



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	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69487
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学位論文

骨代謝関連分子発現に及ぼす
骨吸収抑制剤の影響

2018年3月

大阪大学大学院歯学研究科
口腔科学専攻 顎顔面口腔外科学講座
(口腔外科学第一教室)

毛利 真弥

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- κ B ligand) 抗体などの骨吸収抑制剤が広く使用されている。これらの薬物治療は骨粗鬆症患者に大きな治療効果をもたらす一方で、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¹⁻⁴⁾、歯科領域での関心は高い。BP 製剤は骨に取り込まれ、骨表面に沈着し、破骨細胞による骨吸収に伴い細胞内に取り込まれ、破骨細胞のアポトーシスを誘導することで骨吸収を抑制する⁵⁻⁷⁾。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 との結合を阻害することで、破骨細胞の分化阻害し、骨吸収を抑制する^{7, 8)}。2 種類の骨吸収抑制剤はこのような異なる作用機序を有するが、共に破骨細胞機能を除去することで、骨量の増加を目的に使用されている。過去の報告では、閉経後骨粗鬆症に対する骨吸収抑制効果では、BP 製剤であるアレンドロネートとヒト抗 RANKL モノクローナル抗体製剤 (denosumab) を比較すると、denosumab 投与群に有意な骨量増加が示されている⁹⁻¹¹⁾。一方、顎骨壊死を起こす頻度は BP 製剤がやや高いという報告がある^{12, 13)}。このことから、BP 製剤と denosumab の作用機序が骨量増加効果や顎骨壊死の発症頻度の違いを生んでいる可能性が考えられる。

骨の恒常性は、生理的な骨リモデリングによって制御されている。すなわち、骨リモデリングは骨細胞がアポトーシス、その後、二次性ネクローシスにおちいり¹⁴⁾、細胞内の S100 ファミリー一分子、熱ショックタンパク質等が骨小腔から骨髓腔あるいは骨内の血管に放出される^{15, 16)}。

これらの液性因子は、マクロファージを活性化させ、TNF- α 、IL-6、IL-1 などの産生を促し、破骨細胞の分化・活性化を促進させ、骨吸収を促進させる¹⁷⁾。その後、骨芽細胞の増殖・分化により骨形成が誘導される¹⁸⁾。すなわち、破骨細胞、骨芽細胞、骨細胞が密接に関連して骨の恒常性を維持している。また、骨吸収抑制剤は破骨細胞の分化阻害による骨吸収抑制だけではなく、ゾレドロン酸による骨細胞のアポトーシスの抑制や骨芽細胞の機能や生存を阻害する可能性の報告もある¹⁰⁾。

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する *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、骨芽細胞分化の抑制と骨形成を抑制する^{19, 20)}。ヒトやマウスにおいて、*Sost* 遺伝子が欠失すると骨形成が異常に亢進する²⁰⁻²⁵⁾。すなわち、骨細胞が産生する *Sclerostin* は骨芽細胞分化の負の制御因子であると言える。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²⁶⁾、次世代の骨粗鬆症治療薬として臨床研究中である²⁷⁾。

現在までに、破骨細胞のみならず骨芽細胞、骨細胞に対する骨吸収抑制剤の影響が検討されてきた。しかし、骨吸収抑制剤の骨細胞や骨芽細胞に対する影響は一定の結論を得ていない。骨芽細胞に対する骨吸収抑制剤の影響は、患者での血中骨代謝マーカーによる評価や²⁸⁻³²⁾、骨粗鬆症モデルマウスを用いた骨標識法による骨形成の評価や組織学的な検討に

より研究されてきた³³⁾。そして、*in vitro* では骨芽細胞を用いた研究³⁴⁻³⁶⁾が主体であった。一方、*in vitro* において、骨吸収抑制剤の骨細胞に対する影響を解析しうる骨細胞培養系は現在のところ存在しない。また、臨床研究では、患者の血清中の骨細胞マーカーである Sclerostin 濃度の測定^{31,37-38)}、骨粗鬆症治療モデルラットの組織学的な評価³⁹⁾などで検討されてきた。しかし、*in vivo* での骨吸収抑制剤の骨細胞の分化や細胞機能に関連する遺伝子発現を検討した研究はない。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、側鎖に環状窒素構造を含む第三世代のビスホスホネート製剤である強力な骨吸収抑制作用を持つゾレドロン酸と抗 RANKL 抗体の骨細胞と骨芽細胞に対する影響について、骨微細構造解析、骨組織形態計測、および遺伝子発現解析を用いて検討した。

研究方法

卵巣摘出術 (OVX) マウス、骨吸収抑制剤投与マウスの作成

本研究における動物実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の規定(動物実験委員会承認番号:動歯 -26-019-0)と動物の愛護および管理に関する法律を順守して行った。実験には、C57BL / 6Jcl 系 9 週齢雌性マウス (体重約 20 g: 日本クレア株式会社、東京、日本) マウスを用いた。

1) ズレドロン酸投与マウス

マウスへのズレドロン酸投与は Soundia らの方法⁴⁰⁾に準じて行った(図1 A)。すなわち、9 週齢マウス、4 匹にズレドロン酸 200 µg / kg (AdooQ Bioscience, Irvine, CA, USA)を週 2 回、4 週間、腹腔内注射したものを Z 群とした。対照群 (C 群)は生理食塩水を腹腔内注射したものをを用いた。4 週間標準飼料で飼育後、3 種混合麻酔 (塩酸メドミジン 0.3 mg / kg (ドミトール; 日本全薬工業)、ミタゾラム 4 mg / kg (ドルミカム; アステラス製薬)、酒石酸ブトルフェノール 5 mg / kg (ベトルフェール; Meiji Seika ファルマ株式会社) を腹腔内注射) 下で心臓穿刺にて採血後、ペントバルビタールの腹腔内過剰投与で安楽死させ、以後の実験に用いた。

2) OVX、ズレドロン酸投与マウス作成

OVX は 3 種混合麻酔下で行った。9 週齢マウスの背部を剃毛し、伏臥位にて外科用剪刀にて皮膚切開し、皮膚と腹膜を鈍的に剥離し、腹膜を明示した。腹膜を切開し、腎臓の頭

側にある卵巣を明示、卵管と子宮の間を 4-0 絹糸にて結紮し切断し、卵巣を両側とも摘出した^{41,42)}。腹膜を整復し、4-0 絹糸腹膜縫合、皮膚を整復し、4-0 絹糸にて皮膚縫合した。創部治癒のため 2 週間待機し、実験に用いた⁴³⁾(図 1A)。

マウスへのゾレドロン酸投与は図 1B に従い行った。すなわち、OVX 後 2 週を経過したマウスにゾレドロン酸 200 $\mu\text{g} / \text{kg}$ を週 2 回、4 週間、腹腔内注射したものを OVX-Z 群とした(図 1B)。対照群は生理食塩水を腹腔内注射したものをを用いた(OVX-C 群)。4 週間標準飼料で飼育した。

3) OVX、抗 RANKL 抗体投与マウス作成

抗 RANKL 抗体 (R&D systems, Mineapolis, MN, USA) の投与は、Furuya らの方法に従っておこなった⁴⁴⁾。すなわち、OVX 後 2 週を経過したマウスに抗 RANKL 抗体 5 mg/kg を頸部皮下注射し、4 週間標準飼料で飼育したものを OVX-D 群とした。(図 1C)

CT による骨微細構造解析

4 週間標準飼料で飼育後、3 種混合麻酔下で心臓穿刺にて採血後、ペントバルビタールの腹腔内過剰投与で安楽死させ、以後の実験に用いた。右側後肢をマイクロ CT による骨微細構造解析と組織学的解析に用い、左側後肢を定量的 Real-time PCR 解析に用いた。骨微細構造解析および組織学的解析用のマウス後肢の皮膚を剥離し、ハサミにて股関節を切断摘出した。4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(和光純薬工業株式会社)で 48 時間固定後、大腿骨から脛骨遠位までの骨膜上の軟組織を除去した。動物用マイクロ CT

(R.mCT2 :株式会社リガク、東京、日本)、管電圧 90 kV、管電流 160 μ A、ボクセルサイズは 10 μ m x 10 μ m x 10 μ m で膝関節から脛骨近位端部分をスライス幅 10 μ m で撮影した^{45, 46}。脛骨近位端は内軟骨性骨化して骨形成している部分であり、特に二次海綿骨は、骨代謝を評価するにおいて適しているため、成長板直下の 50 スライス、すなわち、500 μ m 幅 (図 2A の黄色の範囲) の骨量 (BV / TV (%))、骨梁数 (Tb. N (/ mm))、骨梁幅 (Tb. Th (μ m))、骨梁間隙 (Tb. Sp (μ m)) を解析した。解析用ソフトウェアは TRI/3D-Bon64 (ラトック社、東京、日本)を用いた。

定量的 Real-time PCR による遺伝子発現解析

骨膜を保存し、軟組織除去した左側脛骨の近位端と遠位端を切断し、組織保存液 (RNA-later®, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MI, USA) で骨髄をフラッシュし、溶液が透明になるまで繰り返し洗浄した。液体窒素にて凍結した脛骨をクライオプレス (マイクロテック・ニチオン、千葉、日本) を用いて粉碎し、パウダー状にした。1 ml の RNA 抽出試薬 TRIzol[®] 試薬 (Invitrogen, CA, USA) で溶解し、0.2 ml クロロフォルム (和光純薬工業株式会社)を加えて混和、12,000 x g、15 分、4 °Cで遠心した。その上清に 2 倍量のイソプロパノールを混和し、16 時間、-80°C で沈澱させ、12,000 x g、15 分、4°C で遠心した。イソプロパノールを除去し、沈殿に 1 ml の 75% エタノールを加え洗浄し、遠心したペレットを風乾した。20 μ l の DEPC 水 (フナコシ) で溶解し、全 RNA を抽出した。さらに RNA 溶液を RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて精製した。RNA 濃度は超微量分

光光度計 Nano Drop 1000 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) で測定した。RNA を Random Primer (Promega, Madison, WI, USA) および逆転写酵素 Super Script II (Invitrogen, Carlsbad, MA, USA) と 42°C、20 分間逆転写反応させ、cDNA を合成した。cDNA を用いて定量的 Real-time PCR には StepOne Plus™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用した。合成した cDNA を KAPA SYBR FAST qPCR キット (日本ジェネテイクス株式会社、東京、日本) とそれぞれのプライマーで PCR 反応を行った。PCR 反応は 95°C、3 秒間の熱変性と 60°C、30 秒間のアニーリングを 40 サイクル行い、得られたデータは StepOne Plus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems) を使用し分析した。各遺伝子の発現は *Gapdh* をノーマライザーとして比較 Ct 法で解析した。本研究で用いたプライマー群を表に示す。

骨組織形態計測

右側脛骨のヘマトキシリン-エオジン染色 (H-E 染色 ; 武藤化学株式会社、東京、日本) を行なった。H-E 染色は、マイヤーのヘマトキシリン溶液および 1% エオシンアルコール (武藤化学株式会社) を用いて通法に従い染色した。

脛骨近位端は内軟骨性骨化して骨形成している部分であり、特に二次海綿骨は、骨代謝を評価するにおいて適しているが、二次海綿骨内には骨細胞ではほとんど存在しないため、本研究では皮質骨を観察することとした。観察した部位は脛骨矢状方向の 4 μm の薄切パラフィン切片を H-E 染色し、脛骨近位端から 7 mm の皮質骨部分を強拡大 (400 倍) で 2 カ

所撮影した（ライカ光学顕微鏡写真撮影システム;LAS, Wetzlar, Germany）（図 5A）。単位面積当たりの骨細胞数を計測した⁴⁷⁾。単位面積、細胞数の計測には ImageJ（バージョン 1.51）を用いて行った。二次海綿骨の骨芽細胞を観察するために、強拡大（400 倍）で撮影した（図 5B）。

免疫組織染色

ホルマリン固定後、軟組織を除去した右側脛骨を 15% EDTA 水溶液で 3 週間脱灰後、パラフィン包埋し、矢状方向の長軸で 4 μm の薄切切片を作成した（新組織化学研究所、東京、日本）。免疫組織染色は VECTSTAIN ABC kit（VECTOR Laboratories, Burlingame, CA, USA）を用いた。脱パラフィン、0.3% 過酸化水素水を含むメタノールで内因性ペルオキシダーゼの不活化後、0.5% Polyxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate（和光純薬工業株式会社）を含むリン酸緩衝液（PBS）中で 4°C、24 時間、抗原の賦活化を行った。ブロッキングは 0.3% ウシ血清アルブミンを含む PBS に付属の正常血清を希釈し、室温で 30 分間反応させた。1 次抗体としてブロッキング溶液で 200 倍に希釈した抗マウス Sclerostin ヤギポリクローナル抗体（R&D systems）を用い、4°C にて 24 時間反応させた。PBS で洗浄後、ブロッキング溶液で希釈したビオチン標識二次抗体を室温で 1 時間反応させ、ABC 試薬を室温で 30 分間反応させた後、DAB（ヒストファイン SAB-PO (M) キット，株式会社ニチレイバイオサイエンス）にて発色反応を行った。マイヤーヘマトキシリン（武藤化学株式会社）にて対比染色した。光学顕微鏡下にて、弱拡大で脛骨全体の染色性を観察し、強拡大（400

