

골세포의 자멸과 비스포스포네이트

아주대학교 의과대학 내분비대사 내과학교실

정 윤 석

Apoptosis of bone cells and bisphosphonates

Yoon-Sok Chung, M.D.

Department of Endocrinology and Metabolism, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

파골세포의 자멸과 비스포스포네이트

최근 들어 비스포스포네이트가 파골세포의 자멸을 유도할 수 있다는 보고가 늘어나고 있다. 자멸(apoptosis)은 괴사와는 다른 세포의 죽음의 한 형태로서 형태학적인 면에서 감별이된다. 즉, 자멸시에는 세포가 작아지면서 응축(condensation)되고, 핵도 응축되며, 핵염색질(chromatin)이 응축되고, 핵이 조각화(nuclear fragmentation)된다. 또한 endonuclease의 활성화에 따른 DNA의 분해가 일어나는 등의 생화학적 변화도 나타난다. 한편 비스포스포네이트에 의한 세포의 자멸은 대식세포(macrophage)와 다발성골수종 세포에서도 관찰할 수 있다. 비스포스포네이트가 어떻게 해서 파골세포를 자멸시키는지 완전한 기전은 밝혀져 있지 않으나, 현재까지 알려진 바로는 비스포스포네이트가 파골세포의 기능과 생존에 중요한 대사경로를 차단하고, 이에 따른 파골세포의 기능을 억제하며, 궁극적으로는 파골세포를 자멸하도록 만드는 것으로 생각된다. 다음의 2가지 가능한 기전을 설명해 보겠다. 이 기전들은 영국의 Russell과 Rogers 등에 의해서 제시되었다.

1. 비스포스포네이트 대사물(Bisphosphonate metabolites)

비스포스포네이트 대사물은 P-C-P 구조를 가지고 있고, 이 구조는 ATP와 유사하여 ATP(Appp)의 β , γ -phosphate group을 대체하여 끼어 들어 갈 수 있다. 이

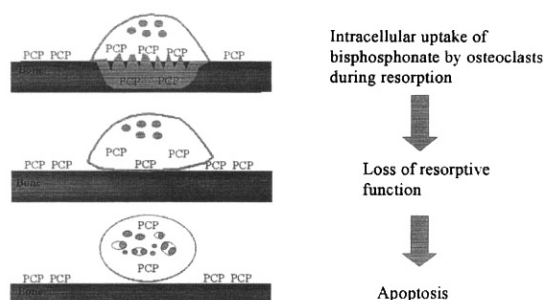


Figure 1. The route by bisphosphonates affect bone-resorbing osteoclast. Russell and Rogers. Bone 25:97, 1999

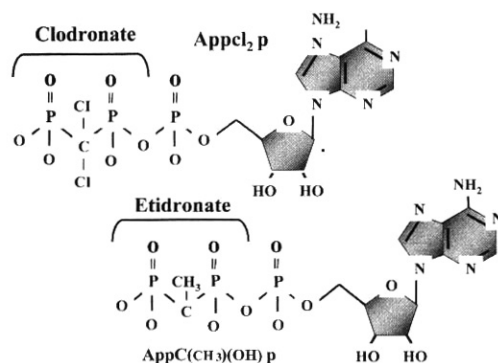


Figure 2. Structure of AppCp-type metabolites of clodronate and etidronate. Rogers et al. Bone 24 suppl:73S, 1999

렇게 되면 AppCp의 구조가 되며 가수분해가 일어나지 못해 세포내 ATP를 필요로 하는 과정에 에너지를 공급

할 수 없게된다. 이러한 과정을 일으킬 수 있는 비스포스포네이트는 에티드로네이트(etidronate)와 클로드로네이트(clodronate)이다. 비스포스포네이트가 AppCp를 구성할 수 있는 경로중 하나는 aminoacyl-tRNA synthetase를 통한 것이다. 이 효소는 아미노산을 ATP와 반응시켜 아미노산-AMP와 pyrophosphate (ppi)를 만드는데 양방향으로 가역적이므로, ppi와 유사한 pCp가 많아지면 역방향으로 반응이 일어나 아미노산과 AppCp가 만들어진다. 비스포스포네이트와 반응할 수 있는 aminoacyl-tRNA synthetase로는 Asn-, Asp-, Gly-, His-, Lys-, Phe-, Ser-aminoacyl-tRNA synthetases가 있다.

