抽出して骨構造パラメータの解析を行った。また各群の代表例を選択し、大腿骨全体、海綿骨部位の測定中心部、皮質骨部位の測定中心部のスライス画像を示した。

カニクイザルを使った実験

3 から 4 歳齢の雄カニクイザル (日本ハムリー) を入手した。ステンレス製吊りケージ (600×600×660mm) に 1 ケージに 1 頭ずつ収容し、部屋の設定温湿度は、18~28 °C、35~75 %に設定した。設定換気回数は、1 時間あたり 10~16 回、設定照明時間は 12 時間 (午前 7 時~午後 7 時) とした。飼料は、PS (オリエンタル酵母(株)製) を 1 日 1 回 70 g 午前中に与え、午後に補食としてバナナ、みかん、りんごのいずれかを 1/2 本給餌した。飲料水は、水道水を自動給水装置により自由摂取させた。

実験に際しては、LA-PTH、PTH(1-34)、及び PTH(1-84) の皮下投与を行い、投与前、及び投与後経時的に伏在静脈から採血を行い、血清を採取した。血清カルシウムは、TPTX ラット試験と同様に、自動分析装置 (7170E、日立製作所) を用いて測定した。

動物実験を実施した中外製薬は、AALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) International) 認証施設であり、実施した動物実験については、中外製薬の動物倫理規定により実験が承認されている。

統計学的解析

SAS (Ver. 5.00., SAS Institute Japan) を用いて解析を行った。LA-PTH は、溶媒投与群に比較してウィリアムズ検定により統計解析を行った。Fig XX については、偽手術群に対しての Dunnett 多重検定を行った。TPTX 試験での溶媒群と偽手術群の統計解析は、2 群の検定を行った。

3-3-1. PTH アナログのヒト PTH1 型受容体における受容体結合性と cAMP シグナル

LA-PTH、PTH(1-34)、及び PTH(1-84) のヒト PTH1 型受容体の RG 構造に対する結合性、及び R0 構造に対する結合性をそれぞれ評価した。その結果、LA-PTH、及び PTH(1-34) の RG 構造に対する結合性は同程度 (IC₅₀ 値、PTH(1-34) : 0.08 nM、LA-PTH : 0.1 nM) であり、PTH(1-84) は LA-PTH、PTH(1-34) より約 2 倍弱かった (IC₅₀ 値 : 0.28 nM)。

同様に、R0 構造に対する結合性は、LA-PTH が PTH(1-34)、及び PTH(1-84) よりも約 8 倍高い結合性を示した (IC₅₀ 値、LA-PTH : 1.5 nM、PTH(1-34) : 11.7 nM、PTH(1-84) : 13.8 nM)。

以上のことから、R0 構造と RG 構造への選択性において、LA-PTH は R0 構造への選択性が PTH(1-34)、及び PTH(1-84) よりも高いことが示された。

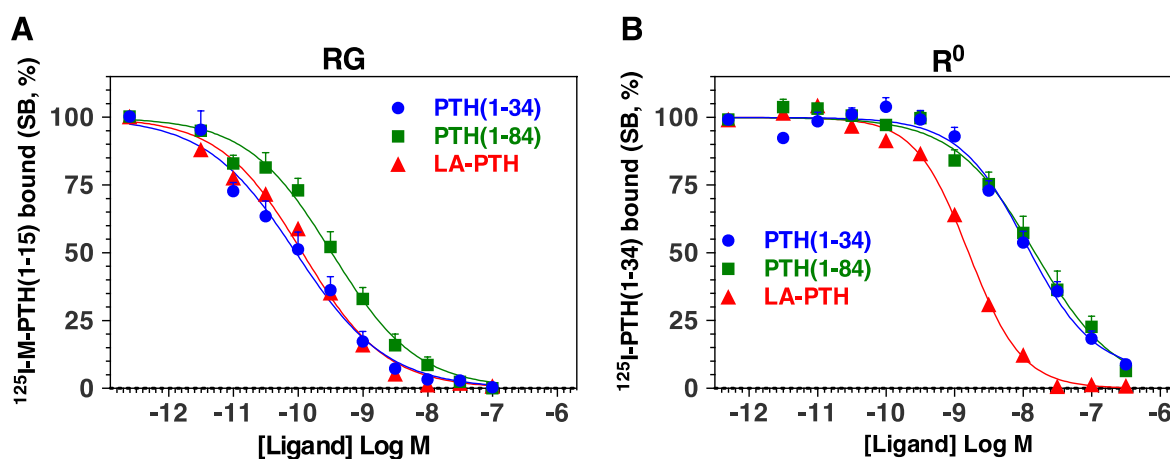


Fig 1. LA-PTH、PTH(1-34)、及び PTH(1-84) のヒト PTH1 型受容体の RG 構造、及び R0 構造に対する結合能

(A) RG 構造に対する結合能、(B) R0 構造に対する結合能、データは平均値±標準誤差 (n=10)

	RG	R ⁰
	pIC ₅₀	pIC ₅₀
PTH(1-34)	10.1 ± 0.1 0.08 nM	7.93 ± 0.09 11.7 nM
PTH(1-84)	9.55 ± 0.12 0.28 nM	7.86 ± 0.14 13.8 nM
LA-PTH	9.99 ± 0.11 0.10 nM	8.82 ± 0.09 1.5 nM

Table 1. ヒト PTH1 型受容体における PTH アナログの RG・R0 構造に対する IC₅₀ 値

次に LA-PTH、PTH(1-34)、PTH(1-84) のヒト PTH1 型受容体における cAMP 反応性を評価した。LA-PTH、PTH(1-34)、及び PTH(1-84) のヒト PTH1 型受容体に cAMP 反応性はほぼ同等であった (EC50 値、LA-PTH : 1.15 nM、PTH(1-34) : 1.00 nM、PTH(1-84) : 1.62 nM)。

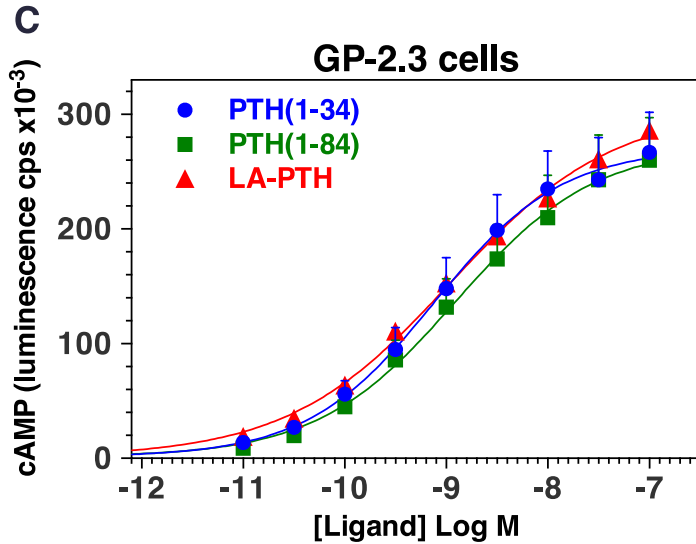


Fig 2. LA-PTH、PTH(1-34)、及び PTH(1-84) のヒト PTH1 型受容体における cAMP 反応性データは平均値±標準誤差 (n=10)

	pEC₅₀	E_{max} (cps x 10⁻³)
PTH(1-34)	9.00 ± 0.06 <i>1.00 nM</i>	275 ± 34
PTH(1-84)	8.79 ± 0.13 <i>1.62 nM</i>	277 ± 37
LA-PTH	8.94 ± 0.12 <i>1.15 nM</i>	300 ± 36

Table 2. ヒト PTH1 型受容体を発現する GP-2.3 細胞における cAMP 反応性 EC50 値

3-3-2. TPTX ラットにおける PTH アナログの血清カルシウム及びリンに対する効果

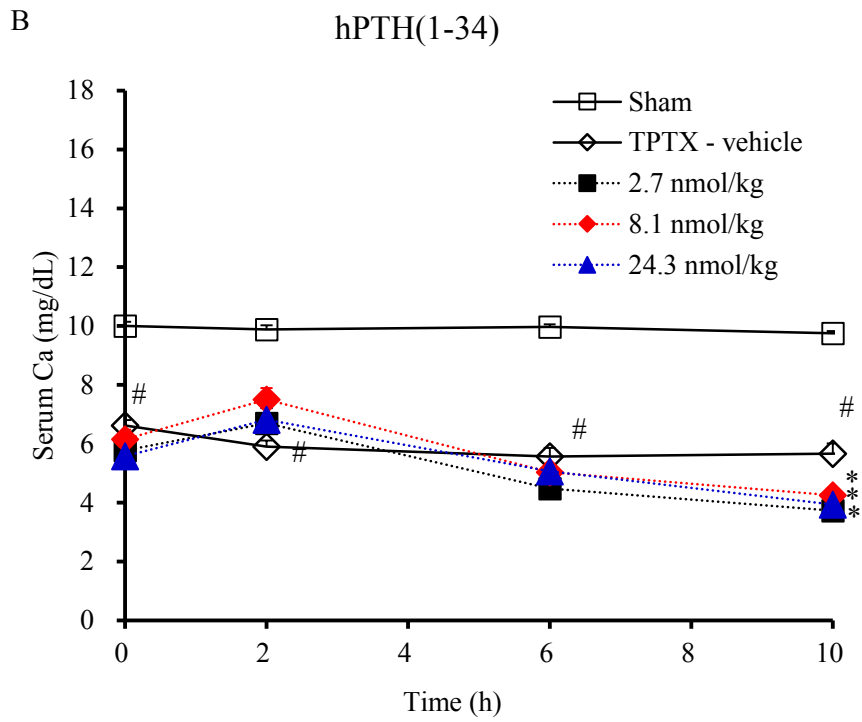
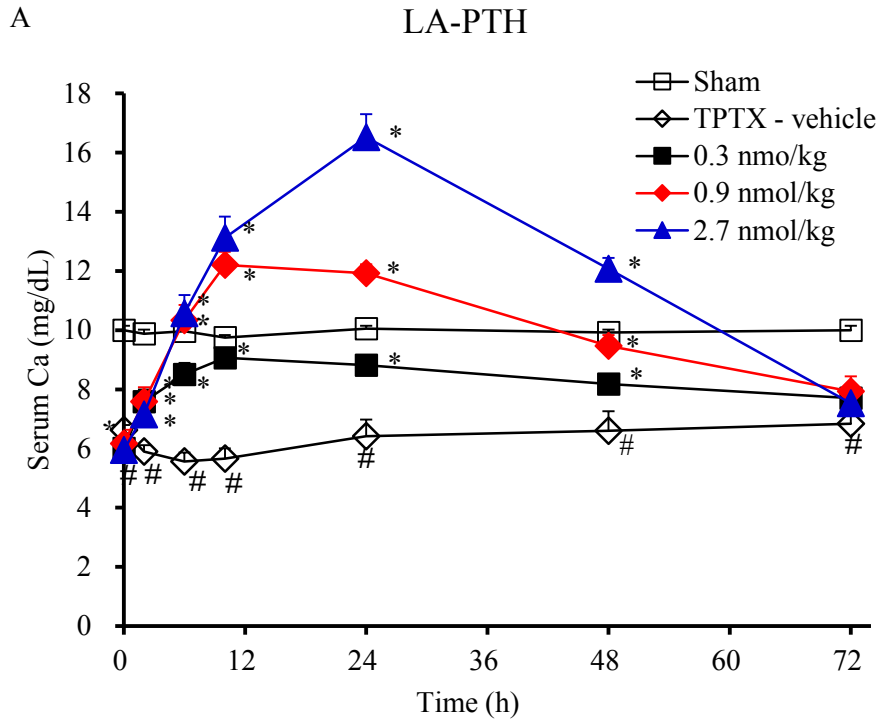
次に LA-PTH の血清カルシウム、及び血清リンに対する効果を検討するために、TPTX ラットに LA-PTH、PTH(1-34)、及び PTH(1-84) を静脈内に単回投与を行い、継時的に採血を行って、血清カルシウム、及び血清リン濃度を測定した。TPTX 術を行うことにより、血清カルシウムは偽手術群の血清カルシウムの約 10.0 mg/dL から、6.6 mg/dL まで低下した (Fig. 3)。

