博士論文

骨芽細胞に対する抗 HIV 薬の影響の解明

若　林　義　賢

要旨

HIV 患者の長期管理において日和見感染症・腫瘍以外の非 AIDS 疾患の合併が重要になってきているが、その中の一つに骨粗鬆症があげられる。抗 HIV 薬の骨芽細胞（MC3T3-E1 細胞）に及ぼす影響について研究を行い、プロテアーゼ阻害薬の一つである ritonavir(RTV)が骨芽細胞の分化と骨化を抑制し、骨形成を阻害することを明らかにした。この結果は、高容量で用いた場合、生体内で RTV が骨形成を阻害し、薬剤性骨粗鬆症を引き起こす可能性を示唆している。

序文

1981 年後天性免疫不全症候群(Adult Immune Deficiency Syndrome:AIDS)患者が報告された。1983 年には新たなレトロウイルスとして、Human immunodeficiency virus(HIV)が発見され、その後 HIV が AIDS の原因として確定した。2012 年の集計では全世界で HIV 感染者は 3500 万人となっている(図 1)。

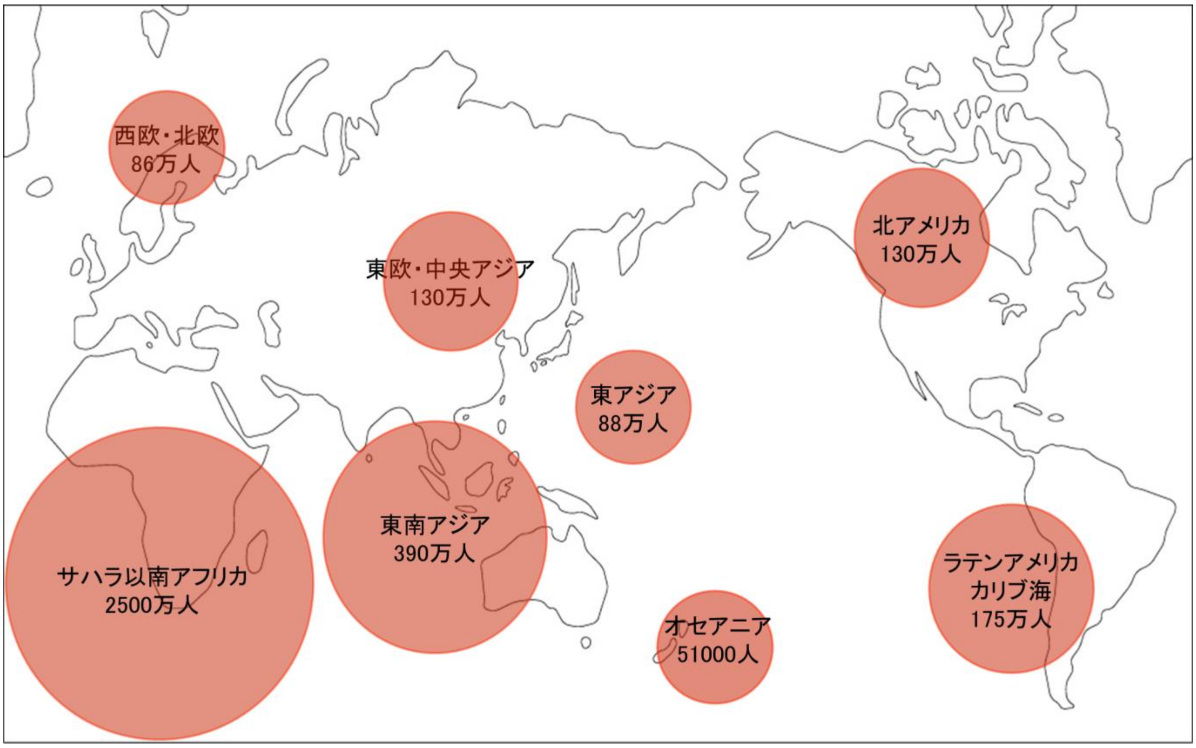


図 1. 全世界の HIV 陽性者数の分布(2012 年国連合同エイズ計画グローバルファクトシートを基に作図)

日本では、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）」により、HIV 感染者と AIDS 患者が届出の対象となっている。近年、一年に約 1,000 件の HIV 感染者と約 500 件の AIDS 患者が新規に報告されており、平成 25 年までに報告された HIV 感染者の累積報告は全国で 15,812 人、AIDS 患者数は 7,203 人であった[1]。HIV 感染症が出現した当初は、有効な治療法がなく「死の病」として

恐れられていたが、多剤併用療法、すなわち cART(combination antiretroviral therapy)が本格的に導入された 1996 年以降、先進工業国では HIV 感染者の平均余命が次第に延長しており、20〜25 歳で感染した人の平均余命は約 40 年で、次第に非感染者に近づいている[2]。

従来 HIV 感染症患者の合併症は AIDS 関連疾患が大多数であったが、平均余命が延長されるにつれ、非 AIDS 合併症の問題が注目されるようになってきている。これらは HIV 自体の直接作用、HIV 感染により惹起される慢性炎症、加齢による変化、および抗 HIV 薬の副作用等による複合的要因で引き起こされており、健常人より若年で発症することが報告されている(図 2)[3]。

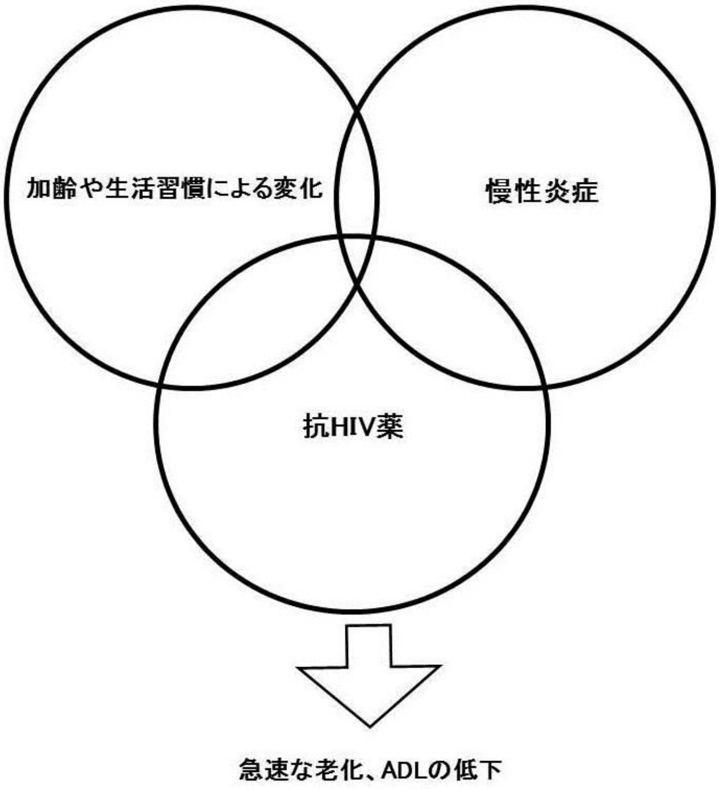


図 2.非 AIDS 合併症の成因。通常の加齢や生活習慣による老化のほか、HIV 持続感染によって引き起こされる慢性炎症や、抗 HIV 薬の長期投与によって老化が加速する。

HIV は現時点においては根治ができないため、ひとたび cART を開始すると、抗 HIV 薬は一生内服を続ける必要がある[4]。治療経過が良好な場合は原則的には薬剤を変更せず内服を続けるため、開始時の抗 HIV 薬が長期的に投与されることが多い。そのため特に薬剤性による非 AIDS 合併症の機序の解明は重要な課題と考えられる。

長期 cART における非 AIDS 合併症は心血管系疾患・悪性腫瘍・糖尿病・脂質代謝異常症・骨粗鬆症・神経認知機能症・肝、腎疾患など多岐にわたる[3]。今回の私の研究では、この中で骨粗鬆症について注目した。骨粗鬆症は、WHO では低骨量と骨組織の微細構造の異常を特徴とし、骨の脆弱性が増大し、骨折の危険性が増大する疾患と定義されている[5]。日本の診断基準では脆弱性骨折をすでに有している場合には骨密度が健常若年成人の平均値(Young Adult Mean : YAM)の 70%以上 80%未満を骨粗鬆症とし、脆弱性骨折がない場合には YAM の 70%未満を骨粗鬆症と判定する[6]。その患者の多くは 40 歳以降に発症する[7]。日本での骨粗鬆症の大規模研究には ROAD study があり、それによると日本での推定有病者数(40 歳以上)は総数 1,280 万人(男性 300 万人、女性 980 万人)とされる[8]。骨粗鬆症の問題点は、脆弱性骨折や、骨折による Activities of daily living(ADL)の低下、寝たきり患者の増加のみにとどまらない。脆弱性骨折や骨密度低下は死亡率を有意に上昇させるという報告はいくつも認められており、骨粗鬆症による骨折は生命予後に密接に関わっている[9]。近年、HIV 感染者における骨密度の低下や、骨折のリスクが健常者と比較し有意に高いという多数の報告がある。これら報告のメタアナリシスでは HIV 感染者の骨粗鬆症の有病率は 15%であり、HIV 非感染者集団の 3.7 倍であった[10]。したがって、HIV 感

染者の平均余命の延長を目指すにあたり、骨粗鬆症の管理は重要な課題となってきている。

骨量は骨芽細胞による骨形成、破骨細胞による骨吸収の働きによって規定され、骨形成と骨吸収は絶えず行われ続け、1 年間で 20-30%の骨が新たに入れ替わっている。これを骨のリモデリングと言う[11]。健常者の場合には 20 歳から 50 歳くらいまでは骨形成と骨吸収の均衡がとれている。骨密度低下、骨粗鬆症は骨吸収の亢進、骨形成の低下によってこの均衡が失われ引き起こされる[6](図 3)。骨吸収が亢進する因子として女性ホルモン消褪、不動化、破骨細胞活性因子である Receptor activator of nuclear factor-κB ligand(RANKL)の刺激などがあり、骨形成が低下する因子として老化、ビタミン D、カルシウム不足などが知られている。

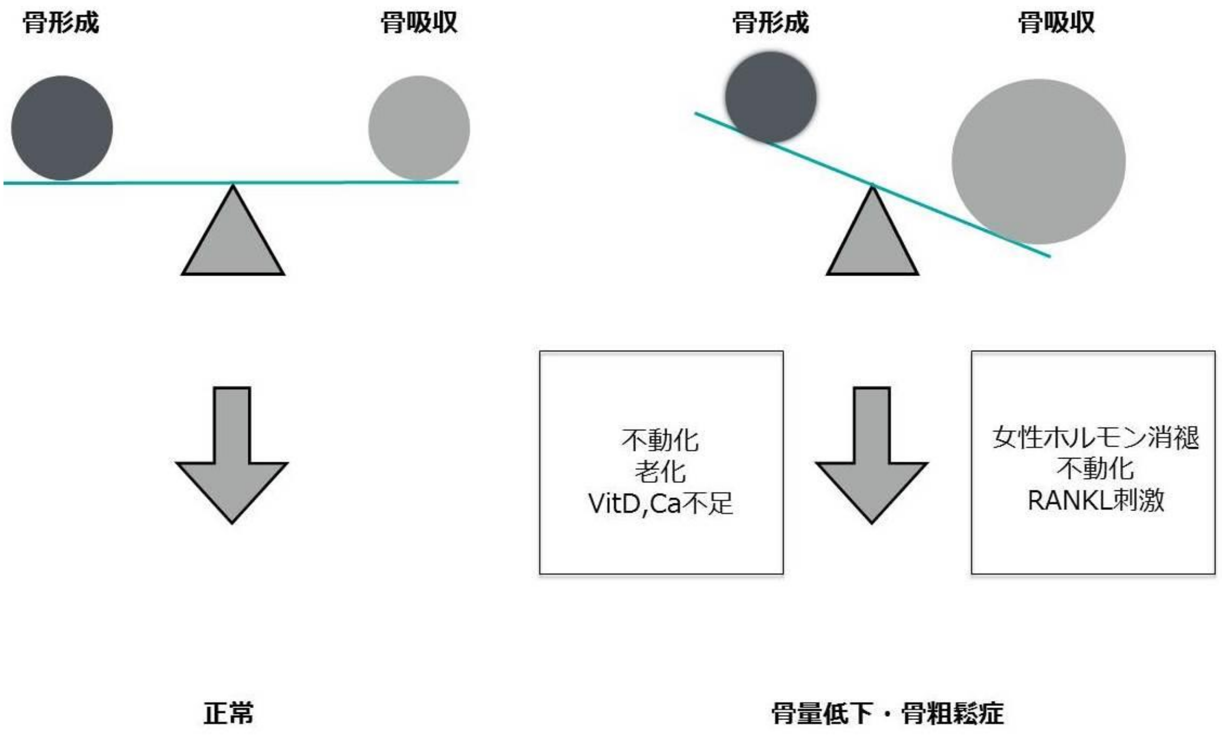


図 3.骨のリモデリングと骨粗鬆症。20 歳から 50 歳までは均衡が取れているが、様々な因子により、骨形成より骨吸収が上回ると骨量低下を引き起こし、骨粗鬆症を発症する。

HIV 感染者においては、喫煙やアルコール、るいそうといった一般的な危険因子に加え HIV による慢性炎症、HIV ウイルス量などの因子も骨密度低下に寄与していると考えられてきた[12-14]。さらに抗 HIV 療法を開始後、48~96 週の間に骨密度は 2-6%低下することが報告されている[15, 16]。これらの結果は抗 HIV 薬にも骨密度低下を促す原因があることを示唆している。

骨のリモデリングが抗 HIV 薬によってバランスを失う場合、骨芽細胞の分化と石灰化の抑制による骨形成の低下、破骨細胞の活性化による骨吸収促進という機序が考えられる。抗 HIV 薬の破骨細胞への影響については、*in vitro* の研究において、ritonavir が破骨細胞の活性化に影響を与えるという報告がある[17, 18]。また、骨芽細胞と抗 HIV 薬の関係については、2002 年に Jain ら、2007 年に Malizia らによって抗 HIV 薬であるプロテアーゼ阻害薬のうち、nelfinavir、lopinavir、indinavir が骨芽細胞の分化を抑制する可能性があることが報告されている[19,20]。これらの報告では、現在の日本の治療ガイドラインでは、選択薬に入っていないプロテアーゼ阻害薬のみを検討している点や、長期刺激による影響、詳細な分化シグナルへの影響は検討されていないなど、いくつかの問題点を認めた。そこで今回私は骨芽細胞を用い、抗 HIV 薬と骨粗鬆症の関係についてさらに詳細に研究を行った。