2. 메바론산 경로 (Mevalonate Pathway)

질소를 함유하는 (nitrogen-containing) 비스포스포네이트는 대사가 되지 않고 따라서 위와 같은 AppCp를 형성하지 않는다. 대신 이 계통의 비스포스포네이트는 메바론산 경로를 차단하는 것으로 밝혀지고 있다. 이 과정은 콜레스테롤 합성과정의 일부로서 여기가 차단되면 isopentenylpyrophosphate (IPP), farnesylpyrophosphate (FPP), 그리고 geranylgeranylpyrophosphate (GGPP)가 생성이 되지 않는다. 이중 FPP와 GGPP는 분자량이 작은 GTPases의 prenylation에 필요하다 Ras, Rho, Rac, 그리고 Rab 등의 GTPases C말단 부위의 cysteine 부위를 갖고 있고 여기에 FPP와 GGPP가 posttranslational modification으로서 결합하게 된다. Ras는 세포의 증식

에 관여하는데 FPP가 공급되지 않아 prenylation 되지 않으면 파골세포의 자멸을 초래할 것이다. Rho는 cytoskeletal organisation에 관여하고, Rac은 membrane ruffling에 관여하며, Rab은 membrane trafficking 과 vesicle transport에 관여한다. 이 GTPases들에 GGPP가 공급되지 않아 prenylation되지 않으며, 파골세포의 기능(골흡수 능력)이 저하될 것이다. 실제로, Van Beek 등(1999년)은 FPP 보다는 GGPP가 aminobisphosphonate의 골흡수 능력에 중요한 기전으로 생각된다고 하였다. 또한 Fisher 등(1999년)도 alendronate에 의한 파골세포의 형성저하는 GGPP가 연관되어 있으며 FPP나 squalene은 관련이 없다고 하였다. 즉, 파골세포의 형성(osteoclastogenesis)과 기능(bone resorption)에는 GGPP에 의해서 prenylation 되는 Rho, Rac, Rab 등이 관여할 가능성이 높다는 것을 뒷받침하고 있다.

한편, Coxon 등(1998년)은 파골세포의 성질을 가진 J774 대식세포에 aminobisphosphonate를 처리하였을 때 일어나는 자멸현상을 단백질합성을 억제하는 물질 cycloheximide를 동시에 처리하면 자멸을 막을 수 있다고 보고하였다. 이 실험에서 aminobisphosphonate는 세포 자멸에 동반되는 caspase activity를 증가시켰으며 cycloheximide는 caspase activity를 정상화 시켰으며, cycloheximide가 25kd이하의 small GTPases의 생성을 억제함을 보여 주어 unprenylated Ras가 많이 생성되면 세포가 자멸할 수 있다는 증거를 보여주었다.