倍)にて骨細胞の形態、骨細胞、骨細管の染色性を観察した。

統計処理

実験結果は平均値±標準偏差 (S.D.) でグラフ化し、以下の方法で統計学的に比較検討した。三群間以上の検定は Kruskal-Wallis test を行い、有意差があるものに関して二群間検定を行った。二群間の有意差検定は Mann-Whitney U test を用いて行い P 値 0.05 未満を有意とし、図中の表記は、測定結果の P 値に応じて、*. $P < 0.05$ 、**. $P < 0.01$ とした。

結果

OVX マウス、骨吸収抑制剤投与マウスの解析

1) マイクロ CT による骨微細構造解析

図 2B は水平断 3D 構築画像を示し、上段はコントロール群、下段は骨吸収抑制剤投薬群の典型的な画像を示す。OVX-C 群は C 群より、皮質骨は薄く、海綿骨骨梁は少ない傾向を示した。OVX-Z 群は OVX-C 群に比べて皮質骨の厚みは厚く、骨梁数は増加した。また、骨梁幅も増大した。OVX-D 群も OVX-C 群に比べて皮質骨は厚い傾向を示し、骨梁数は増加し、骨梁幅も増大した (図 2B)。OVX-Z 群の皮質骨は OVX-D 群より、さらに C 群より厚かった。OVX 処置による骨量の減少と骨吸収抑制剤による骨量増加効果を定量的に構造解析した。骨量の増減を示す指標である骨量 (BV/TV (%); Bone volume / Tissue volume)、骨梁数 (Tb. N (/mm); Trabecular number)、骨梁幅 (Tb. Th (μm); Trabecular thickness)、骨梁間隙 (Tb. Sp (μm); Trabecular separation) を計測した (図 3, 4)。その結果、C 群の骨量 12.3% と比較して、OVX-C 群の骨量は 6.4% と低い傾向を示し、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。比較的、若いマウスにおいても骨粗鬆症に類似した状態を示した。

OVX マウスにゾレドロン酸を投与すると、OVX-C 群の骨量 6.4% に対して、OVX-Z 群は 21.6% と著しい骨量の増加を認めた。OVX-C 群に対して OVX-Z 群の骨梁数、骨梁幅も有意に増大し、骨梁間隙も有意に減少した。OVX-Z 群の骨量、骨梁数、骨梁幅、骨梁間隙は、

C 群よりも緻密な骨であることを示した。OVX した骨粗鬆症マウスに対するゾレドロン酸の骨量増加の効果が認められた (図 3)。

OVX マウスに抗 RANKL 抗体を投与すると、OVX-C 群の骨量 6.4% に対して、OVX-D 群は 17.7% と著しい骨量の増加を認めた。OVX-C 群に対して OVX-D 群の骨梁数、骨梁幅も有意に増大し、骨梁間隙も有意に減少した。OVX-D 群の骨梁幅は、C 群より有意に増大しており、骨量、骨梁数も増大傾向を示し、緻密な骨であることを示した。OVX した骨粗鬆症マウスに対する抗 RANKL 抗体の骨量増加の効果が認められた。ゾレドロン酸と抗 RANKL 抗体の効果を比較すると OVX-D 群 の骨量 (17.7%) と比較して、OVX-Z 群の骨量 (21.6%) は有意に増大した。骨梁数、骨梁幅も OVX-Z 群が大きい傾向を示し、骨梁間隙は小さい傾向を示した (図 3)。

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 処置が薬剤効果に影響を与えるか否かを検討するため、OVX マウスへのゾレドロン酸投与と OVX を実施していないマウスにゾレドロン酸を投与した結果を比べたところ、Z 群は C 群に比べて、著しく皮質骨、海綿骨とも骨量が増大し、OVX-Z 群より、より厚い皮質骨と海綿骨を認めた (図 2B)。その骨微細構造解析の結果、骨量は Z 群 34.6%、OVX-Z 群 21.6% と、骨梁数も有意に Z 群が多かった。また、OVX-Z 群は C 群より骨量、骨梁数、骨梁幅も有意に増大し、骨梁間隙も有意に減少した (図 4)。骨量において、C 群と OVX-C 群

の減少量と Z 群と OVX-Z 群の減少量を比較すると Z 群と OVX-Z 群の減少量が大きいことから、OVX の影響を差し引いても、OVX 処置はゾレドロン酸の骨量増加効果を減弱させることが示唆された (図 3, 4)。そのため、OVX 処置がゾレドロン酸による骨形成を抑制している可能性を考え、骨組織形態計測を検討した。

骨組織形態計測

骨細胞の計測は、図 5A に示すように脛骨近位端から 7 mm 遠位側の皮質骨 (黒い枠) を強拡大で撮影し、Image J 上で単位面積当たりの骨細胞数として計測した。C 群は 1 mm²あたり 515 個の骨細胞を計測し、OVX-C 群では 543 個、OVX-Z 群では 538 個、OVX-D 群では 510 個の骨細胞を計測した (図 6A)。OVX マウス、骨吸収抑制剤投与でも骨細胞数に有意な変化は見られなかった。OVX 処置、ゾレドロン酸投与や抗 RANKL 抗体投与の骨細胞数への影響は少ないことが示唆された。骨細胞の細胞形態、骨小腔に明らかな差は見られなかった (図 6B)。

以上より、骨細胞数は、OVX 処置や骨吸収抑制剤による影響は受けにくい傾向がみられた。

また、本研究では、二次海面骨の骨芽細胞 (図 5) を観察しており、C 群、OVX-C 群では骨代謝回転が高いため、active な骨芽細胞が認められるが、OVX-Z 群、OVX-D 群では、骨代謝回転が低下しているため、active な骨芽細胞が少なく、骨吸収抑制剤による影響が顕著に認められた (図 7)。

定量的 Real-time PCR 解析

骨細胞特異的に発現する遺伝子で、骨細胞の機能に関わる遺伝子として、*Sost*, *Dmpl* (Dentin matrix protein 1)⁴⁸⁾ の脛骨全体での発現を検討した (図 8A, B)。

OVX-C 群と比較して OVX-Z 群の *Sost* 発現量は、約 1/3 倍に減少し、OVX-D 群の *Sost* 発現は約 5.8 倍に有意に上昇した。また、OVX-D 群の *Sost* 発現量は OVX-Z 群より約 20.1 倍と有意に高かった (図 8A)。

OVX-C 群と比較して OVX-Z 群の *Dmpl* 発現量は約 3/5 倍に減少し、OVX-D 群の *Dmpl* の発現量は約 12.0 倍に有意に上昇した。また、OVX-D 群の *Dmpl* 発現量は OVX-Z 群の約 19.2 倍に有意に高かった (図 8B)。

骨芽細胞に特異的に発現する遺伝子で、骨芽細胞の骨形成機能を表す遺伝子として、*Runx2* (Runt-related transcription factor 2), *Osx* (Osterix), *Colla* (type I collagen), *OC* (Osteocalcin) の脛骨全体での発現量を検討した (図 8C-F)。

OVX-C 群と比較して OVX-Z 群の *Runx2* 発現量は約 2.7 倍に上昇し、OVX-D 群 *Runx2* 発現量は約 2.0 倍に上昇する傾向があったが、統計学的な有意差は認められなかった。また、OVX-D 群の *Runx2* 発現量は OVX-Z 群と比較して約 2/3 倍と低い傾向であったが、統計学的な有意差は認められなかった (図 8C)。

OVX-C 群と比較して OVX-Z 群の *Osx* 発現量は約 2/3 倍に減少し、OVX-D 群の *Osx* 発現量は約 5.9 倍に上昇する傾向があったが、統計学的な有意差は認められなかった。

また、OVX-D 群の *Osx* 発現量は OVX-Z 群と比較して約 8.4 倍と高い傾向があり、統計学的な有意差は認められなかった(図 8D)。

OVX-C 群と比較して OVX-Z 群の *Colla* の発現量は約 1/3 倍に減少する傾向があり、OVX-D 群の *Colla* の発現量は約 3.3 倍に上昇する傾向があったが、統計学的な有意差は認められなかった。また、OVX-D 群は OVX-Z 群と比較して約 10.3 倍と有意に高かった(図 8E)。

OVX-C 群と比較して OVX-Z 群の *OC* 発現量は約 1/3 倍に減少する傾向があり、OVX-D 群は OVX-C 群と比較して約 5.8 倍と有意に上昇した。また、OVX-D 群は OVX-Z 群と比較して約 17.9 倍と有意に高かった(図 8F)。

OVX、骨吸収抑制剤による Sclerostin 染色性への影響

脛骨骨幹部皮質骨での Sclerostin 免疫染色写真を図 9 に示す。C 群は骨細胞の細胞質、骨小腔、骨細管、骨基質に Sclerostin の濃染を認め、骨細胞での高い Sclerostin の発現が示唆された。OVX マウスでは C 群(図 9A)と比較して細胞質の染色性、骨小腔の染色性、骨細管の染色性ともに著しく減弱した(図 9B)。すなわち、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(図 9C)、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った。(図 9D)すなわち OVX-Z 群では Sclerostin 発現が低下するが、OVX-D 群は Sclerostin の発現が上昇することが示唆され、脛骨全体の *Sost* 遺伝子発現の結果と矛盾し

なかった。

考察

骨粗鬆症治療におけるビスホスホネート製剤や抗 RANKL 抗体などの骨吸収抑制剤の効果は、文字通り破骨細胞分化の抑制による骨吸収の抑制であるが、骨リモデリングは破骨細胞、骨細胞、骨芽細胞には密接な関連があるため、骨吸収抑制剤の骨細胞、骨芽細胞への作用も研究されてきた。例えば、骨芽細胞に対する影響は、ヒトでは薬剤投与による血中骨代謝、骨形成マーカー^{28-32, 37)} によって骨代謝回転の一部としてしか評価できないが、動物実験では骨標識による骨形成の評価や組織学的な検討により研究されてきた^{33,39)}。そして、*in vitro* では骨芽細胞の分化に対する影響を検討する研究が主体である。³⁴⁻³⁶⁾ 一方、骨吸収抑制剤の骨細胞に対する影響は、ヒトでは骨細胞マーカーである 血清 Sclerostin の測定³⁷⁾、動物実験では組織学的な評価³⁹⁾ などで検討されている。しかし、現在までの研究で、骨吸収抑制剤の骨芽細胞や骨細胞に対する影響は明確な結論を得ていない。例えば、*in vitro* ではゾレドロン酸は濃度依存性に骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 や間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を抑制する³⁴⁾。ヒトでは、リセドロネートは閉経後骨粗鬆症患者の骨代謝マーカーのうち、骨形成をあらわす血清 BAP (Bone specific Alkaline Phosphatase)、血清 OC (Osteocalcin)の低下が報告されており²⁹⁾、ゾレドロン酸も閉経後骨粗鬆症患者の血清 BAP を低下させた³²⁾。マウスを用いた実験では BP 製剤は骨芽細胞数を減少させ⁴⁹⁾、すなわち BP 製剤による骨芽細胞機能の抑制が示唆されている。一方、マウスを用いた実験で抗 RANKL 抗体は血清 OC は変化なかったが、骨表面の骨芽細胞数を減少させ、骨形成量が低下したとの報告がある⁵⁰⁾。

一方、骨吸収抑制剤による骨細胞への影響は、ヒトでは血清 **Screlostin** を指標とする以外検討できない。ゾレドロン酸投与で血清 **Screlostin** 濃度は早期に一時的に上昇するが、のちに低下する報告^{31,37)} や、逆に **denosumab** 投与では上昇する^{31,38)}との報告があり、骨吸収抑制剤による結果の相違が認められる。

骨細胞や骨芽細胞の遺伝子発現を定量的に評価できれば細胞単位、骨単位での影響が明らかになる可能性はあるが、現在までに、*in vivo* の骨細胞あるいは骨芽細胞の遺伝子発現⁵¹⁾ を評価し、骨吸収抑制剤の影響を検討したものは少ない。そこで、本研究では骨吸収抑制剤としてゾレドロン酸と抗 **RANKL** 抗体を用い、骨粗鬆症モデルマウスでの骨微細構造解析と骨組織形態計測に加えて、骨細胞および骨芽細胞の遺伝子発現を検討することで、骨吸収抑制剤の影響を明らかにすることを目的とした。

OVX マウス、骨吸収抑制剤投与マウスの作成

OVX マウスは閉経後骨粗鬆症を再現する実験モデルとして広く用いられている⁵²⁾。そして OVX を行うマウスは若齢のものが多く、週齢については、**Jastrzebski** らは 8 週齢⁴⁷⁾や **Tokuyama** らは 12 週齢⁵⁰⁾ の OVX マウスを用いて検討している。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いる。OVX により、骨量の減少パターンと減少速度は週齢に依存し、高齢になるほど海綿骨の減少率は少なくなることが報告されている⁵³⁾。また、加齢に伴い個体差が大きくなるため、老齢マウスの使用は適切ではないと考えた。実験系として困難と考えられる。よって、閉経後骨粗鬆症患者の劇的な骨の変化を再現し、検討するに