骨芽細胞は未分化な間葉系幹細胞から分化した細胞である。骨芽細胞のもっとも大きな役割は、I 型コラーゲンやオステオカルシンなどの骨基質タンパクを生成し、骨形成を行うという点にある (図 4)。

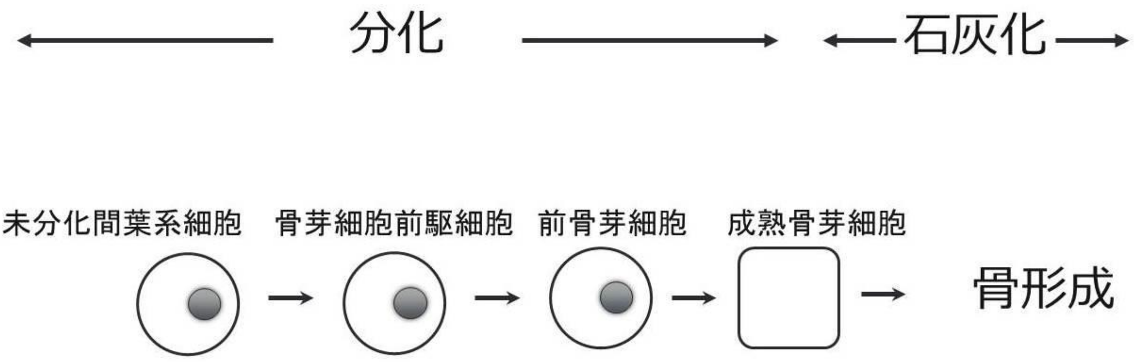


図 4. 骨芽細胞、破骨細胞の分化とその役割。骨芽細胞は未分化間葉系細胞から分化していき、成熟骨細胞となる。分化の過程で骨基質タンパクを生成し、骨形成する。また骨芽細胞系細胞は、Receptor activator of nuclear factor-κB ligand(RANKL)を細胞表面に発現、分泌し破骨細胞を活性化させ、骨吸収を促進させる。

　未分化な間葉系幹細胞は、骨芽細胞前駆細胞(osteoprogenitor cell)、前骨芽細胞(preosteoblast)、骨芽細胞(osteoblast)と分化を経て最終的に骨細胞(osteocyte) へと変化する[21]。各分化段階でタンパク質の発現が変化していくのが特徴で、骨分化のマーカーとしても使用されている。骨芽細胞分化前、中期ではアルカリフォスファターゼ(ALP)、Ⅰ型コラーゲン、オステオポンチン(OPN)の発現量が増加する(図 5)[22]。

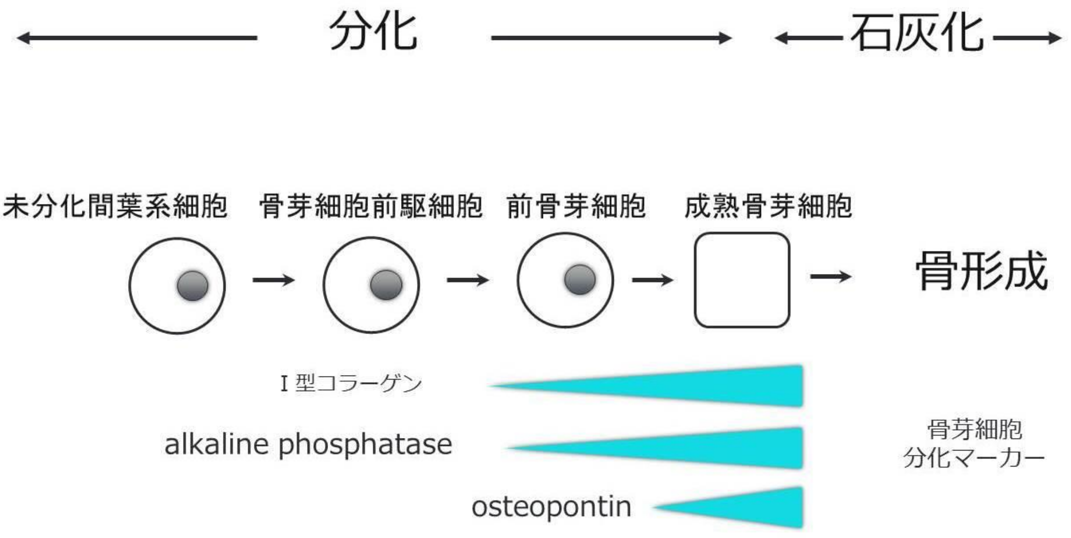


図 5. 骨芽細胞の分化と、分化マーカー。分化初期にはまず I 型コラーゲン、アルカリフォスファターゼ(ALP)を発現し、遅れてオステオポンチン(OPN)を発現する

ALP は生体膜に結合して存在する糖タンパク質であり 6 種類に分類されるが、骨に特異的なものは骨型 ALP と呼ばれる。骨型 ALP は石灰化部位において結晶形成を阻害するピロリン酸を分解したり、有機リン酸エステルを分解して無機リン酸濃度を上げることにより、骨形成を促進させる働きがある[23]。そのため、骨型 ALP は骨代謝サイクルの中で、特に重要な骨形成マーカーとして認知されている。

骨芽細胞の分化には、bone morphogenetic protein(BMP)、insulin-like growth factor 1(IGF-1)、Transforming growth factor-β(TGF-β)などのホルモンやサイトカイン、Wnt 系の刺激よって、Mitogen activated protein kinase(MAPK)、Mothers against DPP homolog(SMAD)、β-catenin などをが活性化することで引き起こされると考えられているが、これらは複雑に相互作用しており、全てのシグナルが解明されておらず、現在でも分化シグナルの解析は研究テーマとして行われている（図 6）[24]。未分化な間葉系幹細胞は、骨芽細胞以外にも、軟骨細胞、筋芽細胞、脂肪細胞など、骨格

系細胞に分化するが、それぞれの分化には異なった転写因子が必要となる。骨芽細胞分化に関わる細胞質内シグナル伝達経路については不明な点が多いが、近年骨芽細胞分化に必須の働きをする転写因子がいくつか発見された。その中でも最も重要なものが Runt-related transcription factor 2 (RUNX2)と考えられている。RUNX2 は①間葉系幹細胞から前骨芽細胞への分化を決定し、脂肪細胞への分化を抑制する、②前骨芽細胞から骨芽細胞に分化させ、軟骨細胞への分化を抑制する、③骨芽細胞から骨細胞への分化は抑制する、などの機能がある[25]。つまり、RUNX2 は分化早期には分化を促進するが、後期では抑制し、過度な骨化を抑制し保とうとする働きがある。

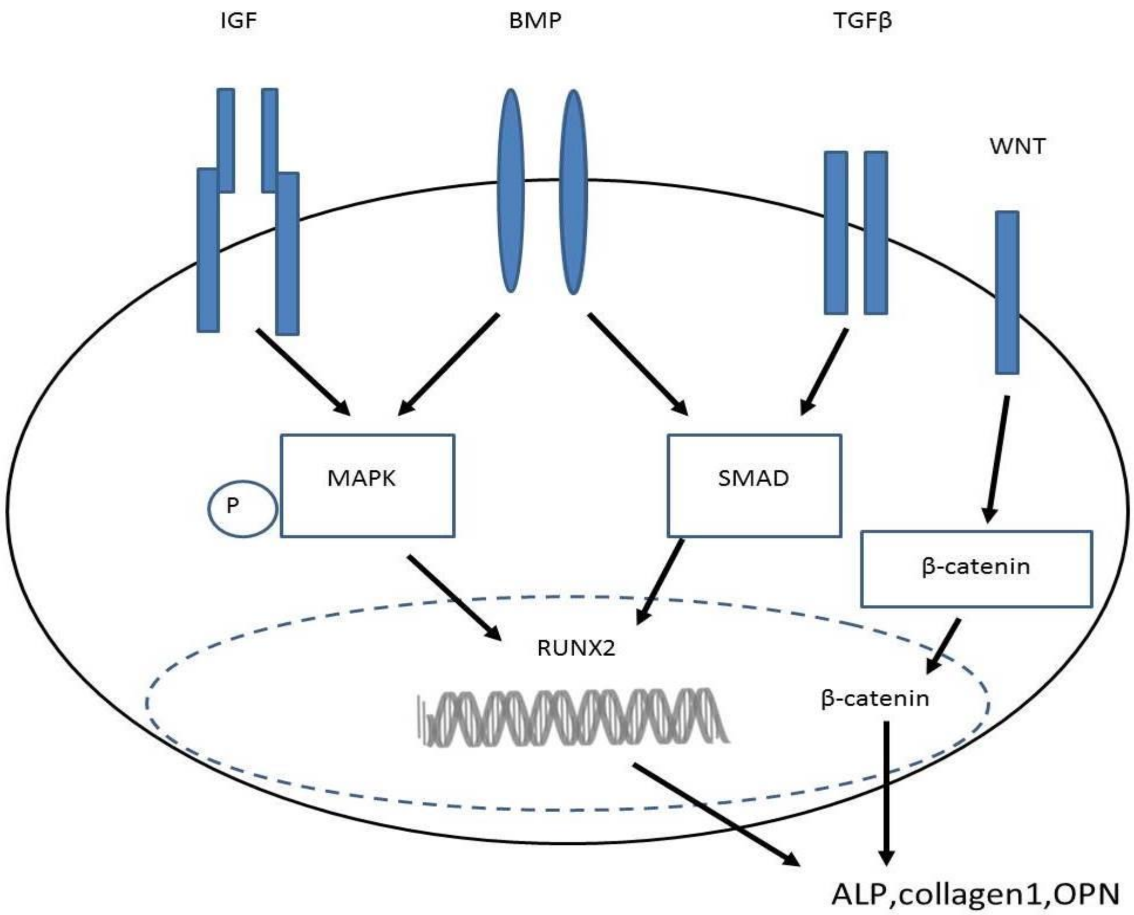


図 6. 骨芽細胞分化のシグナル伝達の模式図。いくつかのホルモン、サイトカインなどの刺激を受けて分化が誘導される。多くの経路で共通しているのは、分化初期には転写因子である Runt-related transcription factor 2 が活性化され、分化が促進されていく。[24]より改変。
MAPK : mitogen activated protein kinase, SMAD : mothers against DPP homolog,
ALP : Alkaliphosphatase, OPN : osteopontin, IGF : insulin-like growth factor,
BMP : bone morphogenetic protein, TGF-β : Transforming growth factor-β

また、骨芽細胞の役割の一つに receptor activator of nuclear factor-κB ligand(RANKL) と呼ばれるリガンドを細胞表面に発現もしくは分泌するというものがある。RANKL 破骨細胞の前駆細胞膜上の受容体 RANK に結合することにより破骨細胞の分化が進行する。分化した破骨細胞は骨吸収を行い、骨粗鬆症を引き起こす。今までの研究では、RANKL と抗 HIV 薬の一つである atazanavir を同時刺激することにより、RANKL 単独の刺激と比較し破骨細胞の活性化が有意に上昇するという報告はあるものの、その詳細な作用機序は不明である[26]。

in vitro の骨芽細胞分化の実験では、マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 が使用されることが多い。これは初代培養頭蓋冠骨芽細胞と同様の分化過程を取り、増殖期、分化期、石灰化期を経て骨形成することが知られている。分化期は生体では前骨芽細胞から骨芽細胞への分化に当たる[15]。また、MC3T3-E1 を分化誘導させる試薬として β-glycerophosphate、アスコルビン酸、BMP などが使用される。アスコルビン酸を添加した培地で MC3T3-E1 を培養すると分化の進展が認められることは以前から報告がある[27]。アスコルビン酸の働きとして、 I 型コラーゲンの産生を促進し、ALP による石灰化に促進的に働くことがあげられる[28]。さらに骨芽細胞自身が分泌する BMP はアスコルビン酸存在下でのみ細胞外基質に蓄積されるため、骨芽細胞分化が促進さると報告されている[28]。また、β-glycerophosphate はコラーゲン重合の促進作用[29]、hydrocortisone には分化を促進する働きがある[30]。

抗 HIV 薬は作用機序によって、核酸系逆転写酵素阻害剤(Nucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitor: NRTI)、非核酸系逆転写酵素阻害剤(Non-Nucleoside RT Inhibitor: NNRTI)、プロテアーゼ阻害剤(Protease Inhibitor: PI)、インテグラ―ゼ 阻害剤(Integrase Strand Transfer Inhibitor: INSTI)、侵入阻害剤に分類される。日本で承認されている抗 HIV 薬は、2014 年 10 月現在で合剤を含め 25 種類になる(表 1)。cART は、抗 HIV 薬による多剤併用療法であり、これらの抗 HIV 薬から原則として 3 剤を選び服用する。キードラッグとして NNRTI、PI、INSTI から 1 剤を選び、バックボーンとして NRTI から 2 剤を選ぶことがガイドラインで推奨されている(表 2)。抗 HIV 薬による薬剤性骨粗鬆症については、PI や NRTI の一つである tenofovir の使用との関連についての臨床報告がある[31-33]。

商品名	一般名	略語
核酸系逆転写酵素阻害剤		
レトロビル	ジドブジン	AZT
エピビル	ラミブジン	3TC
ザイアジェン	アバカビル	ABC
コンビビル	ジドブジン/ラミブジン	AZT/3TC
エプジコム	アバカビル/ラミブジン	ABC/3TC
ゼリット	サニルブジン	d4T
ヴァイデックスEC	ジダノシン	ddI-EC
ビリアード	テノホビル	TDF
エムトリバ	エムトリシタビン	FTC
ツルバダ	テノホビル/エムトリシタビン	TDF/FTC
非核酸系逆転写酵素阻害剤		
ビラミューン	ネビラピン	NVP
ストックリン	エファビレンツ	EFV
インテレンス	エトラビリン	ETR
エジュラント	リルピビリン	RPV

