

난소 절제 백서에서 유전자 재조합 인간 부갑상선 호르몬(1-84) 투여 중단 후의 인카드로네이트 순차적 치료가 골량 및 골질에 미치는 효과

연세대학교 의과대학 내과학교실1, 아주대학교 의과대학 정형외과학교실2

이유미¹ · 윤종찬¹ · 백명현² · 원예연² · 임승길¹

Effect of Sequential Therapy with Incadronate after Withdrawal of Recombinant Human Parathyroid Hormone (1-84) on Bone Quantity and Quality in Ovariectomized Rats

Yumie Rhee¹, Jong Chan Youn¹, Ye-Yeon Won², Myong-Hyun Baek², Sung-Kil Lim¹

Department of Internal Medicine¹, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

Department of Orthopaedic Surgery², College of Medicine, Ajou University, Suwon, Korea

ABSTRACT

Background: Human parathyroid hormone (hPTH) is a promising anabolic agent. However, since hPTH (1-34) is available only via injection, and has a critical side effect of causing bone tumors during life-long administration in the rat, it would be practical to use PTH for the shortest possible duration to obtain the maximal effect. In addition, acquired bone mass due to hPTH tend to decrease after drug cessation. To determine the effectiveness of the osteoporosis-reversing concept of lose, restore, and maintain (LRM), recombinant human PTH(1-84) [rhPTH(1-84)] and the respective anti-resorptive agents were sequentially studied.

Methods: Thirty six, 20-week-old, Sprague-Dawley rats were used in this study. Treatment was started on the 25th week after an ovariectomy, which had been performed at 20 weeks of age, with 5 weeks of rhPTH (1-84) 100 (μg/kg/d), 5 days/wk, followed by the respective sequential therapies for 5 weeks as follows:

1) Ovariectomized rats (OVX, n=6), 2) Sham operated rats (SHAM, n=6), 3) OVX rats with PTH maintenance (PTH-M, n=6), 4) OVX rats treated with PTH then withdrawn (PTH-W, n=6), 5) PTH-treated OVX rats then treated with 17β-estradiol (PTH-E, 10 μg/d, SQ, 5 days/wk, n=6), 6) PTH-treated OVX rats then treated with incadronate (PTH-I, 3 mg/kg, per os 5 days/wk, n=6). The bone mineral density (BMD) of the right femurs was measured using dual x-ray absorptiometry (DXA). Microcomputed tomography (μCT) was used to measure the structural parameters of the 2nd lumbar vertebrae. A three-point bending test of the femur and compressive tests of vertebrae were also performed.

Results: Bone quantity data showed that the femoral BMD was significantly higher in the PTH-M and PTH-I groups than in the OVX and PTH-W groups ($P < 0.05$). Measurement of the cortical thickness revealed that only the PTH-M group had a significant increase ($P = 0.001$). The ultimate force (Fu) at the midshaft of the femur was stronger in the PTH-M group than in the OVX group ($P < 0.001$). However, no significant difference was found among the treated groups.

Conclusion: PTH withdrawal resulted in the loss of the acquired BMD, but sequential therapy with the anti-resorptive, incadronate, prevented further bone loss. The use of incadronate after rhPTH(1-84), as a sequential regimen, was significantly effective on the maintenance in the bone mass, but further clarification in the improvement in the bone quality is needed (J Kor Soc Endocrinol 20:334~343, 2005).

Keywords: Osteoporosis, Sequential therapy, rhPTH(1-84), Incadronate, Microcomputed tomography

접수일자: 2005년 1월 18일

통과일자: 2005년 5월 24일

책임저자: 임승길, 연세대학교 의과대학 내과학교실

서 론

골다공증은 골량의 감소와 골 미세구조의 악화로 정의되며 골 취약성이 증가하고 골절의 위험성이 증가하는 질병이다[1]. 골 강도(bone strength)는 최고 새롭게 중요시되는 개념으로 골다공증의 주요한 합병증인 골절은 이러한 골 강도의 감소에 의하여 발생한다[2]. 따라서 골다공증의 효과적인 치료를 위해서는 전반적인 골 강도의 개선이 동반되어야 하며, 여러 가지 골형성 촉진제 중에서 가장 유망한 약제로는 인간 부갑상선 호르몬(human parathyroid hormone)을 들 수 있다.

부갑상선 호르몬은 칼슘 대사의 주요한 조절인자이지만 이러한 역할 이외에도 골형성 촉진제로서의 기능이 이미 1932년부터 알려져 왔고, 최근에는 이러한 용도로 미국 식품 의약청의 승인을 받았다[3]. 부갑상선 호르몬의 골형성 촉진 작용에 관한 보고는 이미 여러 차례 있었는데, 특히 해면골에서 골량을 증가시키며 골강도도 향상시키는 것이 백서, 토끼, 원숭이, 그리고 최근에는 생쥐에서도 증명된 바 있다[4~8].

골량과 골강도를 증가시키는 부갑상선 호르몬의 이러한 작용을 이용하여 골다공증 환자에서 골형성 촉진제로 사용하는 것이 착안되었다. 임상적으로 부갑상선 호르몬은 펩타이드로 구성되어 있어 소화관 내에서 쉽게 분해되므로 주사제로만 사용해야 하는 단점이 있다. 6 주령의 Fisher 344마리의 백서에 고용량의 인간 부갑상선 호르몬을 일생에 해당하는 18~24개월간 장기 투여한 결과 골육종이 발생하였고[9], 또한 원발성 부갑상선 기능항진증과 골육종간의 연관 관계가 있을 수 있다는 최근의 보고가 있어 부갑상선 호르몬을 장기간 사용하는 것에 대한 우려가 있었다[10]. 또한 인간 부갑상선 호르몬을 투여할 경우 해면골의 골량은 증가하지만 피질골이 감소하는 피질골 이탈 현상(cortical steal phenomenon)이나 피질골의 다공성(cortical porosity)이 발생할 수도 있다[11]. 만일 피질골 부위 중 골막부위(periostrum)가 실제로 감소한다면 비록 골내막(endosteum)이 증가한다 하더라도 오히려 골절의 위험도가 더 높아질 수도 있으나, 실제 부갑상선호르몬의 피질골 다공성은 주로 골내막에 발생한다고 한다. 그렇다 하더라도 피질골의 다공성을 최소화하고, 골형성 촉진제로서의 원래 작용을 최대화하기 위해서는 부갑상선 호르몬을 제한된 기간 동안에만 신중하게 투여하는 것이 바람직하겠다. 그러나 인간 부갑상선 호르몬 투여를 도중에 중단할 경우 증가되었던 골량이 다시 감소하는 현상이 보고되었다[7,12,13]. 부갑상선 호르몬을 투여한 후에 골흡수 억제제를 연이어 사용하는 것이 두 가지 측면에서 좋은 대안으로 생각된다. 우선 재조합 인간 부갑상선 호르몬의 용량과 투여 기간을 줄일 수 있으며, 다음으로 부갑상선 호르몬 치료 동안에 발생 가능성이 있는 피

질골의 다공성을 회복할 수 있다[4,7]. 난소 절제 백서에서 유전자 재조합 인간 부갑상선 호르몬(1-84) 투여 중단 후 졸레드로네이트(zoledronate)의 순차적 치료로 상당히 의미 있는 유지 효과를 보았다[14].

