

活性型ビタミンD₃誘導体である2β-(3-hydroxypropoxy)- 1α,25(OH)₂D₃(ED-71)による骨密度増加作用 —— Hypophosphatemic マウスにおける検討 ——

岡山大学医学部小児科学講座 (指導: 清野佳紀教授)

越 智 英 明

(平成10年3月13日受理)

Key words: ED-71, Hyp mouse, BMD, Ca

結 言

ヒト低リン血症性ビタミンD抵抗性クル病は、著しい低リン血症とクル病・骨軟化症をきたす疾患でその病態にはビタミンDに対する抵抗性が強く関与している¹⁾。現在、その治療として大量の活性型ビタミンDとリンの併用投与が行われているが、現在一般的に投与されている活性型ビタミンDである1α,25(OH)₂D₃や1α,(OH)D₃は高Ca血症や腎石灰化をきたしやすく、必ずしも理想的な治療薬とはいえない^{2)~4)}。清野らは本症のモデル動物であるHyp (Hypophosphatemic) マウスにおいて外因性に1α,25(OH)₂D₃を大量に投与したさいに、血中1α,25(OH)₂D₃の消失速度が速い事実を確認しており、ビタミンD抵抗性の一因となっていることを以前報告した⁵⁾⁶⁾。

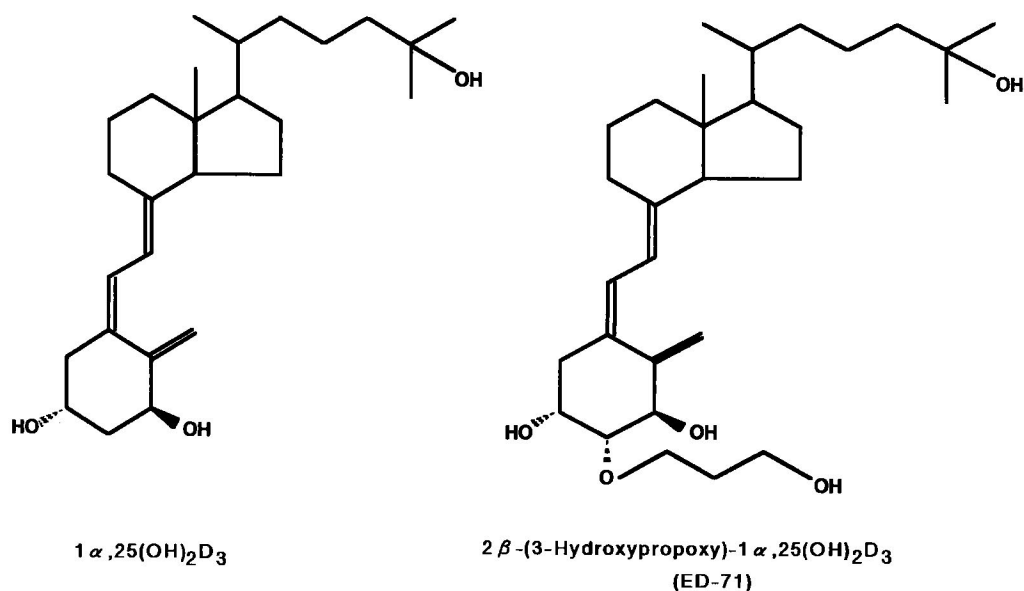
最近、ビタミンDのカルシウム上昇作用と骨髄性白血病細胞の増殖を抑制しマクロファージへの選択的分化を促す分化誘導作用を分離し、新しい作用を持つ新規誘導体を開発する試みがなされてきた。これらの開発の過程で抗腫瘍作用に対するビタミンD誘導体と、骨吸収がほとんどなく積極的に骨形成作用を示すビタミンD誘導体の研究に分かれてきた。本研究では、後者の作用の特性を持ち、1α,25(OH)₂D₃に比し、血中半減期が長い新規誘導体である2β-(3-hydroxypropoxy)-1α,25(OH)₂D₃ (以下ED-71) のHypマウスに対する効果を検討し、ヒ