は、8 週齢のような成獣となっている比較的若いマウスの使用が妥当と考えた。そのため、本研究では 9 週齢で OVX を実施し、閉経後骨粗鬆症のマウス実験モデルとして使用した。

マイクロ CT による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、骨梁間隙ともに減少し、粗な骨構造であった。OVX 処置による骨量減少は、骨代謝回転の亢進と破骨細胞のアポトーシスが抑制され、骨吸収が亢進していることが考えられる⁵⁴⁾。この OVX マウスに骨吸収抑制剤を投与することで、骨量、骨梁数、骨梁幅などの骨微細構造は増加し(図 3)、ゾレドロン酸と抗 RANKL 抗体投与が閉経後骨粗鬆症治療モデルとして妥当であることが示された。特にゾレドロン酸投与の OVX-Z 群は OVX していない対照群より有意に骨量が増加した(図 3)。OVX マウスへのゾレドロン酸の効果と OVX していないマウスにゾレドロン酸投与した効果を比べた結果、ゾレドロン酸投与は対照に比べて、骨量、骨梁数は有意に高いが、OVX-Z 群と比べても Z 群は骨量、骨梁数は有意に高く、骨梁間隙も有意に狭かった(図 4)。骨量において、C 群と OVX-C 群の減少量と Z 群と OVX-Z 群の減少量を比較すると Z 群と OVX-Z 群の減少量が大きいことから、OVX の影響を差し引いても、OVX 処置はゾレドロン酸の骨量増加効果を減弱させることが示唆された(図 3, 4)。つまり、ゾレドロン酸が OVX 状態で骨形成を抑制している可能性が考えられた。

骨組織形態計測

骨細胞の骨組織形態計測において、マウス実験では大腿骨の皮質骨を用い、SHAM 群: 0.91 ± 0.09 個/ μm^2 、OVX 群: 0.96 ± 0.05 個/ μm^2 と骨細胞数の有意的な変化はなく⁴⁷⁾、羊

の左中手骨の骨細胞の密度を比較してもものでは、SHAM 群 : $489 \pm 100 \text{ mm}^{-2}$ 、OVX : $550 \pm 98 \text{ mm}^{-2}$ 、ゾレドロン酸投与群 : $506 \pm 46 \text{ mm}^{-2}$ により骨細胞数の優位的な変化がなかったという報告がある⁵⁵⁾。本研究でも、同様に骨細胞数は OVX や骨吸収抑制剤投与で変化が認められなかった(図 6 A)。本研究では、脛骨近位端の二次海綿骨の骨芽細胞数に関しては、C 群、OVX-C 群、OVX-Z 群、OVX-D 群において評価していないが(図 7)、OVX ラットの脛骨近位端の骨芽細胞数はゾレドロン酸を投与で減少し⁵¹⁾、また、高濃度ゾレドロン酸の治療は、骨周囲長当たりの骨芽細胞の数を減少させ、骨芽細胞の機能を阻害するということが報告されている⁴⁹⁾。一方、最近の研究で、抗 RANKL 抗体投与マウスの骨表面の骨芽細胞数が減少し⁴⁴⁾、OVX マウスに抗 RANKL 抗体を投与したものでは有意に骨芽細胞数が減少した⁵⁰⁾ことが報告されている。これらのことから、ゾレドロン酸と抗 RANKL 抗体は破骨細胞だけではなく、骨芽細胞に影響を与えることが示されている。

そこで、骨吸収抑制剤による骨量増加において、骨形成や骨維持に関わる遺伝子を検討するため、脛骨全体の骨細胞および骨芽細胞に特異的な遺伝子発現を検討した。

骨細胞、骨芽細胞特異的な遺伝子発現の検討

骨細胞特異的な遺伝子として *Sost*, *Dmp1* 発現を検討した結果、興味深いことにゾレドロン酸と抗 RANKL 抗体投与で相反する結果となった(図 8A, B)。ゾレドロン酸は *Sost*, *Dmp1* の発現を抑制する傾向にあったが、抗 RANKL 抗体はそれぞれ 5.8 倍、12.0 倍と有意に増加させ(図 8A, B)た。これらの遺伝子は骨細胞の分化に伴い発現が上昇する、骨細胞の

機能を表すといえる分子である^{20, 56)}。つまり、ゾレドロン酸は骨細胞の細胞機能を抑制する作用があり、抗 RANKL 抗体は骨細胞機能を促進することをあらわす。ゾレドロン酸は骨基質に蓄積するため骨細胞への影響が小さく、抗 RANKL 抗体は循環するため骨基質内に存在する骨細胞へ作用しうる^{10, 31)}とされており、このような結果を得たと考えられた。

現在までにマウスモデルで骨吸収抑制剤が骨細胞機能に及ぼす影響を研究した報告はなく、ヒトの血清 Sclerostin を指標に検討されている。ヒト血清 Sclerostin 濃度は骨生検で採取した骨細胞の Sclerostin mRNA 発現と比例するとの報告もあり⁵⁷⁾、血清 Sclerostin 濃度は骨細胞における Sclerostin の発現をあらわすと考えることができる。さらに、閉経後骨粗鬆症患者の治療経過における臨床研究では、血清 Sclerostin 濃度を骨細胞マーカーだけではなく、血清 Dkk-1 濃度と同じく骨芽細胞機能を促進する Wnt シグナルの阻害因子の指標としている研究が多い^{31, 38)}。ゾレドロン酸は血清 Sclerostin と Dkk-1 を低下させ、逆に、抗 RANKL 抗体は上昇させると報告している^{31, 38)}。つまり、Sclerostin と Dkk-1 の動態だけから推察すると、ゾレドロン酸は骨芽細胞の分化抑制が少なく、denosumab は骨芽細胞の分化を抑制しうると述べている³¹⁾。しかし、ヒト臨床研究では、アレンドロネートより denosumab の方が骨形成効果も大きく¹⁰⁾、血中 Sclerostin の動態とは異なる臨床結果が報告されている。次に、骨細胞の *Sost*, *Dmp1* 発現の動態の差が骨芽細胞の分化、機能に関連する遺伝子発現に関連しているかを検討した。

骨芽細胞に特異的に発現する遺伝子で、骨芽細胞の分化を制御する転写因子として *Runx2*, *Osx* を、骨芽細胞の産生する骨基質遺伝子として *Colla*, *OC* の脛骨全体での発現量を検討した(図 8 C-F)。その結果、ゾレドロン酸による *Colla*, *OC* の発現量はほとんど影響はなかった。*in vitro* の実験で報告されている、ゾレドロン酸による骨芽細胞分化の抑制³⁴⁻³⁶⁾ という報告があり、*OC* の遺伝子発現を抑制するという報告もあるが³⁵⁾、本研究では、ゾレドロン酸が骨細胞の分化抑制するほどの影響は認められなかった。一方、抗 RANKL 抗体では *Colla* は上昇傾向にあり、*OC* は有意に上昇した。ゾレドロン酸と抗 RANKL 抗体の骨芽細胞分化、機能に対する影響も異なる可能性が示された。この結果は、ヒトの臨床研究で BP 製剤と抗 RANKL 抗体で血清 Sclerostin 濃度と同様な結果と矛盾しない。しかし、骨細胞の産生する Sclerostin が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。そこで、Sclerostin の骨細胞での発現を免疫組織染色で検討した。

ヒト血清 Sclerostin は加齢と共に上昇すること、など報告されている¹⁹⁾。Jastrzebski らは 8 週齢に OVX 施行したマウスの *Sost* 発現は継時的に下がること、Sclerostin 染色性も弱くなることを報告している。本研究でも *Sost* 遺伝子発現の結果と一致し、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(図 9)。また、ゾレドロン酸による血清 Sclerostin は低下した(データ示さず)ことも矛盾しなかった。本研究では実験時マウスは 15~16 週齢のマウスで評価しており、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。今後のさらなる検討が必要と考えられた。

最近の研究では、破骨細胞形成を制御する RANKL の供給源としての骨細胞が注目されている³¹⁾。本研究で抗 RANKL 抗体の作用が骨細胞にもあることが示された。すなわち、一つは骨芽細胞だけでなく骨細胞の RANKL をブロックし破骨細胞形成を阻害すること、もう一つは Sclerostin の発現上昇による骨代謝への影響が示唆された。また、次世代の骨粗鬆症治療薬としての抗 Sclerostin 抗体が臨床研究中である。

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。その結果、骨吸収抑制剤により特に骨細胞の遺伝子発現に差異があることが明らかとなった。その機序を示唆する研究報告はまだない。今後の展望として、異なる週齢や異なる部位で評価、異なる手法での解析など、より知見を集積し、骨細胞を介した骨代謝への影響、そして薬剤の影響の違いによる顎骨壊死機序の解明へと繋がるような研究が必要と考える。

結語

本研究は、骨吸収抑制剤の骨細胞および骨芽細胞機能への影響を明らかにするため、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影響を *in vivo* で検討した。その結果、ゾレドロン酸は骨細胞マーカー遺伝子、骨芽細胞マーカー遺伝子の発現にほとんど変化はなかった。抗 RANKL 抗体は骨細胞マーカー遺伝子発現を促進し、骨芽細胞マーカー発現を促進する傾向があり、特に骨細胞の骨形成に関わる機能を促進した。

二つの異なる作用機序にもつ骨吸収抑制剤は、骨細胞に対して異なる作用を有していることが明らかとなった。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて頂き、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎顔面口腔外科学講座(口腔外科学第一教室)古郷幹彦教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の立案ならびに進行にあたり、終始御教示、御指導頂きました大阪大学大学院歯学研究科顎顔面口腔外科学講座(口腔外科学第一教室)相川友直講師、宮川和晃先生に深甚なる謝意を表します。大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病理病態学講座(口腔病理学教室)宇佐美悠先生に助言をいただき、深甚なる謝意を表します。

最後に本研究の円滑な進展のため、特別な御配慮、御協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科顎顔面口腔外科学講座(口腔外科学第一教室)の教室員の皆さまに厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Fukumoto S, Matsumoto T. (2017) : Recent advances in the management of osteoporosis. *F1000Res.* 6 : 625
- 2) Faienza MF, Chiarito M, D'amato G, Colaianni G, Colucci S, Grano M, Brunetti G. (2017) : Monoclonal antibodies for treating osteoporosis. *Expert Opin Biol Ther.* 1-9
- 3) Das S, Crockett JC. (2013) : Osteoporosis - a current view of pharmacological prevention and treatment. *Drug Des Devel Ther.* 7 : 435-448
- 4) Drake MT, Clarke BL, Khosla S. (2008) : Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc.* 83 : 1032-1045
- 5) Lewiecki EM. (2010) : Bisphosphonates for the treatment of osteoporosis: insights for clinicians. *Ther Adv Chronic Dis.* 1: 115-128
- 6) Bock O, Felsenberg D. (2008) : Bisphosphonates in the management of postmenopausal osteoporosis – optimizing efficacy in clinical practice. *Clin Interv. Aging.* 3 : 279-297
- 7) Miyazaki T, Tokimura F, Tanaka S. (2014) : A review of denosumab for the treatment of osteoporosis. *Patient Prefer Adherence.* 8 : 463-471
- 8) Zaheer S, LeBoff M, Lewiecki EM. (2015) : Denosumab for the treatment of osteoporosis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 11 : 461-470
- 9) Brown JP, Prince RL, Deal C, Recker RR, Kiel DP, de Gregorio LH, Hadji P, Hofbauer LC, Alvaro-Gracia JM, Wang H, Austin M, Wagman RB, Newmark R, Libanati C, San Martin J, Bone HG. (2009) : Comparison of the effect of denosumab and alendronate on BMD and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with low bone mass: a randomized, blinded, phase 3 trial. *J Bone Miner Res.* 24 : 153-161
- 10) Baron R, Ferrari S, Russell RG. (2011) : Denosumab and bisphosphonates: different mechanisms of action and effects. *Bone.* 48 : 677-692