LA-PTH は、用量依存的に血清カルシウムを上昇させ、最高用量の 2.7 nmol/kg では、高カルシウム血症 (16.0 mg/dL 以上) を示した。一方、0.3 nmol/kg では、血清カルシウムは投与後 10 時間で偽手術群の正常レベルに近い血清カルシウム値を示し、投与後 48 時間でも血清カルシウムは溶媒投与群に比較して有意に高い値を示した。

PTH(1-34)、及び PTH(1-84) は、2.7 から 24.3 nmol/kg (LA-PTH の 0.3 nmol/kg の約 80 倍量) のいずれの用量においても、血清カルシウムが上昇する傾向は認められたものの有意な上昇は認められず、またその血清カルシウムは投与後 6 時間では溶媒投与群レベルまで低下した。

また血清リンについては、TPTX 術を行うことにより、偽手術群の血清リン濃度の約 8.2 mg/dL から、13.0 mg/dL まで増加した (Fig. 4)。LA-PTH は、用量依存的に血清リンを低下させた。中間用量の 0.9 nmol/kg では、血清リンは偽手術群の血清リンレベルと同程度まで低下し、最高用量の 2.7 nmol/kg では、血清リン濃度は偽手術群の血清リンレベル以下まで低下した。またその効果はいずれの用量においても 72 時間まで持続した。

PTH(1-34) は、2.7、及び 8.1 nmol/kg まで投与後 2 時間、24.3 nmol/kg では投与 6 時間まで一過性に血清リンレベルを有意に低下させたが、その後は溶媒投与群レベルまで上昇した。PTH(1-84) はいずれの投与量においても、投与後 2 時間で一過性に血清リンレベルを低下させたが、投与後 6 時間以降では溶媒投与群レベルまで上昇した。



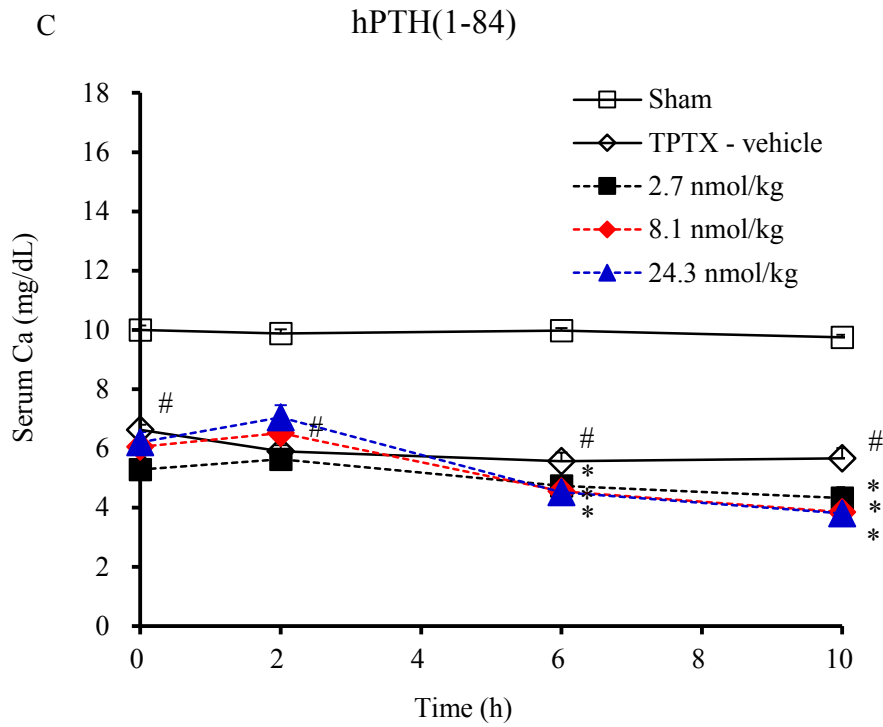
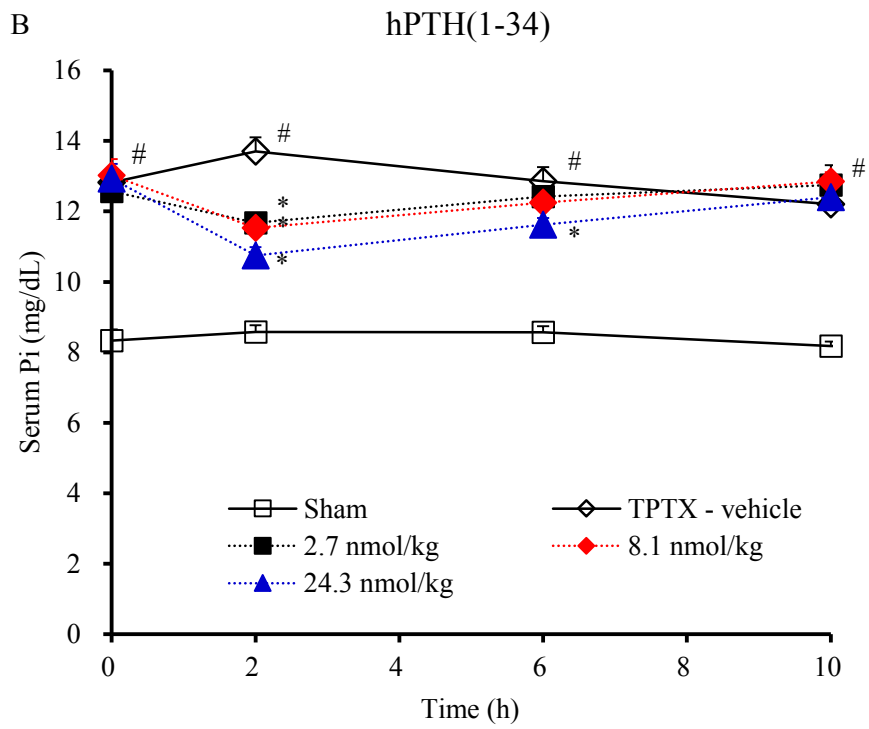
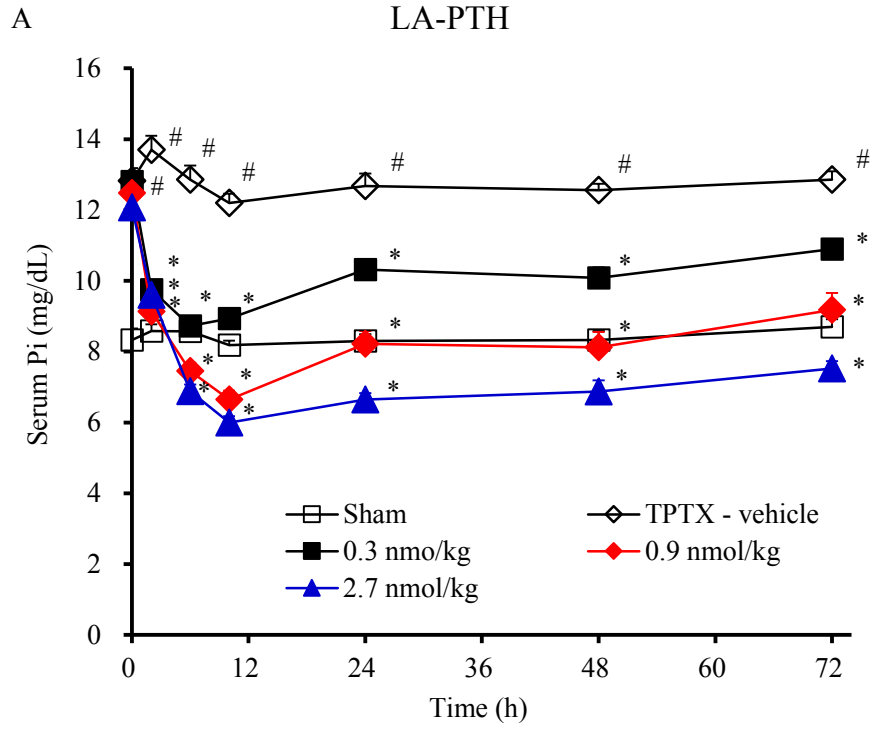


Fig 3. LA-PTH、PTH(1-34)、及び PTH(1-84)の単回静脈内投与による、TPTX ラットにおける血清カルシウムに対する効果

(A) LA-PTH、(B) PTH(1-34)、(C) PTH(1-84) 平均値±標準偏差 (n = 6、TPTX-vehicle : n=5)

*P < 0.05 溶媒投与群と比較した LA-PTH 群の比較、#P < 0.05 溶媒群と sham 群との比較



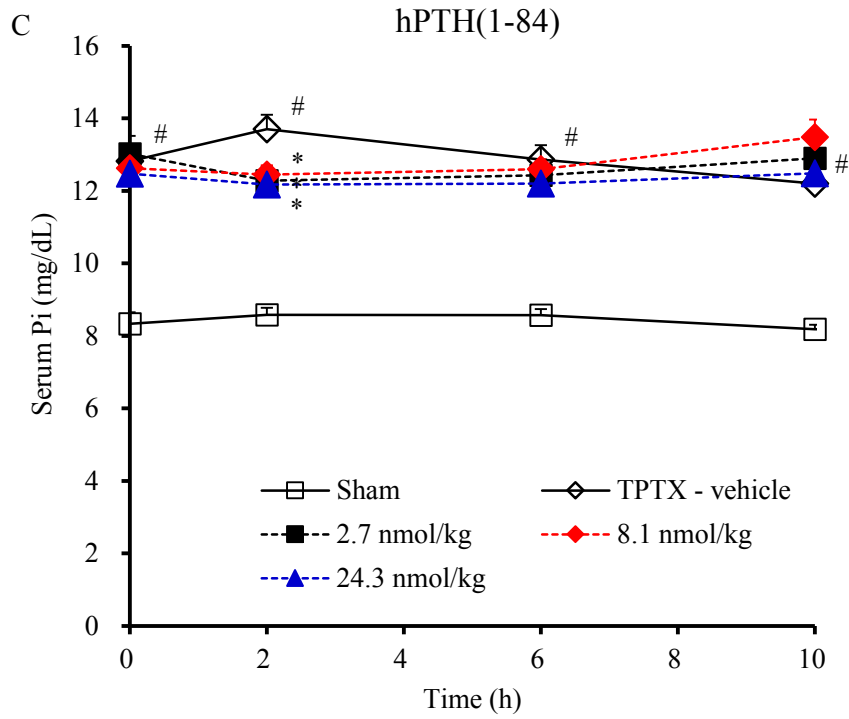


Fig 4. LA-PTH、PTH(1-34)、及び PTH(1-84)の単回静脈内投与による、TPTX ラットにおける血清リンに対する効果

(A)LA-PTH、(B) PTH(1-34)、(C) PTH(1-84)、平均値±標準誤差 (n = 6、TPTX-vehicle : n=5)

