The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	骨代謝関連分子発現に及ぼす骨吸収抑制剤の影響
Author(s)	毛利, 真弥
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69487
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　毛利　真弥　）	
論文題名	骨代謝関連分子発現に及ぼす骨吸収抑制剤の影響

論文内容の要旨

【緒言】

骨粗鬆症治療としてビスホスホネート製剤（以下、BP 製剤）や抗 RANKL （receptor activator of nuclear factor-B κ ligand）抗体などの骨吸収抑制剤による治療が広く行われている。これらの薬物治療は骨粗鬆症患者に非常に大きなメリットをもたらす一方で、頻度は少ないものの顎骨壊死などの副作用を有しており、歯科領域での関心も高い。BP 製剤は破骨細胞が骨吸収の際、骨に取り込まれ、破骨細胞を抑制する。一方、抗 RANKL 抗体は骨芽細胞や骨細胞で産生される破骨細胞分化誘導因子である RANKL とその受容体である RANK との結合し、破骨細胞を不活化し、共に骨吸収を抑制する。2 種類の骨吸収抑制剤は異なる作用機序を持ち、このことが骨量の増加や顎骨壊死の違いに寄与していると考えられる。骨の恒常性は、破骨細胞、骨芽細胞、骨細胞が密接に関連した骨リモデリングによって維持されている。よって、骨吸収抑制剤は破骨細胞に影響を与えるだけではなく、骨細胞や骨芽細胞に影響を与えている可能性が考えられてきた。骨細胞と骨芽細胞の骨代謝における相互作用は複雑で、骨細胞に特異的に発現する *Sost* 遺伝子産物である Sclerostin や骨細胞、骨芽細胞に特異的に発現 Dickkopf-1 (以下、Dkk-1) が骨芽細胞での Wnt シグナルを阻害することで、骨芽細胞分化や骨形成を抑制している。そのため、骨芽細胞の分化と骨形成を促進するために Wnt 受容体への Sclerostin の結合を阻害する抗 Sclerostin 抗体が開発されており、次世代の骨粗鬆症治療薬として臨床研究中である。骨細胞・骨芽細胞に対する骨吸収抑制剤の影響への検討は、患者での血中骨代謝マーカーや組織学的な評価などで検討されてきた。しかし現在までの研究で、骨吸収抑制剤の骨細胞や骨芽細胞に対する影響は明確な結論を得ていない。そこで、本研究では、閉経後骨粗鬆症モデルマウスを作成し、骨吸収抑制剤であるゾレドロン酸と抗 RANKL 抗体の骨細胞と骨芽細胞に対する骨微細構造解析、骨組織形態計測、および遺伝子発現の影響を検討した。

【研究方法】

<u>卵巣摘出術（OVX）マウス、骨吸収抑制剤投与マウスの作成と骨微細構造解析</u>

9 週齢マウスに OVX を施行し、術後 2 週目からゾレドロン酸 200 μg / kg を週 2 回、1 ヶ月間腹腔内投与した（OVX-Z 群）。OVX していないマウスに、ゾレドロン酸を投与したものを Z 群とした。抗 RANKL 抗体投与モデルは、9 週齢マウスを OVX し、術後2週目に抗 RANKL 抗体を 5 mg / kg 1 回、皮下注射し、1ヶ月間飼育した（OVX-D 群）。それぞれ薬剤投与をしていないマウスを対照とした（C 群、OVX-C群）摘出した右側脛骨をホルマリン固定した後、マイクロ CT を用いて脛骨近位骨端を撮影した。成長板直下から500 μm の断面幅で骨微細構造解析を行い、骨量（BV/TV(%)）、骨梁幅（Tb.Th (μm)）、骨梁数（Tb.N (/mm)）、骨梁間隙（Tb.Sp (μm)）を算出した。

<u>BP 製剤、抗 RANKL 抗体が骨代謝関連分子に及ぼす影響</u>

1：骨組織形態計測

各モデル群の脛骨長軸のパラフィン切片を HE 染色し、単位面積当たりの骨細胞数を計測した。

2：定量的 Real-time PCR 解析

摘出した左側脛骨の近位端と遠位端を切断し、骨髄をフラッシュし、液体窒素にて凍結しクライオプレスにて骨を粉砕し、全 RNA を抽出した。定量的 PCR 法にて骨細胞（*Sost*、*Dmp1*）、骨芽細胞（*Runx2*、*Osx*、*Col1a*、*OC*）機能に関連する遺伝子発現を検討した。

3：免疫組織染色（Sclerostin）

抗マウス Sclerostin 抗体を用いて骨細胞、骨基質の Sclerostin を免疫染色した。

【結果】

<u>OVX マウス、骨吸収抑制剤投与マウスの作成と骨微細構造解析</u>

骨微細構造解析の結果として、OVX-C 群は C 群と比較して骨量は低い傾向を示し、骨梁数は有意に低下した。骨

梁幅は減少する傾向を示し、骨梁間隙も有意に増大し、粗な海綿骨であることが示された。OVX-Z 群、OVX-D 群はOVX-C 群と比較して、骨量、骨梁数、骨梁幅が有意に増大し、骨梁間隙も有意に減少した。この結果より、OVX-C 群は、閉経後骨粗鬆症実験モデルとして妥当であり、OVX-Z 群、OVX-D 群は骨粗鬆症治療モデルとして妥当であると考えた。次に、OVX が薬剤効果に影響を与えるか否かを検討するため、Z 群と OVX-Z 群を比較したところ、骨量、骨梁数が Z 群は OVX-Z 群と比較して有意に高値であった。そのため、ゾレドロン酸の効果の減弱は、OVX 状態でゾレドロン酸が骨形成を抑制している可能性が示唆された。