プロテアーゼ阻害剤		
ノービア	リトナビル	RTV
ビラセプト	ネルフィナビル	NFV
レクシヴァ	ホスアンプレナビル	FPV
カレトラ	ロピナビル/リトナビル	VLP/r
レイアタッツ	アタザナビル	ATV
プリジスタ	ダルナビル	DRV
インビラーゼ	サキナビル	SQV
インテグラーゼ阻害剤		
アイセントレス	ラルテグラビル	RAL
デビケイ	ドルテグラビル	DTG
侵入阻害剤		
シーエルセントリ	マラビロク	MVC
配合剤		
スタリビルド	エルテグラビル/コビシスタット/テノホビル/エムトリシタビン	STB

表 1. 現在日本で承認されている抗 HIV 薬一覧

A欄(Key drug)			B欄(backbone)	
NNRTIかPIかINSTI			NRTI2剤	
推奨	NNRTI	EFV	推奨	TDF/FTC or ABC/3TC
	PI	ATV+rtv or DRV+rtv		
	INSTI	RAL		
代替	PI	LPV+rtv or FPV+rtv		
	NNRTI	RPV		

表 2. cART の実際。A 欄から 1 剤、B 欄から 2 剤を選び内服を行う。ブースターとして使用される Ritonavir は 1 剤と数えない。厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業　平成 25 年度版抗 HIV 治療ガイドラインより改変。
NNRTI : Non-Nucleoside RT Inhibitor, PI : Protease Inhibitor , INSTI : Integrase Strand Transfer Inhibitor, NRTI : Nucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitor
EFV : efavirents, ATV : atazanavir, DRV : darunavir, RAL : raltegravir, LPV : lopinavir, FPV : fosamprenavir, RPV : rilipivirine, TDF : tenofovir, FTC : emtricitabine, ABC : abacavir, 3TC : lamivudine

前述のヒト初代骨芽細胞に対する抗 HIV 薬の影響の報告は、これら抗 HIV 薬のうち indinavir(IDV)、 nelfinavir(NFV)、lopinavir(LPV)によって ALP 活性が低下するというものであった。現在の日本のガイドラインにおける第一選択薬のプロテアーゼ阻害剤については darunavir(DRV)、atazanavir(ATV)であるが、これらについては検討されておらず、また、プロテアーゼ阻害剤以外の薬剤についても検討されていなかった。さらに骨芽細胞の最終的な石灰化までの確認は行われておらず、再検討の余地があると考えられた[19,20]。そのため、今回の研究では骨芽細胞に対する抗 HIV 薬の作用について、現在の抗 HIV 薬の第一選択薬を中心に、骨芽細胞の分化、石灰化への影響について、マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞を用いて行った。

材料と方法

細胞と試薬

マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 subclone14(ATCC® CRL-2594™)を American Type Culture Collection より購入し、10% FBS, 2 mM L-glutamine, penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 μl/ml を含有した Dulbecco's Modified Eagle's medium(DMEM, sigma-aldrich)で気温 37℃、二酸化炭素 5%の条件で培養を行った。分化メディウムは、DMEM に骨芽細胞分化試薬(TAKARA)を加え、Ascorbic acid (最終濃度 1%)、Hydrocortisone (最終濃度 0.2%)、β-Glycerophospate (最終濃度 2%)となるよう調整した。以下この溶液を分化メディウムと記載する。

Western blot 法に用いる 1 次抗体は rabbit RUNX2 抗体(Santa Cruz)、mouse β-actin(Abcam)、2 次抗体にはヤギ由来抗マウス、抗ウサギ免疫グロブリンポリクローナル抗体(DAKO)を用いた。また、化学発光のための Horseradish Peroxidase(HRP)基質は Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate(Millipore)を用いた。

抗 HIV 薬の調整

抗 HIV 薬である ritonavir, darunavir, atazanavir, lopinavir, abacavir, lamivudine, tenofovir, emtricitabine はいずれも Toronto Research Chemicals 社より購入した。各種抗 HIV 薬およびその溶媒を健常人に治療常用量を単回投与した場合の血中薬物濃度の最大値をまとめた(表 3)。これらの値を参考に今回の研究を行った。

	血中薬物濃度最大値(Cmax)(μg/ml)	溶媒
Ritonavir	11.2	Methanol
Darunavir	6.5	Methanol
Atazanavir	3.15	Methanol
Lopinavir	9.6	Metanol
Abacavir	4.26	Water
Lamivudine	2	Methanol
Tenofovir	0.3	DMSO
Emtricitabine	1.8	Methanol

表 3. 各種抗 HIV 薬の血中濃度最大値と、その溶媒。University of Liverpool , www.hiv-druginteractions.org より作表

ALP 活性の測定

MC3T3-E1 細胞を 96 ウェルプレートに $1x10^4$ cells/well となるよう播種した。24 時間培養した後に培養液を除去し、DMEM のほか前述の分化メディウム、各種抗 HIV 薬を添加した分化メディウムで刺激し、この日を 0 日目とした。その後、培養液を 48 時間おきに交換した。ALP 活性は TRACP & ALP double-stain Kit(TAKARA)を用い推奨手順に従って行った。すなわち刺激後、培養液を除去し生理食塩水で細胞表面を 1 回洗浄した後に各ウェルにつき細胞抽出液 50 µl を添加した。pNPP(p-nitro-phenyl phosphate)substrate24 mg をアルカリ性フォスファターゼ用緩衝液 5 ml で溶解し、反応基質液(12.5 mM)とした。各ウェルに 50 µl の反応基質液を添加し、37℃で 15 分間反応させた後に呈色 405 nm の吸光度を測定した。各ウェルの細胞数補正のため DC™ プロテインアッセイ(BIO-RAD)を用い、各ウェルごと総タンパク質量を算出した。ALP 活性は単位タンパクあたりの ALP 活性で表記した。

骨芽細胞石灰化の確認

MC3T3-E1 細胞を 48 ウェルプレートに 1 ウェルあたり $5x10^4$ cells/well となるように播種した。24 時間後より培養液を除去し、DMEM、前述の分化メディウム、各種抗 HIV 薬を添加した分化メディウムを使用し刺激を行った。刺激開始日を 0 日とし、培地は 24-48 時間おきに交換し、7 日目より 1 週間おきにアリザリンレッド染色を行い石灰化の確認を行った。アリザリンレッド染色には石灰化染色キット(プライマリーセル社)を使用し、推奨手順に従って行った。すなわち、培養液を除去後、Phosphate buffered saline(PBS)で 3 回洗浄し、1 ウェルあたりメタノール 500 µl を加え、4℃で 20 分間固定した。メタノールを除去し、精製水で再度 3 回洗浄した後、付属の染色基質で染色を行った。

RNA 抽出およびリアルタイム PCR による mRNA の発現

刺激後の MC3T3-E1 細胞を PBS で 1 回洗浄し、1 ウェルあたり 350 µl の Tripure(Roche)を添加した。よく撹拌した後にマイクロチューブに移し、これにクロロホルム 70 µl (Nacalai)加え、15 秒間転倒混和し 15 分間室温で静置した。その後、マイクロチューブを 12,000g、4 °C、15 分間で遠心し、上清を新しいマイクロチューブに回収し、さらにクロロホルム 150 µl を入れ前述の手順を繰り返した。再度上清を回収した後、これにイソプロパノール 175 µl(Nacalai)を加え、15 秒間転倒混和し室温に 15 分間静置した後、マイクロチューブを 12,000g、4 °C、15 分間で遠心した。上清を取り除き、200 µl の 70 % エタノールを加え、軽く撹拌した後、20,000 g、4°C、15 分間で遠心した。上清を除き感想させた後、DEPC 処理水を 50 µl 加え、これを実験試料とした。

Total RNA から cDNA への逆転写には、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA remover(TOYOBO)を使用した。操作手順に従い Total RNA を cDNA に逆転写した。すなわち、DNase 反応は、RNA 0.5 μg あたり、4x DN Master Mix を 2 μl 添加し、Nuclease free water で全量 8 μl となるよう調整し 37°C で 5 分間インキュベートした。その後逆転写反応として、5×RT Master mix を 2 μl 添加し、37°C で 15 分間、50°C で 5 分間、98°C で 5 分間インキュベートした後、4°C で冷却した。

リアルタイム PCR には LightCycler®480(Roche)を使用した。96 ウェルリアルタイム PCR マイクロプレート(Roche)1 ウェルあたり、cDNA サンプル溶液 5.0 μl LightCycler®480prove master10 μl(Roche)、Universal ProbeLibrary Probes(Roche)0.4 μl、Forward and Reverse Primers(5 μM)各 0.4 μl、dH2O 3.8 μl 合計 20.0 μl の反応液を調整した。リアルタイム PCR に使用したプライマーは Universal ProbeLibrary(Roche)を用い設計し、使用したプローブとプライマー配列を表 4 に示した。プライマー配列は Roche 社プローブアッセイセンターより作成した。LightCycler® 480 で 95℃5 分のインキュベートの後、95℃10 秒、60℃30 秒、72℃1 秒を 45 サイクル行い反応させ、50℃10 秒で冷却し終了した。

gene	Accession number	primer	Primer sequence	Universal Probe(#)
RUNX2	NM_001146038.1	left	cgtgtcagcaaagcttctttt	#66
		right	ggctcacgtcgctcatct	
Collagen type1	NM_007742.3	left	catgttcagctttgtggacct	#15
		right	gcagctgacttcagggatgt	
actin	NM_007393.3	left	tgacaggatgcagaaggaga	#106
		right	cgctcaggaggagcaatg	

表 4. リアルタイム PCR 法で使用した各種プライマー配列

Western blot 法によるタンパク検出

MC3T3-E1 細胞を 6 ウェルプレートに 1 ウェルあたり $2x10^5$ cells/well となるよう播種し DMEM、前述の分化メディウム、各種抗 HIV 薬を添加した分化メディウムで刺激を行った。刺激した後、細胞を PBS で 3 回洗浄を行った。その後 1 ウェルあたり RIPA buffer200 µl で細胞溶解液を得た。10%ポリアクリルアミドゲルを使用し、SDS アクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)を行った。その後ウェット法でセルロースメンブレンへ転写し、3%BSA を含有した Tris-Buffered Saline-Tween20(TBS-T、137 mM Sodium Chloride, 20 mM Tris,0.1% Tween-20,pH 7.4)を用い室温で 1 時間ブロッキングを行った。 1 次抗体は rabbit RUNX2(1:1000)あるいは mouse β-actin(1:5000)を用い 4℃で一晩反応させ、2 次抗体は抗ウサギ免疫もしくは抗マウス免疫グロブリンポリクローナル抗体(1:10000)を用い室温で 1 時間反応させた。その後 HRP 基質を加え、ChemiDoc™ XRS Imager(BIO-RAD)を使用しバンドの検出を行った。バンドの強度(intensity)は Image Lab™ software を使用し定量化した。各サンプルの細胞数を補正するため RUNX2 は β-actin とのバンドの強度の比で表示した。

細胞傷害性の評価

抗 HIV 薬による細胞傷害性を評価するために、培養液中に放出される LDH を測定することで評価を行った。MC3T3-E1 細胞を 12 ウェルプレートに $1×10^5$ cells/well で播種した後、24 時間後に培養液を除去し、DMEM、前述の分化メディウム、各種抗 HIV 薬を添加した分化メディウムを使用し刺激を行った。48 時間おきにメディウムを交換した後、8 日目から 9 日目にかけて 24 時間刺激した培養液と細胞溶解液を回収した。DMEM のみの上清をコントロール群とした。各群の液を Roche 社

Cytotoxicity detection kit plus を用いて処理を行い、490 nm の吸光度を測定した。cell viability は以下の数式で算出した。

$$\text{Cell viability(\%)} = \left(1 - \frac{\text{上清吸光度} - \text{コントロール群の吸光度}}{\text{細胞溶解液の吸光度} - \text{コントロール群の吸光度}}\right) \times 100$$

統計解析

上記の方法はいずれも 1 条件あたり 3 標本、3 回以上の実験を行い再現性の確認を行った。また、ALP 活性、リアルタイム PCR 法の結果は N=3 とし、その平均値および標準偏差を算出した。標本間の差については one-way ANOVA を行い、有意水準は 5%未満を有意とした。統計処理に関しては JMP® 11(SAS 社、version10.0.0)を用いた。

結果

MC3T3-E1 細胞分化の経時的変化の確認

分化の経時的変化を調べるため、分化メディウムで刺激開始後 5、7、9、11、14 日目の ALP 活性を測定した(図 7)。DMEM のみで培養した細胞(陰性コントロール)では ALP 活性の上昇を認めなかったが、分化メディウムを使用した細胞では 7 日目より有意な ALP 活性の上昇を認めた。細胞間の分化速度のばらつきも考慮し、以降の抗 HIV 薬を使用した実験では 7 日目でなく 9 日目の ALP 活性を測定することとした。