- 11) Tella SH, Gallagher JC. (2014) : Biological agents in management of osteoporosis. *Eur J Clin Pharmacol.* 70:1291-1301
- 12) Khan AA, Morrison A, Hanley DA, Felsenberg D, McCauley LK, O'Ryan F, Reid IR, Ruggiero SL, Taguchi A, Tetradis S, Watts NB, Brandi ML, Peters E, Guise T, Eastell R, Cheung AM, Morin SN, Masri B, Cooper C, Morgan SL, Obermayer-Pietsch B, Langdahl BL, Al Dabagh R, Davison KS, Kendler DL, Sándor GK, Josse RG, Bhandari M, El Rabbany M, Pierroz DD, Sulimani R, Saunders DP, Brown JP, Compston J; International Task Force on Osteonecrosis of the Jaw. (2015) : Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. *J Bone Miner Res.*30 : 3-23
- 13) 米田俊之, 萩野浩, 杉本利嗣, 太田博明, 高橋俊二, 宗圓聰, 田口明, 永田俊彦, 浦出雅裕, 柴原孝彦, 豊澤悟 (2016) : 骨吸収抑制薬関連顎骨壊死の病態と管理 :顎骨壊死検討委員会ポジションペーパー 2016 : 1-16
- 14) Komori T. (2013) : Functions of the osteocyte network in the regulation of bone mass. *Cell Tissue Res.* 352:191-198
- 15) Lotze MT, Tracey KJ. (2005) : High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol.*5 : 331-342
- 16) Zong WX, Thompson CB. (2006) : Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.*20:1-15
- 17) Firestein GS.(2003) Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature.* 423 : 356-361
- 18) Raggatt LJ, Partridge NC. (2010) : Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem.* 285 : 25103-25108
- 19) Mödder UI, Hoey KA, Amin S, McCready LK, Achenbach SJ, Riggs BL, Melton LJ, Khosla S. (2011) : Relation of age, gender, and bone mass to circulating sclerostin levels in women and men. *J Bone Miner Res.* 26 : 373-379
- 20) Compton JT, Lee FY. (2014) : A review of osteocyte function and the emerging importance of sclerostin. *J Bone Joint Surg Am.* 96 : 1659-1668

- 21) Balemans W, Ebeling M, Patel N, Van Hul E, Olson P, Dioszegi M, Lacza C, Wuyts W, Van Den Ende J, Willems P, Paes-Alves AF, Hill S, Bueno M, Ramos FJ, Tacconi P, Dikkers FG, Stratakis C, Lindpaintner K, Vickery B, Foernzler D, Van Hul W. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). (2001) : *Hum Mol Genet.* 10 : 537-543
- 22) Brunkow ME, Gardner JC, Van Ness J, Paepfer BW, Kovacevich BR, Proll S, Skonier JE, Zhao L, Sabo PJ, Fu Y, Alisch RS, Gillett L, Colbert T, Tacconi P, Galas D, Hamersma H, Beighton P, Mulligan J. (2001) : Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am J Hum Genet.* 68 : 577-589
- 23) Bhadada SK, Rastogi A, Steenackers E, Boudin E, Arya A, Dhiman V, Bhansali A, Van Hul W. (2013) : Novel SOST gene mutation in a sclerosteosis patient and her parents. *Bone.* 52 : 707-710
- 24) Balemans W, Cleiren E, Siebers U, Horst J, Van Hul W. (2005) : A generalized skeletal hyperostosis in two siblings caused by a novel mutation in the SOST gene. *Bone.* 36 : 943-947
- 25) Kim CA, Honjo R, Bertola D, Albano L, Oliveira L, Jales S, Siqueira J, Castilho A, Balemans W, Piters E, Jennes K, Van Hul W. (2008) : A known SOST gene mutation causes sclerosteosis in a familial and an isolated case from Brazilian origin. *Genet Test.* 12 : 475-479
- 26) Ominsky MS, Boyce RW, Li X, Ke HZ. (2017) : Effects of sclerostin antibodies in animal models of osteoporosis. *Bone.* 96:63-75
- 27) McClung MR. (2017) : Sclerostin antibodies in osteoporosis: latest evidence and therapeutic potential. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 9 : 263-270
- 28) Ravn P, Neugebauer G, Christiansen C. (2002) : Association between pharmacokinetics of oral ibandronate and clinical response in bone mass and bone turnover in women with postmenopausal osteoporosis. *Bone.* 30 : 320-324
- 29) Kasukawa Y, Miyakoshi N, Ebina T, Aizawa T, Hongo M, Nozaka K, Ishikawa Y, Saito H, Chida S, Shimada Y. : (2014) Effects of risedronate alone or combined with vitamin K2 on serum undercarboxylated osteocalcin and osteocalcin levels in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Metab.* 32 : 290-297

- 30) Liang BC, Shi ZY, Wang B, Wu P, Kong LC, Yao JL, Li CW, Shi XL. (2017) : Intravenous Zoledronic Acid 5 mg on Bone Turnover Markers and Bone Mineral Density in East China Subjects with Newly Diagnosed Osteoporosis: A 24-month Clinical Study. *Orthop Surg.* 9 : 103-109
- 31) Anastasilakis AD, Polyzos SA, Gkiomisi A, Bisbinas I, Gerou S, Makras P. (2013) : Comparative effect of zoledronic acid versus denosumab on serum sclerostin and dickkopf-1 levels of naive postmenopausal women with low bone mass: a randomized, head-to-head clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 98 : 3206-3212
- 32) Nakamura T, Fukunaga M, Nakano T, Kishimoto H, Ito M, Hagino H, Sone T, Taguchi A, Tanaka S, Ohashi M, Ota Y, Shiraki M1. (2017) : Efficacy and safety of once-yearly zoledronic acid in Japanese patients with primary osteoporosis : two-year results from a randomized placebo-controlled double-blind study (ZOledroNate treatment in Efficacy to osteoporosis ; ZONE study). *Osteoporos Int.* 28 : 389-398
- 33) Kubek DJ, Burr DB, Allen MR. (2010) : Ovariectomy stimulates and bisphosphonates inhibit intracortical remodeling in the mouse mandible. *Orthod Craniofac Res.* 13 : 214-222
- 34) Patntirapong S, Singhatanadgit W, Chanruangvanit C, Lavanrattanukul K, Satravaha Y. (2012) : Zoledronic acid suppresses mineralization through direct cytotoxicity and osteoblast differentiation inhibition. *J Oral Pathol Med.* 41 : 713-720
- 35) Basso FG, Silveira Turrioni AP, Hebling J, de Souza Costa CA. (2013) : Zoledronic acid inhibits human osteoblast activities. *Gerontology.* 59 : 534-541
- 36) Huang X, Huang S, Guo F, Xu F, Cheng P, Ye Y, Dong Y, Xiang W, Chen A. (2016) : Dose-dependent inhibitory effects of zoledronic acid on osteoblast viability and function in vitro. *Mol Med Rep.* 13 : 613-622
- 37) Catalano A, Morabito N, Basile G, Brancatelli S, Cucinotta D, Lasco A. (2013) : Zoledronic acid acutely increases sclerostin serum levels in women with postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 98 : 1911-1915
- 38) Gatti D, Viapiana O, Fracassi E, Idolazzi L, Dartizio C, Povino MR, Adami S, Rossini M. (2012) : Sclerostin and DKK1 in postmenopausal osteoporosis treated with denosumab. *J Bone*

- 39) Ye T, Cao P, Qi J, Zhou Q, Rao DS, Qiu S (2017). : Protective effect of low-dose risedronate against osteocyte apoptosis and bone loss in ovariectomized rats. *PLoS One.* 12
- 40) Soundia A, Hadaya D, Esfandi N, de Molon RS, Bezouglaia O, Dry SM, Pirih FQ, Aghaloo T, Tetradis S. (2016) : Osteonecrosis of the jaws (ONJ) in mice after extraction of teeth with periradicular disease. *Bone.* 90 : 133-141
- 41) Idris AI. (2012) Ovariectomy/orchidectomy in rodents. *Methods Mol Biol.* 816 : 545-551
- 42) Sophocleous A, Idris AI. (2014) : Rodent models of osteoporosis. *Bonekey Rep.* 3 : 614
- 43) Holcomb VB, Keck VA, Barrett J, Hong J, Libutti SK, Nunez NP. (2009) : Obesity impairs wound healing in ovariectomized female mice. *In Vivo.* 23 : 515-518
- 44) Furuya Y, Mori K, Ninomiya T, Tomimori Y, Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Uchida K, Yasuda H. (2011) Increased bone mass in mice after single injection of anti-receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand-neutralizing antibody: evidence for bone anabolic effect of parathyroid hormone in mice with few osteoclasts. *J Biol Chem.* 286 : 37023-37031
- 45) Noguchi T, Matsunaga S, Kinoshita H, Fukuda M, Saka H, Ide Y, Abe S. (2013) : A Site-Specific Comparison of the Trabecular Structure in Senescence-Accelerated Mice-Evaluation of Time-Course Changes in Bone Architecture using in Vivo Micro-CT-. *Journal of Hard Tissue Biology.* 22 : 171-176
- 46) Matsunaga S, Maki H, Noguchi T, Odaka K, Kasahara M, Yamamoto M, Abe S. (2016) : Effect of Ovariectomy on the Tibia and Alveolar Bone in a Senescence-Accelerated Mouse-Prone 6 (SAMP6) Model. *Journal of Hard Tissue Biology.* 25 : 104-108
- 47) Jastrzebski S, Kalinowski J, Stolina M, Mirza F, Torreggiani E, Kalajzic I, Won HY, Lee SK, Lorenzo J. (2013) : Changes in bone sclerostin levels in mice after ovariectomy vary independently of changes in serum sclerostin levels. *J Bone Miner Res.* 28:618-626
- 48) Toyosawa S, Shintani S, Fujiwara T, Ooshima T, Sato A, Ijuhin N, Komori T. (2001) : Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in

osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 16 : 2016-2026

49) Pozzi S, Vallet S, Mukherjee S, Cirstea D, Vaghela N, Santo L, Rosen E, Ikeda H, Okawa Y, Kiziltepe T, Schoonmaker J, Xie W, Hideshima T, Weller E, Bouxsein ML, Munshi NC, Anderson KC, Raje N. (2009) High-dose zoledronic acid impacts bone remodeling with effects on osteoblastic lineage and bone mechanical properties. *Clin Cancer Res.* 15:5829-5839

50) Tokuyama N, Hirose J, Omata Y, Yasui T, Izawa N, Matsumoto T, Masuda H, Ohmiya T, Yasuda H, Saito T, Kadono Y, Tanaka S. (2015) : Individual and combining effects of anti-RANKL monoclonal antibody and teriparatide in ovariectomized mice. *Bone Rep.* 21:1-7

51) Li GW, Xu Z, Chang SX, Zhou L, Wang XY, Nian H, Shi X. (2014) Influence of early zoledronic acid administration on bone marrow fat in ovariectomized rats. 155 : 4731-4738

52) Inada M, Matsumoto C, Miyaura C. (2011) : Animal models for bone and joint disease. Ovariectomized and orchidectomized animals. *Clin Calcium.* 21 : 164-170

53) Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. (1995) : FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone.* 17 : 125S-133S

54) Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. (1996) : Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nature medicine.* 2 : 1132-1136

55) Brennan O, Kennedy OD, Lee TC, Rackard SM, O'Brien FJ. (2011) : Effects of estrogen deficiency and bisphosphonate therapy on osteocyte viability and microdamage accumulation in an ovine model of osteoporosis. *J Orthop Res.* 29 : 419-424

56) Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. (2013) : The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocr Rev.* 34 : 658-690

57) Reppe S, Noer A, Grimholt RM, Halldórsson BV, Medina-Gomez C, Gautvik VT, Olstad OK, Berg JP, Datta H, Estrada K, Hofman A, Uitterlinden AG, Rivadeneira F, Lyle R, Collas P, Gautvik KM. (2015) : Methylation of bone SOST, its mRNA, and serum sclerostin levels correlate strongly with fracture risk in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 30 : 249-256

遺伝子	primer
<i>Sost</i>	F : 5' TCAGGAATGATGCCACAGAG3' R : 5' TGTCAGGAAGCGGGTGTAG3'
<i>Dmp1</i>	F : 5' AGTGAGTCATCAGAAGAAAGTCAAGC3' R : 5' CTATACTGGCCTCTGTCGTAGCC3'
<i>Runx2</i>	F : 5' TCCACAAGGACAGAGTCAGATTACAG3' R : 5' CAGAAGTCAGAGGTGGCAGTGTCATC3'
<i>Osx</i>	F : 5' ATGGCGTCCTCTCTGCTTG3' R : 5' TGAAAGGTCAGCGTATGGCTT3'
<i>Colla</i>	F : 5' CTGGCGGTTTCAGGTCCAAT3' R : 5' TTCCAGGCAATCCACGAGC3'
<i>OC</i>	F : 5' CTGACCTCACAGATCCCAAGC3' R : 5' TGGTCTGATAGCTCGTCACAAG3'