본 연구에서는 골다공증 치료의 측면에서 감소, 회복, 유지라는 개념(lose, restore, and maintain, LRM)의 효용성을 인카드로네이트(incadronate)를 이용하여 확인해 보고자 하였다. 감소된 골량의 회복을 위해서는 재조합 인간 부갑상선 호르몬(1-84)을 사용하였고, 추가적인 유지를 위해서는 17β -estradiol과 인카드로네이트를 이용하였다. 또한 부갑상선 호르몬 치료 후의 추가적인 치료가 양적인 면뿐만 아니라 질적인 면에서도 효과적인지를 확인하기 위하여 골밀도 검사 이외에도 생역학 검사(biomechanical test)와 미세전산화 단층촬영술(microcomputed tomography, μ CT)을 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물(Animals)

36마리의 5개월 된 Sprague-Dawley 처녀 암컷 백서를 연세 임상의학 연구 센터 실험 동물부(서울, 대한민국)를 통하여 구입하였다. 실험동물은 12시간 간격의 조명 주기와 22.2°C 로 유지되는 공간에서 사육되었다. 물과 사료는 자유롭게 제공되었으며 사료는 1 g당 1.17%의 칼슘과 0.77%의 인산, 2.6 IU의 비타민 D가 포함된 Purina laboratory rodent chow (Hagribbrand Purina Co., 군산, 대한민국)를 사용하였다. 동물 실험에 있어서의 모든 과정은 연세대학교의 실험 동물 관리 규정을 준수하였다. 실험 동물은 생후 5개월 때에 각 6마리 씩 총 6군으로 무작위 배분되었고 한 우리 당 두 마리씩 길러졌다. 위장 수술을 한 군(SHAM)과 난소 절제술을 시행한 군(OVX)은 수술 후 5주부터 10주간 식염수만 피하 주사로 투여되었다. 나머지 네 군에 속하는 백서들은 모두 생후 5개월 때에 난소 절제술을 시행받았고 수술 후 5주부터 그 다음 5주간 동안 유전자 재조합 인간 부갑상선 호르몬(1-84) [rhPTH (1-84)]을 투여 받았고 이후에 추가 치료 여부 및 방법에 따라 각기 다른 군으로 나누었다. 한 군은 rhPTH(1-84) 투여를 5주간 더 지속하였고(PTH-M), 다른 한 군은 rhPTH(1-84) 사용 중지에 따른 현상을 확인하기 위하여 후반부 5주는 식염수만 투여하였다(PTH-W). 나머지 두 군은 rhPTH(1-84) 투여 후 추가적으로 골흡수 억제제를 투여한 경우로 한 군은 17β -estradiol (PTH-E)을 다른 군은 인카드로네이트(PTH-I)를 투여하였다. 부갑상선 호르몬 치료는 목암연구소에서 기증 받은 유전자 재조합 인간 부갑상선 호르몬(1-84)을 0.9% 생리 식염수에 녹여 1주일에 5일간, 100 $\mu\text{g/kg/d}$ 의 용량으로 피하 주사하였다. 대조군에서는 동량의 0.9% 생리 식염수를 같은 간격으로

Table 1.

Groups	Time after ovariectomy (weeks)		
	0	5	10
SHAM	sac
OVX	sac
PTH-M	sac
PTH-W	sac
PTH-E	sac
PTH-I	sac

Footnote: sac (sacrifice), small dotted line (no treatment), bold line (rhPTH(1-84) treatment), large dotted line (vehicle treatment), broken line with one dot (17 β -estradiol treatment), broken line with two dots (incadronate treatment)

파하 주사하였다. 17 β -estradiol (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)은 난소 절제된 백서에서 골감소증을 예방한다고 알려진 용량인 10 μ g/kg/d를 1주일에 5일간 투여하였다[15, 16]. 인카드로네이트 (Yamanouchi Pharmaceutical, 동경, 일본)는 매일 3 mg/kg의 용량으로 위 영양관을 통해 투여하였다. 요약한 실험 프로토콜은 Table 1과 같다. 총 10주간의 투여기간이 끝난 후에 모든 백서는 희생되었고 대퇴골과 척추를 채취하여 분석 시점까지 생리 식염수에 적신 거즈에 싸서 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

2. 골밀도 검사 (Bone densitometry)

절제된 오른쪽 대퇴골의 골밀도는 dual energy X-ray absorptiometry (DXA, QDR-4500A, Hologic, Waltham, MA, USA)를 사용하여 측정하였다. 대퇴골은 0.5 mm의 분해능으로 2 mm/sec의 스캐닝 속도로 스캔하였고, 상기 부위에서 골 무기질 함량 (Bone Mineral Content, BMC)과 골밀도 (Bone mineral density, BMD), 투사된 골면적을 측정하였다. 다섯 가지 서로 다른 대퇴골을 5회 재배열하여 얻은 측정치의 분산 계수 (coefficient of variation)는 0.59%였다.

3. 미세 전산화 단층 촬영술 (microcomputed tomography, μ CT)

본 실험을 위한 미세 전산화 단층 촬영기계와 소프트웨어는 Skyscan (Antwerpen, Belgium)을 사용하여 이전에 기술된 바와 같은 방법으로 측정하였다[19]. 이러한 방법을 통하여 난소절제백서의 제 2요추부의 척추체를 대상으로 분석했으며, 해면골의 골 부피 (Bone Volume, BV), 부피 분획 (Volume Fraction, Vol. F), 해면골 두께 (Trabecular Thickness, Tb. Th.), 해면골 분리 정도 (Trabecular Separation, Tb. Sp.), 골 부피당 표면적, 해면골 수 (Trabecular Number,

Tb. N.), 비등방 정도 (Degree of Anisotropy, DOA), 그리고 구조적 모델 계수 (Structural Model Index, SMI)를 측정하였다.