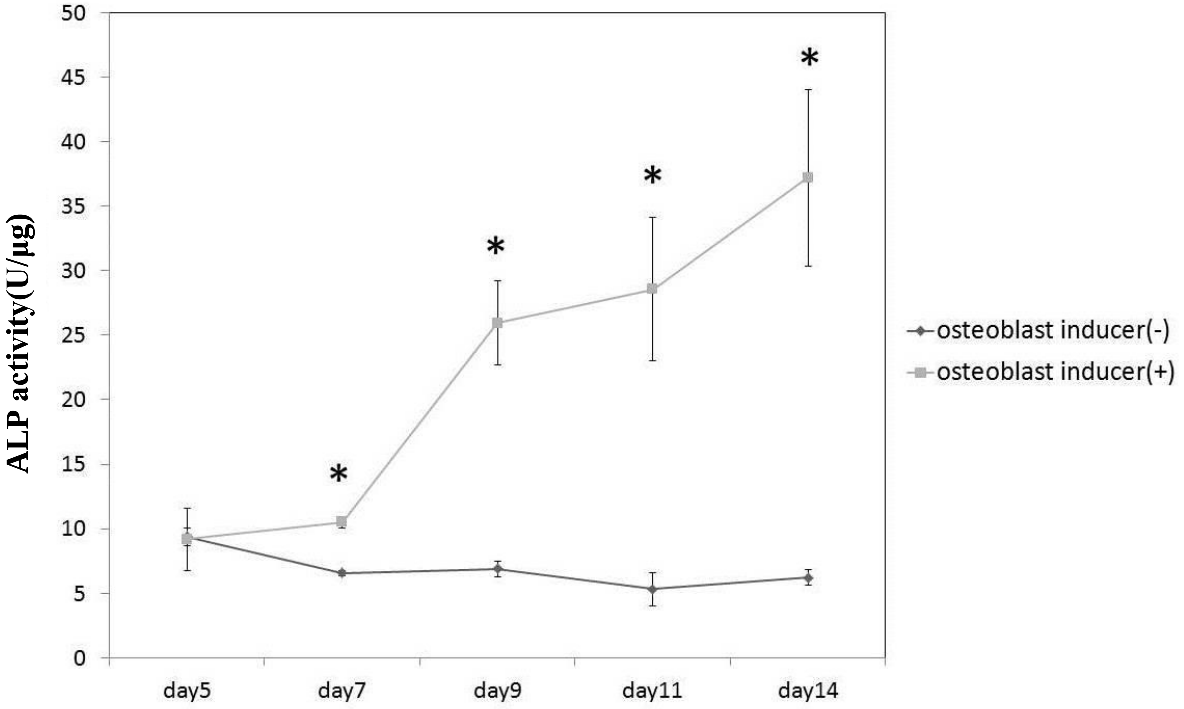


図 7. 分化メディウム刺激開始後の ALP 活性の経時的変化。MC3T3-E1 細胞を 96 ウェルプレートに $1x10^4$ cells/well となるよう播種し、24 時間後より DMEM のみ(osteoblast inducer(-))と、骨芽細胞分化メディウム(osteoblast inducer(+))で刺激開始し、その日を 0 日目とした。各日に細胞溶解液を回収し、ALP、総タンパク量を測定し、その比で ALP 活性を求めた。7 日目より有意な差を持って分化メディウムで刺激した細胞の ALP 活性の上昇を認めた。*は同日の 2 群間で有意差を認めたことを示す($P<0.05$)。N=3。

分化メディウムの構成成分別の **MC3T3-E1** 細胞分化能の確認

今回使用した骨芽細胞分化試薬は Ascorbic acid、Hydrocortisone、β-Glycerophospate の 3 種類が含有されており、分化に最も適切な薬剤の組み合わせを検証した。3 種類を単体もしくは 2 種類の組み合わせ、3 種類の組み合わせで添加させた DMEM を作成し刺激を行い、9 日目の ALP 活性を測定した(図 8)。各々の単剤の刺激では ALP 活性の上昇は認められなかったが、3 種類および Ascorbic acid+Hydrocortisone の組み合わせでは ALP 活性の上昇を認めた。3 種類の刺激では Ascorbic acid+Hydrocortisone の刺激に対し有意に ALP 活性の上昇を認め、以下の実験では 3 種類を添加させた DMEM を分化メディウムとして使用した。

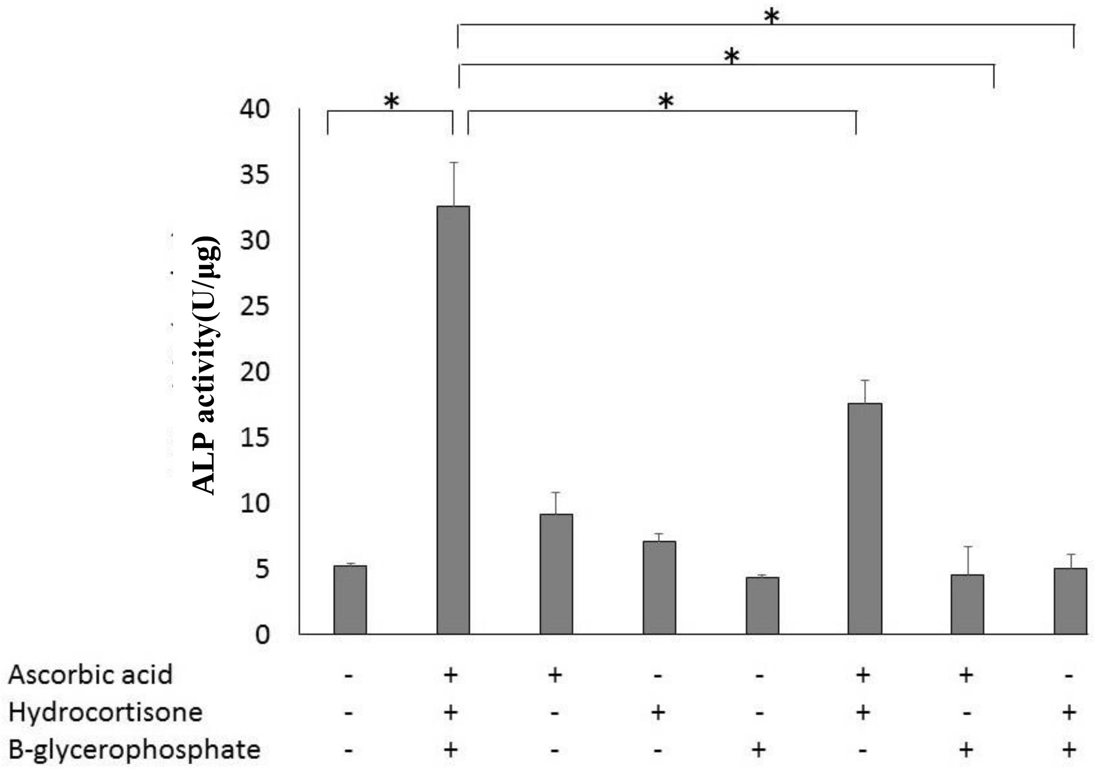
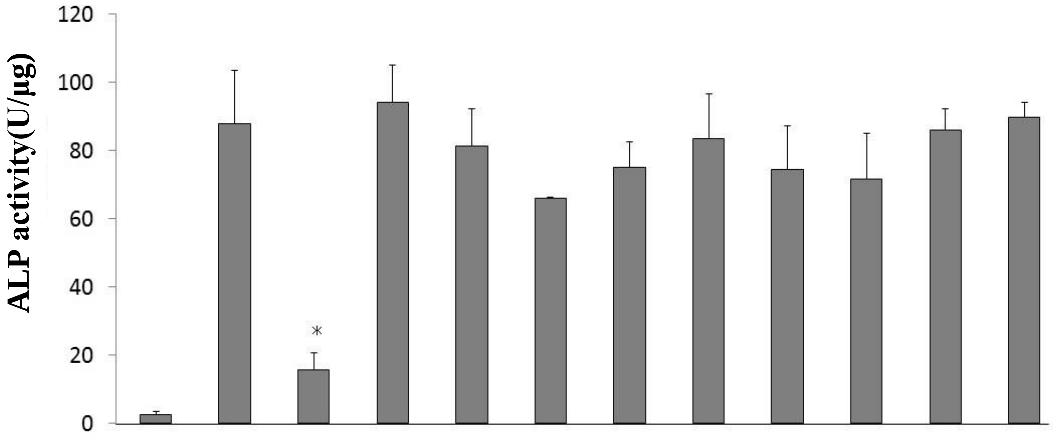


図 8. 分化メディウムの構成成分別の MC3T3-E1 細胞分化能の確認。MC3T3-E1 細胞を 96 ウェルプレートに 1x10^4 cells/well となるよう播種し、24 時間後より刺激を開始し、その日を 0 日目とした。骨芽細胞分化試薬は Ascorbic acid、Hydrocortisone、β-

Glycerophospate の 3 種類が含有されるため各種組み合わせで刺激を行った。9 日目に細胞溶解液を回収し、ALP、総タンパク量を測定し、その比で ALP 活性を求めた。3 種類すべてで刺激、Ascorbic acid+Hydrocortisone の組み合わせで刺激した細胞では DMEM のみの細胞(陰性コントロール)と比較し有意に ALP 活性の上昇を認めた。また、3 種類すべてで刺激した細胞、Ascorbic acid+Hydrocortisone の組み合わせで刺激した細胞の ALP 活性の間にも有意差を認めた。*は 2 群間で有意差を認めたことを示す(P<0.05)。N=3。

各種抗 HIV 薬による MC3T3-E1 細胞の分化能への影響

抗 HIV 薬による分化能への影響を調べるため各種抗 HIV 薬を添加し、9 日目に ALP 活性を測定した。各種抗 HIV 薬は臨床データを参考に、健常人に治療常用量を単回投与したした場合の血中薬物濃度の最大値(Cmax)の濃度となるよう抗 HIV 薬を添加した(表 3)。分化メディウムで刺激した細胞(陽性コントロール)と比較し、ritonavir(RTV)を添加した細胞では有意に ALP 活性の低下を認めた(図 9)。



Osteoblast inducer	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HIV Drug	-	-	RTV	LPV	DRV	ATV	FTC	3TC	TDF	ABC	-	-
Methanol(vehicle)	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
DMSO(vehicle)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+

図 9.各種抗 HIV 薬による MC3T3-E1 細胞の分化能への影響。MC3T3-E1 細胞を 96 ウェルプレートに 1x10^4 cells/wel となるよう播種し、24 時間後より刺激を開始し、その日を 0 日目とした。分化メディウムに各種抗 HIV 薬を添加させ刺激を行った。9 日目に細胞溶解液を回収し、ALP、総タンパク量を測定し、その比で ALP 活性を求めた。分化メディウムに RTV を添加させた細胞の ALP 活性は、陽性コントロール、そのほかの抗 HIV 薬を添加させたものと比較し有意に低下をした。*は陰性コントロール群以外のすべてにおいて有意差を認めたことを示す(P<0.05)。N=3。

また、9 日目以降の分化能を確認するために、分化メディウムに RTV を添加し 14 日目の ALP 活性も測定を行った(図 10)。9 日目に測定した ALP 活性と同様に、陽性コントロールと比較し、RTV を添加した細胞では有意に ALP 活性の低下を認めた。そのため RTV と骨芽細胞の分化への影響について詳細に検証していくこととした。

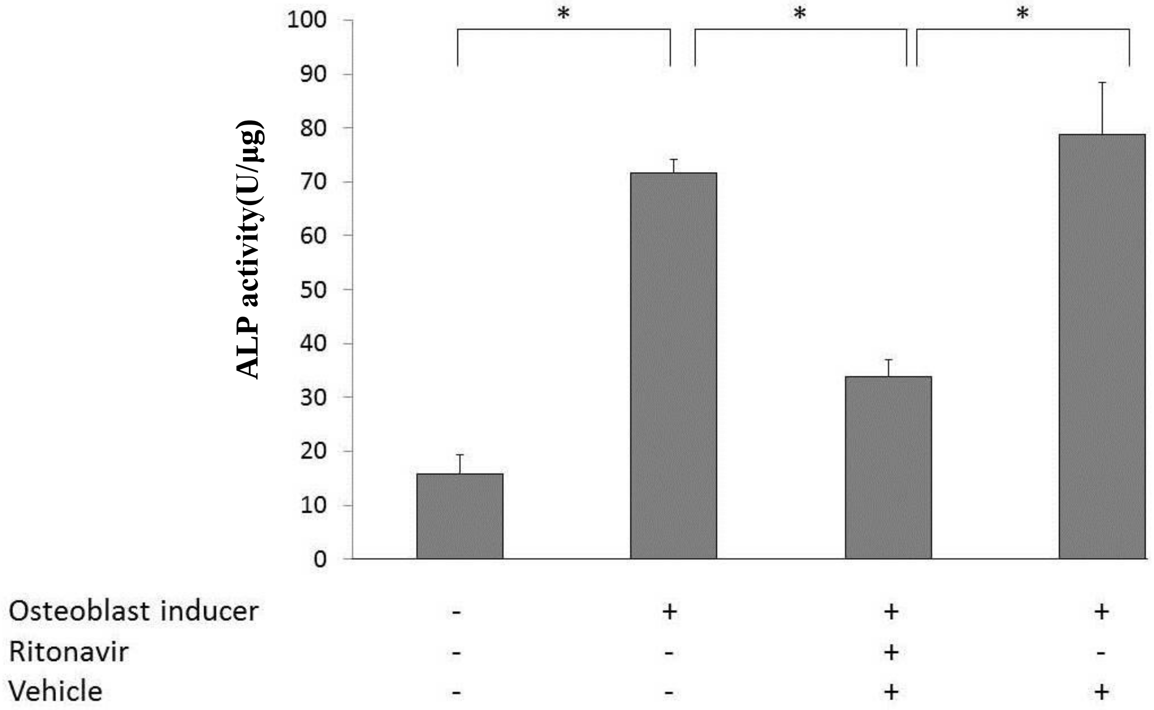


図 10. RTV による MC3T3-E1 細胞の分化能への、14 日目における影響。MC3T3-E1 細胞を 96 ウェルプレートに 1x10^4 cells/wel となるよう播種し、24 時間後より刺激を開始し、その日を 0 日目とした。分化メディウムに RTV を添加させ刺激し 14 日目に細胞溶解液を回収した。ALP、総タンパク量を測定し、その比で ALP 活性を求めた。14 日目に測定した場合と同様に、分化メディウムに RTV を添加させた細胞の ALP 活性は、陽性コントロール比較し有意に低下した。*は有意差を認めたことを示す(P<0.05)。N=3

RTV による MC3T3-E1 の分化能への影響

RTV 濃度と分化能への影響を調べた。分化メディウムに添加する RTV 濃度を 0.1、0.5、1、5、10 µg/mL とし、9 日目に ALP 活性の測定を行った(図 11)。RTV を 5、10 µg/mL の濃度で刺激した細胞は陽性コントロールに比べ有意に ALP 活性の抑

制を認め、それ以下の濃度では有意な ALP 活性の抑制は認めなかった。このことより、RTV は骨芽細胞の分化、骨細胞の形成を遅延もしくは阻害する可能性を示唆された。以降の実験では RTV の濃度は 10 μg/mL とすることとした。