表：本研究で使用した定量的Real-time PCR primerの一覧

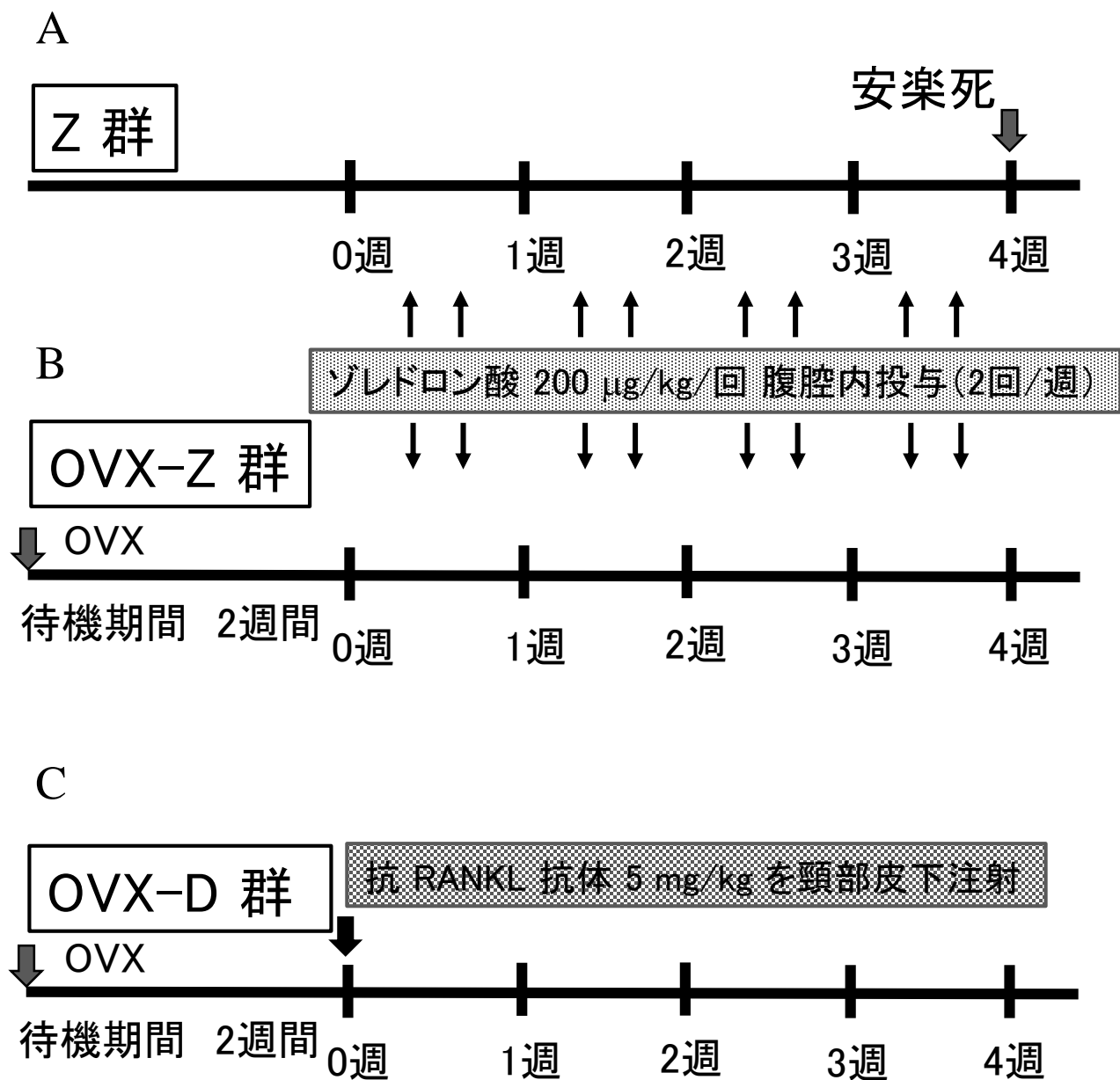


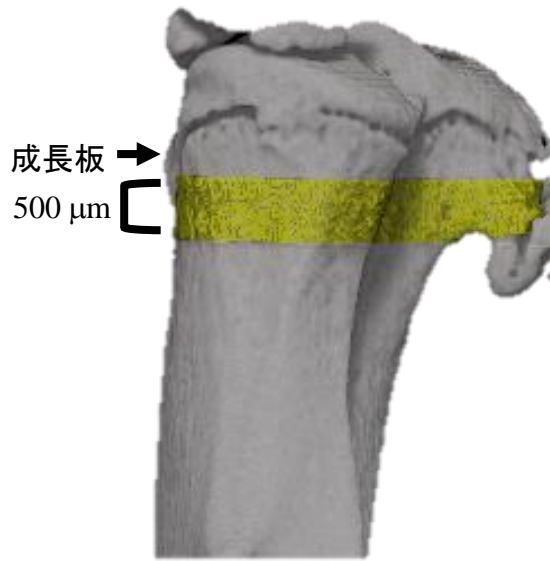
図 1 :モデルマウスの作成(投薬スケジュール)

Z 群:ゾレドロン酸 200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{回}$ 腹腔内投与(2回/週)

OVX-Z 群:OVXし、2 週間創部治癒を待ち、ゾレドロン酸 200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{回}$ 腹腔内投与(2回/週)

OVX-D 群:OVXし、2 週間創部治癒を待ち、抗 RANKL 抗体を5 mg/kg を頸部皮下注射
各々の薬剤を投与していない群を対象群(C 群)

A



B

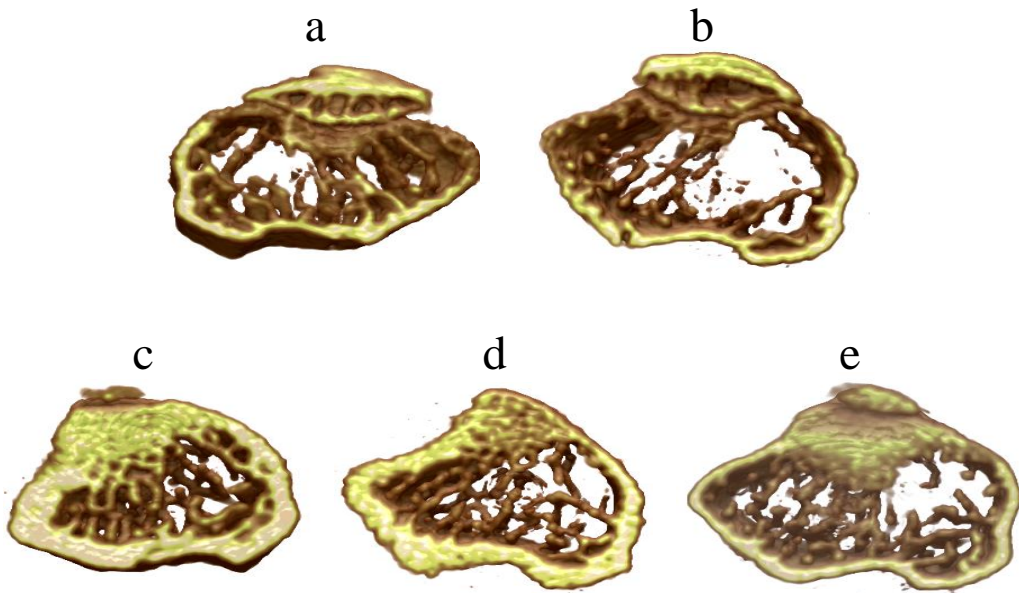


図 2：骨微細構造解析

A：CT を用いた骨微細構造解析

脛骨を摘出、ホルマリン固定後にスライス幅 10 mm で CT 撮影

成長板直下の 50 スライス (500 μm) を解析

マイクロ CT 撮影機：R-mCT2 (Rigaku 社)

解析ソフトウェア：TRI/3D-Bon64 (ラトック社)

B：脛骨の水平断の 3D 画像

a：C 群

b：OVX-C 群

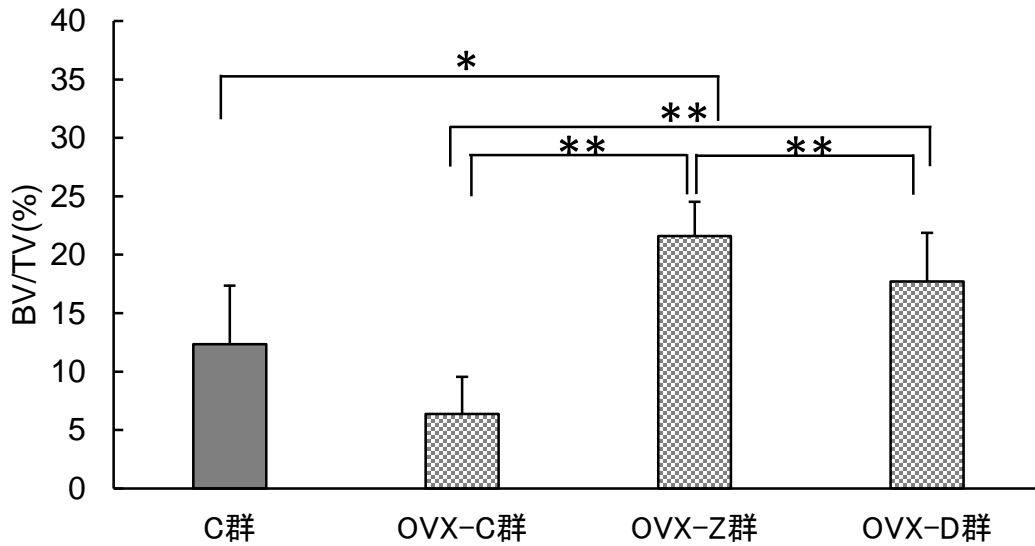
c：Z 群

d：OVX-Z 群

e：OVX-D 群

OVX-C 群は C 群より、皮質骨は薄く、海面骨骨梁は少ない傾向を示した。OVX-Z 群は OVX-C 群に比べて皮質骨の厚みは厚く、骨梁数は増加した。また、骨梁幅も増大した。OVX-D 群も OVX-C 群に比べて皮質骨は厚い傾向を示し、骨梁数は増加し、骨梁幅も増大した。OVX-Z 群の皮質骨は OVX-D 群より、さらに C 群より厚かった。

A: 骨量



B: 骨梁数

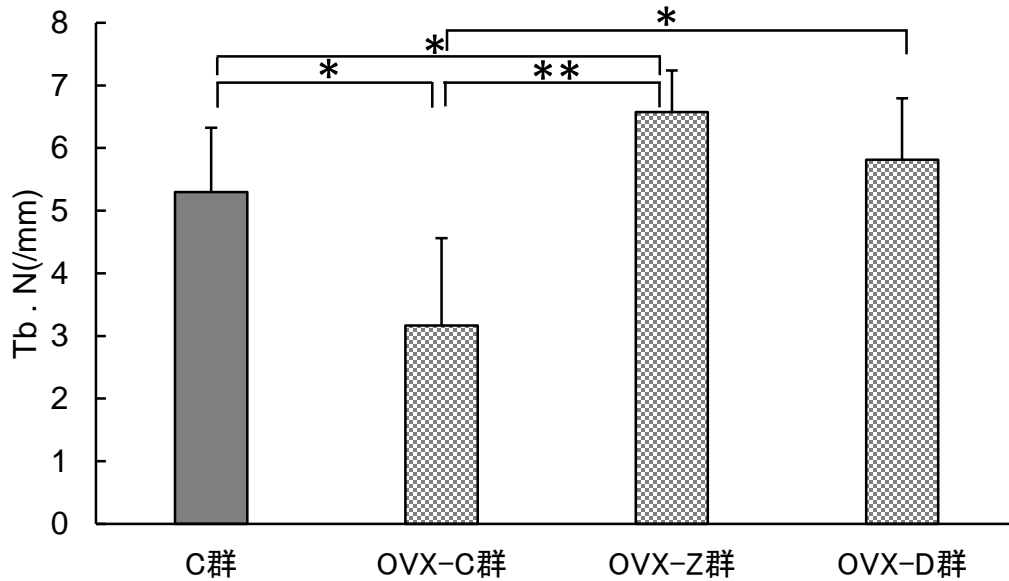


図 3: 骨微細構造解析

A: 骨量

C 群の骨量 12.3% と比較して、OVX-C 群は 6.4% と低い傾向を示した。OVX-C 群の骨量 6.4% に対して、OVX-Z 群は 21.6% と著しい骨量の増加を認めた。OVX-C 群の骨量 6.4% に対して、OVX-Z 群は 21.6% と著しい骨量の増加を認め、OVX-D 群は 17.7% と著しい骨量の増加を認めた。

OVX-D 群の骨量 (17.7%) と比較して、OVX-Z 群の骨量 (21.6%) は有意に増大した。

(C 群 : n = 4, OVX-C 群 : n = 14, OVX-Z 群 : n = 7, OVX-D 群 : n = 7)