4. 생역학적 분석 (Biomechanical Analyses)

대퇴골의 피질골 두께는 중앙부 단면에서 앞뒤로 가장 긴 내경과 그 중심으로 90도 각도의 내경을 측면내경으로 해서 4군데의 두께를 측정하여 평균값을 분석에 이용하였다. 대퇴골은 분석 전에 모두 해동 과정을 거쳤고, 대퇴골 전체의 골강도를 측정하기 위하여 삼중점 굴곡 시험을 시행하였다. 부하는 15 mm 간격으로 떨어진 두 지지점의 중간 부위에 주었다. 원위부 오금 공간으로부터 7.5 mm 되는 지점이 부하점이 되도록 대퇴골을 배치하였고 내외축 (medial-lateral axis)을 기준으로 굴곡을 주었다. 부하-변위 곡선은 Servo-hydraulic material testing machine (Instron LTD, Buckinghamshire, England)과 X-ray recorder (Hewlett Packard 7090A, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 1 mm/sec의 크로스헤드 속도로 측정되었다.

L2척추의 골 강도를 측정하기 전에 diamond wafering saw (Buehler Isomet, Evanston, IL)를 사용하여 척추뼈 뒤 돌기를 모두 제거한 후, 척추 중앙 부의 양쪽 끝을 평행하게 만들었다. Instron 기계를 이용하여 50 N/sec의 부하율로 압축력을 가하는 상태에서 각 척추의 생역학 계수들을 측정하였다.

5. 통계분석

모든 수치는 평균과 표준 편차로 나타내었고, 통계학적 분석을 위하여는 SPSS 10.0 software (Chicago, Illinois, USA)를 사용하였다. 골밀도, 피질 두께, 그리고 여러 미세 구조적 수치들과 생역학적 수치들의 차이는 ANOVA with

- 이유태 외 4인: 난소 절제 백서에서 유전자 재조합 인간 부갑상선 호르몬(1-84) 투여 중단 후의 인카드로네이트 순차적 치료가 골량 및 골질에 미치는 효과 -

a Bonferroni's multiple group comparison procedure를 사용하여 비교하였다. P 값은 0.05미만일 때 통계학적으로 의미 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 골밀도

위장 수술만을 시행한 군(SHAM)에 비하여 난소 절제술을 시행한 군(OVX)에서 오른쪽 대퇴골의 골밀도가 8% 더

낮았다($P < 0.05$) [Fig. 1]. rhPTH (1-84)투여 5주 후 중단한 군(PTH-W)에서는 골밀도가 SHAM 군과 차이가 없었으며, OVX 군에 해서는 높은 경향을 보였다. rhPTH(1-84) 투여를 10주간 지속한 군(PTH-M)에서는 골밀도에서 유의한 차이가 있었는데 OVX군에 비하여는 15.4% ($P < 0.001$), PTH-W나 PTH-E 군에 비하여는 각각 9.0%, 8.8% ($P < 0.05$) 더 높은 것으로 확인되었다. rhPTH (1-84) 후 17β -estradiol을 투여한 군은(PTH-E) PTH-W 군과 비슷한 수준이었다. 반면에 rhPTH(1-84) 후 인카드로네이트를 투여한

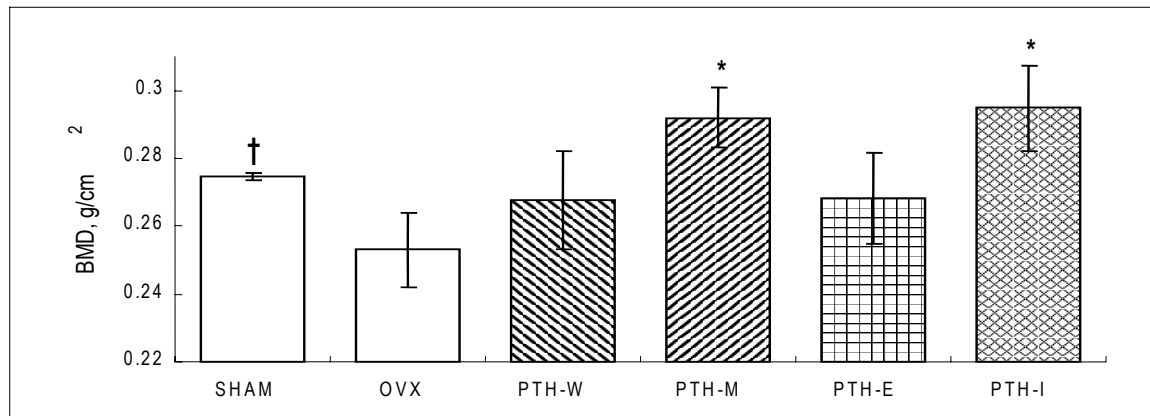


Fig. 1. Bone mineral density (BMD, g/cm³) of the right femur. *: $P < 0.003$ vs. OVX, PTH-W & PTH-E, †: $P < 0.05$ vs. OVX

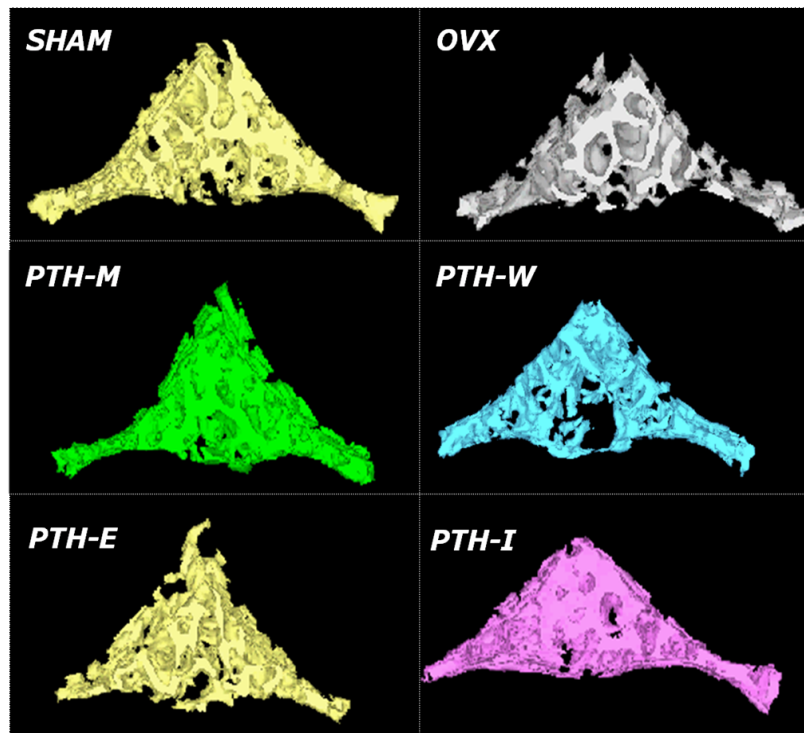


Fig. 2. Three-dimensional trabecular microstructures of L2 vertebral body from each group.