*P < 0.05 溶媒投与群と比較した LA-PTH 群の比較、#P < 0.05 溶媒群と sham 群との比較

3-3-3. PTH アナログの TPTX ラットにおける血中濃度推移

次に、LA-PTH、PTH(1-34)及びPTH(1-84)の TPTX ラットにおける血中濃度推移を評価した。TPTX ラットに各 PTH アナログを 24.3 nmol/kg の用量で静脈内投与を行い、経時的に採血を行って、血中の各 PTH アナログの濃度を測定した (Figure 5)。

その結果、各 PTH アナログは静脈内投与により血中から速やかに消失し、60 分以降では測定方法の限界以下まで低下した。各 PTH アナログの消失速度の半減期 (T1/2) は 5 から 8 分程度 (LA-PTH : 7.3 分、PTH(1-34) : 7.8 分、PTH(1-84) : 5.4 分) であった。このことから、LA-PTH の持続的な血中カルシウム上昇作用 (48 時間以上の持続時間) は、LA-PTH が血中に持続的に存在することではなく、PTH1 型受容体の R0 構造への結合性が高いことによると推察された。LA-PTH の速やかな血中濃度推移と持続的薬理作用との関係は、PTH1 型受容体の R0 構造に結合性が高く、構造的にも LA-PTH に類似した M-PTH(1-34) が、マウスにおいて速やかに血中から消失するにも関わらず、持続的な血中カルシウム上昇作用を示すことと一致している (6)。

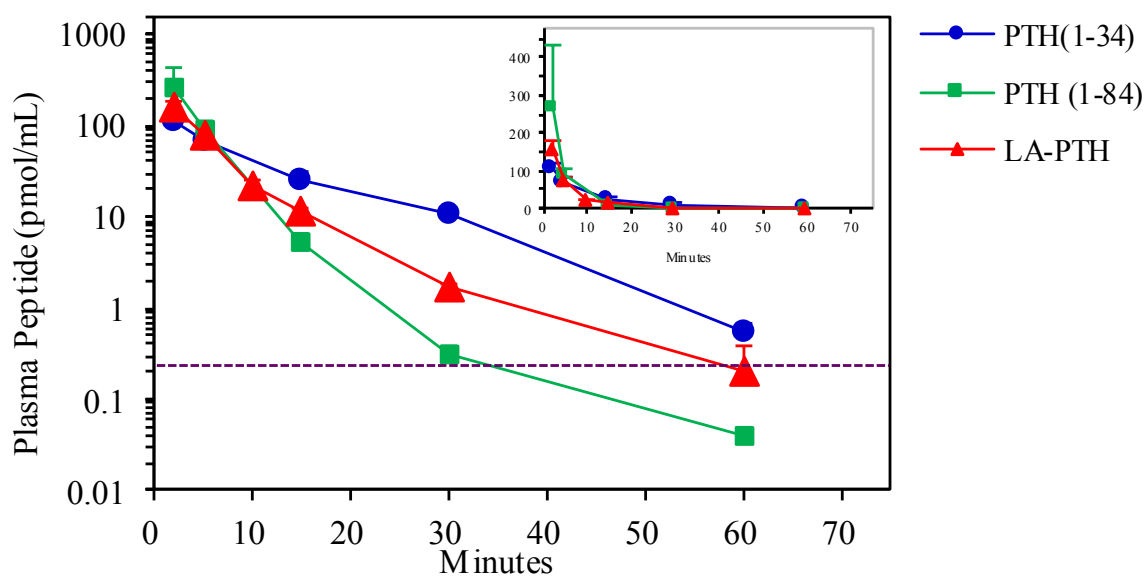


Fig 5. LA-PTH, PTH(1-34)、及び PTH(1-84)の静脈内投与による TPTX ラットでの血中濃度推移
点線 (紫) は、LA-PTH、及び PTH(1-84)の LC-MS による測定限界値を示す。PTH(1-34)の ELISA による測定限界は 0.01 pmol/mL。内部の図は Y 軸の直線表示を示す。平均値±標準偏差 (n=3)

3-3-4. TPTX ラットにおける LA-PTH の単回皮下投与による血清及び尿中カルシウムに対する効果

TPTX ラットにおける LA-PTH の臨床投与ルートと想定される皮下投与による、血清カルシウム、及び尿中カルシウムに対する効果を検証した。LA-PTH の単回皮下投与により、0.3 から 72.9 nmol/kg まで、用量依存的に血清カルシウム濃度を上昇させた。投与後 2 時間では全ての用量で、投与後 6 時間では 0.9 nmol/kg 以上、投与後 10 時間では 2.7 nmol/kg 以上、で血清カルシウムの有意な上昇が認められた。また 8.1 nmol/kg 以上の用量では、血清カルシウムを 24 時間まで有意に上昇させ、24.3 もしくは 72.9 nmol/kg では 48 時間以上、血清カルシウムの高いレベルを維持させた。

尿中カルシウムについては、0 から 24 時間、24 から 48 時間、48 から 72 時間において、LA-PTH の 24.3 nmol/kg で増加傾向を示し、72.9 nmol/kg では、溶媒投与群に比較して有意な尿中カルシウムの増加を示した。一方、8.1 nmol/kg 以下の用量については、溶媒投与群に対して有意な増加は認められなかった。この用量では、血清カルシウム値は溶媒投与群よりも高い値を示したものの、偽手術群を超える高い血清カルシウム値を示す用量ではなかった。

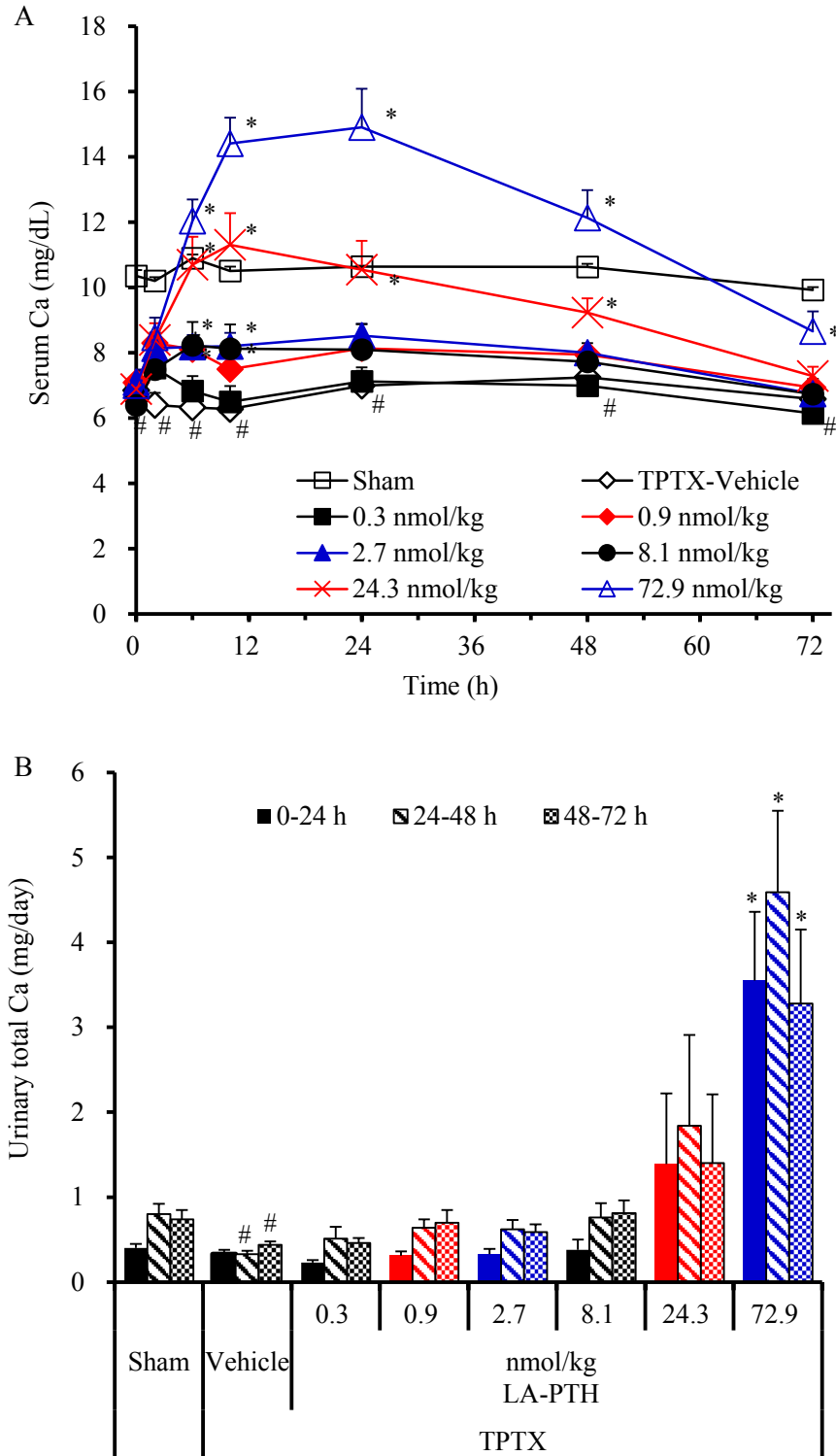


Fig 6. TPTX ラットにおける LA-PTH の単回皮下投与による血清及び尿中カルシウムに対する効果

(A) 血清カルシウム値、(B) 尿中カルシウム値

平均値±標準誤差 (n = 8 or 72.9 nmol/kg のみ n=7)

*P < 0.05 溶媒投与群と比較した LA-PTH 群の比較、#P < 0.05 溶媒群と sham 群との比較

(A) LA-PTH 投与後 2 時間においては、0.3 から 72.9 nmol/kg まで溶媒群に対して有意な増加

3-3-5. TPTX ラットにおける LA-PTH の 4 週間反復投与による血清及び尿中カルシウムに対する効果

LA-PTH の連日皮下投与による血清及び尿中のカルシウムとリンに対する効果を検証するために、TPTX ラットに 28 日間、連日皮下投与を行った。採血については、投与初日、7 日、15 日、21 日、27 日、及び最終日の 28 日に、投与直前、投与後 10 時間で頸静脈採血を行い、最終投与日の 28 日目では、最終投与後 24 時間での採血も行った。また、TPTX ラットでの LA-PTH の単回皮下投与での検討において、血清カルシウム値のピークが投与後 10 時間であったことから、投与後の 10 時間での採血を行った。