ト低リン血症性ビタミンD抵抗性クル病に対する治療薬としての可能性について検討した。

材 料 と 方 法

Jackson Laboratory より購入し、岡山大学小児科学教室で繁殖、維持している生後4週令で体重8~15gの雄性のHyp (Hypophosphatemic) マウス104匹を使用した。このマウスは雄はすべてC57BL/6J Hyp/Yで雌はすべてC57BL/6J Hyp/Hypの系統維持しており産生されるマウスはすべてHypのgenotypeをもつ。マウスは数匹ずつ、プラスチックのケージに入れ、12時間周期の明暗の蛍光灯のもとで飼育した。飼料はオリエンタル酵母社製の飼育用MF(カルシウム1.2%, リン0.91%, ビタミンD80IU/100gを含むmeal food)を使用した。実験期間中、すべてのマウスに飼料と水を任意に与えた。ED-71および1α,25(OH)₂D₃(図1)は中外製薬創業第二研究所から供与を受けた。

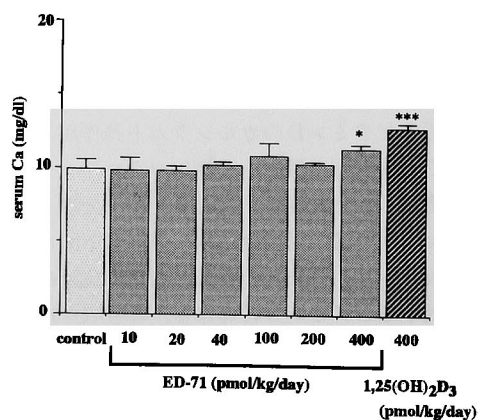
各々のマウスを1~22匹ずつ10群に分けそれぞれ対照群(22匹), ED-71: 10(22匹), 20(14匹), 40(14匹), 100(10匹), 200(19匹), 400(16匹), 800(1匹), 1200(2匹) pmol/kg/day, 1α,25(OH)₂D₃: 400(4匹) pmol/kg/dayを21日間連日皮下投与した。ここで()内は投与したマウスの匹数を示す。ただし、これらの各群はED-71および1α,25(OH)₂D₃は1% ethanolを含む0.1% Tween 20/PBSで溶解し、必要な濃度に調整して0.1mlを皮下投与した。ま

図1 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ および ED-71の構造

た対照群 (control) は, 1% ethanol, 0.1% Tween 20/PBS で, 投与量は0.1mlとした, 投与終了24時間後エーテル麻酔下で脱血死させ, さらに70%エタノールで固定し, 大腿骨および脛骨を摘出した。ただし, ED-71 1200pmol/kg/day 投与群では投与開始16日目に衰弱したためエーテル麻酔下で脱血死させ, さらに70%エタノールで固定し, 大腿骨および脛骨を摘出した。大腿骨は骨密度測定に供した。脱血死させたときの血液中の血清 Ca および P を測定した。これらの血清 Ca は, Wako kit 272-21801 (Wako pure chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を用いて orthocresolphthalein complexone (OCPC) 法で測定し, 血清 P は Wako kit 270-49801 を用いて p-methylaminophenol reduction 法で測定した。また, 大腿骨および脛骨は, マイクロメーターで長さの測定を行った。さらに, アロカ社製二重エックス線骨塩測定装置 (DCS-600) で大腿骨の骨密度を測定した。骨密度の測定は大腿骨を10等分間隔で断続測定し平均値で表した。得られたデータはすべて mean $\pm$ SEM (standard error of the mean) で表わし, 統計処理は one-way ANOVA を用いて検定し, Fisher's post hoc を用い群間の差を検討した。

結 果

図2に血清 Ca 値を示す。血清 Ca 値は, 対照群 (control) では $9.84 \pm 0.71 \text{ mg/dl}$ であり, ED-71 10から200pmol/kg/day 投与群, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 40pmol/kg/day 投与群では高 Ca 血症は認めなかった。 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 400pmol/kg/day 投与群では血清 Ca は $12.76 \pm 0.35 \text{ mg/dl}$