Table 2. Effects of Sequential Therapy After RhPTH(1-84) Treatment on the Microstructural Parameters of L2 Vertebrae

	BV	Vol.F	Surface/volume	Tb.Th	Tb.Sp	Tb.N	DOA	SMI
SHAM	0.23 ± 0.04 ^o	39.9 ± 6.8 ^o	29.1 ± 2.0	0.13 ± 0.006 ^{o,w}	0.15 ± 0.03	3.5 ± 0.3 ^{o'}	0.24±0.02	1.31 ± 0.14 ^{o'}
OVX	0.15 ± 0.03	25.9 ± 5.3	33.3 ± 2.4	0.11 ± 0.005	0.18 ± 0.17	3.4 ± 0.07	0.23±0.03	1.79 ± 0.14
PTH-M	0.29 ± 0.04 ^{o,w,e}	50.4 ± 6.9 ^{o,w,e}	23.1 ± 1.4 ^{o,w,e, s'}	0.14 ± 0.01 ^{o,w,e}	0.15 ± 0.05	3.3 ± 0.4	0.24±0.02	1.13 ± 0.16 ^{o'}
PTH-W	0.18 ± 0.02	30.4 ± 3.2	31.7 ± 1.9	0.12 ± 0.006	0.17 ± 0.07	3.5 ± 0.6	0.32±0.02	1.58 ± 0.14
PTH-E	0.16 ± 0.05	28.1 ± 7.9	35.3 ± 5.6 ^{s'}	0.11 ± 0.01	0.18 ± 0.03	3.4 ± 0.4	0.26±0.02	1.74 ± 0.12
PTH-I	0.23 ± 0.07 ^o	42.8 ± 11.1 ^o	41.3 ± 3.6 ^{o,w,s,e}	0.13 ± 0.02 ^{o'}	0.20 ± 0.04 ^{s'}	3.0 ± 0.3 ^{o,w,s,e}	0.27±0.03	1.45 ± 0.17 ^{o'}

Footnote:

Results are presented as the mean ± SD.

BV (Bone Volume, mm³), Vol. F (Volume Fraction, %), Surface/volume (1/mm), Tb.Th (Trabecular Thickness, mm), Tb.Sp (Trabecular Separation, mm), Tb.N (Trabecular Node Number), DOA (Degree of Anisotropy), SMI (Structure Model Index)

o: $P < 0.001$ vs. OVX, w: $P < 0.01$ vs. PTH-W, e: $P < 0.05$ vs. PTH-E, s: $P < 0.001$ vs. SHAM, o': $P < 0.05$ vs. OVX, s': $P < 0.05$ vs. SHAM

Table 3. Changes in the Biomechanical Parameters of the Femur after Various Treatment Modality

group	F _u (N)	I (mm ⁴)	σ _u (N/mm ²)	S (N/mm)	E (N/mm ²)	ε _u
SHAM	177.8 ± 11.9 ^o	7.7 ± 0.9	888.4 ± 142.6	235.6 ± 20.9 ^o	2260.9 ± 303.5 ^o	0.31 ± 0.13
OVX	139.8 ± 21.0	7.2 ± 1.0	653.3 ± 196.8	160.9 ± 13.9	1728.9 ± 235.5	0.23 ± 0.02
PTH-M	212.1 ± 11.4 ^{o,s}	7.7 ± 0.9	1050.2 ± 205.9 ^{o,s'}	284.0 ± 12.9 ^o	2633.8 ± 323.8 ^o	0.22 ± 0.04
PTH-W	203.2 ± 22.3 ^o	7.4 ± 0.7	959.8 ± 228.2	263.5 ± 16.9 ^o	2530.1 ± 196.3 ^{o'}	0.23 ± 0.02
PTH-E	205.9 ± 15.8 ^o	7.5 ± 0.6	984.0 ± 165.8	261.7 ± 18.4 ^o	2474.8 ± 301.6 ^{o'}	0.23 ± 0.02
PTH-I	181.5 ± 21.9 ^o	7.7 ± 1.6	929.7 ± 310.8	260.1 ± 18.9 ^o	2500.2 ± 67.7 ^{o'}	0.25 ± 0.03

Footnote:

Data are shown as the mean ± SD.

The cortical bones of the femora diaphysis were examined using the three-point bending test to measure the ultimate force (Fu), ultimate stress (σ_u), stiffness (S), Young's modulus (E) and ultimate strain (ε_u). I denotes the moment of inertia.

o: $P < 0.0001$ vs. OVX, s: $P < 0.05$ vs. SHAM, o': $P < 0.05$ vs. OVX

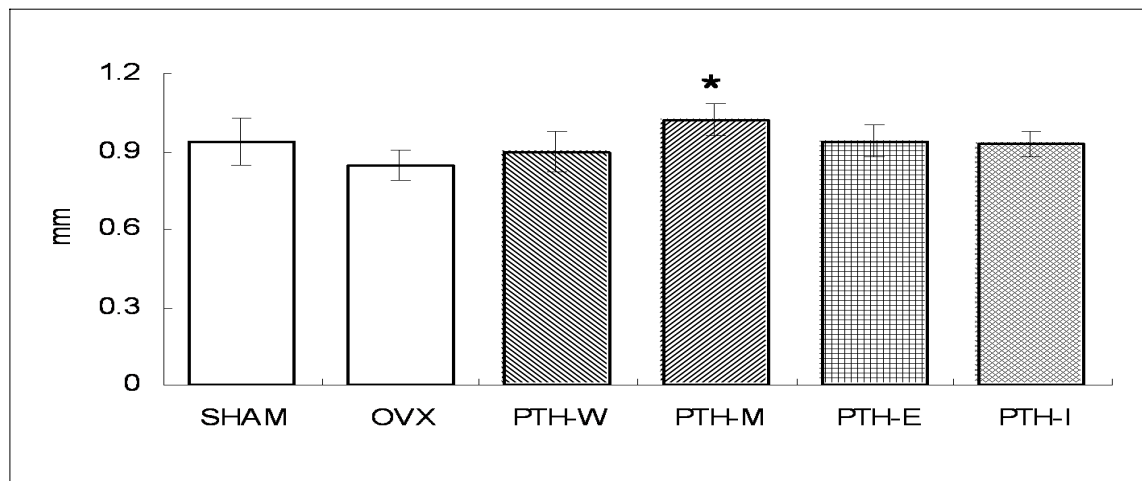


Fig. 3. Cortical thickness of the mid-diaphysis of the femur. *: $P = 0.001$ vs. OVX

경우는(PTH-I) OVX군에 비하여는 16.5% ($P < 0.001$), PTH-E나 PTH-W군에 비하여는 각각 10.1%, 9.9% ($P < 0.003$)로 유의하게 더 높은 것으로 확인되었다.