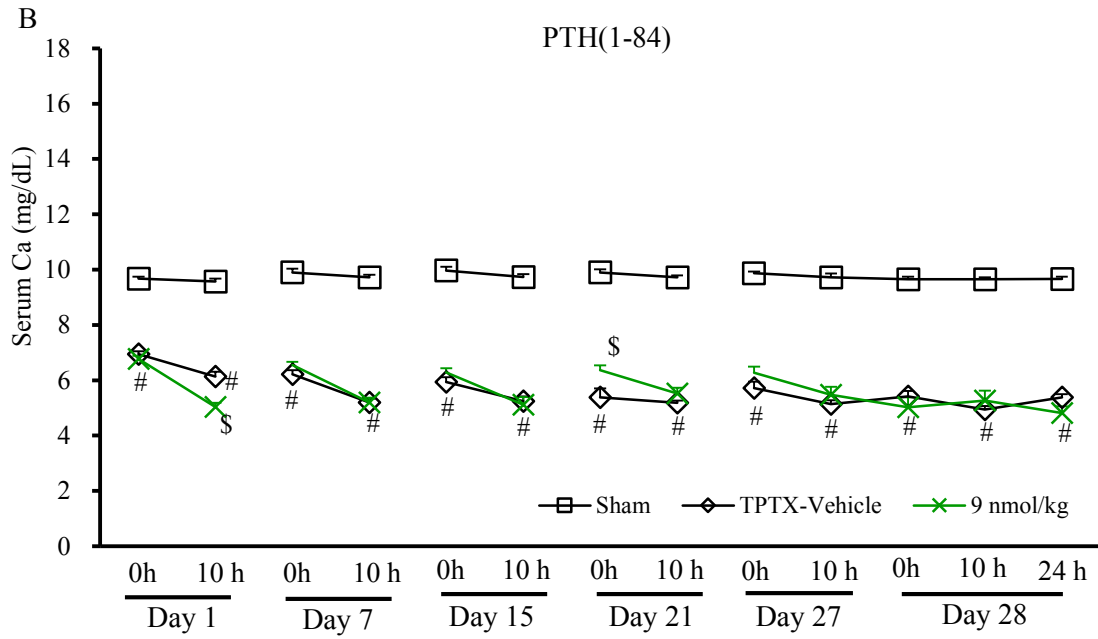
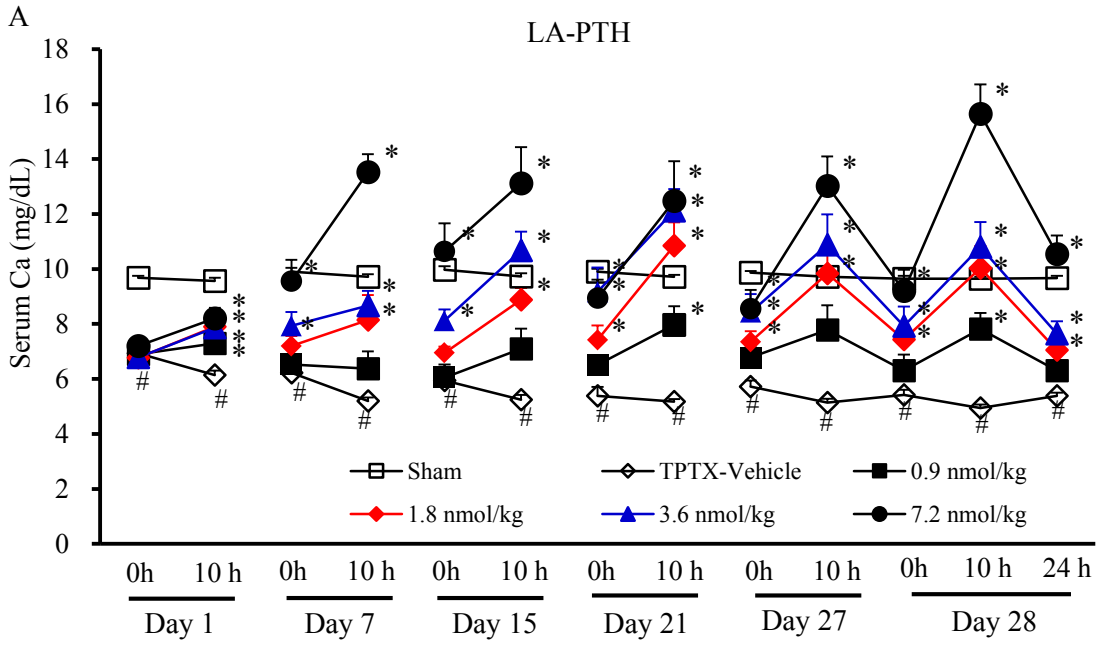
28 日間の連日皮下投与により、LA-PTH は 0.9 から 7.2 nmol/kg まで用量依存的に血清カルシウムを増加させた。連日皮下投与により、LA-PTH による血清カルシウム上昇作用は、特にピークの 10 時間値において、投与初日より増加する傾向が認められた。この反応性の増加は、血清カルシウムを偽手術群レベル以内に維持する 3.6 nmol/kg まででは、投与後 21 日以降落ち着く傾向が認められた。連日投与によるこの血清カルシウムの反応性増加の理由は今のところ不明である。LA-PTH の 1.8、及び 3.6 nmol/kg では、投与期間の 28 日間に渡り、血清カルシウム値は溶媒群よりも高く、偽手術群に近いレベルを維持していた。

最終投与時の 28 日目における 24 時間蓄尿での尿中カルシウムは、LA-PTH は 3.6 nmol/kg まで溶媒投与群、及び偽手術群に対して有意な増加は認められず、1.8 nmol/kg では偽手術群と同程度であった。

一方、比較対照として使用した PTH(1-84)の 9 nmol/kg においては、投与期間の 28 日間に渡り、血清カルシウムの明らかな上昇はほぼ認められず、尿中カルシウムに対しても特に影響は認められなかった。

血清リンに対する効果については、LA-PTH は用量依存的に血清リンを低下させた。また血清カルシウムで認められたの同様に、連日皮下投与することにより血清リンの低下作用は増大し、28 日目では落ち着く傾向が認められた。

PTH(1-84)は、溶媒投与群に比較して血清リンを低下させたものの、投与期間の 28 日間に渡り、偽手術群レベルまで低下させることはなかった。



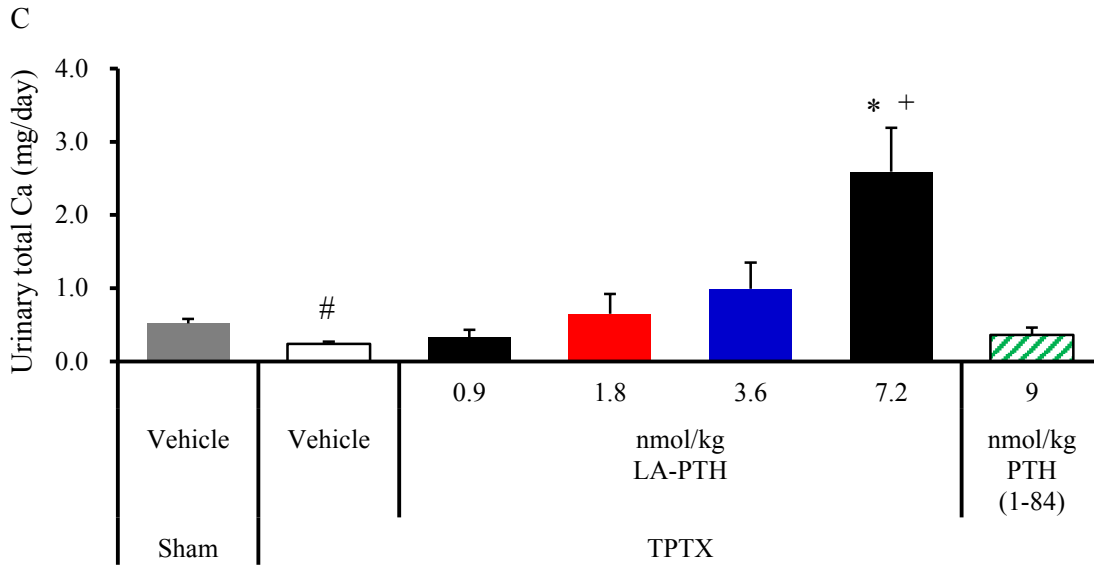


Fig 7. TPTX ラットにおける LA-PTH の 4 週間連日皮下投与による血清及び尿中カルシウムに対する効果

(A) LA-PTH、(B) PTH(1-84)、(C) 28 日目の尿中カルシウム排泄量

経時的に頸静脈から採血を行い、血清カルシウムレベルを測定するとともに、最終投与から 24 時間の間、代謝ケージにて 24 時間蓄尿を行い、尿中カルシウムレベルを測定。

平均値±標準誤差 (n = 6、溶媒群及び 72.9 nmol/kg、n=5)