図2 ED-71および $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 投与における Hyp マウスの血清 Ca 値* : $p < 0.01$ vs. control*** : $p < 0.0001$ vs. control

と明らかな高Ca血症を示したが、ED-71 400 pmol/kg/day 投与群では血清Ca値は 11.32 ± 0.36 mg/dlと軽度高値を示した。図には示さなかったが、ED-71 800 pmol/kg/day 投与群では、血清Ca値は 18.03 mg/dlと著明な高Ca血症を示した。投与開始16日目で衰弱したため脱血死させたHypマウスのED-71 1200 pmol/kg/day 投与群では、血清Ca値は 22.28 ± 0.16 mg/dlと著明な高値を示した。

図3に血清P値を示す。血清P値は、対照群(control)では 6.56 ± 0.44 mg/dlであるのに比較して $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 400 pmol/kg/day 投与群では 8.69 ± 0.35 mg/dlと有意に上昇を認めた。対照群(control)とED-71 10から400 pmol/kg/day 投与群では有意差は認められなかった。図には示さなかったが、ED-71 800 pmol/kg/day 投与群では、血清P値は 6.97 mg/dlと対照群と有意差は認められなかった。ED-71 1200 pmol/kg/day 投与群では、血清P値は 7.40 ± 1.00 mg/dlと軽度高P血症を認めた。

図4に大腿骨および脛骨の長さを示す。ED-71の10から40 pmol/kg/day 投与群では、大腿骨および脛骨の長さはともに対照群(control)と比較して有意差はなかった。ED-71の100から400 pmol/kg/day 投与群では対照群(control)と比較して大腿骨および脛骨の長さはともに有意に増加を認めた。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 400 pmol/kg/day

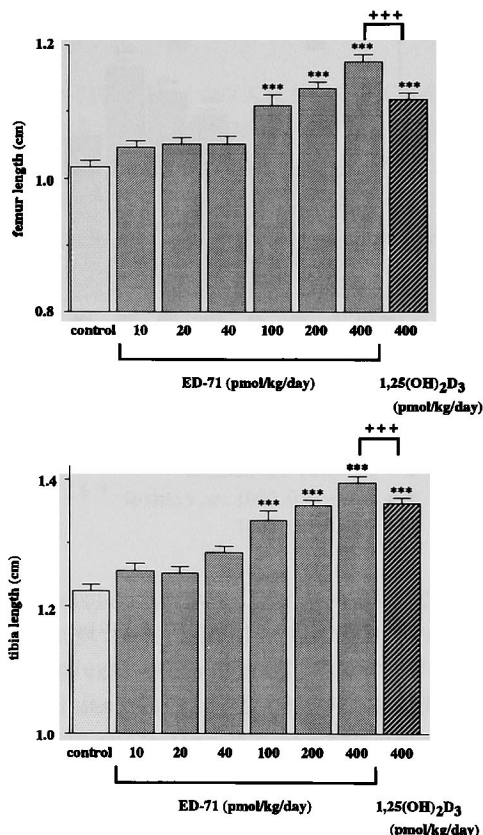


図4 ED-71および $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 投与におけるHypマウスの大腿骨および脛骨の長さ

***: $p < 0.0001$ vs. control

+++: $p < 0.0001$

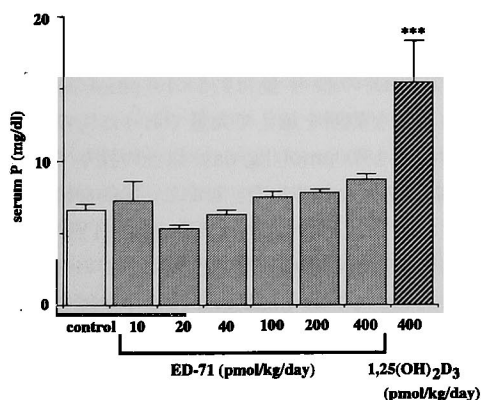


図3 ED-71および $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 投与におけるHypマウスの血清P値