2. 미세골구조 (microarchitecture)

Fig. 2는 각 군에서 L2 척추뼈의 3차원적인 미세 해면골 구조를 보여 주고 있다. rhPTH(1-84) 투여를 받은 군 (PTH-

- 이유미 외 4인: 난소 절제 백서에서 유전자 재조합 인간 부갑상선 호르몬(1-84) 투여 중단 후의 인카드로네이트 순차적 치료가 골량 및 골질에 미치는 효과 -

Table 4. Changes in the Biomechanical Parameters of the Lumbar Vertebrae after Various Treatment Modality

group	Fu (N)	σ_u (N/mm ²)	S (N/mm)	E (N/mm ²)	ϵ_u
SHAM	249.2 ± 73.4	26.7 ± 19.3	1007.9 ± 462.4	597.1 ± 384.3	0.08 ± 0.04
OVX	212.7 ± 19.6	19.0 ± 13.2	1024.2 ± 324.2	640.6 ± 451.6	0.06 ± 0.005
PTH-M	302.9 ± 82.8	35.9 ± 9.1	1726.6 ± 895.2	1060.6 ± 531.9	0.06 ± 0.02
PTH-W	207.2 ± 16.7	20.9 ± 14.7	1008.7 ± 124.6	536.7 ± 384.2	0.06 ± 0.02
PTH-E	176.6 ± 10.9	18.7 ± 11.3	1060.9 ± 337.2	580.5 ± 387.5	0.08 ± 0.02
PTH-I	218.8 ± 18.3	28.4 ± 9.4 ^o	1587.3 ± 847.1	1109.4 ± 613.3	0.07 ± 0.02

Footnote:

Data are shown as the mean ± SD.

L2 vertebrae were loaded to failure in compression, to measure the ultimate force (Fu), ultimate stress (σ_u), stiffness (S), Young's modulus (E) and ultimate strain (ϵ_u)

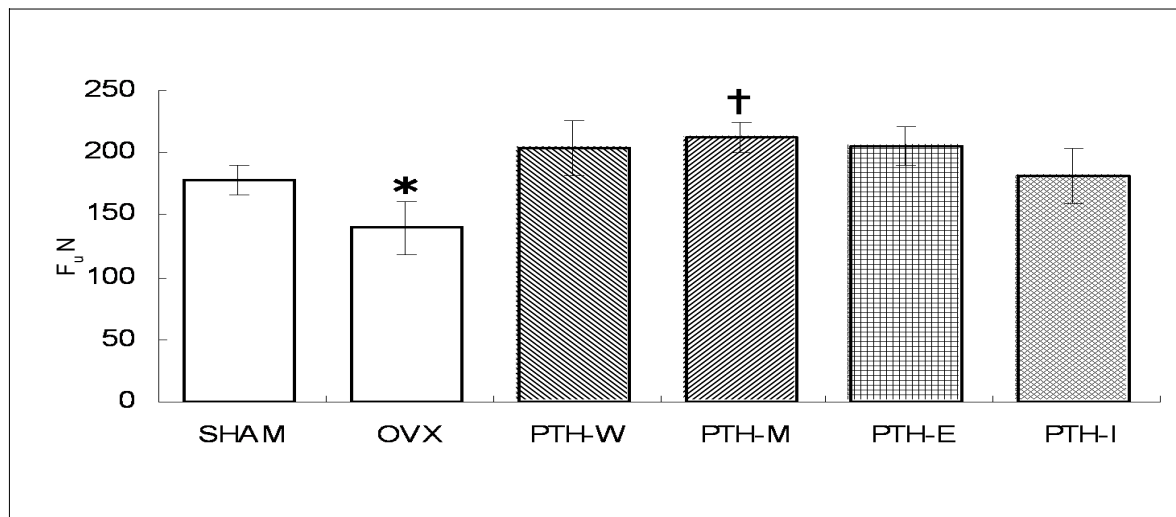


Fig. 4. Fmax of right femur. *: $P < 0.005$ vs. all other groups, †: $P = 0.03$ vs. SHAM, $P = 0.089$ vs. PTH-I

M)에 비하여 OVX군에서 골 미세 구조의 약화가 두드러지게 나타났다. 그러나 골 미세 구조가 회복되는 것은 PTH-M 군과 PTH-I 군에서만 관찰되었다.

Table 2는 OVX 군을 포함한 여러 군에서 제 2요추부 미세 구조의 지표들을 측정된 결과이다. SHAM 군과 비교하였을 때 OVX 군에서 골 부피 (BV)와 부피 분획 (Vol.F.)이 각각 53.3%, 54.9%로 더 낮은 것으로 확인되었다 ($P < 0.001$). PTH-M 군과 OVX 군을 비교하였을 때에는 PTH-M 군에서 골 부피 (BV)와 부피 분획 (Vol.F.)이 각각 93.3%, 94.6%로 더 높았다 ($P < 0.001$).

PTH-W 군이나 PTH-E 군에서는 이러한 지표들이 OVX 군과 통계학적으로 차이가 없는 것으로 확인되었다. PTH-I 군의 경우에는 골 부피 (BV)와 부피 분획 (Vol.F.)이 OVX 군에 비하여 각각 53.3%, 65.3% ($P < 0.001$) 높은 것으로 나타났으나, PTH-W 군이나 PTH-E 군과 비교하였을 때에는 통계학적으로 의미 있는 차이는 없었다.

해면골 두께 (Tb. Th.)에 있어서도 PTH-M 군이 OVX 군

이나 PTH-W 군, PTH-E 군에 비하여 각각 27.3%, 16.7%, 27.3% ($P < 0.001$) 더 두꺼운 것으로 확인되었다. PTH-I 군도 OVX 군에 비하여 18.2% 정도 더 두꺼웠다 ($P < 0.05$). 그러나 PTH-I 군에서는 해면골 분리 정도 (Tb. Sp.)나 비등방 정도 (DOA), 구조적 모델 계수 (SMD)에 있어서 의미 있는 개선 효과를 보여 주지는 못하였다.