*P < 0.05 溶媒投与群と LA-PTH 群の比較、#P < 0.05 溶媒群と sham 群との比較、+p<0.05 偽手術群と LA-PTH 群の比較

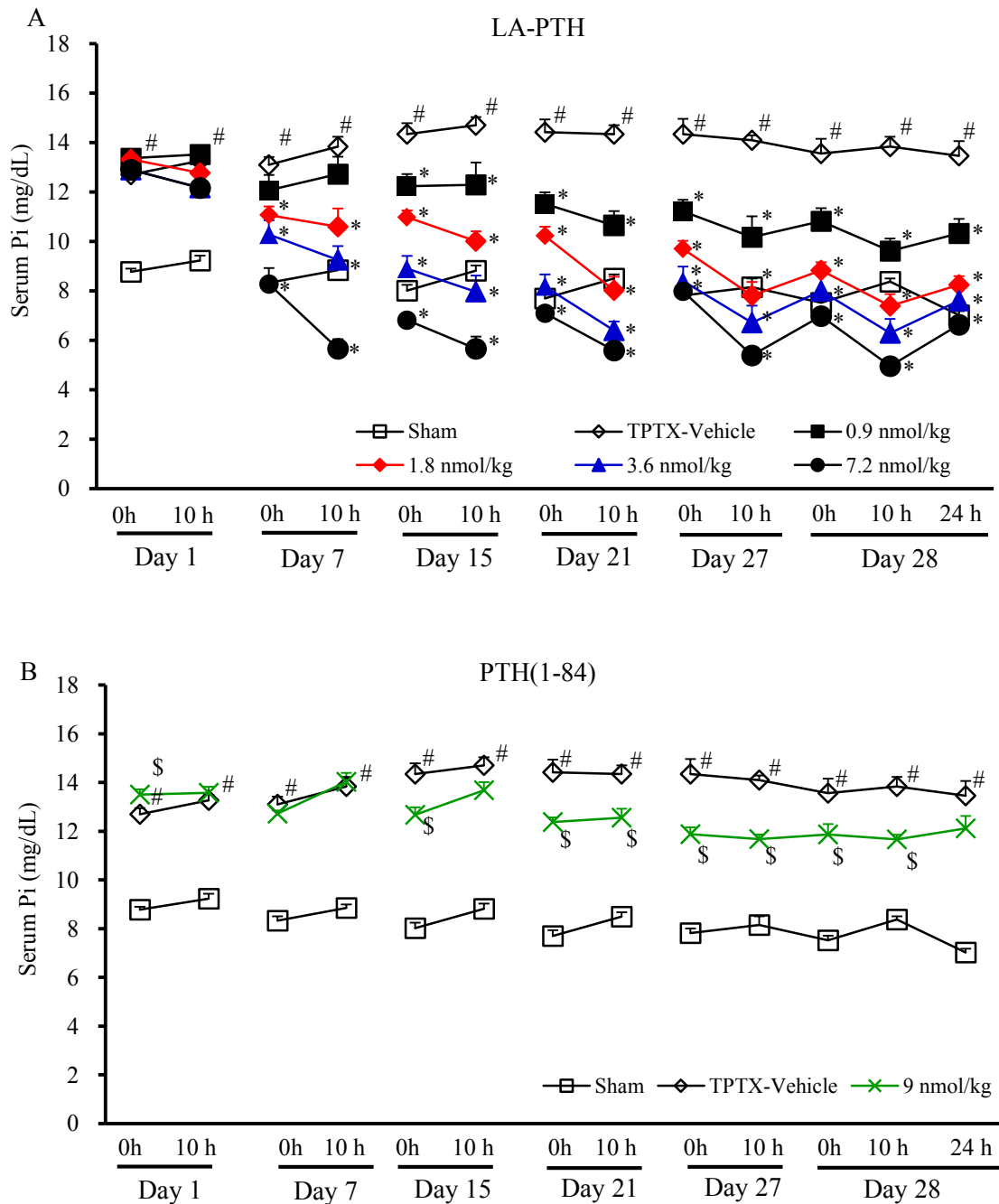


Fig 8. TPTX ラットにおける LA-PTH の 4 週間連日皮下投与による血清リンに対する効果

(A) LA-PTH、(B) PTH(1-84)

経時的に頸静脈から採血を行い、血清リンレベルを測定した。

平均値±標準誤差 (n = 6、溶媒群及び 72.9 nmol/kg、n=5)

*P < 0.05 溶媒投与群と LA-PTH 群の比較、#P < 0.05 溶媒群と sham 群との比較、+p<0.05 偽手術群と LA-PTH 群の比較

LA-PTH の 28 日間の連日投与により、最終投与後の血清中の活性型 1,25 (OH) ビタミン D3 の濃度は増加する傾向が認められたものの、最高用量の 7.2 nmol/kg でのみ有意な増加が認められた (Fig. 9)。PTH(1-84)については、特に血清中の活性型 1,25 (OH) ビタミン D3 の濃度に特に影響は認められなかった。

LA-PTH の 28 日間連日投与による骨への影響を評価するため、試験終了後の TPTX ラットの腰椎と大腿骨の骨密度 (Bone Mineral Density : BMD)、及び骨代謝マーカーを測定した (Fig. 10)。その結果、LA-PTH はいずれの用量においても、腰椎、及び大腿骨の BMD を低下させることはなかった。また、PTH(1-84)投与により、腰椎と大腿骨 BMD は増加した。

大腿骨の骨構造を μ CT を使用して解析した (Fig. 11、及び Table. 1)。大腿骨遠位部の海綿骨部位では、TPTX 術により骨量が増加していた (BV/TV、Tb.N、Tb.Th、Tb.Sep、Connective Density)。LA-PTH 投与では、TPTX 術により増加した海綿骨に対し、特に影響は認められなかった。また大腿骨皮質骨部位では、TPTX 術により特に変化は認められず、LA-PTH の最高用量である 7.2 nmol/kg で、約 10%程度の皮質骨の低下 (Cortical Bone Volume) が認められた。PTH(1-84)では、大腿骨の海綿骨 (Tb.N) が有意に増加していた。

LA-PTH 投与により、骨吸収マーカーの尿中 CTx はわずかに上昇する傾向が認められたものの、3.6 nmol/kg までは有意な上昇は認められなかったが、高カルシウム血症を示す 7.2 nmol/kg においてのみ、有意な尿中 CTx の上昇が認められた。PTH(1-84)の投与によっても、わずかに尿中 CTx が上昇した。骨形成マーカーである PINP については、LA-PTH、及び PTH(1-84)の投与で特に大きな上昇は認められなかった。

以上のことから、LA-PTH の 1.8 nmol/kg では、TPTX ラットにおいて、血中カルシウム及び血清リン濃度を適切なレベルに維持するとともに、高カルシウム尿症や、過剰な骨吸収誘導による骨量減少を引き起こすことはなく、PTH(1-84)の高用量投与よりも優れた効果を発揮することが示された。また、

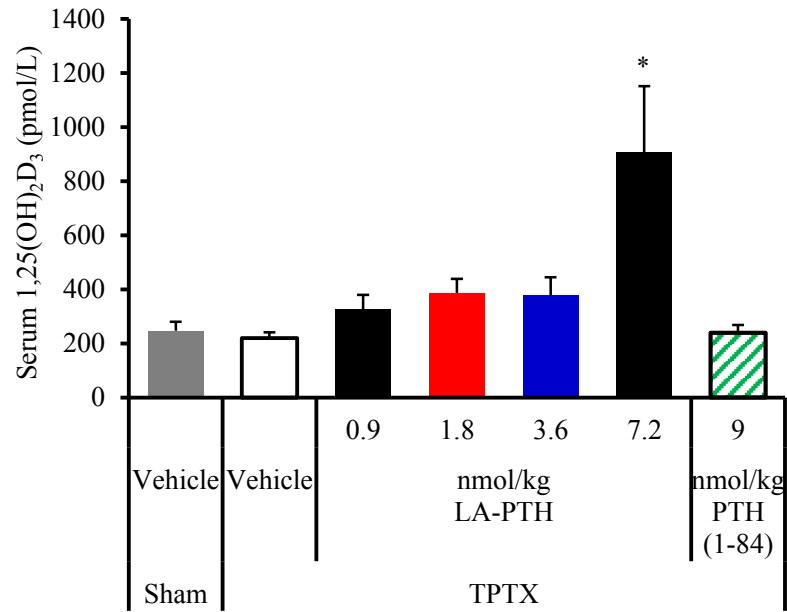
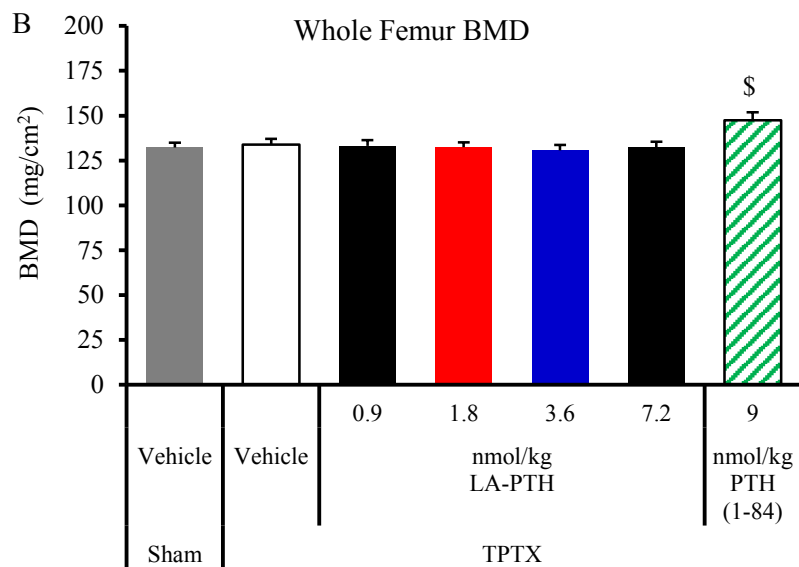
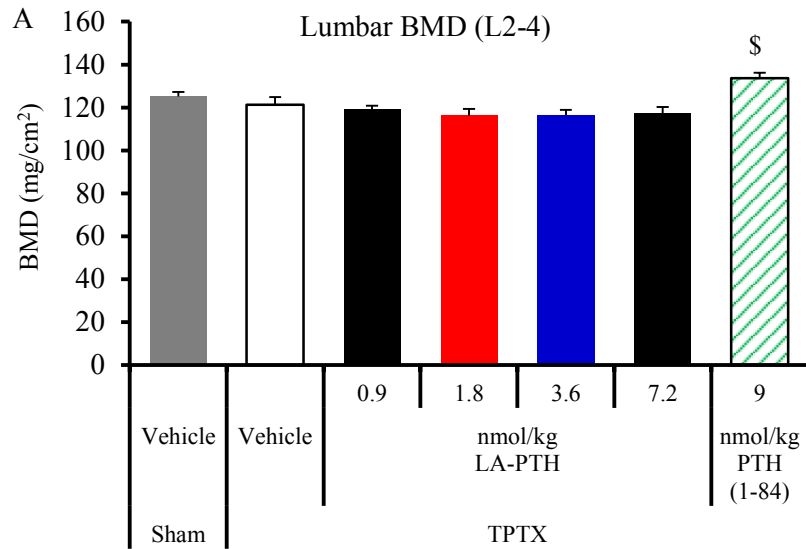


Fig 9. TPTX ラットにおける LA-PTH の 4 週間連日皮下投与による血中活性型ビタミン D3 に対する効果

平均値±標準誤差 (n = 6、溶媒群及び 72.9 nmol/kg、n=5)