한편, 흥미로운 사실은 HMG-CoA reductase inhibi-

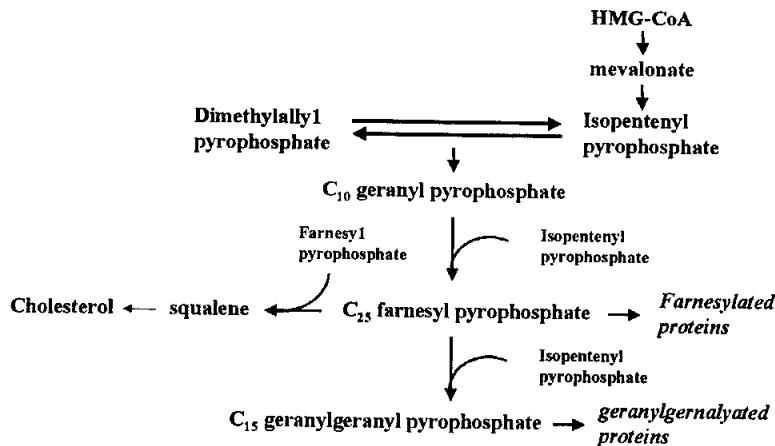
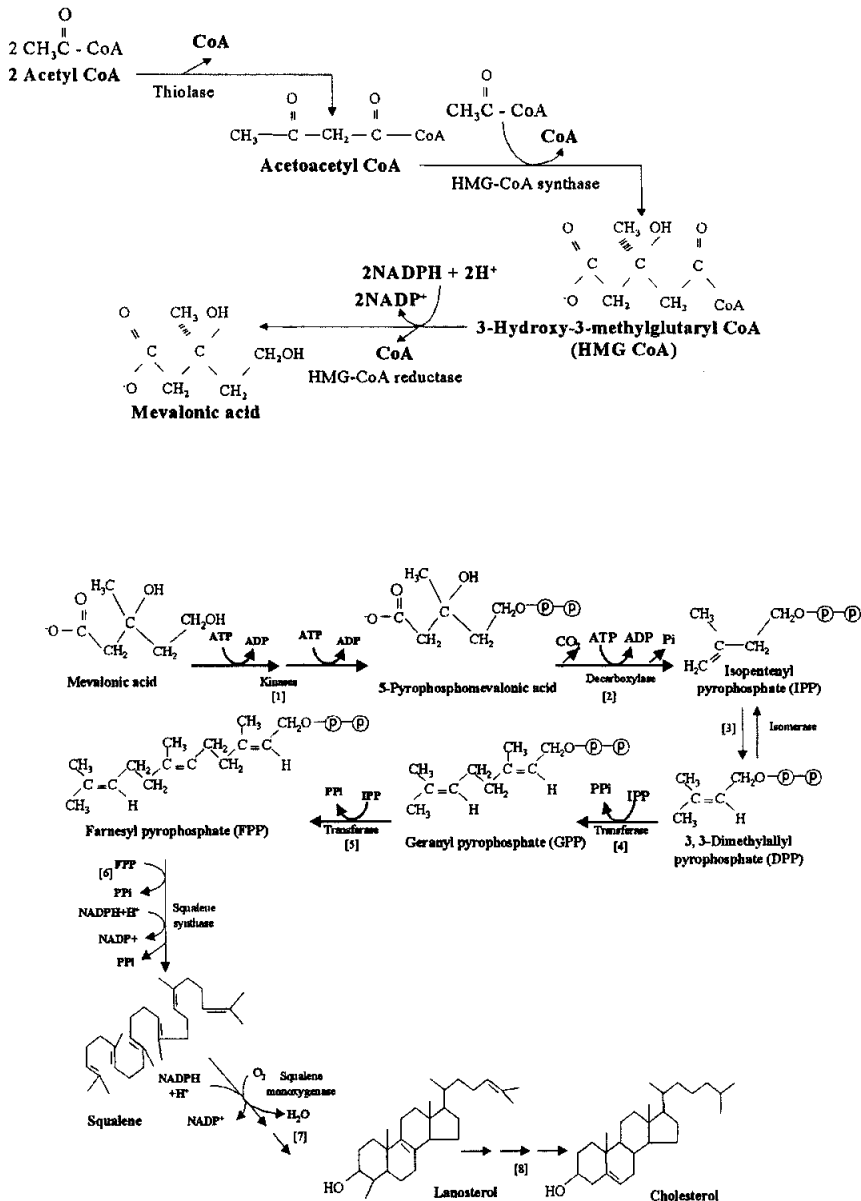


Figure 3. Schematic representation of the mevalonate pathway. Rogers et al. Bone 24 suppl:73S, 1999

tor를 처리하여도 과골세포의 활성도가 감소하며, 세포자멸을 유도할 수 있다는 것이다. Luckman 등(1998년)은 J774 대식세포에 mevastatin을 처리하면 세포자멸이 발생함을 보고하였다. 또한 여기에 mevalonate를 추가하면 세포자멸이 일어나지 않음을 관찰하여, bisphosphonate와 HMG-CoA reductase inhibitor가 같은 경로

로 작용을 나타냄을 알 수 있었다. 다만 mevastatin, lovastatin, pravastatin, simvastatin은 HMG-CoA reductase를 억제하여 mevalonate pathway의 상위과정을 차단하고, bisphosphonate는 FPP와 GGPP의 생성을 억제하는 mevalonate pathway의 하위과정을 차단하는 것으로 생각된다.