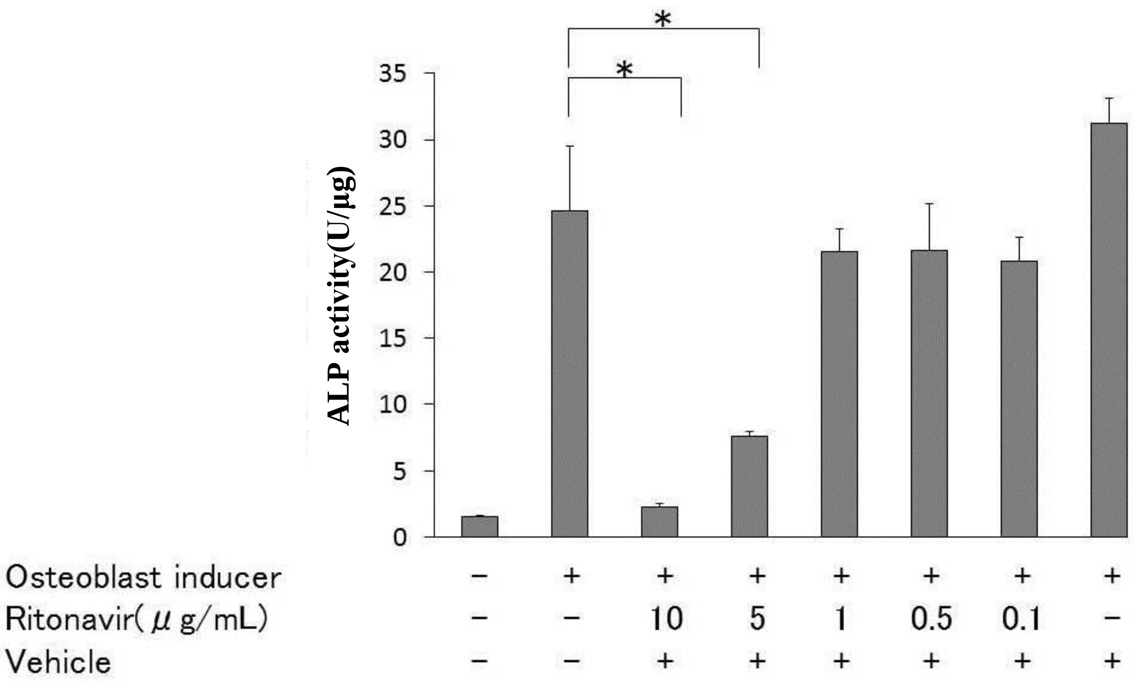


図 11.RTV による MC3T3-E1 細胞の分化能への影響。MC3T3-E1 細胞を 96 ウェルプレートに $1x10^4$ cells/wel となるよう播種し、24 時間後より刺激を開始し、その日を 0 日目とした。分化メディウムに Ritonavir を 0.1、0.5、1、5、10 μg/mL となるよう添加させ刺激し。9 日目に細胞溶解液を回収し、ALP、総タンパク量を測定し、その比で ALP 活性を求めた。陽性コントロールと比較し RTV5、10 μg/mL の濃度に添加した分化メディウムの細胞の ALP 活性は有意に低下した。RTV5、10 μg/mL の濃度とした群の間には有意差を認めなかった。*は有意差を認めたことを示す(P<0.05)。N=3

RTV による MC3T3-E1 細胞の石灰化への影響

MC3T3-E1 細胞は長期間に渡り培養を行うと石灰化するため、経時的な変化を確認した。DMEM、分化メディウム、RTV もしくは溶媒(Methanol)を添加した分化メディウムで 7 日目から一週間おきに 28 日目まで培養し、アリザリンレッド染色を行

った(図 12)。7 日目、14 日目まではいずれも明らかな分化を認めなかったが、21 日目の染色では分化メディウム、Methanol を添加した分化メディウムで刺激した細胞では石灰化が認められた。RTV を添加した細胞に関しては 21 日目、28 日目でも石灰化を認めることはできなかった。そのため RTV は MC3T3-E1 細胞の分化、石灰化を阻害もしくは遅延させると考えられた。

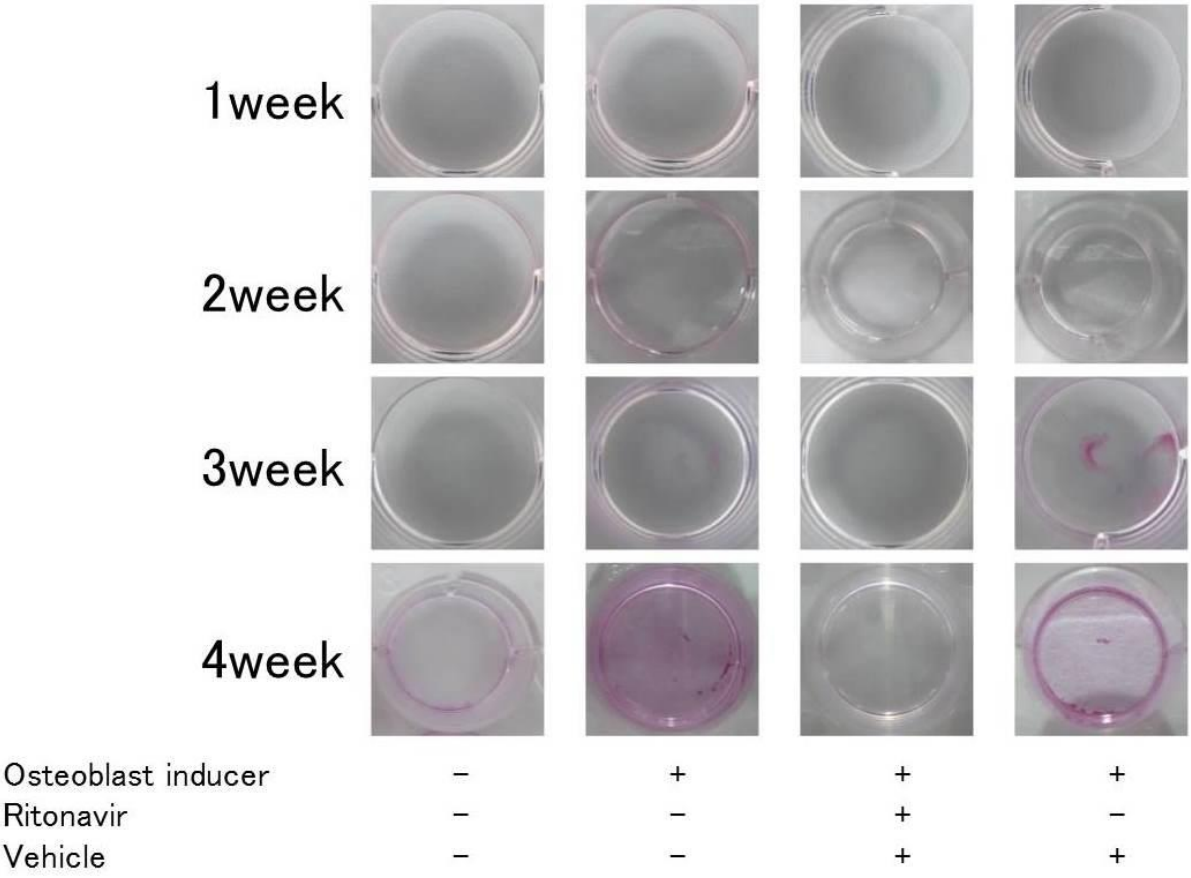


図 12.RTV による MC3T3-E1 細胞の石灰化への影響。48 ウェルプレートに 1 ウェルあたり $5x10^4$ cells/well となるように播種した。1 週間おきにアリザリンレッド染色を行い、石灰化の確認を行った。赤く染まる部分が石灰化を示す。分化メディウムで刺激した細胞、分化メディウムに溶媒を添加した細胞では 3 週目になると淡く赤色が染まりはじめ、4 週目でははっきりと染まることがわかる。DMEM のみ、分化メディウムに RTV を添加した細胞では染色されなかった。N=3

抗 HIV 薬による MC3T3-E1 細胞の石灰化への影響

前述の各種抗 HIV 薬を添加した分化メディウムで MC3T3-E1 細胞を 28 日間培養し、アリザリンレッド染色を行った。各種抗 HIV 薬は臨床データを参考に、健常人に治療常用量を単回投与したした場合の血中薬物濃度の最大値(Cmax)の濃度となるよう抗 HIV 薬を添加した(表 3)。RTV を除く全ての各種抗 HIV 薬を添加した分化メディウムで刺激した細胞はすべて石灰化が認められた。そのため、RTV 以外の抗 HIV 薬、すなわち LPV、DRV、ATV、FTC、TDF、3TC、ABC は MC3T3-E1 細胞の石灰化を抑制もしくは遅延させないことがわかった(図 13)。

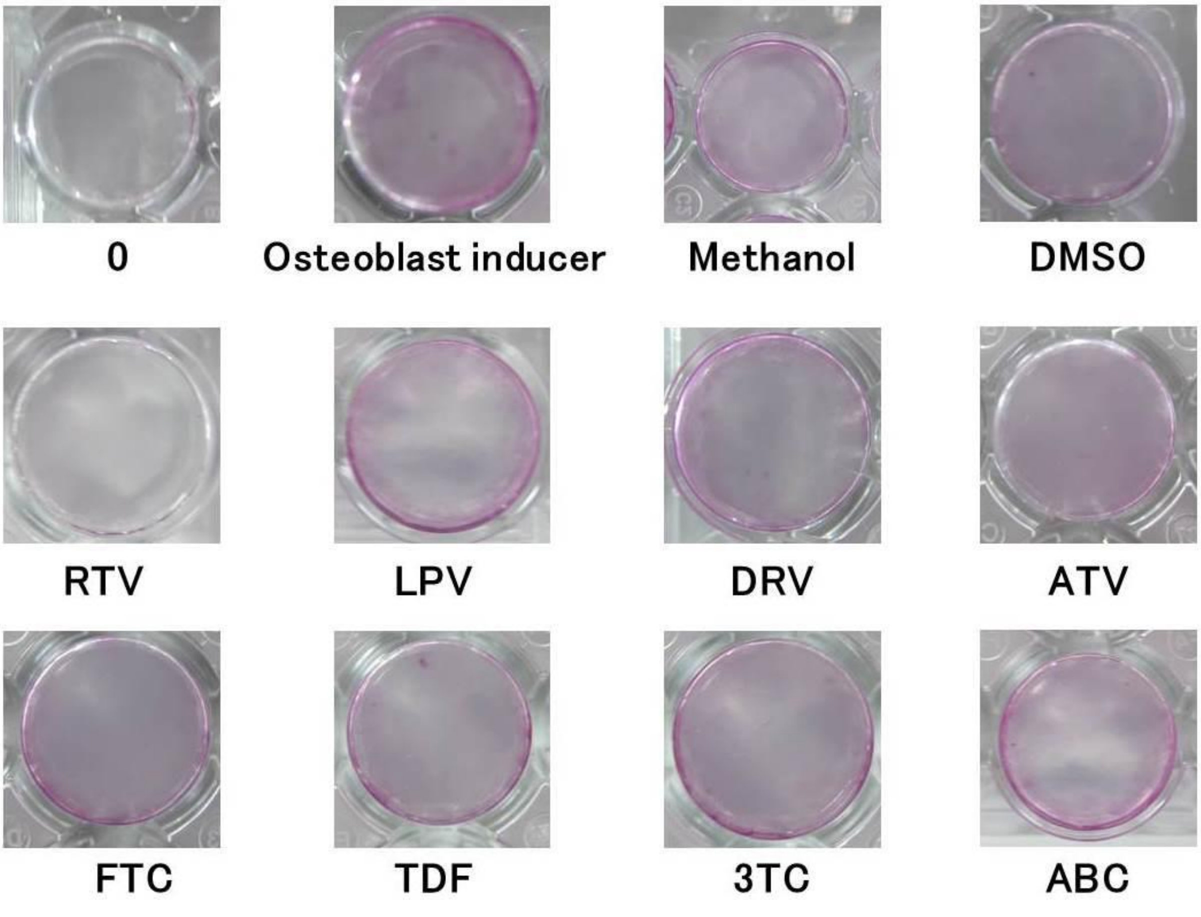


図 13. 各種抗 HIV 薬による MC3T3-E1 細胞の石灰化への影響。48 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 5×10^4 cells/well となるように播種し 4 週目にアリザリンレッド染色を行った。分化メディウムで刺激した細胞、分化メディウムに溶媒を添加した細胞、分化メディウム RTV を除く各種抗 HIV 薬を添加した細胞では染色された。DMEM のみ、分化メディウムに RTV を添加した細胞では染色されなかった。N=3

RTV による RUNX2 発現の影響

骨芽細胞の分化には様々なシグナル経路が存在するが、分化に必須の転写因子として RUNX2 がある。RUNX2 が初期段階で抑制されると、骨芽細胞の分化が抑制されることが知られている[25]。RTV を添加することで RUNX2 の発現量がどのように変化するかリアルタイム PCR 法、Western blot 法で評価することとした。

7 日目より ALP 活性の上昇が認められるため、シグナル上流にある RUNX2 は 7 日目以前に発現量が上昇していると考えられた。DMEM、分化メディウム、RTV もしくは溶媒を添加した分化メディウムで刺激を行い、3、5、7 日目に total RNA を回収し、RUNX2 mRNA の定量を、リアルタイム PCR を用いて行った。3、5 日目で RUNX2 mRNA の発現量は DMEM で培養した細胞と比較し、分化メディウムと溶媒を添加した分化メディウムで刺激した細胞では有意差をもって上昇を認めたが、RTV を添加した分化メディウムで刺激した細胞では上昇を認めなかった。7 日目の RUNX2 mRNA の発現量はいずれの細胞でも有意差を認めなかった(図 14)。