*P < 0.05 溶媒投与群と LA-PTH 群の比較、#P < 0.05 溶媒群と sham 群との比較



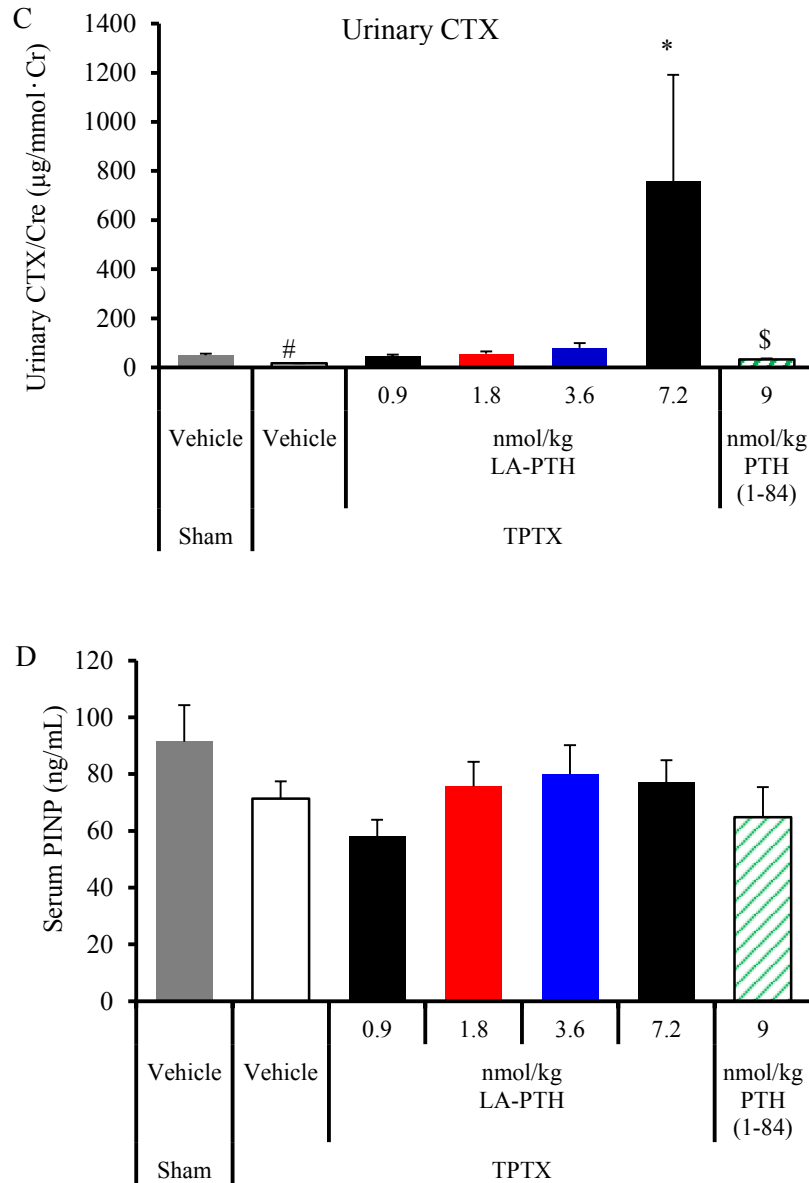


Fig 10. TPTX ラットにおける LA-PTH の 4 週間連日皮下投与による骨関連パラメーターに対する効果

(A) 腰椎 BMD (第 2-第 4 腰椎) (B) 大腿骨 BMD (C) 28 日目の尿中 C 末 Type I コラーゲンフラグメント (CTx) (D) 血清中プロコラーゲン Type I N 末ペプチド (PINP)

平均値±標準誤差 (n = 6、溶媒群及び 7.2 nmol/kg、n=5)

*P < 0.05 溶媒投与群と LA-PTH 群の比較、#P < 0.05 溶媒群と sham 群との比較

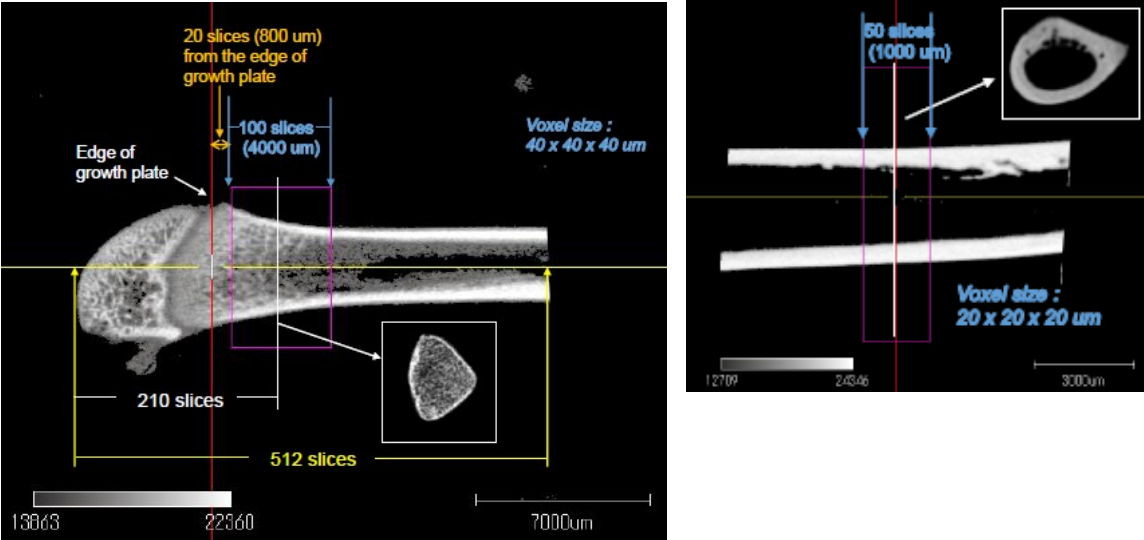
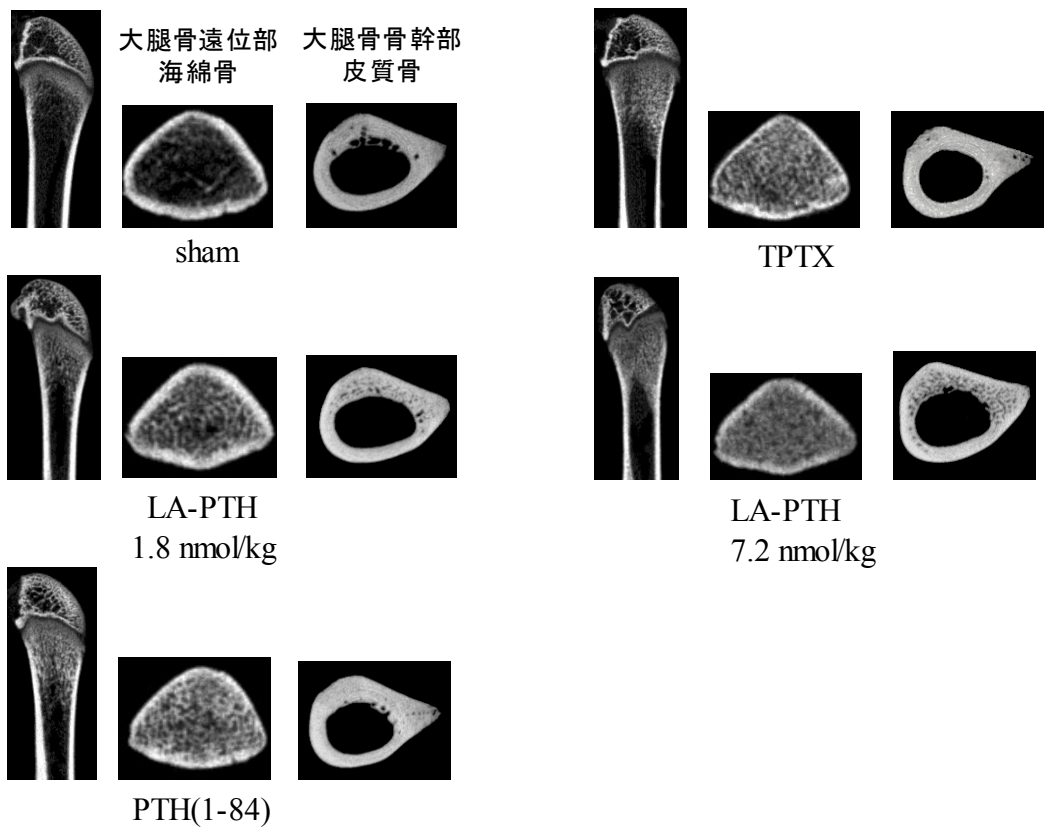


Fig 11. TPTX ラットにおける LA-PTH の 4 週間連日皮下投与での大腿骨の μ CT 画像
各群の代表例を画像として表示、 μ CT 解析方法と画像作成法も表示

	Sham	TPTX-vehicle	LA-PTH				PTH(1-84)
			0.9 nmol/kg	1.8 nmol/kg	3.6 nmol/kg	7.2 nmol/kg	9.0 nmol/kg
μ CT							
大腿骨遠位部海綿骨							
BV/TV, %	1.2 \pm 0.2	20.2 \pm 3.6 [#]	15.3 \pm 2.9	17.2 \pm 2.6	20.3 \pm 4.8	32.4 \pm 10.0	36.4 \pm 7.6
Tb.Th, mm	111.8 \pm 7.3	200.5 \pm 14.8 [#]	166.8 \pm 9.5	165.6 \pm 5.5	178.7 \pm 10.7	214.7 \pm 34.9	244.8 \pm 43.4
Tb.N, 1/mm	0.06 \pm 0.01	0.55 \pm 0.04 [#]	0.55 \pm 0.07	0.55 \pm 0.08	0.58 \pm 0.08	0.67 \pm 0.10	0.71 \pm 0.03 ^S
Tb.Sp, mm	1512.0 \pm 300.4	255.1 \pm 37.1 [#]	255.0 \pm 9.0	266.5 \pm 17.6	230.5 \pm 11.5	247.0 \pm 42.9	238.7 \pm 9.3
Connective.Density, 1/mm ³	0.10 \pm 0.04	5.17 \pm 0.78 [#]	4.58 \pm 1.01	6.15 \pm 1.15	6.53 \pm 1.67	8.16 \pm 1.35	6.74 \pm 0.64
大腿骨骨幹部皮質骨							
Cortical Bone Volume, mm ³	6.5 \pm 0.2	6.6 \pm 0.2	6.1 \pm 0.1	6.2 \pm 0.2	6.0 \pm 0.2	5.9 \pm 0.3*	6.8 \pm 0.3
Medullary Volume, mm ³	4.4 \pm 0.3	3.8 \pm 0.2	4.3 \pm 0.3	4.1 \pm 0.2	4.0 \pm 0.3	4.1 \pm 0.4	4.1 \pm 0.4
All Bone Volume, mm ³	10.9 \pm 0.4	10.4 \pm 0.3	10.4 \pm 0.4	10.3 \pm 0.3	10.1 \pm 0.3	10.1 \pm 0.4	10.9 \pm 0.4
Cortical Bone Ratio, %	60.0 \pm 1.9	63.8 \pm 1.0	59.2 \pm 1.6	60.4 \pm 1.1	59.9 \pm 2.1	59.3 \pm 3.0	62.6 \pm 2.5
Cortical Thickness, μ m	656.8 \pm 21.8	695.6 \pm 22.4	622.0 \pm 18.3	647.1 \pm 13.6	633.8 \pm 29.0	624.9 \pm 38.8	700.3 \pm 34.4

Table. 1 TPTX ラットにおける LA-PTH の 4 週間連日皮下投与による大腿骨 μ CT 解析結果

BV/TV (Bone Volume/Tissue Volume) : 単位組織量あたりの骨量、Tb.Th (Trabecular Thickness) : 骨量幅、Tb.N (Trabecular Number) : 骨量数、Tb.Sp (Trabecular Separation) 骨梁間隔、Connectivity density : 骨梁の連結性、Cortical Bone Volume : 皮質骨体積、Medullary Volume : 骨髓腔体積、All Bone Volume : 全骨体積、Cortical Bone Ratio : 全骨量に対する皮質骨割合、Cortical Thickness : 皮質骨幅