3. 생역학적인 특성 (Biomechanical properties)

대퇴골의 피질골 두께는 PTH-M 군에서만 의미 있게 증가하였다 ($P < 0.05$) [Fig. 3].

대퇴골 골간 중앙 부위에서 삼중점 굴곡 검사를 시행하였다 [Table 3]. 유전자 재조합 인간 부갑상선 호르몬(1-84)을 10주간 치료받은 군 (PTH-M)에서 궁극력 (ultimate force, F_u) (Fig. 4)과 경직도 (stiffness, S)가 OVX 군에 비하여 의미 있게 높았으며 ($P < 0.001$), 궁극 부하 (ultimate stress, σ_u), Young's modulus (E)도 OVX 군보다 높은 것으로 확인되었다 ($P < 0.05$). 그러나 PTH-M 군과 나머지 순차적 치료

를 시행한 군들과는 유의한 차이를 보이지는 않았다. 요추의 역학적 특성은 압박 시험을 통하여 측정하였으나 [Table 4], 각 실험 군간의 통계학적으로 의미 있는 차이는 없었다.

고 찰

골다공증을 정의하는 데에 있어서 최근에는 골량의 감소보다 골강도의 약화에 더 비중을 두고 있다[2]. 골강도는 대부분 뼈의 양적인 부분에 의해 결정되지만 질적인 부분도 약 30% 정도 기여하는 것으로 알려져 있다. 질적인 부분이 중요하다는 것은 골흡수 억제제를 사용할 경우 골밀도의 개선은 제한적이지만 골절의 위험은 상대적으로 더 많이 감소한다는 점에서 확인할 수 있다. 그러나 골흡수 억제제를 오래 사용할 경우 골 재형성이 심각하게 감소하고 미세 손상이 축적되어 골 강도의 약화로 결국 골절 위험을 증가시킬 수 있다는 의견도 있다[20,21].

2002년 미국 식품 의약청에 의해 골형성 촉진제로 유일하게 승인된 유전자 재조합 인간 부갑상선 호르몬(1-34)은 골 형성을 촉진하여 매우 효과적으로 골 강도를 개선시킨다. 그러나 부갑상선 호르몬을 치료제로 사용하는 데에는 몇 가지 제한점이 있다. 우선 첫째로 펩타이드 호르몬 제제이므로 소화관 내에서는 쉽게 분해되기 때문에 환자에게 불편하더라도 피하 주사로 투여할 수밖에 없고, 두 번째는 비용이 매우 비싸다는 단점이 있다. 세 번째는 골육종의 발생 가능성에 대한 위험성으로, 백서에서 평생 동안 부갑상선 호르몬(1-34)을 투여한 경우 골육종이 발생하였고[9], 원발성 부갑상선 기능 항진증과 골육종과 연관 관계가 있다는 증례 보고[10]가 최근에 있었다. 그러므로 골량의 증가를 위해 부갑상선 호르몬을 단기간 동안에만 사용한 후에는 이미 알려진 골흡수 억제제를 연이어 사용하는 방법이 하나의 대안이 될 수 있다.

이에 본 연구에서는 Tang 등[15]의 “감소, 회복, 유지 (lose, restore, and maintain, LRM)”라는 개념을 이용하여 골형성 촉진제 투여에 이은 골흡수 억제제의 순차적 유지 요법에 대한 효과를 확인하고자 하였다. 골의 ‘감소’유도를 위해서 5개월 된 백서의 난소를 제거하여 약 5주간 에스트로겐 결핍상태를 유도함으로써 골감소증이 발생하도록 하였다[22]. 감소된 골을 ‘회복’시키기 위해서는 5주간 재조합 인간 부갑상선 호르몬(rhPTH, 1-84)을 투여하였다. rhPTH (1-34)의 경우, 골모세포와 골세포의 세포 고사(apoptosis)를 억제하지만 rhPTH(1-84)의 경우에는 카르복시 말단이 c-PTH fragments와 결합하는 골세포 수용체(CPTRs)에 작용하여 세포 고사를 촉진시켜 종양 발생 가능성을 낮출 수 있어[23] 이 제제를 사용하게 되었다. 실제로 최근 rhPTH (1-84)의 경우에는 백서에게 투여하여 골육종 발생이 관찰되지 않았다[24]. 유전자 재조합 인간 부갑상선 호르

몬(1-84)치료 후, 골의 ‘유지’를 위해서는 골흡수 억제제로 알려진 17β -estradiol과 3세대 비스포스포네이트(bisphosphonate)인 인카드로네이트를 투여하여 서로의 효과를 비교하였다. 골 분석을 위해서는 DXA나 μ CT, 그리고 생역학적 검사 등을 통하여 양적인 방식뿐만 아니라 질적인 방식도 이용하여 LRM 개념의 유용성을 확인하고자 하였다. 특히 생역학 검사는 골절에 대한 골강도를 나타내 주는 가장 중요한 표지자로서 골자체의 외부강도 중 궁극력(ultimate force, F_u)과 경직도(stiffness, S)와, 골조직의 내부강도를 반영하는 궁극 부하(ultimate stress, σ_u) 및 Young's modulus (E)를 측정하여 평가하였다[20].

첫 5주간 간헐적으로 rhPTH(1-84)을 투여한 군(1주일에 5일간, 100 (g/kg/d)의 대퇴골 골밀도는 골소실이 없었던 같은 연령의 대조군인 SHAM 군과 거의 비슷한 수준으로 나타났다. 5주 동안 PTH 치료를 한 후 아무런 추가 치료 없이 중단한 PTH-W 군에서는 PTH 치료에 따른 골량 증가가 소실되었다. 그러나 추가 약제로 인카드로네이트를 투여한 PTH-I 군에서는 PTH에 의한 골량 증가의 소실을 막을 수 있었다. 에스트로겐 치료는 1주일에 5일간, 10 (g/kg/d)의 용량으로 투여하였으나 골감소 예방에는 그다지 효과적이지 않았으며 PTH-W 군과 비슷한 수준이었다. 반면에 인카드로네이트를 투여한 경우에는 부갑상선 호르몬에 의한 골량 증가가 대퇴골 골밀도 및 미세구조분석 요소 중 양적인 측면인 경우 비교적 잘 유지되었다. 흥미롭게도 단지 골밀도만을 분석한 경우에는 PTH-M 군 만큼의 유지 효과를 보였으나, 요추부 내의 질적인 요소를 반영하는 미세골구조 수치나 생역학 검사에서는 기대치에 못 미치는 결과를 보여주었다.