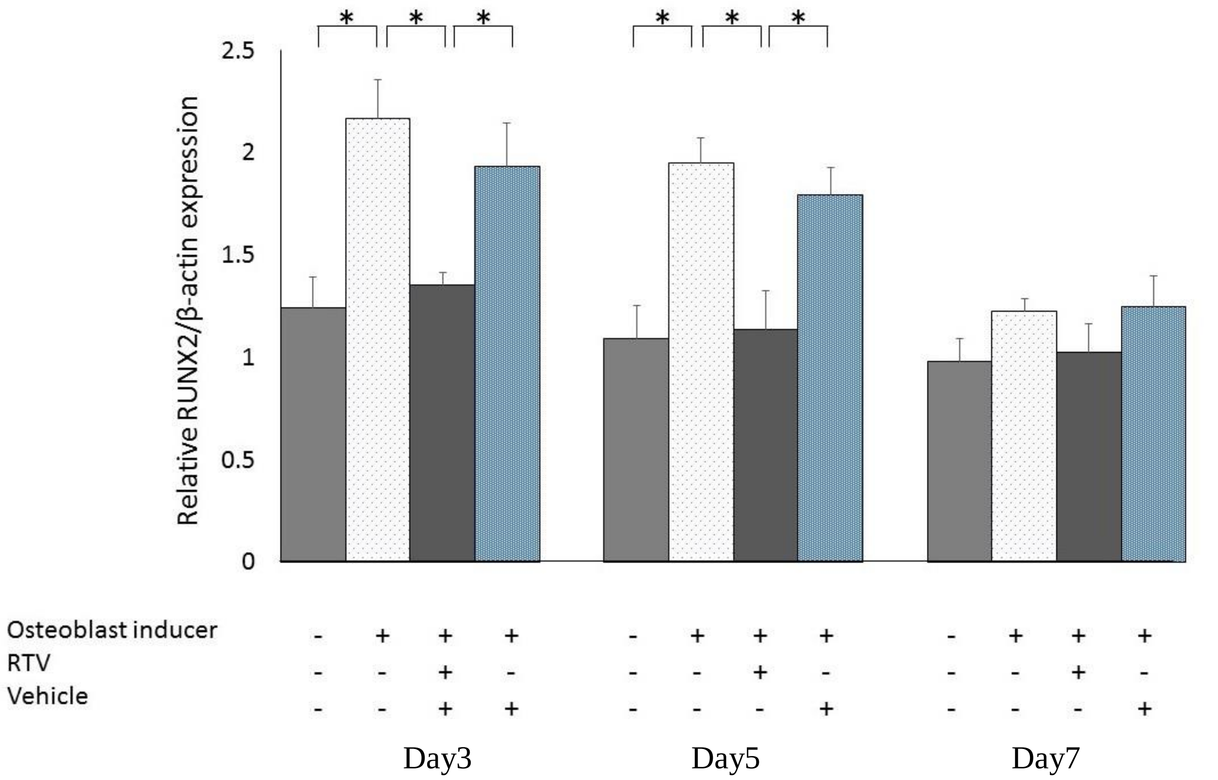


図 14.RTV による RUNX2 発現の影響。MC3T3-E1 細胞を 12 ウェルプレートに 1x10^{5} cells/well となるよう播種し、24 時間後より刺激を行った。刺激開始日を 0 日目とした。3、5、7 日目の細胞より RNA を抽出し、RT-PCR 法を用い RUNX2　mRNA の測定を行った。3 日目、5 日目では陽性コントロールと比較し、分化メディウムに RTV を添加した細胞では RUNX2 mRNA の発現は有意に抑制されていた。7 日目ではいずれの細胞間でも RUNX2 mRNA の発現には影響を認めなかった。*は 2 群間で有意差を認めたことを示す(P<0.05)。N=3

さらに RUNX2 のタンパク発現を Western blot 法によって評価した。分化メディウム、RTV もしくは溶媒を添加した分化メディウムで刺激し、3、5、7、9 日目の RUNX2、β-actin のタンパク発現量を Western blot 法で解析した。3、5 日目では各群の細胞のバンド強度に差を認められなかったが、7、9 日目では分化メディウムと溶媒を添加した分化メディウムで刺激した細胞ではコントロールと比較しバンド強度の上昇を認めたが、一方で RTV を添加した分化メディウムで刺激した細胞ではバンドの増強が認められなかった(図 15)。7 日目、9 日目の結果については、バンドの強

度(intensity)を Image Lab™ software を使用し定量化した。7 日目において、RTV を添加した分化メディウムで刺激した細胞の RUNX2 発現は有意差を持って抑制された(図 16)そのため、RUNX2 の発現は分化の過程で増強するが、RTV を添加することによって抑制されることが示唆された。

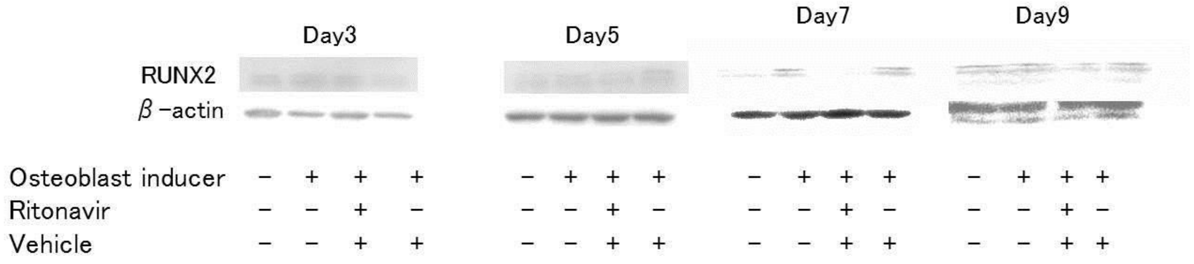


図 15.Western blot 法による、RUNX2 発現の変化。MC3T3-E1 細胞を 6 ウェルプレートに $2x10^5$ cells/well となるよう播種し、24 時間後より刺激を行った。24 時間後より刺激を開始し、その日を 0 日目とした。3、5、7 日、9 日目の細胞の RUNX2 発現を、Western blot 法を用いて測定した。3、5 日目の RUNX2 発現は各群で明らかな差を認めなかったが、7、9 日目の細胞では陰性コントロールと比較し、陽性コントロール、溶媒を入れた分化メディウムで刺激した細胞では上昇した。

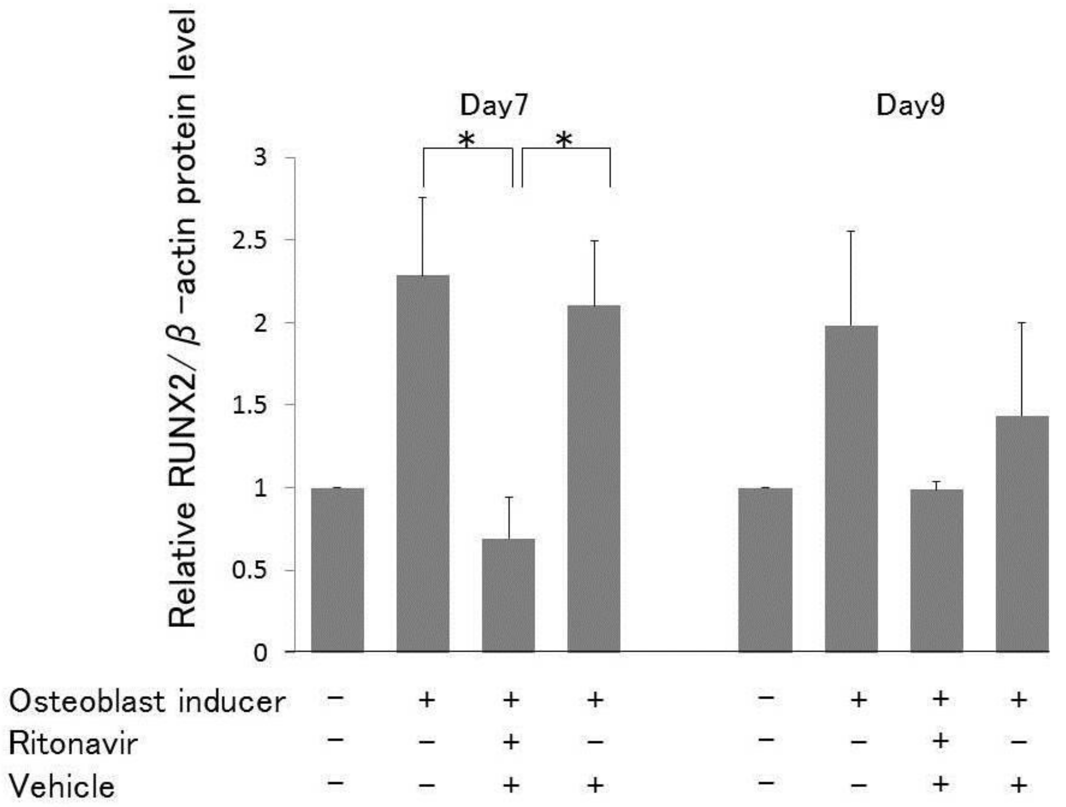


図 16.Western blot 法による、RUNX2 発現の変化。MC3T3-E1 細胞を 6 ウェルプレートに 2x10^5 cells/well となるよう播種し、24 時間後より刺激を行った。24 時間後より刺激を開始し、その日を 0 日目とした。7 日、9 日目の細胞の RUNX2 発現を、Western blot 法を用いて測定した。バンドの強度(intensity)は Image Lab™ software を使用し定量化した。各サンプルの細胞数を補正するため RUNX2 は β-actin との比で表示した。7 日目では RTV を添加した分化メディウムで刺激した細胞の RUNX2 発現が抑制された。9 日目では統計学的有意差を示すことはできなかった。*は有意差を認めたことを示す(P<0.05)。N=3

RTV による I 型コラーゲン発現の影響

骨芽細胞の分化マーカーとして、I 型コラーゲンは ALP と同様に重要な骨形成マーカーとして認知されている。I 型コラーゲンの発現も ALP 活性と同様に RTV による影響を受けるのか、リアルタイム PCR 法を用いて評価した。

RUNX2 mRNA の定量を行った際と同様に、DMEM、分化メディウム、RTV もしくは溶媒を添加した分化メディウムで刺激を行い、3、5、7 日目に total RNA を回

収した。リアルタイム PCR 法を用い I 型コラーゲン mRNA を測定した。3、5、7 日目いずれの 1 型コラーゲン mRNA の発現量は DMEM で培養した細胞と比較し、分化メディウムと溶媒を添加した分化メディウムで刺激した細胞では有意差をもって上昇を認めたが、RTV を添加した分化メディウムで刺激した細胞では上昇を認めなかった(図 17)

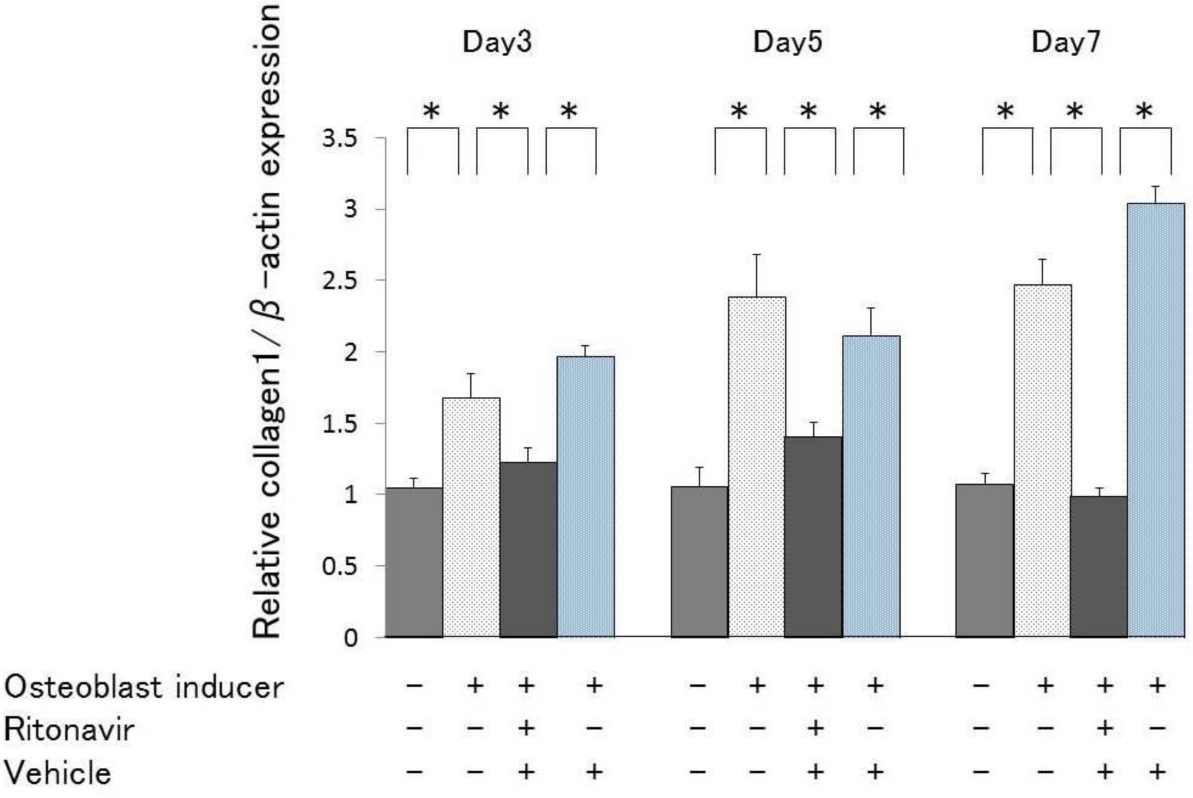


図 17.RTV による I 型コラーゲン発現の影響。MC3T3-E1 細胞を 12 ウェルプレートに $1x10^5$ cells/well となるよう播種し、24 時間後より刺激を行った。刺激開始日を 0 日目とした。3、5、7 日目の細胞より RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用い I 型コラーゲン mRNA の測定を行った。3 日目、5 日目、7 日目では陽性コントロールと比較し、分化メディウムに RTV を添加した細胞では I 型コラーゲン mRNA の発現は有意に抑制されていた。*は 2 群間で有意差を認めたことを示す(P<0.05)。N=3

細胞傷害性の評価

RTV による骨芽細胞分化抑制が、細胞傷害性に起因する可能性も考えられたため、LDH assay による細胞傷害性の評価を行った。RTV を添加した分化メディウムで刺激した細胞の培養液中の LDH 活性を、DMEM のみで刺激した細胞の培養液中の LDH 活性と比較することで、細胞傷害性の評価を行った。また同時に分化メディウム、溶媒である Methanol の細胞傷害性についても確認を行った。細胞培養期間は 9 日間と長期にわたるため、培養液中の LDH 活性は 8 日目から 9 日目の 24 時間で行った(図 18)。その結果、いずれの細胞間の LDH 活性には有意差を認めなかった。そのため RTV には明らかな細胞傷害性がないと考えられた。