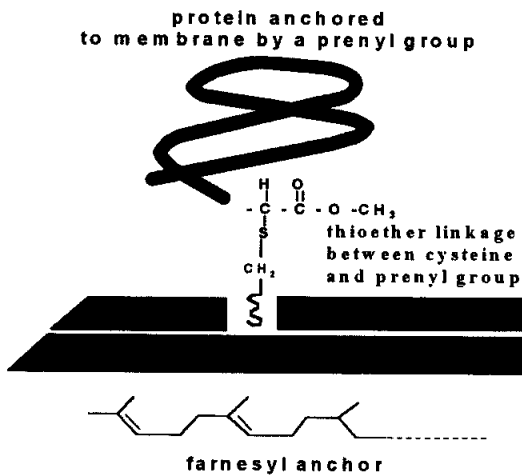


Figure 5. The covalent attachment of either of two types of lipid groups can help localize a water-soluble protein to a membrane after its synthesis in the cytosol. Prenylation : Covalent attachment of an isoprenoid lipid group to a protein

이러한 사실로 미루어 보아 HMG-CoA reductase inhibitor를 골다공증 치료에 시도할 수도 있을 것이다. 본 저자 등은 1999년 4월 춘계 대한내분비학회때 고지혈

증이 동반된 당뇨병 환자에서 HMG-CoA reductase inhibitor를 사용한 군(실험군)이 사용하지 않은군(대조군)에 비하여 약 1년후 대퇴골 경부의 골밀도가 유의하게 증가하였으며(0.853 vs 0.878 g/cm²), 대조군의 요추 골밀도가 약 1년후 의미있게 감소(1.116 vs 1.081 g/cm²)한 반면 실험군은 차이가 없었음을 보고하였다(Table 1, 2). 또한, 요추골과 대퇴골에서 골밀도가 2%이상 증가한 경우가 대조군에서는 각각 15.2%와 9.1%인 반면, 실험군에서는 30.6%와 30.6%로 의미있게 높았다.

조골세포 및 골세포(osteocyte)의 자멸과 비스포스포네이트

당질코르티코이드 유발성 골다공증(glucocorticoid-induced osteoporosis)의 최근 가설중 하나는 당질코르티코이드가 직접적으로 조골세포와 골세포의 자멸을 유도한다는 것이다. Weinstein 등(1998년)은 prednisolone을 장기간(27일)투여한 동물모델(mice)에서 조골세포의 형성(osteoblastogenesis)이 감소하였을 뿐아니라, 골조직 검사상 세포의 형태변화와 TUNEL반응으로 조골세포와 골세포의 자멸이 증가함을 보고하였다. 또한, 2명

Table 1. Comparison of bone mineral density(g/cm²) of control subjects

	Total		Male		Female	
	Before	After	Before	After	Before	After
LS	1.116 ± 0.165	1.081 ± 0.178*	1.141 ± 0.116	1.116 ± 0.130	1.092 ± 0.198	1.048 ± 0.208*
FN	0.903 ± 0.145	0.894 ± 0.146	0.904 ± 0.096	0.895 ± 0.101	0.902 ± 0.180	0.893 ± 0.178
FW	0.706 ± 0.178	0.698 ± 0.185	0.700 ± 0.144	0.684 ± 0.144	0.711 ± 0.204	0.709 ± 0.216
FTR	0.783 ± 0.142	0.775 ± 0.140	0.833 ± 0.115	0.826 ± 0.115	0.737 ± 0.148	0.726 ± 0.143
FT	0.988 ± 0.149	0.978 ± 0.148	1.015 ± 0.101	1.004 ± 0.103	0.963 ± 0.179	0.956 ± 0.177

Paired t-test : * p < 0.05 before vs. after, Values are mean ± SD.