*: $p < 0.01$ vs. control

***: $p < 0.0001$ vs. control

day 投与群でも大腿骨および脛骨の長さはともに対照群(control)に比較して有意に増加を認めたが、ED-71 400 pmol/kg/day 投与群では $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 400 pmol/kg/day 投与群に比較しても大腿骨および脛骨の長さはともに有意に増加を示した。図には示さなかったが、ED-71 800 pmol/kg/day 投与群では大腿骨および脛骨の長さはともに対照群(control)と比較して有意差はなかった。ED-71の1200 pmol/kg/day 投与群でも大腿骨および脛骨の長さはともに有意差はなかった。

図5に大腿骨全体の平均骨密度を示す。大腿骨全体の平均骨密度は対照群(control)では 20.20 ± 0.36 mg/cm²で、ED-71の10から40 pmol/kg/day 投与群では対照群(control)に比較し

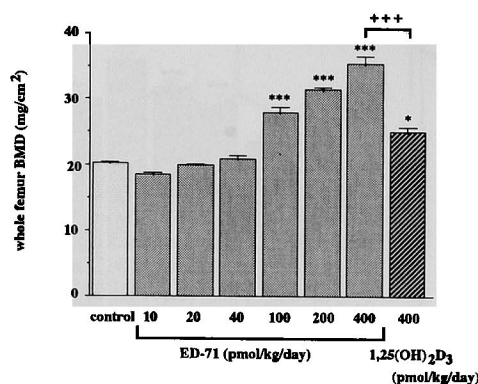


図5 ED-71および $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 投与におけるHypマウスの大腿骨全体の骨密度

* : $P < 0.01$ vs. control

*** : $P < 0.0001$ vs. control

++++ : $P < 0.0001$

て有意差はなかった。ED-71の100から400pmol/kg/day 投与群では用量依存性に有意に増加を認めた。 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 400pmol/kg/day 投与群でも大腿骨の平均骨密度は $25.06 \pm 0.88 \text{ mg/cm}^2$ と有意に増加を認めた。これに対してED-71の400pmol/kg/day 投与群では大腿骨の平均骨密度は $35.52 \pm 1.35 \text{ mg/cm}^2$ であり、同量の $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 投与群に比較して有意に高値を示した。図には示さなかったが、ED-71の800pmol/kg/day 投与群では大腿骨全体の平均骨密度は 24.18 mg/cm^2 で対照群 (control) に比較して軽度高値を示した。ED-71の1200pmol/kg/day 投与群では大腿骨の平均骨密度は $20.49 \pm 1.12 \text{ mg/cm}^2$ で対照群 (control) と比較して有意差はなかった。

考 察

Hyp マウスにおいて $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の代謝が亢進しており⁵⁾⁶⁾骨病変の改善のために $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を投与しても、効果の発現には高Ca血症を惹起するような量を必要とする。山手らはHypマウスに $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 250pmol/kg/dayを28日間連続投与したところ大腿骨の骨塩量を増加させたと報告している⁷⁾。 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の新しい誘導体であるED-71は $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の2 β 位にヒドロキシプロポキシ鎖をもつ。この特徴的な構造の結果、ED-71は、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に比較してビタミンD結合蛋白への結合能が

2.7倍と高く、血中濃度の半減期が長く、小腸ビタミンD受容体結合能が $1/8$ と低い特徴をもつ⁸⁾。

今回の実験では、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 400pmol/kg/day 投与群では大腿骨、脛骨の長さ、平均骨密度はわずかに増加したものの著しい高Ca血症が発生した。これに対してED-71は100から400pmol/kg/day 投与では高Ca血症をきたさず、用量依存性到大腿骨および脛骨の長さ、大腿骨の平均骨密度を増加させた。

この結果は、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ においてみられる代謝状態を凌駕してED-71が骨代謝状態の改善をしたのみならず、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ には認められない独自の作用を骨に対して有することを示唆する。卵巣摘除ラットや正常ラットにおいて $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に比べED-71は高Ca血症をきたさずに用量依存的に骨形成を促進するという報告⁹⁾があり、また、骨芽細胞機能を活性化するという報告¹⁰⁾もあり、ED-71の作用発現機構には骨芽細胞に特異的な機構が存在することが示唆される。また高Ca血症をきたしにくい理由として、鶴上らはED-71が副甲状腺ホルモンを直接抑制するデータはないが、用量依存的に骨吸収を減少させることが副甲状腺機能と関係しているかもしれないと述べている¹¹⁾。