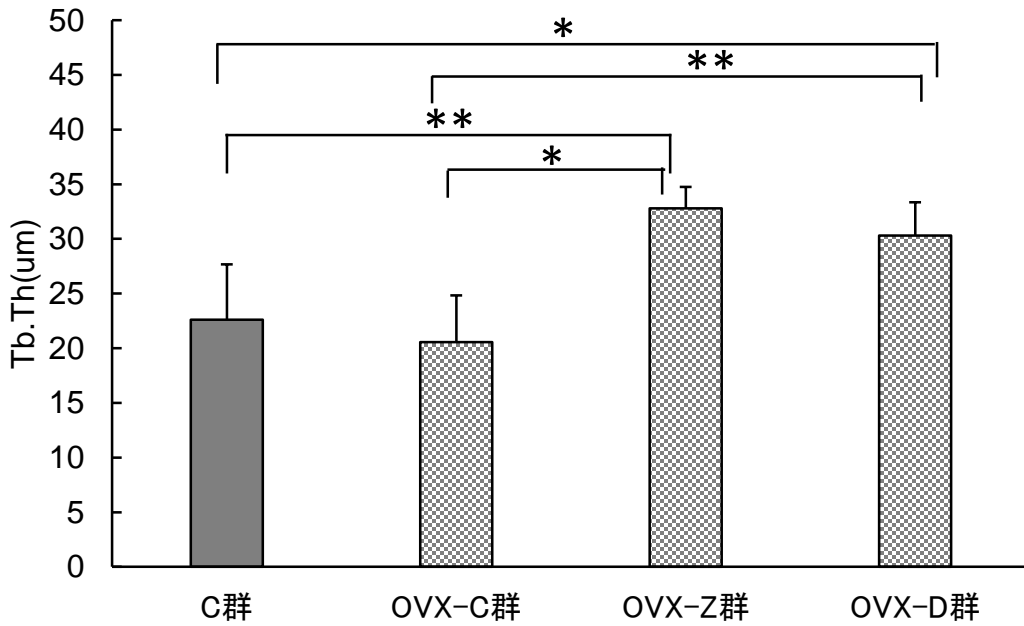
B: 骨梁数

C 群と比較して OVX-C 群の骨梁数は有意に低下した。OVX-C 群に対して OVX-Z 群、OVX-D 群の骨梁数は、OVX-C 群に対して有意に増大した。OVX-D 群と比較して、OVX-Z 群は骨梁数が多い傾向を示した。

(C 群 : n = 4, OVX-C 群 : n = 14, OVX-Z 群 : n = 7, OVX-D 群 : n = 7)

(Mann-Whitney U test : * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

C: 骨梁幅



D: 骨梁間隙

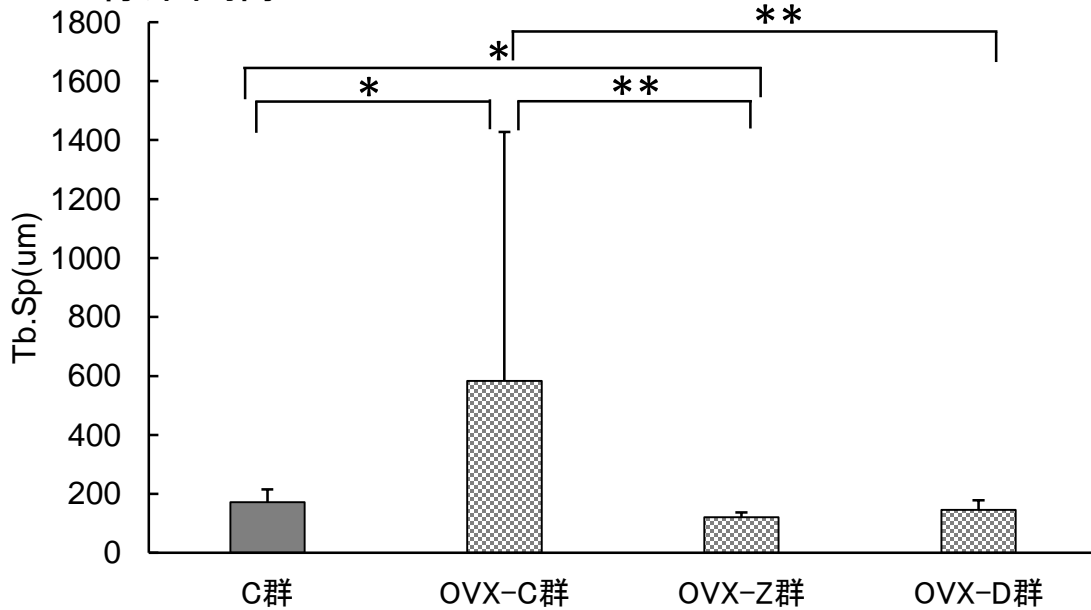


図3: 骨微細構造解析

C: 骨梁幅

C群と比較してOVX-C群の骨梁幅は減少する傾向を示した。OVX-C群と比較して、OVX-Z群、OVX-D群の骨梁幅も有意に増大した。

OVX-D群と比較して、OVX-Z群は骨梁幅が大きい傾向を示した。

(C群: n=4, OVX-C群: n=14, OVX-Z群: n=7, OVX-D群: n=7)

D: 骨梁間隙

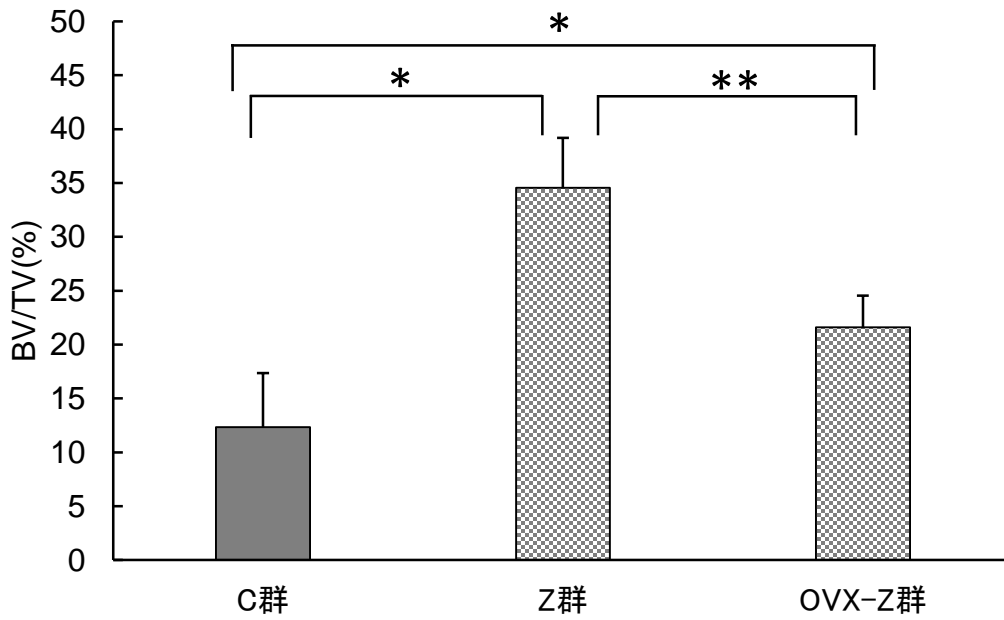
C群と比較してOVX-C群の骨梁間隙は有意に増大した。OVX-C群と比較して、OVX-Z群、

OVX-D群の骨梁間隙も有意に減少した。OVX-D群と比較して、OVX-Z群は骨梁間隙が小さい傾向を示した。

(C群: n=4, OVX-C群: n=14, OVX-Z群: n=7, OVX-D群: n=7)

(Mann-Whitney U test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

A: 骨量



B: 骨梁数

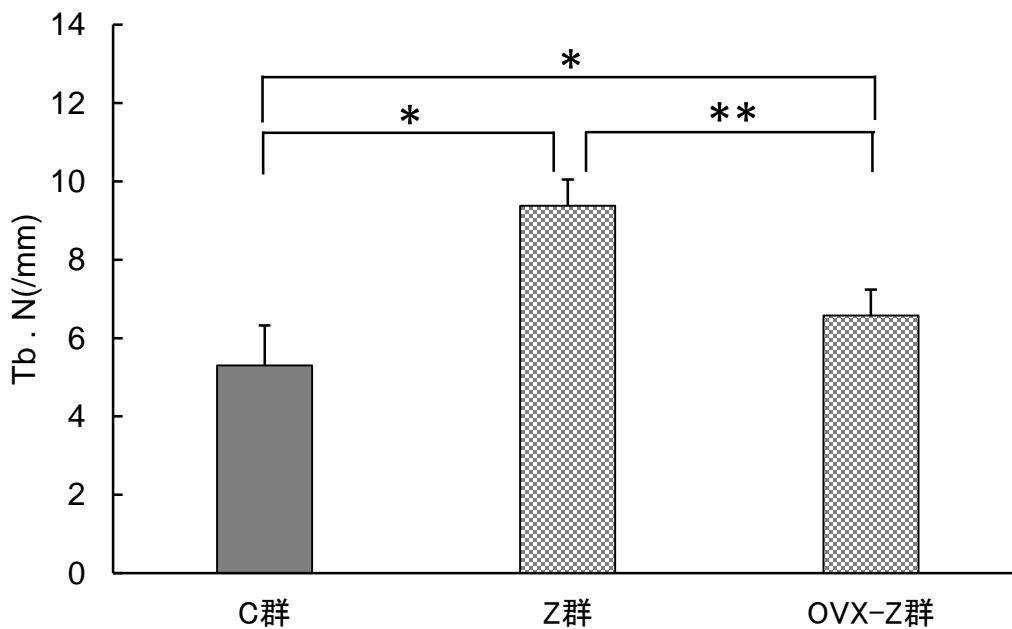


図 4: 骨微細構造解析 (OVXの影響を検討)

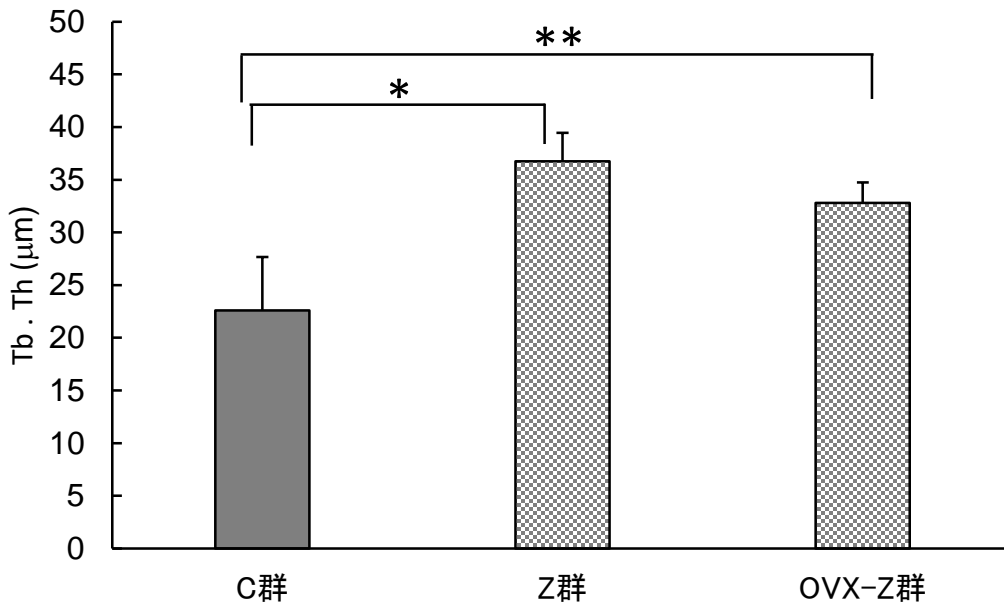
骨量はZ群 34.6%、OVX-Z群 21.6%と、骨梁数も有意にZ群が多かった。また、C群と比較して、OVX-Z群は骨量、骨梁数が有意に増大した。

A: 骨量(C群: n = 4, Z群: n = 4, OVX-Z群: n = 7)

B: 骨梁数(C群: n = 4, Z群: n = 4, OVX-Z群: n = 7)

(Mann-Whitney U test: * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$)

C:骨梁幅



D:骨梁間隙

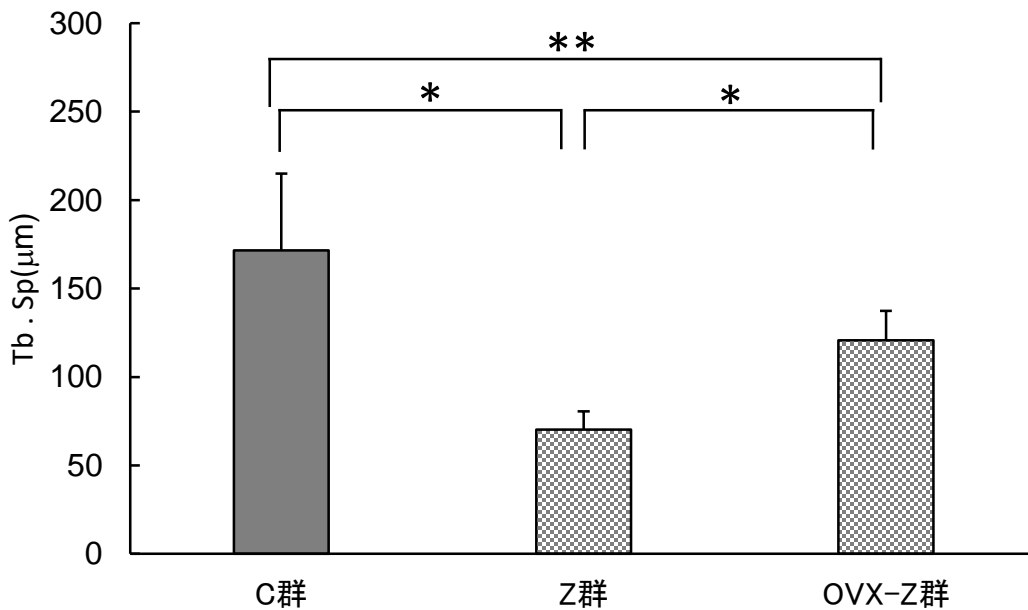


図4:骨微細構造解析 (OVXの影響を検討)