平均値 \pm 標準誤差 (n = 6、溶媒群及び LA-PTH 7.2 nmol/kg、n=5)

*P < 0.05 溶媒投与群と LA-PTH 群の比較、#P < 0.05 溶媒群と sham 群との比較

3-3-6. 正常カニクイザルにおける LA-PTH 単回投与による血清カルシウムに対する効果

LA-PTH の正常カニクイザルにおける血清カルシウム上昇作用を評価した。まずカニクイザルに LA-PTH を 0.25、0.5、1.0 nmol/kg を単回皮下投与を行い、経時的に採血を行って血清カルシウム濃度を評価した。

その結果、LA-PTH は用量依存的に血清カルシウムを上昇させ、そのピークは投与後 24 時間であった (Fig. 12)。最低用量の 0.25 nmol/kg で血清カルシウムの有意な増加 (LA-PTH : 約 11.9 mg/dL、溶媒投与群 : 約 10.5 mg/dL) を示し、0.5 及び 1.0 nmol/kg では、血清カルシウムはピークの 24 時間時で約 13.0 mg/dL まで上昇し、血清カルシウム上昇作用は 72 時間まで持続した。

次に、LA-PTH の 2.5 及び 10 nmol/kg、PTH(1-34)、及び PTH(1-84) の 10 nmol/kg を皮下投与し、経時的に血清カルシウム濃度を評価した。LA-PTH は 2.5 及び 10 nmol/kg で高カルシウム血症 (13.0 から 16.0 mg/dL) を誘導し、その血清カルシウム作用は 96 時間以上持続した。

一方 PTH(1-84) の 10 nmol/kg では、投与後 10 時間において血清カルシウムは約 11.4 mg/dL 程度まで一過性に上昇する傾向が認められたものの、その後 24 時間では投与前レベルまで低下した。PTH(1-34) は血清カルシウム上昇作用は更に弱いものであった。

以上のことから、カニクイザルにおいても、LA-PTH は皮下投与により、強力且つ持続的な血清カルシウム上昇作用を示すことが明らかとなった。

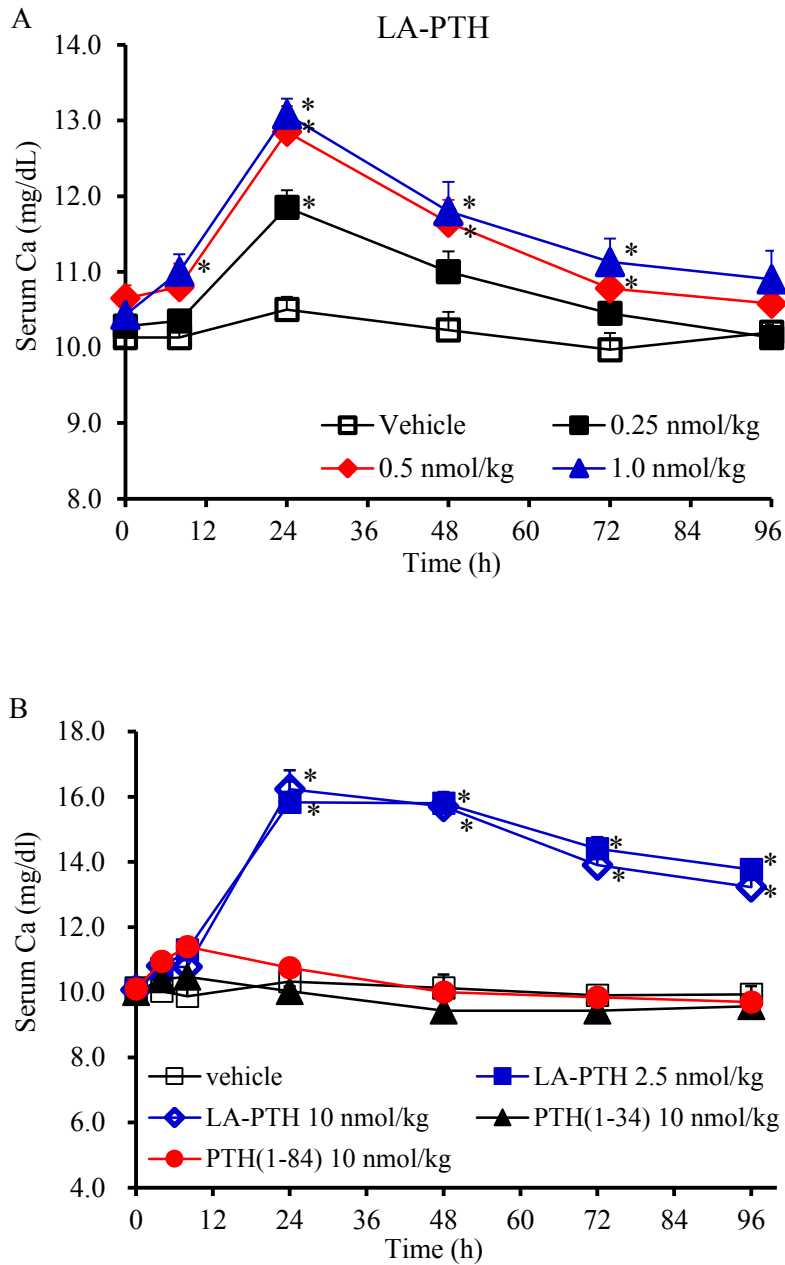


Fig 12. カニクイザルにおける LA-PTH、PTH(1-34)、及び PTH(1-84) 単回皮下投与による血清カルシウムに対する効果

(A) LA-PTH の血清カルシウム上昇作用の用量反応性、(B) LA-PTH と PTH(1-34)、PTH(1-84) との血清カルシウム上昇作用の比較

平均値±標準誤差 (n = 3、PTH(1-84)、n=2)、*P < 0.05 溶媒投与群と LA-PTH 群の比較

3-4. 考察

本検討では、HP の動物モデルである TPTX ラットモデルにおいて、LA-PTH は PTH(1-34)、及び PTH(1-84)に比較して、強力且つ持続的な血中カルシウム上昇作用、及び血中リン低下作用を示すことが判明した。この LA-PTH の持続的な効果は、PTH1 型受容体の R0 構造への高い結合性と持続的な cAMP シグナルによるものであり、LA-PTH が血中に長く滞留して持続的な効果を示しているものではないと考えられる。このことは、TPTX ラットにおいて、静脈内投与により LA-PTH は PTH(1-34)、及び PTH(1-84)と同様に血中からは速やかに消失するものの、LA-PTH の血中カルシウム上昇作用は、PTH(1-34)と PTH(1-84)に比較して明らかに持続したという実験データ (Fig 3 及び Fig 5) が示している。

また、TPTX ラットとサルでの検討結果は、LA-PTH や M-PTH(1-34)が、正常マウスやラットにおいて、血中濃度の持続性が認められず、血中カルシウム上昇作用が持続した過去の検討結果と一致する (1、2)。

本検討で最も大事な点は、LA-PTH の 4 週間連投試験において、1.8 nmol/kg では、血中カルシウムを正常に近いレベルまで上昇させながら、尿中カルシウムの明らかな増加は認められなかった点と思われる。HP の治療においては、尿中カルシウムを上昇させずに血中カルシウムを上昇させることが、HP の治療薬にとって重要な治療のゴールである。

LA-PTH や M-PTH(1-34)などの R0 構造に高い親和性を持つ PTH アナログについて、PTH1 型受容体の R0 構造と PTH アナログのアミノ酸相互作用については未だ不明な点が多い。しかし、過去の検討により、この持続型 PTH アナログのシグナルメカニズムは、不可逆的な受容体への結合と、ターゲット細胞におけるエンドソームなどの細胞内コンパートメントでの G 蛋白を介した持続的シグナルが関与していると考えられる (10、11)。

本検討では、1.8 nmol/kg の LA-PTH は、TPTX ラットにおいて 1 日 1 回の 4 週間連日皮下投与では、血中カルシウムを投与前とピークの投与後 10 時間値において、おおよそ正常範囲 (7.6-10.5 mg/dL) の間に維持し、尿中カルシウムは有意な増加を示さなかった。また、ピーク時の血中カルシウムは、LA-PTH の連日投与で投与後 21 日目まで緩やかに増加し、また最高用量の 7.2 nmol/kg では、高カルシウム血症と高カルシウム尿症を示した。

LA-PTH の連日投与により、血中カルシウム上昇作用と血中リン低下作用が増幅された理由は明らかでないが、LA-PTH の連日投与により、リガンドのクリアランスやターゲット細胞での PTH1 型受容体の脱感作作用など、今後は更なる詳細な検討が必要と思われる。このような非臨床試験での検討は、将来の LA-PTH の臨床応用を進める上で、重要な検討になると考えられる。

最近の HP 治療において、標準療法に更にアドオンする形での PTH(1-84)の 1 日 1 回、もしくは 2 日に 1 回の臨床適応の検討においては、彼らの試験結果により、PTH(1-84)は 1 日 2 回の投与頻度が適切と考えられている。その理由は、PTH(1-84)投与による血中カルシウム上昇作用は、投与後 7 時間でピークを迎え、その後 24 時間後には最も低くなっていたことである (12)。

また、HP の治療を考える上では、長期治療における骨に対する効果も考慮しなければいけない。HP 患者は内因性 PTH レベルが低く、骨代謝回転が低下し、その結果 HP 患者の BMD は健常人に比較して高いことが報告されている (13)。また、PTH は骨形成と骨吸収の両方を上昇させ、骨代謝回転を向上させることから、HP 患者を PTH(1-84)で治療することにより、低下した骨代謝回転を正常化させることが報告されている (14)。本実験では、TPTX 術により大腿骨海綿骨部位が増加していることが μ CT 解析によって明らかとなった。過去の PTH 欠損マウス (PTH-null) においても、2 カ月目では骨形成と骨吸収が共に低下し、また大腿骨海綿骨部位と皮質骨幅が増加していることが報告されており、今回の結果と類似している (15)。

また、LA-PTH の 28 日間の連日皮下投与においては、BMD の有意な減少、もしくは増加は認められず、また骨代謝マーカースの変化は最高用量の 7.2 nmol/kg で以外では大きな変化は認められなかった。また、至適用量と思われる 1.8 nmol/kg では、腰椎と大腿骨 BMD、及び骨代謝マーカースの有意な変化も認められなかった。骨パラメーターの解析では、LA-PTH の 1.8 nmol/kg の用量では、特に骨密度や骨構造、骨代謝マーカースに影響は認められなかった。最高用量の 7.2 nmol/kg では、尿中骨吸収マーカース (CTx) が有意に増加し、 μ CT による骨構造解析でも皮質骨量が低下していることが示された。ただし、この用量では、高カルシウム血症と高カルシウム尿症も呈しており、用量としては過剰である。LA-PTH は、投与量を調節することにより、血中カルシウムをコントロールしながら、骨への副作用は回避できることが想定された。