今回の成績と同様の効果は他のビタミンD誘導体として $24\text{R},25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が報告されている。山手らはHypマウスに $24\text{R},25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を投与し、高Ca血症をきたさずに用量依存性に骨形成を増強したと報告した⁷⁾。しかし、この $24\text{R},25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の投与量は $2.5 \times 10^6 \text{ pmol/kg/day}$ と生理的な範囲を越えて大量であった⁷⁾。本実験においても800pmol/kg/day以上の投与では高Ca血症をきたしていた。しかし、量的な問題を除けば $24\text{R},25(\text{OH})_2\text{D}_3$ とED-71のHYPマウスの骨に対する作用は非常に類似している。さらに両ビタミンD analogueは血中半減期が長いことでも共通している。この点から考えると、破骨細胞に対するビタミンDの作用は、短時間にパルス的に作用すれば破骨細胞を刺激するが、長時間に低濃度で作用する場合はあまり作用しないのかもしれない。副甲状腺ホルモンにおいては間歇的投与は骨形成を促進するが、持続投

与は骨吸収を促進するという報告^{12)~13)}もあり、作用時間の違いが骨形成と骨吸収のバランスを決定していることは十分に考えられる。すなわち ED-71は Hyp マウスにおいて $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に比較して破骨細胞への刺激が弱いため、骨吸収作用が抑制され高 Ca 血症をきたしにくいのではないかと推測される。また ED-71は $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に比較して骨芽細胞機能を活性化することにより骨形成を促進し骨密度を増加させると推測される。

ED-71は高 Ca 血症をきたさずに骨形成促進作用をもち、さらに $24\text{R},25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に比較して投与量が少量ですむ点で優れており、家族性低リン血症ビタミン D 抵抗性クル病の治療薬として有力なものとなると考えられる。

結 論

ED-71は、Hyp マウスにおいて高 Ca 血症をきたさずに強い骨密度増加作用を示した。ED-71は、Hyp マウスの骨形成能を促進させることが示唆された。したがって ED-71はヒト低リン血症性ビタミン D 抵抗性クル病の有力な治療薬と考えられた。

稿を終えるにあたり、本研究のご指導および本稿のご閲覧をして頂いた清野佳紀教授、本実験について多くの助言を頂いた田中弘之先生ならびに ED-71を御提供いただいた中外製薬創業第二研究所に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Rasmussen H and Tenenhouse HS : Hypophosphatemias; In the metabolic basis of inherited disease, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D eds, T, 6th edn. McGraw Hill, New York (1989) pp 2581—2601.
- 2) Goodyear PR, Kronick JB, Jequier S, Reade TM and Scriver CR : Nephrocalcinosis and its relationship to treatment of hereditary rickets. J Pediatr (1987) 111, 700—704.
- 3) Weber G, Gazzuffi MA, Frisone F, de Angelis M, Pasolini D, Tomaselli V and Chiumello G : Nephrocalcinosis in children and adolescents: sonographic evaluation during longterm treatment with 1,25-dihydroxycholecalciferol. Child Nephrol Urol (1988-89) 9, 273—276.
- 4) Reusz GS, Hoyer PF, Lucas M, Krohn HP, Ehrich JHH and Brodehl J : X linked hypophosphatemia: treatment, height gain and nephrocalcinosis. Arch Dis Child (1990) 65, 1125—1128.
- 5) Seino Y, Yamaoka K, Ishida M, Tanaka Y, Kurose H, Yabuuchi H, Tohira Y, Fukushima M and Nishii Y : Plasma clearance for high doses of exogenous 1,25-dihydroxy [23,24(n)-³H] cholecalciferol in X-linked hypophosphatemic mice. Biomed Res (1982) 3, 683—687.
- 6) Yamaoka K, Seino Y, Satomura K, Tanaka Y, Yabuuchi H and Haussler MR : Abnormal relationship between serum phosphate concentration and renal 25 hydroxycholecalciferol-1-alpha-hydroxylase activity in X-linked hypophosphatemic mice. Miner Electrolyte Metab (1986) 12, 576—580.
- 7) Yamate T, Tanaka H, Nagai Y, Yamato H, Taniguchi N, Nakamura T and Seino Y : Bone-forming ability of 24R,25-dihydrovitamin D₃ in the hypophosphatemic mouse. J Bone Miner Res (1994) 9, 1967—1974.
- 8) Okano T, Tsugawa N, Masuda S, Takeuchi A, Kobayashi T, Takita Y and Nishii Y : Regulatory activities of 2β-(3-hydroxypropoxy)-1α,25-dihydroxycholecalciferol D₃, a novel synthetic vitamin D₃ derivative on calcium metabolism. Biochem Biophys Res Commun (1989) 163, 1444—1449.
- 9) Okano T, Tsugawa N, Masuda S, Takeuchi A, Kobayashi T and Nishii Y : A Novel Synthetic Vitamin D₃ Analogue, 2-Beta-(3-Hydroxypropoxy)-Calcitriol (ED-71): Its biological activities and