<u>BP 製剤、抗 RANKL 抗体が骨代謝関連分子に及ぼす影響</u>

1：骨組織形態計測

骨細胞：OVX マウス、骨吸収抑制剤投与ともに骨細胞数に有意な変化は見られなかった。

2：定量的 Real-time PCR

骨細胞特異的に発現する遺伝子 (*Sost, Dmp1*) を検討した。*Sost, Dmp1* の発現はともに、OVX-C 群と比較して、OVX-Z 群では変化がなく、OVX-D 群で有意に上昇した。また、OVX-D 群はOVX-Z 群より有意に高かった。

骨芽細胞に特異的に発現する遺伝子（*Runx2, Osx, Col1a, OC*）を検討した。*Runx2* の発現はOVX-C 群と比較してOVX-Z 群、OVX-D 群では *Runx2* 発現は上昇する傾向があった。また、OVX-D 群は OVX-Z 群と比較して、低い傾向があった。*Osx* の発現は、OVX-C 群と比較して OVX-Z 群では変化がなく、OVX-D 群は上昇する傾向があった。また、OVX-D 群は OVX-Z 群と比較して、高い傾向があった。*Col1a, OC* の発現はともに、OVX-C 群と比較してOVX-Z 群では変化がなく、OVX-D 群の発現は上昇する傾向があった。また、OVX-D 群は OVX-Z 群と比較して有意に高かった。

3: 免疫組織染色(Sclerostin)

OVX-C 群は C 群と比較して細胞質、骨小腔、骨細管の染色性が著しく減弱し、Sclerostin の発現低下が認められた。骨吸収抑制剤投与すると、OVX-Z 群の Sclerostin 染色性はさらに減弱し、OVX-D 群では OVX-C 群と比較して細胞質、骨小腔、骨細管、骨基質の染色性は強くなり、Sclerostin の発現に違いが認められた。

【考察】

骨微細構造解析により、OVX を施行したマウスは、骨量、骨梁数は減少し、骨梁間隙ともに増加し、粗な骨構造であった。8 週齢のような若齢マウスは急性な骨量減少モデルとして適しており、本研究で使用した 9 週齢の OVX マウスは閉経後骨粗鬆症モデルとして妥当と考えた。骨吸収抑制剤を投与した OVX-Z 群、OVX-D 群は OVX-C 群と比較して、骨量、骨梁数、骨梁幅などが増加したことから、閉経後骨粗鬆症治療モデルとして妥当であると考えた。骨組織形態計測おいて、本研究では、骨細胞の顕著な数的な変化は認められなかったが、過去の報告よりOVX モデル動物で骨細胞の数的変化はなく、ゾレドロン酸投与においても骨細胞数に数的変化が認められない、またOVX モデル動物で、ゾレドロン酸、抗 RANKL 抗体投与群の骨芽細胞数が減少するという報告がある。このことから、ゾレドロン酸と抗 RANKL 抗体は破骨細胞だけではなく、骨芽細胞分化に作用をすることが示唆された。そこで、骨形成や骨維持に関わる遺伝子を検討するため、脛骨全体の骨細胞、骨芽細胞に特異的な遺伝子発現を検討した。ゾレドロン酸は骨芽細胞と骨細胞の分化マーカーの発現に影響を与えなかったが、一方、抗 RANKL 抗体は骨細胞マーカー、骨芽細胞マーカーの発現は増加する傾向が認められた。よって、ゾレドロン酸と抗RANKL抗体では異なる作用効果がある可能性が示唆された。ゾレドロン酸と抗 RANKL 抗体の骨芽細胞分化に対する影響も異なる可能性が示されたが、本研究において骨細胞の産生する Sclerostin の増減による骨芽細胞分化や骨基質産生機能に連結する関連性は見られなかった。ヒト血清 Sclerostin は加齢や骨粗鬆症モデルで上昇することなど報告されている。本研究の免疫組織染色では、OVX により Sclerostin の染色性は減弱し、ゾレドロン酸でさらに減弱し、抗 RANKL 抗体で OVX-C 群と比較すると染色性が強くなることを示した。*Sost* 遺伝子発現の結果と一致した結果であった。Sclerostin の影響を骨芽細胞が受けない理由として、本研究に用いたマウスは、実験時比較的若い週齢のため骨芽細胞の骨形成能がもともと高く、Sclerostin による Wnt シグナル阻害以外で細胞分化が制御されている、などの理由が考えられた。

【結語】

本研究では、閉経後骨粗鬆症モデルマウスを用い、骨吸収抑制剤による骨細胞、骨芽細胞への作用を検討することを目的に行った。ゾレンドロン酸、抗 RANKL 抗体の二つの骨吸収抑制剤は、骨細胞に対して異なる作用を有していることが明らかになった。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　毛利　真弥　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	古郷幹彦
	副 査	教授	豊澤　悟
	副 査	准教授	伊藤祥作
	副 査	講師	村上智彦

論文審査の結果の要旨

本研究は、薬剤性顎骨壊死のメカニズムを明らかにする目的で、閉経後骨粗鬆症のモデルマウスを作成し、ゾレドロン酸や抗 RANKL 抗体が、骨細胞、骨芽細胞に及ぼす影響を検討したものである。

その結果、ゾレドロン酸は、骨細胞、骨芽細胞のマーカー発現に有意な変化はなかったが、抗 RANKL 抗体は、骨細胞、骨芽細胞のマーカー発現を増加させた。

この結果は、異なる作用機序をもつ骨吸収抑制剤が、特に骨細胞に対して異なる作用を有する可能性を示した点で有意義であり、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。