Z群と比較して、OVX-Z群の骨梁幅は減少傾向があり、骨梁間隙は有意に増大した。また、C群と比較して、OVX-Z群は骨量幅は有意に増大し、骨梁間隙も有意に減少した。

C:骨梁幅 (C群:n=4, Z群:n=4, OVX-Z群:n=7)

D:骨梁間隙 (C群:n=4, Z群:n=4, OVX-Z群:n=7)

(Mann-Whitney U test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

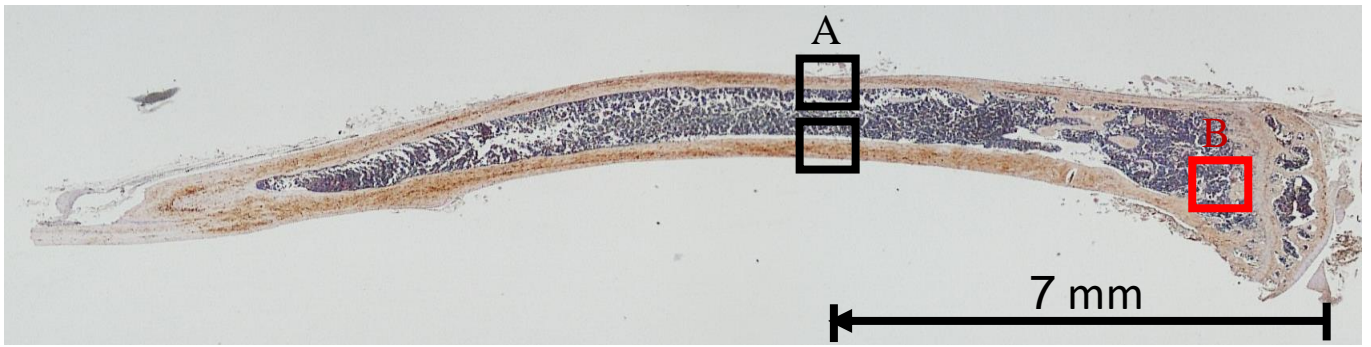


図 5 : 骨組織形態計測

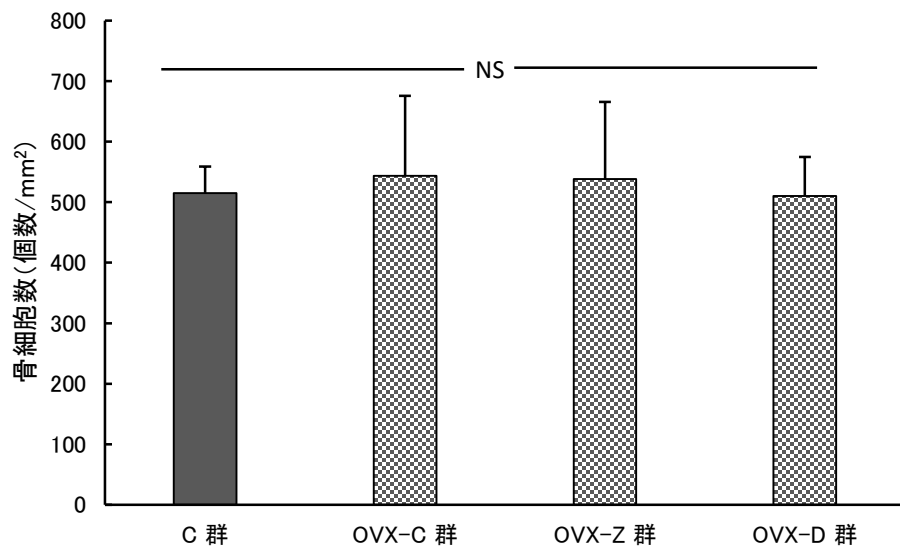
A : 骨細胞 (■ 枠内)

脛骨近位端から 7 mm の皮質骨を強拡大で撮影
単位面積あたりの骨細胞を計測

B : 骨芽細胞 (■ 枠内)

脛骨近位端の二次海綿骨の骨芽細胞を強拡大で撮影

A



B

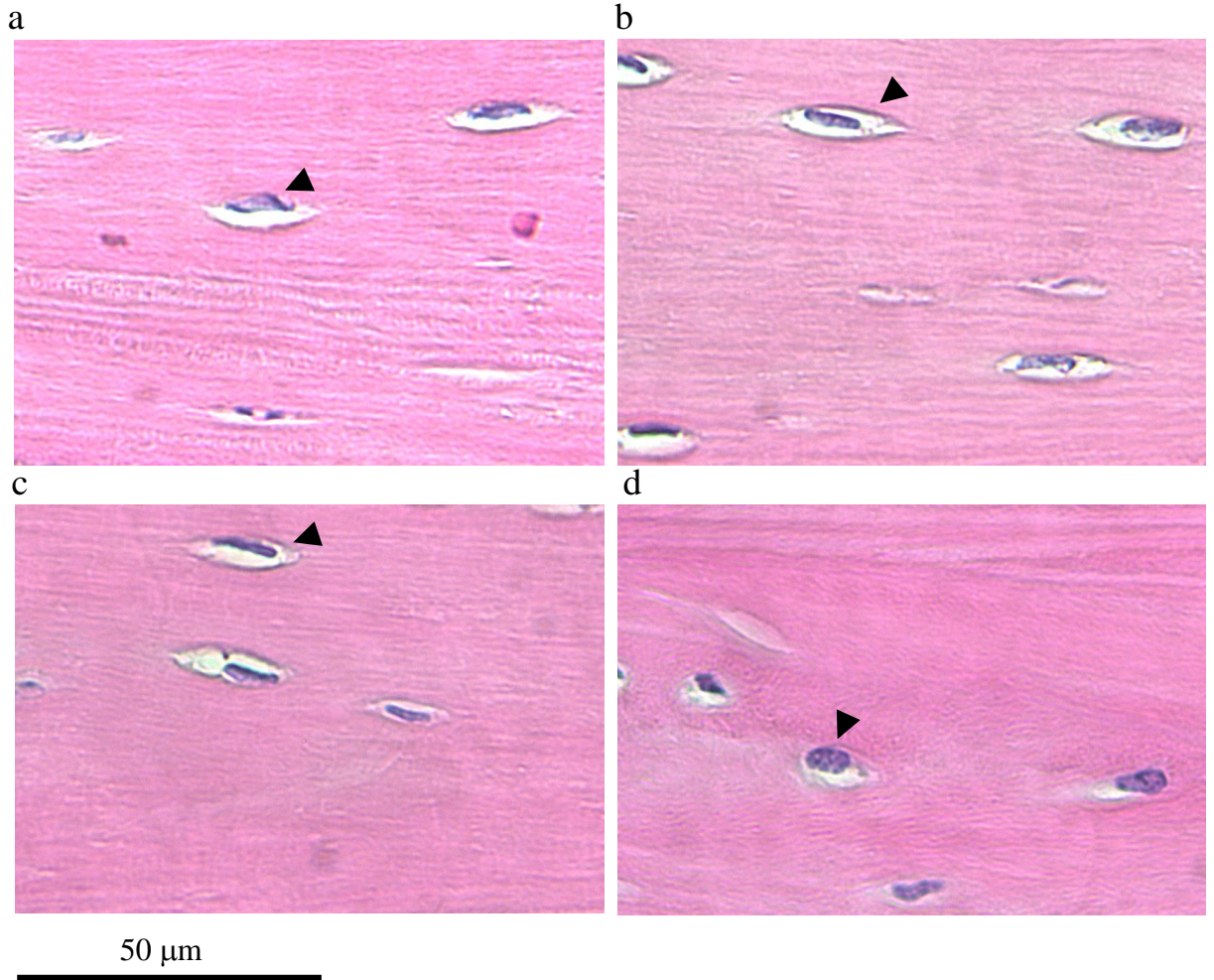


図 6: 骨組織形態計測

A: C群では 515 個の骨細胞を計測し、OVX-C 群では 543 個、OVX-Z 群では 538 個、OVX-D 群では 510 個の骨細胞を計測した。OVXマウス、骨吸収抑制剤投与でも骨細胞数に有意な変化は見られなかった。OVX 処置、ゾレドロン酸投与や抗 RANKL 抗体投与の骨細胞数への影響は少ないことが示唆された。(C 群: n=4, OVX-C 群: n=4, OVX-Z 群: n=11, OVX-D 群: n=7)

B: ヘマトキシリン・エオジン染色: 骨細胞

骨細胞の細胞形態、骨小腔に明らかな差は見られなかった。

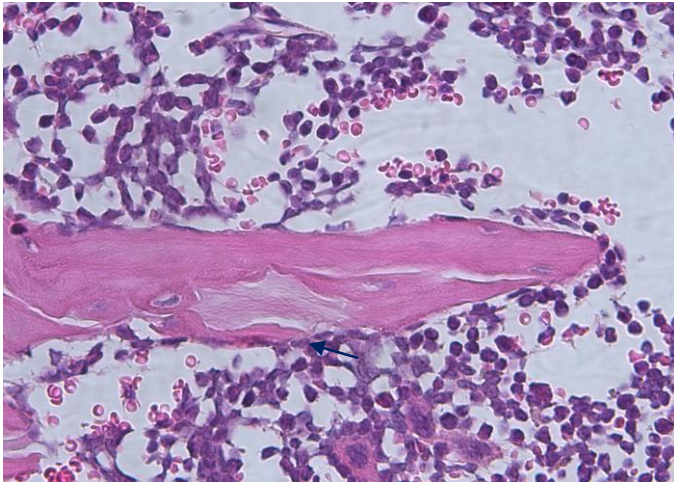
a: C 群

b: OVX-C 群

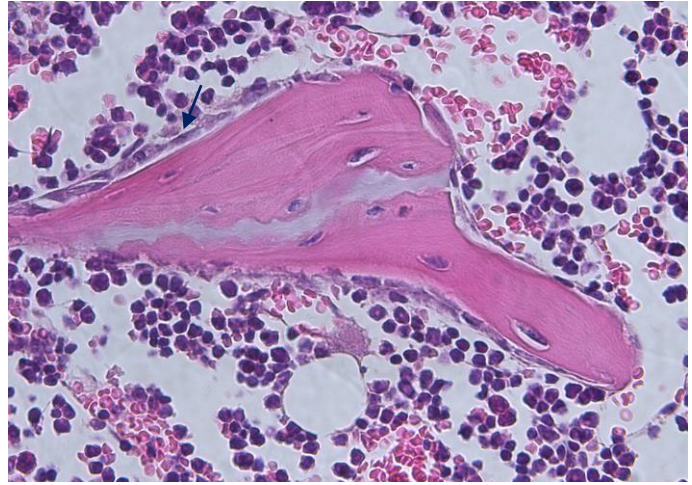
c: OVX-Z 群

d: OVX-D 群

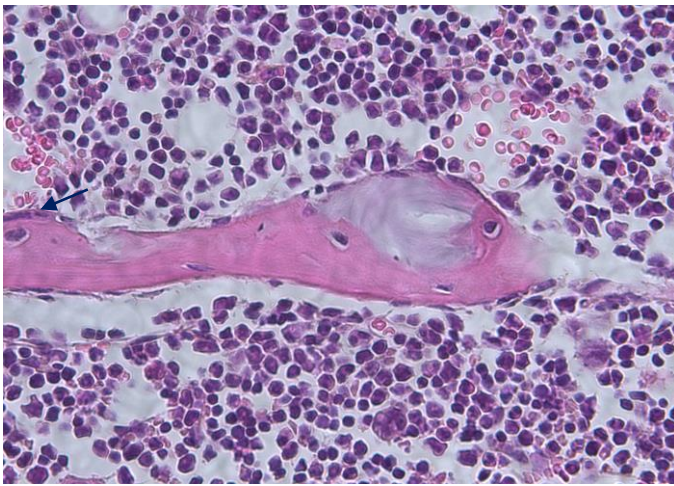
A



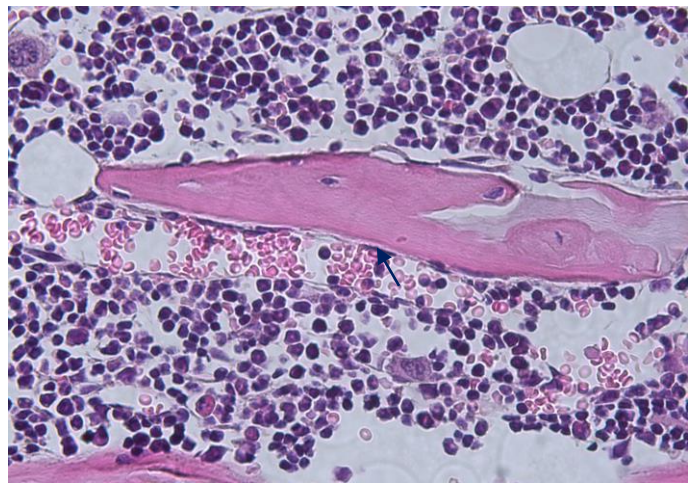
B



C



D



50μm

図 7：ヘマトキシリン・エオジン染色 ▲ :骨芽細胞

二次海綿骨を撮影したものであり、C 群 (A) や OVX-C 群 (B) は骨代謝回転が亢進状態であり、骨芽細胞は活性状態の細胞が認められた。ゾレドロン酸を投与した OVX-Z 群 (C)、OVX-D 群 (D) は骨代謝回転が抑制状態であり、骨芽細胞は不活性な細胞が認められた。