Ls : Luvbar spine, FN : Femoral neck, FW : Femoral Ward, FTR : Femoral trochanter, FT : Femur total

Table 2. Comparison of bone mineral density(g/cm²) of treatment subjects

	Total		Male		Female	
	Before	After	Before	After	Before	After
LS	1.035 ± 0.172	1.015 ± 0.186	1.049 ± 0.172	1.051 ± 0.184	1.000 ± 0.172	0.988 ± 0.187
FN	0.853 ± 0.139	0.878 ± 0.147*	0.899 ± 0.139	0.934 ± 0.139*	0.819 ± 0.132	0.834 ± 0.143*
FW	0.674 ± 0.162	0.688 ± 0.161	0.721 ± 0.157	0.737 ± 0.155	0.638 ± 0.159	0.651 ± 0.160
FTR	0.748 ± 0.142	0.763 ± 0.163	0.801 ± 0.145	0.833 ± 0.167*	0.708 ± 0.129	0.710 ± 0.144
FT	0.954 ± 0.149	0.968 ± 0.158	0.987 ± 0.169	1.004 ± 0.174	0.930 ± 0.130	0.933 ± 0.141

Paired t-test : * p < 0.05 and * p < 0.001 before vs. after, Values are mean ± SD.

(이미덕, 정윤석 등, 대한내분비학회 1999년 제17차 춘계학술대회)

Ls : Luvbar spine, FN : Femoral neck, FW : Femoral Ward, FTR : Femoral trochanter, FT : Femur total

의 prednisone을 투여한 사람에서도 골조직 검사상 비슷한 변화인 조골세포와 골세포의 자멸을 관찰할 수 있었다고 하였다.

한편, Plotkin 등(1998년)은 골세포주인 MLO-Y4를 이용하여 dexamethasone을 처리하였을 때 증가하는 세포자멸을 비스포스포네이트인 alendronate, pamidronate, 또는 olpadronate를 전처치함으로써 방지할 수 있었다고 보고하였다.

REFERENCES

- 1) 이미덕, 이성규, 이수진, 채봉남, 홍은경, 김윤정, 노혜림, 정윤석, 김현만 : *HMG-CoA reductase inhibitor*가 제2형 당뇨병 환자의 골밀도에 미치는 영향. 대한내분비학회 제 17차 학술대회. p53, 1999
- 2) Coxon FP, Benford HL, Russell RGG, Rogers MJ: *Protein synthesis is required for caspase activation and induction of apoptosis by bisphosphonate drugs. Molecular Pharmacology* 54:631-638, 1998
- 3) Fisher JE, Rogers MJ, Halasy JM, Luckman SP, Hughes DE, Masarachla PJ, Wesolowsk G, Russell RGG, Rodan GA, Reszka AA: *Alendronate mechanism of action: Geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. Proc Natl Acad Sci* 96:133-138, 1999
- 4) Noble BS, Stevens H, Loveridge N, Reeve J: *Identification of apoptotic changes in osteocytes in normal and pathological human bone. Bone* 20:273-282, 1997
- 5) Plotkin LJ, Bellido T, Bonewald L, Papapoulos SE, Jilka RL, Manolagas SC: *Bisphosphonates prevent glucocorticoid-induced apoptosis of osteocytes in vitro: A putative mechanism influencing mechanosensing. ASBMR-IBMS Second Joint Meeting. Bone* 23 Suppl:S157, 1998
- 6) Rogers MJ, Frith JC, Luckman SP, Coxon FP, Benford HL, Monkkonen J, Auriola S, Chilton MK, Russell RGG: *Molecular mechanism of action of bisphosphonates. Bone* 24 suppl:73s-79s, 1999
- 7) Russell RGG, Rogers MJ: *Bisphosphonates: From the laboratory to the clinic and back again. Bone* 25:97-106, 1999
- 8) Van Beek E, Lowik C, Van Der Pluijm G, Papapoulos S: *The role of geranylgeranylation in bone resorption and its suppression by bisphosphonates in fetal bone explants in vitro: A clue to the mechanism of action of nitrogen-containing bisphosphonates. J Bone Miner Res* 14:722-729, 1999
- 9) Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC: *Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. J Clin Invest* 102:274-282, 1998