

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 西村 隆慈

骨粗鬆症は骨強度の低下と骨折リスクの増大を特徴とする疾患である。日本国内における 40 歳以上の骨粗鬆症患者数は 1280 万人(男性 380 万人、女性 900 万人)ときわめて多数であり、社会的問題と認識されている。骨粗鬆症の治療薬はその作用機序が 2 種類に大別されており、骨吸収の抑制作用を持つ薬と、骨形成の促進作用を持つ薬となっている。しかしながら、多くの治療薬において重篤な副作用が報告されていることや、投薬期間に制限を持つ治療薬もあり、これらの薬を適宜組み合わせて調節しながら使用する必要がある。病態も多岐にわたっており、治療方針を単純に決定することができない。これらの様々な状況を改善するため、新たな作用機序を持ち、かつ副作用が少なく長期使用できる新しい骨粗鬆症治療薬が望まれている。

Norzoanthamine (NZ) は 1995 年にスナギンチャク(*Zoanthas.sp*)から単離、構造決定されたアルカロイドである。NZ は、骨粗鬆症モデルマウスにおいてエストロゲン様の作用は示さずに骨量や骨パラメータの低下を抑制することが報告されている。その作用機序としてはコラーゲンとヒドロキシアパタイトの結合を強化することでコラーゲンの分解が抑制されることが示された。これらのことから、NZ は従来の作用機序とは異なる骨粗鬆症の新たな治療薬として期待された。しかしながら天然の NZ は 5kg のスナギンチャクから 21mg (0.00042%) しか抽出することができず、臨床的に使用するには十分な供給量を確保できないという問題点があった。そこで NZ の構造の一部を切断し簡略化した NZ 類似化合物として、切断型 NZ (Truncated Norzoanthamine, 以下 TZ) が開発された、TZ は、NZ と比較して合成過程が単純であり、化学合成による大量供給が可能である。構造を簡略化した TZ が、もし NZ と同様の骨吸収抑制作用を示すのであれば、骨粗鬆症の新規治療薬として広く臨床応用できる可能性が期待される。

そこで本研究では、まず TZ の骨粗鬆症に対する効果を検討するため、卵巣の摘出により作製した骨粗鬆症モデルマウス (OVX マウス) を用いて、TZ 投与による骨吸収抑制作用および骨強度の変化を評価した。続いて、TZ の骨への作用メカニズムを検討するために、TZ 処理した骨芽細胞株における骨形成能に対する影響を評価した。最後に TZ の骨質に対する影響を検討するために、TZ 処理した骨芽細胞株由来のコラーゲンについて評価を行った。

OVX マウスに対する TZ 経口投与実験では、大腿骨の遠位部 2 次海綿骨領域においてコントロール群は海綿骨がほぼ消失したのに対して、TZ の低用量群 (TZ 0.004、TZ 0.02) は海綿骨減少の抑制が認められた。 μ CT の測定においても、海綿骨の骨量/組織量、骨梁幅、骨間隙、骨塩濃度の項目において TZ 投与群はコントロール群と比較して有意に改善するこ

とが確認された。また、皮質骨に対する TZ の影響は認められなかった。さらに、TZ の骨強度に対する影響を検討するため、3 点曲げ試験を行った。TZ 群は破断エネルギーおよび剛性においてコントロール群に対して有意に高い値を示した。以上のことから TZ は OVX マウスに対して海綿骨の骨量減少抑制効果を示し、さらに骨強度も改善することが示された。また、TZ は皮質骨よりも海綿骨に大きく影響すると考えられた。

次いで、TZ によるマウス由来骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞の骨形成機能への影響について検討を行った。また、TZ が骨芽細胞の分化誘導に影響するかどうかを検討するため、MC3T3-E1 細胞は未分化、分化誘導させたもの 2 つのグループで検討した。まず、TZ が MC3T3-E1 細胞の細胞数に影響を与えるか検討したところ、未分化および分化誘導 MC3T3-E1 細胞どちらにおいても TZ 処理によって有意な増加を示した。また未分化 MC3T3-E1 細胞では濃度依存性に TZ により石灰化が有意に増加していた。しかし、分化誘導 MC3T3-E1 細胞では濃度依存性に減少傾向がみられ、TZ 高濃度群はコントロール群と比較して有意な石灰化量の減少を示した。さらに、未分化および分化誘導 MC3T3-E1 細胞の双方で TZ によって ALP が有意に減少することが確認された。

次に、MC3T3-E1 細胞の骨形成能の抑制に対する更なる検討を行うために、ALP、OCN、OPN、RANKL の 4 つについて定量的リアルタイム PCR を行った。その結果、TZ は破骨細胞による骨吸収を抑制することが示唆された。

ここまでの結果では、*in vivo* では TZ が骨芽細胞の活性化を予想させる結果であったが、*in vitro* においては一貫した結果とならなかった。そこで、骨強度に影響する因子であり、骨形成とは独立した機序で生成される有機基質であるコラーゲンに対する TZ の影響を検討した。未分化および分化誘導 MC3T3-E1 細胞では TZ 群の細胞外基質のコラーゲン量がコントロールと比較して有意に増加していたが *col1A1* の遺伝子発現量には有意差は認められなかった。この結果から TZ によるコラーゲン分解抑制作用が生じている可能性が示唆された。さらに、TZ によるコラーゲン架橋に関与する LOX、LH2 および LH3 の遺伝子発現量の変化を検討したところ、全ての遺伝子において有意な発現量の増加が認められた。以上の結果から、TZ はコラーゲン分解抑制作用とコラーゲン架橋酵素の発現を促進することで骨芽細胞株の細胞外マトリックスコラーゲンを増生させることが示された。

以上のことから、TZ は骨粗鬆症モデル動物において、骨量減少抑制効果が示され、そのメカニズムとして細胞レベルでの骨形成能を直接調節するのではなく、細胞外マトリックスの主成分であるコラーゲン構造の成熟や分解抑制に強く関与していることが明らかとなった。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。