A : C 群

B : OVX-C 群

C : OVX-Z 群

D : OVX-D 群

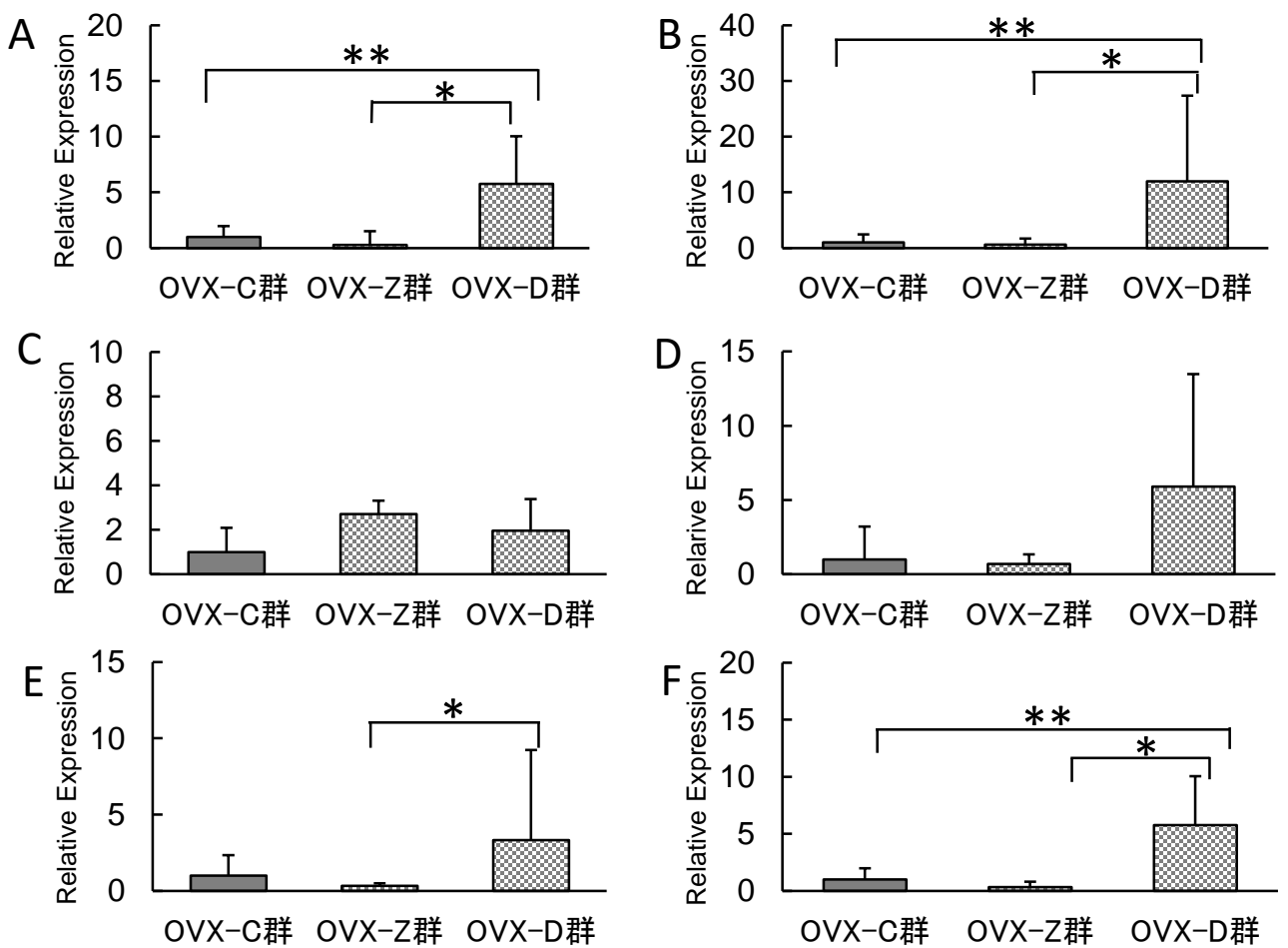


図8：Realtime PCR結果(Relative Expression)

A: *Sost*

OVX-C 群と比較してOVX-Z 群の *Sost* 発現は、1/3 倍に減少し、OVX-D 群の *Sost* 発現は 5.8 倍に有意に上昇した。また、OVX-D 群の *Sost* 発現はOVX-Z 群より 20.1 倍有意に上昇した。(OVX-C 群 : n = 7, OVX-Z 群 : n = 3, OVX-D 群 : n = 4)

B: *Dmp1*

OVX-C 群と比較してOVX-Z 群の *Dmp1* 発現は約 3/5 倍に減少し、OVX-D 群の *Dmp1* の発現は 12.0 倍に有意に上昇した。また、OVX-D 群の *Dmp1* 発現はOVX-Z 群の 19.2 倍に有意に上昇した。(OVX-C 群 : n = 7, OVX-Z 群 : n = 3, OVX-D 群 : n = 4)

C: *Runx2*

OVX-C 群と比較してOVX-Z 群の *Runx2* 発現は約 2.7 倍に上昇し、OVX-D 群の *Runx2* 発現は約 2.0 倍に上昇し、OVX-D 群の *Runx2* 発現はOVX-Z 群と比較して約 2/3 倍に上昇する傾向があった。(OVX-C 群 : n = 6, OVX-Z 群 : n = 4, OVX-D 群 : n = 3)

D: *Osx*

OVX-C 群と比較してOVX-Z 群の *Osx* 発現は約 2/3 倍に減少し、OVX-D 群の *Osx* 発現は約 5.9 倍に上昇し、OVX-D 群の *Osx* 発現は OVX-Z 群と比較して約 8.4 倍に上昇する傾向があった。(OVX-C 群 : n = 7, OVX-Z 群 : n = 4, OVX-D 群 : n = 4)

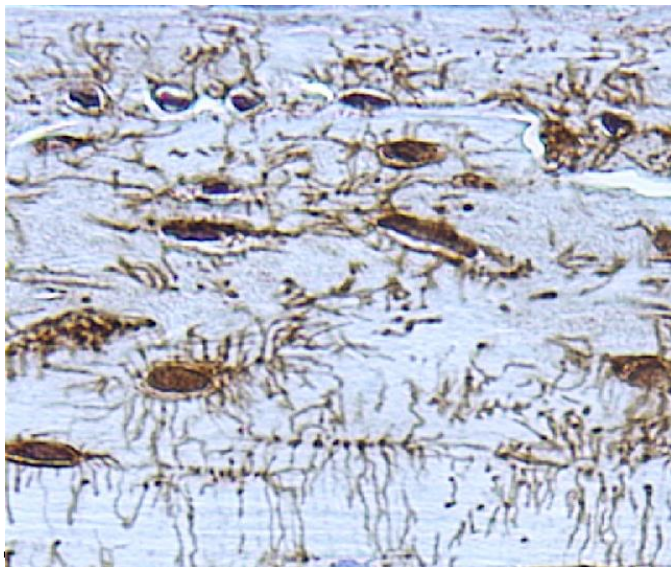
E: *Colla*

OVX-C 群と比較してOVX-Z 群の *Colla* の発現は約 1/3 倍に減少する傾向があり、OVX-D 群の *Colla* の発現は約 3.3 倍に上昇する傾向があった。また、OVX-D 群はOVX-Z 群と比較して約 10.3 倍に有意に上昇することが認められた。(OVX-C 群 : n = 7, OVX-Z 群 : n = 4, OVX-D 群 : n = 4)

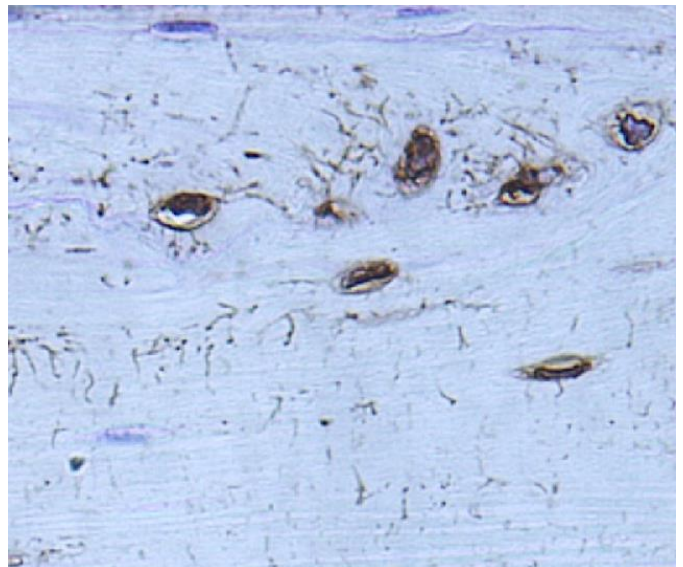
F: *OC*

OVX-C 群と比較してOVX-Z 群の *OC* 発現は約 1/3 倍に減少する傾向があり、OVX-D 群は OVX-C 群と比較して約 5.8 倍に有意に上昇することが認められた。また、OVX-D 群はOVX-Z 群と比較して約 17.9 倍に有意に上昇することが認められた。(OVX-C 群 : n = 7, OVX-Z 群 : n = 4, OVX-D 群 : n = 4)
(Mann-Whitney U test : * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

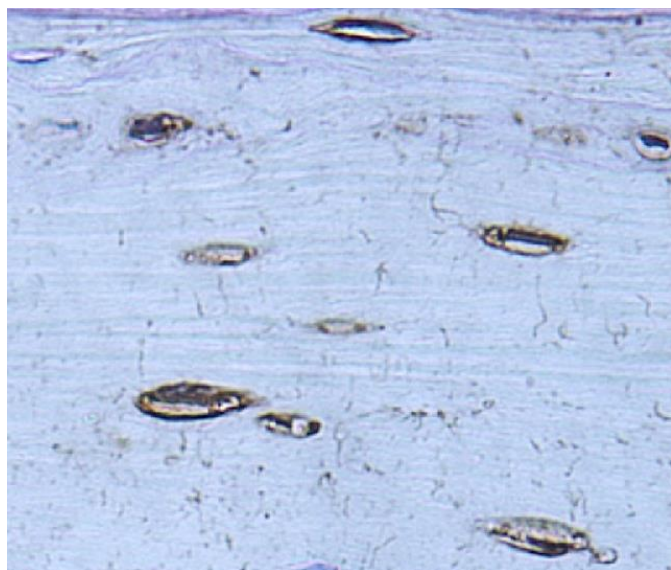
A



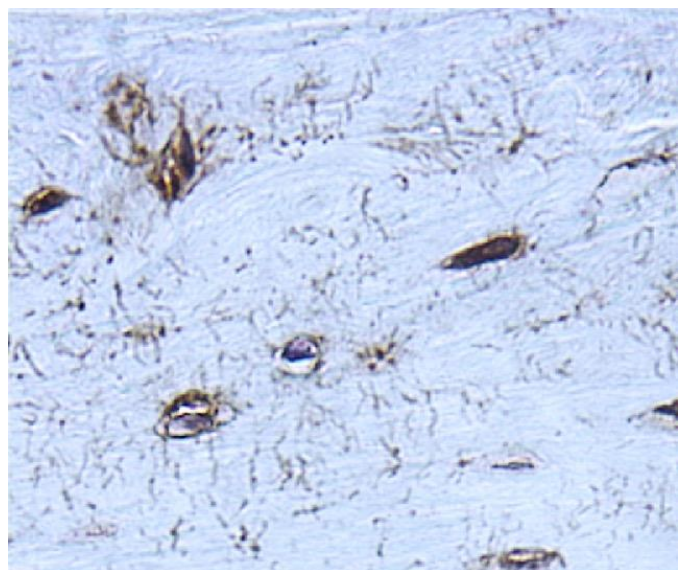
B



C



D



50μm

図9：脛骨免疫染色 (Sclerostin)

C群は骨細胞の細胞質、骨小腔、骨細管、骨基質に Sclerostin の濃染を認め、骨細胞での高い Sclerostin の発現が示唆された。OVXマウスではC群と比較して細胞質の染色性、骨小腔の染色性、骨細管の染色性ともに著しく減弱した。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った。

A: C群

B: OVX-C群

C: OVX-Z群

D: OVX-D群