- pharmacological effects on calcium metabolism. *Contrib Nephrol* (1991) **91**, 116—122.
- 10) Sato K, Nishii Y, Woodiel FN and Raisz LG : Effects of two new vitamin D₃ derivatives, 22-oxa-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (OCT) and 2 β -(3-Hydroxypropoxy) 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃(OCT) and 2 β -(3-Hydroxypropoxy) 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (ED-71), on bone metabolism in organ culture. *Bone* (1993) **14**, 47—51.
 - 11) Tsurukami H, Nakamura T, Suzuki K, Sato K, Higuchi Y and Nishii Y : A Novel Synthetic Vitamin D Analogue, 2 β -(3-Hydroxypropoxy) 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ (ED-71), Increases Bone Mass by Stimulating the Bone Formation in Normal and Ovariectomized Rats. *Calcif Tissue Int* (1994) **54**, 142—149.
 - 12) Schmidt IU, Dobnig H and Turner RT : Intermittent parathyroid hormone treatment increases osteoblast number, steady state messenger ribonucleic acid levels for osteocalcin, and bone formation in tibial metaphysis of hypophysectomized female rats. *Endocrinology* (1995) **136**, 5127—5134.
 - 13) 成田裕一郎：実験的骨減少ラットに対する h-PTH 間欠投与の影響 — 椎体の海綿骨と皮質骨の骨形態計測による検討一. *日本整形外科学会雑誌* (1995) **69**, 1027—1036.

**2 β -(3-Hydroxypropoxy)1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃(ED-71),
increases bone mass by stimulating bone formation in
hypophosphatemic mice**

Hideaki OCHI

**Department of Pediatrics,
Okayama University Medical School,
Okayama 700-8558, Japan
(Director : Prof. Y. Seino)**

To determine the effects of ED-71, a new active vitamin D₃ analogue, on bone, we examined the action of ED-71 and 1 α ,25(OH)₂D₃, using hypophosphatemic (Hyp) mice, a model for X-linked hypophosphatemic rickets in humans. ED-71 has the unique characteristics of a longer half-life in serum, a higher binding affinity to serum vitamin D binding protein and lower affinity to the vitamin D receptor than 1 α ,25(OH)₂D₃. Hyp mice were treated with 10-1200 pmol/kg/day of ED-71, 40-400 pmol/kg/day of 1 α ,25(OH)₂D₃, or the vehicle alone, administered daily for 21 days by subcutaneous injection. ED-71 at doses of 100-400 pmol/kg/day, dose-dependently effects in increased bone size and bone mineral density (BMD) without causing hypercalcemia. However 1 α ,25(OH)₂D₃ at a dose of 400 pmol/kg/day, demonstrated only slight increases in bone size and BMD with hypercalcemia. These findings suggest that ED-71 may be more beneficial in the treatment of X-linked hypophosphatemic rickets than 1 α ,25(OH)₂D₃.