생역학적 분석 결과에서는 피질골이 우세한 부분인 대퇴골 골간 중앙부위에서나 해면골이 우세한 척추에서 모두 궁극력, 궁극부하, 경직도, Young's modulus가 부갑상선 호르몬 치료를 한 모든 군에서 OVX 군에 비하여 높았으나 치료 군 내에서는 유의한 차이가 없었다. 이는 치료기간이 상대적으로 짧았거나 투약 제제의 효과가 적어서, 혹은 개체간 결과의 변이 계수가 컸던 것에 기인하는 것으로 생각된다.

부갑상선 호르몬을 12~24주간 사용하여 발생한 골량의 증가가 치료 중단에 의해 역전되는 현상은 이미 여러 차례 보고된 바 있다[17,25,26]. 이는 부갑상선 호르몬의 골량 증가에 대한 작용이 지속적으로 유지되는 것이 아니라 투여가 중단되면 급격히 역전될 수 있음을 나타낸다. 게다가 부갑상선 호르몬(hPTH, 1-84) 치료 중단 5주 후부터 이미 골량과 미세 구조의 지표들이 OVX 군과 비슷한 것으로 알려져 있다. 치료 중단에 따른 이러한 골량의 감소를 막고 증가된 골량을 계속 유지하기 위해서 인간 부갑상선 호르몬(hPTH, 1-34)치료 후에 에스트로겐 수용체 선택적 조절제(Selec-

tive Estrogen Receptor Modulator, SERM) 제제나 비스포스포네이트 제제, 에스트로겐과 같은 골흡수 억제제를 사용하는 치료법에 대한 보고가 있었고, 이 중에서는 SERM 제제나 리세드로네이트(risedronate)와 같은 비스포스포네이트 제제만이 의미 있는 유지 효과를 나타냈다[17,27,28]. 본 연구에서는 인카드로네이트를 이용한 추가 치료의 효과를 확인하였다. 비록 인카드로네이트 투여로 양적인 부분에서의 개선은 분명하였으나, 골질의 면에서, 특히 생역학 검사에서 기대치에 못 미쳤다. 이전 졸레드로네이트를 순차 투여하여 얻었던 결과와는 차이를 보였고[14], 최근 인카드로네이트가 3상 연구 중 에티드로네이트 보다 골질 감소에 대한 우월한 효과를 보이지 못함으로써 중단한 것과 일치하는 결과로 볼 수 있다.

결론적으로 난소 절제술을 시행하여 골감소 상태에 있는 백서 모델에서 유전자 재조합 인간 부갑상선 호르몬(rhPTH, 1-84) 치료 후에 인카드로네이트를 투여함으로써 어느 정도의 골밀도 유지 효과는 보였으나 골 질적인 측면에서는 조금 다른 결과를 보였다. 또한, 추가 치료제로 에스트로겐을 투여한 경우에는 인카드로네이트를 투여한 경우만큼의 골량도 유지하지는 못하였다. 이러한 결과는 유전자 재조합 인간 부갑상선 호르몬(rhPTH, 1-84)을 단기간 동안 투여하여 골량을 증가시킨 후에 이를 유지하는 데에 비스포스포네이트 제제가 유용하겠으나 어떤 제제가 가장 유용할 지에 대하여는 차후 임상적인 대규모 연구가 추가적인 증거로 제시되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구에 도움을 주신 야마노우치 제약회사에 감사드립니다. 본 연구는 보건복지부 보건의료기술 연구개발사업(01-PJ1-PG1-01CH08-0001)를 기반으로 이루어 졌습니다.

요 약

연구배경: 유전자 재조합 인간부갑상선호르몬은 저용량으로 간헐적 투여시 에스트로겐 결핍 백서 및 폐경기 골다공증 여성에서 골밀도 증가 효과가 잘 알려져 있다. 그러나, 장기간 투여시 골육종이 발생된 동물실험과 인간부갑상선호르몬을 투여 중단시에는 증가했던 골밀도가 다시 가역적으로 떨어지는 것으로 보고되고 있어 단기간 투여로 골형성 촉진 후에 기존의 골흡수억제제를 유지기에 투여함으로써 증가된 골밀도를 유지하려는 시도가 있어 왔다. 본 연구에서는 인간부갑상선호르몬 투여 중단시 골에 오게 되는 영향 및 인카드로네이트를 순차적 치료시 골밀도 및 골질에 대한 강도 변화를 보고자 하였다.

방법: 5개월된 백서를 사용했으며 난소절제 5주 후부터

5주간의 PTH(1-84)를 투여하고 나머지 5주는 rhPTH(1-84)를 계속 투여하거나, 생리식염수, 17β-estradiol 또는 인카드로네이트를 투여하였다. 위장수술군, 난소절제군, 부갑상선호르몬 유지군(PTH-M), 부갑상선호르몬 투여 중단군(PTH-W), 부갑상선호르몬 투여 후 여성호르몬투여군(PTH-E) 및 부갑상선호르몬 투여 후 인카드로네이트 투여군(PTH-I)으로 나누었다. 각 약제의 투여 후 우측 대퇴부 골밀도를 측정하고 대퇴부 생역학 검사 및 척추부에 대한 미세골 구조 분석 및 생역학 검사를 시행하였다.

결과: PTH-M군에서는 예상한 대로 의미있는 골밀도 및 미세골 구조 요소들의 개선을 보여 주었다. 또한 PTH-W에서는 증가된 골량이 유지되지 못하고 골밀도가 저하되었다. PTH-I군은 난소절제군에 비해서 골밀도 및 미세골 구조상 골량이 의미있게 높았으나, PTH-E군은 PTH-W군 정도의 골밀도를 보여주었다. 흥미롭게도 PTH-I군에서 보여준 양적인 골밀도의 개선에 비해 미세골 구조 요소 중 골질을 반영하는 것들과 생역학 검사시 의미 있는 골강조 증가의 차이를 보여주지는 못했다.