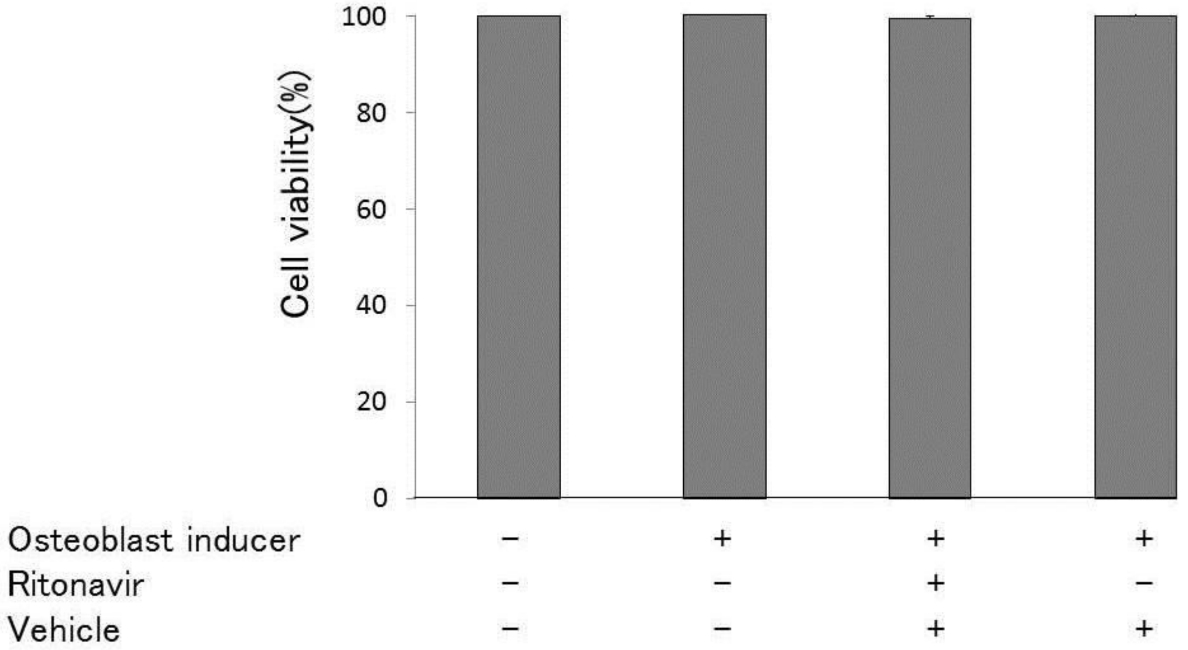


図 18.RTV による細胞傷害性の評価。MC3T3-E1 細胞を 12 ウェルプレートに $1x10^5$ cells/well となるよう播種し、24 時間後より各種刺激を行った。刺激開始日を 0 日目とし、8 日目から 9 日目の培養液を回収した。培養液中の LDH 活性を測定し、細胞傷害性を評価した。いずれの細胞間の LDH 活性は有意差を認めなかった。N=3

考察

今回の実験で抗 HIV 薬の一つである RTV はマウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞の分化、石灰化を抑制もしくは遅延させせることが確認された。さらに、RTV により骨芽細胞の転写因子である RUNX2 の発現を抑制されることによって、MC3T3-E1 の分化、石灰化が抑制もしくは遅延されることが考えられた。Jain らは、ヒト初代骨芽細胞において、PI である NFV、LPV によって ALP 活性が抑制されると報告しているが、最終的な石灰化までの観察を行っていない点や薬剤濃度別の実験が行われていなかった [20]。さらに、Malizia らは、同様にヒト初代骨芽細胞において NFV、IDV による ALP 活性低下を報告しているが、24 時間の刺激での解析であり、最終的な分化、石灰化の確認までは行われていなかった[19]。私の実験では最大 28 日間の観察を行い、RTV が分化、最終的な石灰化も抑制をもしくは遅延されることを示した。さらに RTV による、分化に重要な転写因子である RUNX2 に対する影響についても示した点で新しい報告である。

RTV は PI の一つであり、治療薬として NRTI と組み合わせて常用量が使用されていたが、現在のガイドラインでは他の PI の血中濃度を高く維持するためのブースターとして少量投与を行うのが推奨されている[34]。RTV と骨粗鬆症の関連についての臨床研究は認められなかったが、理由として RTV はブースターとして使用されるため単独での使用がないことが一因に考えられる。基礎研究の分野では、RTV と破骨細胞についてはいくつか研究されてきた。RTV は破骨細胞において、RANKL 刺激による akt シグナルを阻害することにより破骨細胞の分化、活性化を抑制するという報告がある一方[16]、RTV は wnt シグナルを増強することによって破骨細胞の分化を促進し、骨粗鬆症に結びつく可能性があるという報告もある[8]。また、RTV は

骨代謝分野以外でも、NF-κB を阻害したり、MAPK のうち ERK のリン酸化を抑制するといった報告など、様々な作用を指摘されている[35]。しかし、RTV による骨芽細胞の分化シグナルへの影響を調べた報告はなく、これが初めてとなる。

DAD study で明らかになったように、PI は心筋梗塞発症リスクを高めるほか、糖、脂質代謝に影響を及ぼすことが報告されている[36, 37]。骨粗鬆症に関しては PI で治療された HIV 患者では、NNRTI で治療した患者や未感染者と比較し骨吸収マーカーである NTX や、RANKL の上昇が認められることが報告されている[38]。また、LPV の使用が骨折の独立した危険因子とするものもある[39]。日本人の cART 療法中の臨床研究でも PI の使用は骨粗鬆症のリスクファクターの一つであることが指摘されている[40]。これらの報告がある一方で、PI と骨粗鬆症の関連は臨床的には関連がないとする論文も出ており、薬剤と骨粗鬆症の関連についてはまだ結論が出ていない[41]。

今回の研究では、マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 において、RTV を 5 µg/mL、10 µg/mL の濃度として刺激した場合には有意に ALP 活性が抑制されたが、それ以下の濃度であると十分な抑制を観察することができなかった。RTV は治療量として以前は 1 回 600 mg1 日 2 回が投与されていた。治療量として投与した場合の最高血中濃度は 11.2 µg/mL、最小血中濃度は 3.6 µg/mL となるが[42]、現在のガイドラインでは、RTV は治療量ではなく、ブースターとして 1 日 100 mg の投与が推奨されている。ブースターとして使用する場合の最高血中濃度は 1.5 µg/mL に達すると報告されている[43]。この濃度で今回の実験を行うと、ALP の活性を抑えることはできなかった。そのため生体内では骨芽細胞に対する影響は少ない可能性も否定はでき

ない。但し、生体内での RTV の組織移行について調べられた研究はなく、局所的に高い濃度が保たれているとすると骨芽細胞の分化が抑制されている可能性もある。

今回の実験では、MC3T3-E1 細胞を、RTV を添加した分化メディウムで培養すると、石灰化を認められなかった。MC3T3-E1 細胞は 10%FBS を含む培地で培養すると 30 日程度より石灰化することが報告されている[44, 45]。今回私が分化メディウムで培養したところ 21 日以降で石灰化が観察された。今回の研究での観察期間は 28 日までとしたが、さらに培養を続ければ DMEM、RTV を添加した分化メディウムで培養した細胞も石灰化が起こった可能性は否定できない。RTV によって完全に分化を抑制できなくても、少なくとも骨化速度が遅延することは示すことが出来た。

RTV 添加群では RUNX2 の発現が抑制されていることより、RTV は RUNX2 か、もしくはその上流のシグナルを抑制していると考えられた。骨芽細胞の分化には様々な経路があるが、RUNX2 の活性化は多くの経路に共通しており、きわめて重要である[46]。RUNX2 のノックアウトマウスでは骨芽細胞を欠如し、骨形成が全く起こらず生後死亡するため、RUNX2 は骨形成に必須である[47]。RUNX2 は ALP、Ⅰ型コラーゲン、osteopontin、osteocalcin といった骨芽細胞に特有の遺伝子発現を制御し、骨形成に関わる一方で、分化した骨芽細胞には抑制的に働き過剰な成熟と骨化を抑制する働きがある[48]。HIV エンベロープタンパクである p55-gag や、gp120 は RUNX2 の発現を抑制する作用があり、HIV 感染そのものでも骨芽細胞の分化は抑制することが知られている[49]。

ウエスタンブロット法による RUNX2 のバンドは２本認められた。RUNX2 には少なくとも２種類のアイソフォーム(RUNX2-I, RUNX2-II)が存在することが知られており、これらは N 末端が異なるが機能は同じである[50-53]。今回の実験では、刺激開

始後 7 日目の細胞において、RUNX2 のバンドは２本とも RTV 添加群では抑制されていた。

RTV が抑制する分化シグナルの部位を明確に特定することが今回はできなかった。RTV はその立体構造より、直接エストロゲン受容体である ERαと Leu536 に結合することが報告されている[54]。アテローム性動脈硬化症の進行は、エストロゲンの抗酸化作用によって抑制されることが知られているが[55]、RTV はこのエストロゲンシグナルの抑制をし、アテローム性動脈硬化症を引き起こす[54]。これらと同様に、リトナビルは骨芽細胞の分化に関わる何らかの受容体にも直接結合し、そのシグナルを抑制している可能性もあり、今後も調べていく必要がある。

破骨細胞の分化と機構を調節する因子である RANKL は、骨芽細胞から発現、分泌される。HIV 患者の HIV mRNA 値と血清中 RANKL 値は相関関係があるといった報告があり、さらに HIV 慢性炎症による IL-6、TNF-αは RANKL を産生、分泌を刺激する[56]。また、HIV エンベロープタンパクである g120 や、HIV-1 アクセサリー遺伝子の Vpr によって RANKL は発現を上昇させることが知られており[57, 58]、HIV による慢性炎症で RANKL 発現が上昇し、破骨細胞が活性化されると考えられる。今後は抗 HIV 薬よる、RANKL 発現への影響などさらに検証していく必要がある。

その他の抗 HIV 薬では骨芽細胞の分化、石灰化における影響は今回の実験系では認めなかった。しかし、問題点として①48 時間おきにメディウムは交換したが、その間に薬剤が失活した可能性②今回の研究では薬剤刺激濃度を、単剤で治療量を内服した際の薬物最高血中濃度に設定したということが挙げられる。実際の生体内では PI を RTV と併用することで治療が行われる。RTV には P450 阻害作用があることが知られており、これを利用し RTV を少量入れることで PI の血中濃度を高く維持し

ている[59]。そのため単剤で内服した場合と RTV 併用で内服した場合の最高血中濃度は異なることが予想される。また、ATV は胃内酸度により溶出が大きく変化するため、血中濃度には個人差と報告されている[60]。PI は相互作用の多い薬剤であり、患者の抗 HIV 薬以外の内服状況によっても血中濃度は変わってくる。今回設定した濃度より高い値で刺激した場合、RTV 以外の抗 HIV 薬でも骨芽細胞の分化が抑制される可能性もある。

RTV は骨細胞以外でも様々な作用が報告されている。RTV はマクロファージに対し、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)の一つである ERK のリン酸化を促進させることでコレステロールの細胞外への排出を阻害するといった報告や[61]、脂肪細胞において RTV ブースターとしてその他の PI と併用した場合に MAPK の一つである JNK を活性化することで糖代謝異常を引き起こす[62]といった報告がある。MAPK は全身の細胞に広く発現しており、骨芽細胞おいて MAPK は RUNX2 の発現に関わり、RUNX2 の上流に位置していると考えられているが、その役割に関しての評価は一定しない。Kono らの報告では、MC3T3-E1 の分化は ERK 特異的阻害剤で促進されるとする一方で[63]、ERK の活性化によって骨芽細胞の分化を促進するという報告もある[64]。今後は MAPK 等のさらに RUNX2 上流シグナルについて研究していく必要がある。

結論として、抗 HIV 薬の一つである RTV は、RUNX2 の発現を抑制することによって、マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞の分化を抑制もしくは遅延させた。ただし、RTV の濃度が現在のブースターとして使用される投与量の場合には分化抑制が起こらなかったなどから、実際ブースターとして RTV を治療に用いた場合に、生体に影響が少ない可能性がある。RTV を含む cART 療法は多くの患者に使用

されており、RTV を使用せず HIV の治療を行うことは困難である。そのためをさらにマウスモデルなどを使用し実際の生体に近づけることで、RTV の人体に及ぼす影響を明らかにし、抗 HIV 薬と骨粗鬆症の関連を明らかにしていく必要がある。

結語

マウス骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞において、Ascorbic acid、Hydrocortisone、β-Glycerophospate の 3 剤を添加した培地で細胞分化、石灰化を誘導することができる。しかし、抗 HIV 薬の一つであるプロテアーゼ阻害薬の一つである ritonavir を添加することによって MC3T3-E1 細胞の分化、石灰化は抑制される。それは ritonavir が骨芽細胞分化に必須である転写因子 RUNX2 の発現を、もしくはその上流のシグナルを抑制することによって起きていると考えられる。

プロテアーゼ阻害薬の内服は、HIV 感染者の骨粗鬆症のリスクファクターの一つと考えられており、この結果と矛盾しない結果であった。これらの結果は今後の抗 HIV 薬の選択や、骨粗鬆症の治療開始時期などを決定する上で重要な役割を担うと考えられた。

謝辞

本研究および本論文の作成に当たり、指導教官である東京大学大学院医学系研究科内科学専攻生体防御感染症学准教授　四柳宏先生、帝京大学医学部内科学講座感染症内科教授　太田康男先生に様々なご指導、ご支援をいただき感謝の意を表します。また、実験指導や論文作成で指導して頂いた元帝京大学医学部内科助教　吉野友祐先生、 東京大学医学部感染症内科講師　畠山修司先生、帝京大学医学部内科講師　北沢貴利先生　古賀一郎先生にも深く感謝の意を表します。

参考文献リスト

1. 厚生労働省エイズ動向委員会. 平成 25(2013)年エイズ発生動向. 2013.

2. Lohse N, Hansen A B, Pedersen G, Kronborg G, Gerstoft J, Sorensen H T, Vaeth M, Obel N. Survival of persons with and without HIV infection in Denmark, 1995-2005. Annals of internal medicine.146(2):87-95;2007

3. Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. Lancet.;384(9939):258-71;2014.