本検討は、LA-PTH の HP の動物モデルでの効果を検討したものであるが、この TPTX ラットでの検討や、他の動物モデルでの検討結果は、HP 治療に非常に有用と思われる LA-PTH の臨床研究、及び将来の HP 治療薬としての特性を示すために重要と考えられた。

3-5. 参考文献

1. Maeda A, Okazaki M, Baron DM, Dean T, Khatri A, Mahon M, Segawa H, Abou-Samra AB, Jüppner H, Bloch KD, Potts JT Jr, Gardella TJ. Critical role of parathyroid hormone (PTH) receptor-1 phosphorylation in regulating acute responses to PTH. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110:5864-9
2. Okazaki M, Ferrandon S, Vildardaga JP, Bouxsein ML, Potts JT Jr, Gardella TJ. Prolonged signaling at the parathyroid hormone receptor by peptide ligands targeted to a specific receptor conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105:16525-30
3. Winer KK, Zhang B, Shrader JA, Peterson D, Smith M, Albert PS, Cutler GB Jr. Synthetic human parathyroid hormone 1-34 replacement therapy: a randomized crossover trial comparing pump versus injections in the treatment of chronic hypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012; 97:391-9
4. Winer KK, Fulton KA, Albert PS, Cutler GB Jr. Effects of pump versus twice-daily injection delivery of synthetic parathyroid hormone 1-34 in children with severe congenital hypoparathyroidism. *J Pediatr*. 2014; 165:556-63
5. Gardella TJ, Rubin D, Abou-Samra AB, Keutmann HT, Potts JT Jr, Kronenberg HM, Nussbaum SR. Expression of human parathyroid hormone-(1-84) in *Escherichia coli* as a factor X-cleavable fusion protein. *J Biol Chem*. 1990; 265:15854-9.
6. Ferrandon S, Feinstein TN, Castro M, Wang B, Bouley R, Potts JT, Gardella TJ, Vildardaga JP. Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nat Chem Biol*. 2009; 5:734-42
7. Dean T, Linglart A, Mahon MJ, Bastepe M, Jüppner H, Potts JT Jr, Gardella TJ. Mechanisms of ligand binding to the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor: selectivity of a modified PTH(1-15) radioligand for GalphaS-coupled receptor conformations. *Mol Endocrinol*. 2006; 20:931-43.
8. Ferrandon S, Feinstein TN, Castro M, Wang B, Bouley R, Potts JT, Gardella TJ, Vildardaga JP. Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nat Chem Biol*. 2009; 5:734-42.
9. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010; 25:1468-86.

10. Cheloha RW, Gellman SH, Vilardaga JP, Gardella TJ. PTH receptor-1 signalling-mechanistic insights and therapeutic prospects. *Nat Rev Endocrinol.* 2015; 11:712-24
11. Vilardaga JP, Jean-Alphonse FG, Gardella TJ. Endosomal generation of cAMP in GPCR signaling. *Nat Chem Biol.* 2014; 10:700-6
12. Sikjaer T, Amstrup AK, Rolighed L, Kjaer SG, Mosekilde L, Rejnmark L. PTH(1-84) replacement therapy in hypoparathyroidism: a randomized controlled trial on pharmacokinetic and dynamic effects after 6 months of treatment. *J Bone Miner Res.* 2013; 28:2232-43
13. Rubin MR, Dempster DW, Zhou H, Shane E, Nickolas T, Sliney J Jr, Silverberg SJ, Bilezikian JP. Dynamic and structural properties of the skeleton in hypoparathyroidism. *J Bone Miner Res.* 2008; 23:2018-24
14. Rubin MR, Dempster DW, Sliney J Jr, Zhou H, Nickolas TL, Stein EM, Dworakowski E, Dellabadia M, Ives R, McMahon DJ, Zhang C, Silverberg SJ, Shane E, Cremers S, Bilezikian JP. PTH(1-84) administration reverses abnormal bone-remodeling dynamics and structure in hypoparathyroidism. *J Bone Miner Res.* 2011; 26:2727-36
15. Miao D, He B, Lanske B, Bai XY, Tong XK, Hendy GN, Goltzman D, Karaplis AC. Skeletal abnormalities in Pth-null mice are influenced by dietary calcium. *Endocrinology.* 2004;145:2046-53

第4章 結論

生体において、骨格を維持する骨代謝と、生体の機能を制御するカルシウム代謝は重要な機能の一つである。その骨代謝とカルシウム代謝を調節する副甲状腺ホルモン (Parathyroid Hormone : PTH) について、以下の点に着目して研究を行った。

1. 骨粗鬆症に対する治療効果

PTH が骨形成促進作用を示す最適な間歇投与の時間とその骨量増加作用のメカニズム

骨吸収因子である PTH は、臨床応用されている唯一の骨形成促進剤である。PTH(1-34)を間歇投与と持続投与では、骨量増加作用に対して異なる効果を示すものの、PTH(1-34)の骨量を増加させる最適な投与時間は明らかでない。このことから、PTH(1-34)を異なる時間で反復インフュージョンを行い、その骨量増加効果を検証することで、骨量増加に最適な投与時間とそのメカニズムの検討を行った。

PTH(1-34)による、骨量を増加させる最適な間歇投与時間について、過去の検討では、臨床で使用されている PTH(1-34)の投与量 (0.3~0.4 μ g/kg、血中最大濃度 160~360 pg/mL) よりもはるかに高い用量 (80 μ g/kg、血中濃度 3,800~18,000 pg/mL) での研究が報告されている。このことから、臨床用量に近い PTH(1-34)の低用量 (Cmax 約 300 pg/mL 前後) を用いて、骨量を増加させる最適な投与時間の検討を行った。動物モデルとしては、インフュージョンポンプを用いて、ラットを拘束せずに一定時間薬剤を反復投与できるラットインフュージョンモデルを用いて、PTH(1-34)を異なる時間 (1、2、4 時間) で反復インフュージョンを行い、その骨代謝と骨量増加効果を検証した。

PTH 単回インフュージョンにより誘導される骨関連遺伝子の検索では、c-fos、Wnt4、EphrinB2、RANKL の誘導が高く、骨量を増加させる間歇投与ではこれら遺伝子が一過性に上昇したが、4 時間のインフュージョンではこれら遺伝子が 4 時間まで持続的に上昇していた。

PTH(1-34)を 1、2、4 時間と、異なる時間で 4 週間の反復インフュージョン投与を行い、その骨量増加作用を検討した。その結果、PTH(1-34)を 1 時間のみ反復インフュージョンした場合には、大腿骨骨密度 (BMD) の有意な増加が認められたが、2、4 時間の反復インフュージョンでは、大腿骨骨密度の有意な増加は認められなかった。

この違いを検討するため、PTH(1-34)を 1 時間と 4 時間で、14 日間の反復インフュージョンを行い、骨代謝マーカーの変化を評価した。その結果、PTH(1-34)の 1 日 1 時間のインフュージョンでは、骨形成マーカーの PINP (I 型プロコラーゲン N 末ペプチド) 及びオステオカルシンのみが上昇

したが、PTH(1-34)の1日4時間のインフュージョンでは、骨形成マーカーのみならず、骨吸収マーカーの尿中CTx (I型コラーゲンC-テロペプチド)も上昇した。

以上のことから、PTH(1-34)の臨床に近い用量 (Cmax 300 pg/mL 前後) において、骨形成のみを誘導して骨量を増加させる PTH(1-34)の最適投与時間は1時間であることが明らかとなった。

2. 副甲状腺機能低下症に対する治療

持続型 PTH アナログの副甲状腺機能低下症モデルラットにおける血中カルシウム上昇作用

内因性 PTH を欠損し低カルシウム血症を引き起こす副甲状腺機能低下症は、現行治療は高用量の経口カルシウム剤と活性型ビタミン D 製剤であるが、ビタミン D は尿中カルシウム再吸収作用がなく、高カルシウム尿症を引き起こす。近年 PTH(1-84)注射剤が承認されたが、PTH(1-84)は血中カルシウム上昇作用が弱く、経口カルシウム剤と活性型ビタミン D 製剤との併用療法での治療であり、高カルシウム尿症を改善できていない。一方、PTH を持続投与することで血中カルシウムが上昇する作用が知られていることから、PTH1 型受容体の R0 構造に特異的に結合し、PTH1 型受容体に持続的に作用する PTH アナログ (Long-Acting PTH) を使い、甲状腺・副甲状腺摘出モデルラット (TPTX ラット) を用い、その血中カルシウム上昇作用、及び骨代謝への影響を検討した。

TPTX ラットにおいて、静脈内投与した LA-PTH は、PTH(1-34)、PTH(1-84)に比較して強力且つ持続的 (48 時間以上) に血中カルシウムを上昇させた。また、LA-PTH の反復 4 週間投与では、1.8 nmol/kg において、血中カルシウムを治療領域 (約 7.6~10.5 mg/dL) のレベルに 4 週間維持できることが示された。その際、尿中カルシウムは有意に増加せず、また TPTX ラットの BMD を有意に減少させることはなかった。

カニクイザルにおいても、PTH(1-34)、及び PTH(1-84)と比較して、LA-PTH は強力且つ持続的な血中カルシウム上昇作用を示すことが明らかとなった。このことから、PTHLA-PTH は副甲状腺機能低下症に有用なものと考えられた。

以上、本研究から、PTH(1-34)の臨床に近い投与量においては、PTH を使って骨形成を選択的に促進し骨量を増加させるには、1 時間の間 PTH を暴露させることが重要であることが明らかとなった。

また、内因性 PTH を欠損させ、低カルシウム血症をきたす副甲状腺機能低下症の治療においては、血中カルシウムを強力に上昇させる持続型 PTH アナログが有用であり、至適投与量を選択すれば、高カルシウム尿症や骨量減少を引き起こさずに、低カルシウム血症を治療できる可能性が示された。

最後に、本研究が副甲状腺ホルモンの更なる研究の深耕と創薬への応用の一助になれば幸いである。

謝辞

本書が完成するまでには、これまでご協力、ご指導頂きました全ての方々に、心から感謝、御礼申し上げます。

本博士研究を行うにあたり、本学入学から論文作成に至るまで懇切丁寧なご指導、ご鞭撻を賜りました、東京農工大学大学院 生物システム応用学府 共同先進健康科学専攻 宮浦千里教授、稲田全規准教授、松本千穂特任助教、に心より御礼申し上げます。また、動物実験は、中外製薬株式会社創薬薬理研究第一部、及び中外医科学研究所の多くの方々にサポート頂きましたこと、厚く御礼申し上げます。

また、持続型 PTH アナログの研究と論文作成につきましては、マサチューセッツ総合病院、内分泌講座のポッツ先生、ガーデラ先生に多くのご指導を頂き、深く感謝申し上げます。今日まで生活面、精神面、健康面で支えてくれました家族に心より感謝、御礼申し上げます。