결론: 부갑상선호르몬의 투여기간을 최소화하기 위해서는 단기간 투여해서 골형성을 시킨 후에는 골흡수 억제제를 순차적으로 쓰는 것이 획득한 골량을 유지하는데 어느 정도 도움이 될 것으로 보인다. 그러나, 어떤 제제가 골밀도의 양적인 증가와 동시에 골질의 개선에도 적절할 지에 대한 고찰은 더욱 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Consensus development conference: *Prophylaxis and treatment of osteoporosis*. *Am J Med* 90:107-110, 1991
2. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, March 7-29, 2000: *highlights of the conference*. *South Med J* 94: 569-573, 2001
3. Dempster DW, Cosman F, Parisien M, Shen V, Lindsay R: *Anabolic actions of parathyroid hormone on bone*. *Endocr Rev* 14:690-709, 1993
4. Kneissel M, Boyde A, Gasser JA: *Bone tissue and its mineralization in aged estrogen-depleted rats after long-term intermittent treatment with parathyroid hormone (PTH) analog SDZ PTS 893 or human PTH(1-34)*. *Bone* 28:237-250, 2001
5. Sato M, Zeng GQ, Turner CH: *Biosynthetic human parathyroid hormone (1-34) effects on bone quality in aged ovariectomized rats*. *Endocrinology* 138:4330-4337, 1997

6. Mashiba T, Burr DB, Turner CH, Sato M, Cain RL, Hock JM: *Effects of human parathyroid hormone (1-34), LY333334, on bone mass, remodeling, and mechanical properties of cortical bone during the first remodeling cycle in rabbits. Bone* 28:538-547, 2001
7. Burr DB, Hirano T, Turner CH, Hotchkiss C, Brommage R, Hock JM: *Intermittently administered human parathyroid hormone(1-34) treatment increases intracortical bone turnover and porosity without reducing bone strength in the humerus of ovariectomized cynomolgus monkeys. J Bone Miner Res* 16:157-165, 2001
8. Alexander JM, Bab I, Fish S, Muller R, Uchiyama T, Gronowicz G, Nahounou M, Zhao Q, White DW, Chorev M, Gazit D, Rosenblatt M: *Human parathyroid hormone 1-34 reverses bone loss in ovariectomized mice. J Bone Miner Res* 16:1665-1673, 2001
9. Vahle JL, Sato M, Long GG, Young JK, Francis PC, Engelhardt JA, Westmore MS, Linda Y, Nold JB: *Skeletal changes in rats given daily subcutaneous injections of recombinant human parathyroid hormone (1-34) for 2 years and relevance to human safety. Toxicol Pathol* 30:312-321, 2002
10. Betancourt M, Wirfel KL, Raymond AK, Yasko AW, Lee J, Vassilopoulou-Sellin R: *Osteosarcoma of bone in a patient with primary hyperparathyroidism: a case report. J Bone Miner Res* 18:163-166, 2003
11. Horwitz M, Stewart A, Greenspan SL: *Sequential parathyroid hormone/alendronate therapy for osteoporosis- robbing Peter to pay Paul? J Clin Endocrinol Metab* 85:2127-2128, 2000
12. Gunness-Hey M, Hock JM: *Loss of the anabolic effect of parathyroid hormone on bone after discontinuation of hormone in rats. Bone* 10:447-452, 1989
13. Tanizawa T, Yamamoto N, Takano Y, Mashiba T, Zhang L, Nishida S, Endo N, Takahashi HE, Fujimoto R, Hori M: *Effects of human PTH(1-34) and bisphosphonate on the osteopenic rat model. Toxicol Lett* 102-103:399-403, 1998
14. Rhee Y, Won YY, Baek MH, Lim SK: *Maintenance of Increased Bone Mass After Recombinant Human Parathyroid Hormone(1-84) With Sequential Zoledronate Treatment in Ovariectomized Rats. J Bone Miner Res* 19(6): 931-937, 2004
15. Tang LY, Jee WS, Ke HZ, Kimmel DB: *Restoring and maintaining bone in osteopenic female rat skeleton: I. Changes in bone mass and structure. J Bone Miner Res* 7:1093-1104, 1992
16. Wronski TJ, Yen CF, Qi H, Dann LM: *Parathyroid hormone is more effective than estrogen or bisphosphonates for restoration of lost bone mass in ovariectomized rats. Endocrinology* 132:823-831, 1993
17. Iwaniec UT, Samnegard E, Cullen DM, Kimmel DB: *Maintenance of cancellous bone in ovariectomized, human parathyroid hormone [hPTH(1-84)]-treated rats by estrogen, risedronate, or reduced hPTH. Bone* 29: 352-360, 2001
18. Green JR: *Chemical and biological prerequisites for novel bisphosphonate molecules: results of comparative preclinical studies. Semin Oncol* 28:4-10, 2001
19. Rueggsegger P, Koller B, Muller R: *A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. Calcif Tissue Int* 58:24-29, 1996
20. Turner CH: *Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality. Osteoporos Int* 13:97-104, 2002
21. Komatsubara S, Mori S, Mashiba T, Ito M, Li J, Kaji Y, Akiyama T, Miyamoto K, Cao Y, Kawanishi J, Norimatsu H: *Long-term treatment of incadronate disodium accumulates microdamage but improves the trabecular bone microarchitecture in dog vertebra. J Bone Miner Res* 18:512-520, 2003
22. Frost HM, Jee WS: *On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. Bone Miner* 18:227-236, 1992
23. Divieti P, Inomata N, Chapin K, Singh R, Juppner H, Bringham FR: *Receptors for the carboxyl-terminal region of PTH(1-84) are highly expressed in osteocytic cells. Endocrinology* 142:916-925, 2001
24. Wilker CE, Jolette J, Smith SY, Doyle N, Hardisty JF, Metcalfe AJ, Marriott TB, Fox J, Wells DS. S: *A no observable carcinogenic effect dose level identified in Fischer 344 rats following daily treatment with PTH(1-84) for 2 years: Role of the C-terminal PTH receptor? 19(suppl 1): abstract, 2004*
25. Shen V, Birchman R, Liang XG, Wu DD, Dempster DW, Lindsay R: *Accretion of bone mass and strength with parathyroid hormone prior to the onset of estrogen deficiency can provide temporary beneficial effects in skeletally mature rats. J Bone Miner Res* 13:883-890, 1998
26. Yamamoto N, Takahashi HE, Tanizawa T, Fujimoto

– 이유미 외 4인: 난소 절제 백서에서 유전자 재조합 인간 부갑상선 호르몬(1-84) 투여 중단 후의 인카드로네이트 순차적 치료가 골량 및 골질에 미치는 효과 –

R, Hara T, Tanaka S: *Maintenance of bone mass by physical exercise after discontinuation of intermittent hPTH(1-34) administration. Bone Miner* 23:333-342, 1993

27. Sato M, Zeng GQ, Rowley E, Turner CH: LY353381 x HCl: *an improved benzothiophene analog with bone efficacy complementary to parathyroid hormone-(1-34). Endocrinology* 139:4642-4651, 1998