4. Gunthard HF, Aberg JA, Eron JJ, Hoy JF, Telenti A, Benson CA, Burger DM, Cahn P, Gallant JE, Glesby MJ, Reiss P, Saag MS, Thomas DL, Jacobsen DM, Volberding PA. Panel Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2014 recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. JAMA : the journal of the American Medical Association.312(4):410-25;2014.

5. Kanis JA. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA.4(6):368-81;1994.

6. 日本骨代謝学会，日本骨粗鬆症学会合同. 原発性骨粗鬆症診断基準改訂検討委員会. 原発性骨粗鬆症の 診断基準. 日骨代謝誌. 2012.

7. Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Mabuchi A, En-Yo Y, Yoshida M, Saika A, Yoshida H, Suzuki T. Yamamoto S, Ishibashi H, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T. Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in Japanese

men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. Journal of bone and mineral metabolism. 27(5):620-8;2009.

8. Orimo H Nakamura T, Hosoi T, Iki M, Uenishi K, Endo N, Ohta H, Shiraki M, Sugimoto T, Suzuki T, Soen S, Nishizawa Y, Hagino H, Fukunaga M, Fujiwara S. Japanese 2011 guidelines for prevention and treatment of osteoporosis--executive summary. Archives of osteoporosis. 7(1-2):3-20;2012

9. Orimo H, Yaegashi Y, Onoda T, Fukushima Y, Hosoi T, Sakata K. Hip fracture incidence in Japan: estimates of new patients in 2007 and 20-year trends. Archives of osteoporosis. 4(1-2):71-7;2009.

10. Brown TT, Qaqish RB. Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis: a meta-analytic review. Aids. 20(17):2165-74;2006.

11. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. The Journal of biological chemistry. 285(33):25103-8;2010.

12. Bruera D, Luna N, David DO, Bergoglio LM, Zamudio J. Decreased bone mineral density in HIV-infected patients is independent of antiretroviral therapy. Aids. 17(13):1917-23;2003.

13. Fausto A, Bongiovanni M, Cicconi P, Menicagli L, Ligabo E, V Melzi S, Bini T, Sardanelli F, Cornalba G, Monforte Ad. Potential predictive factors of osteoporosis in HIV-positive subjects. Bone. 38(6):893-7;2006.

14. Cazanave C, Dupon M, Lavignolle-Aurillac V, Barthe N, Lawson-Ayayi S, Mehsen N, Mercie P, Morlat P, Thiebaut R, Dabis F. Reduced bone mineral density in HIV-infected patients: prevalence and associated factors. Aids. 22(3):395-402;2008.

15. Brown TT, McComsey GA, King MS, Qaqish RB, Bernstein BM, da Silva BA. Loss of bone mineral density after antiretroviral therapy initiation, independent of antiretroviral regimen. Journal of acquired immune deficiency syndromes. 51(5):554-61;2009.

16. Walker Harris V, Brown TT. Bone loss in the HIV-infected patient: evidence, clinical implications, and treatment strategies. The Journal of infectious diseases. 205 Suppl 3:S391-8;2012.

17. Modarresi R, Xiang Z, Yin M, Laurence J. WNT/beta-catenin signaling is involved in regulation of osteoclast differentiation by human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir: relationship to human immunodeficiency virus-linked bone mineral loss. The American journal of pathology. 174(1):123-35;2009.

18. Santiago F, Oguma J, Brown AM, Laurence J. Noncanonical Wnt signaling promotes osteoclast differentiation and is facilitated by the human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir. Biochemical and biophysical research communications. 417(1):223-30;2012.

19. Jain RG, Lenhard JM. Select HIV protease inhibitors alter bone and fat metabolism ex vivo. The Journal of biological chemistry.277(22):19247-50;2002.

20. Malizia AP, Cotter E, Chew N, Powderly WG, Doran PP. HIV protease inhibitors selectively induce gene expression alterations associated with reduced calcium deposition in primary human osteoblasts. AIDS research and human retroviruses. 23(2):243-50;2007.

21. Endo I, Mastumoto T. Bone and Stem Cells. Regulatory mechanism of mesenchymal stem cell differentiation to osteoblasts. Clinical calcium. 24(4):555-64;2014.

22. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak D. R.Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 284(5411):143-7;1999.

23. 塩井淳. 血管石灰化とその調節機構. Clinical calcium. 2002;12:1056-66;2002.

24. Fujiwara M, Ozono K. Cytokines and osteogenesis. Clinical calcium. 2014;24(6):845-5;2014.

25. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. Advances in experimental medicine and biology. 658:43-9;2010.

26. Pan G, Yang Z, Ballinger SW, McDonald JM. Pathogenesis of osteopenia/osteoporosis induced by highly active anti-retroviral therapy for AIDS. Annals of the New York Academy of Sciences. 1068:297-308;2006.

27. Takeuchi Y, Nakayama K, Matsumoto T. Differentiation and cell surface expression of transforming growth factor-beta receptors are regulated by interaction with matrix collagen in murine osteoblastic cells. The Journal of biological chemistry. 271(7):3938-44;1996.

28. Suzawa M, Takeuchi Y, Fukumoto, S Kato S, Ueno N, Miyazono K, Matsumoto T, Fujita T. Extracellular matrix-associated bone morphogenetic proteins are essential for differentiation of murine osteoblastic cells in vitro. Endocrinology. 140(5):2125-33;1999.

29. Sakamoto S, Sakamoto M, Goldberg L, Colarusso L, Gotoh Y. Mineralization induced by beta-glycerophosphate in cultures leads to a marked increase in collagenase synthesis by mouse osteogenic MC3T3-E1 cells under subsequent stimulation with heparin. Biochemical and biophysical research communications. 162(2):773-80;1989.

30. Ireland DC, Bord S, Beavan SR, Compston JE. Hydrocortisone increases the rate of differentiation of cultured human osteoblasts. Journal of cellular biochemistry. 91(3):594-601;2004.

31. Duvivier C, Kolta S, Assoumou L, Ghosn J, Rozenberg S, Murphy RL, Katlama C, Costagliola D. Greater decrease in bone mineral density with protease inhibitor regimens compared with nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor regimens in HIV-1 infected naive patients. Aids. 23(7):817-24;2009.

32. Stellbrink HJ, Orkin C, Arribas JR, Compston J, Gerstoft J, Van Wijngaerden E, Lazzarin A, Rizzardini G, Sprenger HG, Lambert J, Sture G, Leather D, Hughes S, Zucchi P, Pearce H. Comparison of changes in bone density and turnover with abacavir-lamivudine versus tenofovir-emtricitabine in HIV-infected adults: 48-week results from the ASSERT study. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 51(8):963-72;2010.

33. McComsey GA, Kitch D, Daar ES, Tierney C, Jahed NC, Tebas P, Myers L, Melbourne K, Ha B, Sax P E. Bone mineral density and fractures in antiretroviral-naive persons randomized to receive abacavir-lamivudine or tenofovir disoproxil fumarate-emtricitabine along with efavirenz or atazanavir-ritonavir: Aids Clinical Trials Group A5224s, a substudy of ACTG A5202. The Journal of infectious diseases. 203(12):1791-801;2011.

34. Council AWGotOoARA. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents. 2014.

35. Dewan M Z, Tomita M, Katano H, Yamamoto N, Ahmed S, Yamamoto M, Sata T, Mori N, Yamamoto N.An HIV protease inhibitor, ritonavir targets the nuclear factor-kappaB and inhibits the tumor growth and infiltration of EBV-positive lymphoblastoid B cells. International journal of cancer Journal international du cancer. 124(3):622-9;2009.

36. Group DADS, Friis-Moller, N. Reiss, P. Sabin, C. A. Weber, R. Monforte, Ad El-Sadr, W. Thiebaut, R. De Wit, S. Kirk, O. Fontas, E. Law, M. G. Phillips, A. Lundgren, J. D. Class of antiretroviral drugs and the risk of myocardial infarction. The New England journal of medicine. 356(17):1723-35;2007.

37. Flint O P Noor M A, Hruz P W, Hylemon P B, Yarasheski K, Kotler D P, Parker R A, Bellamine A. The role of protease inhibitors in the pathogenesis of HIV-associated lipodystrophy: cellular mechanisms and clinical implications. Toxicologic pathology. 37(1):65-77;2009.

38. Madeddu G, Spanu A, Solinas P, Calia GM, Lovigu C, Chessa F, Mannazzu M, Falchi A, Mura M S. Bone mass loss and vitamin D metabolism impairment in HIV patients receiving highly active antiretroviral therapy. The quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine. 48(1):39-48;2004.

39. Bedimo R, Maalouf NM, Zhang S, Drechsler H, Tebas P. Osteoporotic fracture risk associated with cumulative exposure to tenofovir and other antiretroviral agents. Aids. 26(7):825-31;2012.

40. Kinai E, Nishijima T, Mizushima D, Watanabe K, Aoki T, Honda H, Yazaki H, Genka I, Tanuma J, Teruya K, Tsukada K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Long-Term Use of Protease Inhibitors Is Associated with Bone Mineral Density Loss. AIDS research and human retroviruses. 2014.

41. Amiel C Ostertag A, Slama L, Baudoin C, N'Guyen T, Lajeunie E, Neit-Ngeilh L, Rozenbaum W, De Vernejoul MC. BMD is reduced in HIV-infected men irrespective of treatment. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 19(3):402-9;2004.

42. Ltd AL. Norvir® Tablets Summary of Product Characteristics. 2010.

43. Estevez JA, Molto J, Tuneu L, Cedeno S, Antonijoan RM, Mangues MA, Clotet B, Domingo P, Puntes M, Barbanoj MJ, Valle M. Ritonavir boosting dose reduction from 100 to 50 mg does not change the atazanavir steady-state exposure in healthy volunteers. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 67(8):2013-9;2012.

44. Kodama H, Amagai, Y., Sudo, H., Kasai, S., Yamamoto, S. Establishment of a clonal osteogenic cell linefrom newborn mouse calvaria. Jpn J Oral- Biol. 1981(23).

45. Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. The Journal of cell biology. 1983;96(1):191-8;1983.

46. Chen G, Deng C, Li YP. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. International journal of biological sciences. 8(2):272-88;2012.

47. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. Cell. 89(5):755-64;1997.

48. Xiao ZS, Liu SG, Hinson TK, Quarles LD. Characterization of the upstream mouse Cbfa1/Runx2 promoter. Journal of cellular biochemistry. 82(4):647-59;2001.

49. Cotter EJ, Malizia AP, Chew N, Powderly WG, Doran PP. HIV proteins regulate bone marker secretion and transcription factor activity in cultured human osteoblasts with consequent potential implications for osteoblast function and development. AIDS research and human retroviruses. 23(12):1521-30;2007.

50. Ogawa E, Maruyama M, Kagoshima H, Inuzuka M, Lu J, Satake M, Shigesada K, Ito Y. PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factor homologous to the products of the Drosophila runt gene and the human AML1 gene Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90 : 6859–6863;1993.

51. Stewart M, Terry A, Hu M, O'hara M, Blyth K, Baxter E, Cameron E, Onions DE, J.C. Neil JC. Proviral insertions induce the expression of bone-specific isoforms of PEBP2aA (CBFA1): evidence for a new myc collaborating oncogene Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 94:8646-8651;1997.

52. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development Cell, 89 :765-771;1997.

53. Kanatani N, Fujita T, Fukuyama R, Liu W, Yoshida CA, Moriishi T, Yamana K, Miyazaki T, Toyosawa S, Komori T. Cbfβ regulates Runx2 function isoform-dependently in postnatal bone development. Dev Biol. 296(1):48-61; 2006.

54. Xiang J, Wang Y, Su K, Liu M, Hu PC, Ma T, Li JX, Wei L, Zheng Z, Yang F. Ritonavir binds to and downregulates estrogen receptors: molecular mechanism of promoting early atherosclerosis. Exp Cell Res. 327(2);318-30:2014

55. Barnabas O, Wang H, Gao XM. Role of estrogen in angiogenesis in cardiovascular diseases.J Geriatr Cardiol. 10(4):377-82;2013

56. Gibellini D, De Crignis E, Ponti C, Cimatti L, Borderi M, Tschon M, Giardino R, Re MC. HIV-1 triggers apoptosis in primary osteoblasts and HOBIT cells through TNFalpha activation. Journal of medical virology. 80(9):1507-14;2008.

57. Fakruddin JM, Laurence J. HIV envelope gp120-mediated regulation of osteoclastogenesis via receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) secretion and its modulation by certain HIV protease inhibitors through interferon-gamma/RANKL cross-talk. The Journal of biological chemistry. 278(48):48251-8;2003.

58. Fakruddin JM, Laurence J. HIV-1 Vpr enhances production of receptor of activated NF-kappaB ligand (RANKL) via potentiation of glucocorticoid receptor activity. Archives of virology. 150(1):67-78;2005.

59. Kageyama M, Namiki H, Fukushima H, Terasaka S, Togawa T, Tanaka A, Ito Y, Shibata N, Takada K. Effect of chronic administration of ritonavir on function of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein in rats. Biological & pharmaceutical bulletin. 28(1):130-7;2005.

60. Gibbons S RL, Dickinson L. Therapeutic drug monitoring of atazanavir in routine clinical settings in the UK. 7th ICDTHI,14-18 Nov. 2004.

61. Wang X, Mu H, Chai H, Liao D, Yao Q, Chen C. Human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir inhibits cholesterol efflux from human macrophage-derived foam cells. The American journal of pathology. 171(1):304-14;2007.

62. Bogachus LD, Turcotte LP. HIV protease inhibitors induce metabolic dysfunction in part via increased JNK1/2 pro-inflammatory signaling in L6 cells. Antiviral research. 92(3):415-23;2011

63. Kono SJ, Oshima Y, Hoshi K, Bonewald LF, Oda H, Nakamura K, et al. Kono, S. J. Oshima, Y. Hoshi, K. Bonewald, L. F. Oda, H. Nakamura, K. Kawaguchi, H. Tanaka, S.40(1):68-74;2007.

64. Ge C, Xiao G, Jiang D, Franceschi RT. Critical role of the extracellular signal-regulated kinase-MAPK pathway in osteoblast differentiation and skeletal development. The Journal of cell biology. 176(5):709-18;2007