



Title	炎症性骨疼痛における破骨細胞性骨吸収の役割に関する研究
Author(s)	長江, 麻帆
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45189
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 ^{なが}長 ^え江 ^ま麻 ^ほ帆

博士の専攻分野の名称 博 士 (歯 学)

学 位 記 番 号 第 18609 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 16 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

歯学研究科分子病態口腔科学専攻

学 位 論 文 名 炎症性骨疼痛における破骨細胞性骨吸収の役割に関する研究

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 米田 俊之

(副査)

教 授 姜 英男 助教授 松本 憲 助教授 米原 典史

論 文 内 容 の 要 旨

(目的)

骨粗鬆症や癌の骨転移などの骨疾患は通常の鎮痛剤では抑制困難な骨痛を惹き起こし、患者の Quality of Life に大きな影響を与える。にもかかわらず、骨痛の発症メカニズムは、ほとんど解明されていない。しかし、ビスフォスフォネート (BP) やカルシトニンのような破骨細胞性骨吸収の抑制作用を有する薬剤が骨痛を軽減するという臨床的事実から、破骨細胞による骨吸収の亢進が骨痛の発症に関与することが推測される。本研究では炎症性骨疼痛動物モデルおよび遺伝子工学的に形質変化を加えた培養細胞を用いて、破骨細胞性骨吸収と骨痛発症の関連、ならびにその分子メカニズムについて検討を行った。

(実験方法)

1. 炎症性骨疼痛モデルの作成と疼痛閾値の評価

8-12 週齢、オス、ddY マウスの左側足底部に complete Freund's adjuvant (CFA) 0.1 ml を皮下接種することにより、炎症性骨疼痛モデルを作成した。疼痛閾値は、温熱刺激に対する逃避反応時間を指標に、プランターテストにより評価した。CFA 接種翌日に BP 製剤である zoledronic acid (ZOL; 2.5、25、250、2,500 μ g/kg)、alendronate (ALN; 100、1,000、10,000 μ g/kg) の単回静脈内投与、または osteoprotegerin (OPG; 0.5、5 mg/kg) の5日間連日皮下投与を行い、炎症性骨疼痛に対する効果を検討した。

2. 炎症性骨吸収に対する ZOL の効果

CFA 接種翌日に ZOL (250 μ g/kg) を静脈内投与し、2日後に骨組織を摘出した。脱灰の後、通法に従いパラフィン切片を作製し、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を施し、顕微鏡下で破骨細胞数を算定した。

3. *c-src* 遺伝子欠損マウスを用いた炎症性骨疼痛の検討と組織学的解析

c-src 遺伝子欠損マウスに CFA を接種し、疼痛閾値の変化をプランターテストにより評価した。また、骨組織切片を作製し、骨吸収を検討した。

4. 脊髄後角ニューロンにおける *c-Fos* 発現の免疫組織化学的検討

CFA 接種翌日に ZOL (250 μ g/kg) を静脈内投与し、2日後にマウスを4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定後、後肢支配相当部の脊髄神経 (L3-5) を摘出した。通法に従い、連続凍結切片を作成し、抗 *c-Fos* 抗体を用いた免疫染色後、脊髄後角神経第 I および II 層における *c-Fos* 陽性細胞数を顕微鏡下で算定した。

5. 培養細胞における *c-fos* mRNA 発現に対する酸性 pH の効果

293T 細胞に酸感受性受容体 transient receptor potential vanilloid receptor subtype 1 (TRPV1) 遺伝子を導入し、TRPV1 を構成的に発現する細胞 (293T/TRPV1) を樹立した。この細胞を pH 5.5 に調整した培養液中において、30 および 60 分間インキュベート後、総 RNA を抽出した。逆転写反応の後、*c-fos* mRNA の発現を RT-PCR 法により解析した。

(結果)

1. 未処理のマウスは CFA 接種翌日より、著明な疼痛閾値の低下、つまり痛覚過敏を示した。これに対して、ZOL、あるいは ALN を投与されたマウスでは持続的、ならびに用量依存的に有意な疼痛閾値の上昇が認められ、痛覚過敏が軽減した。OPG も同様の作用を示した。
2. CFA 接種により TRAP 陽性破骨細胞数の著明な増加と骨吸収の亢進が認められた。これらはいずれも ZOL 投与により抑制された。
3. *c-src* 遺伝子欠損マウスにおいては、野生型マウスと比較して、CFA 接種による痛覚過敏ならびに骨吸収の亢進が有意に抑制されていた。
4. CFA 接種により接種側脊髄後角ニューロンにおける *c-Fos* 陽性細胞数の有意な増加を認めた。この増加は ZOL 投与により有意に減少した。
5. 293T/TRPV1 細胞における *c-fos* mRNA の発現は、酸性培養液中でのインキュベーション時間依存的に増加した。一方、TRPV1 が導入されていない 293T 細胞では pH 低下による *c-fos* mRNA の発現誘導は認められなかった。

(考察・結論)

ZOL や ALN の投与により、温熱刺激に対する痛覚閾値が有意に上昇し、痛覚過敏が軽減したこと、また脊髄後角ニューロンにおいて疼痛マーカーである *c-Fos* 陽性細胞数が減少したことなどから、破骨細胞特異的阻害剤 BP が炎症性骨疼痛の軽減に有効であることが示された。また、BP とは異なる機序で破骨細胞を特異的に抑制する OPG も同様の作用を示したこと、さらに、破骨細胞の骨吸収機能不全を有する *c-src* 遺伝子欠損マウスでは痛覚過敏が抑制されたことなどから、破骨細胞による骨吸収の亢進が炎症性骨疼痛の発症に重要な役割を演じていることが示唆された。また、骨を終末する知覚神経線維に発現する酸感受性受容体 TRPV1 が、骨吸収時に破骨細胞から産出される酸により活性化されることが骨痛発症のメカニズムである可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、骨疾患を有する患者の QOL に多大な影響を与える骨痛の機序を解明する目的で行われたものである。その結果、炎症性骨疼痛の病態において、骨吸収細胞である破骨細胞が重要な役割を演じることが明らかとなり、さらに骨吸収の降に破骨細胞から産出される酸が骨痛誘発のメカニズムに関与する可能性が示唆された。

以上の結果は、骨疾患患者における骨痛の制御を試みる上で重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。