

# 博士論文

骨粗鬆症モデルマウスに対する  
Truncated-Norzoanthamine の抑制効果および  
そのメカニズムに関する検討

西村 隆慈

# 目次

緒言 .....	4
第1章 卵巣摘出マウスにおける TZ 投与による骨量減少抑制効果の検討 .....	9
緒言 .....	10
材料と方法 .....	12
結果 .....	20
考察 .....	23
第2章 骨芽細胞の骨無機基質形成能に対する TZ の影響の検討 .....	42
緒言 .....	43
材料と方法 .....	45
結果 .....	52
考察 .....	56

第3章 骨芽細胞の骨有機基質形成能に対する TZ の影響の検討 .....	74
緒言 .....	75
材料と方法 .....	77
結果 .....	80
考察 .....	82
総括 .....	93
謝辞 .....	96
参考文献 .....	97

## 緒言

## 緒言

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<sup>1</sup>。骨は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収が同時に進行している状態（リモデリング）を繰り返しており、古い骨が吸収され新たな骨に絶えず置き換わっているのが正常な状態である。しかし何らかの原因（閉経、高齢化、薬物使用など）によりリモデリングのバランスが崩れた結果、骨吸収能が骨形成能を上回り骨粗鬆症の原因になると考えられている<sup>2</sup>。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）であり、特に女性において年齢とともに発生率が増大する傾向にある<sup>3</sup>。骨粗鬆症が原因で起こる主な症状は骨折であるが、その中でも問題となる大腿骨の骨折は年間14万件発生しており、その多くが高齢者である<sup>4</sup>。そのため、大腿骨骨折患者の30%が寝たきりとなることや、10%が一年以内に死亡し、非骨折者と比べて死亡リスクが高くなることも報告されている<sup>5,6</sup>。骨粗鬆症による骨折は高齢者介護の大きな要因となっており社会的にも深刻な問題となっている<sup>7</sup>。現代において、骨粗鬆症の適切な治療および予防は、高齢者自身のQOLを維持するだけでなく、それを取り巻く家族のQOLにとっても非常に重要な課題となっている。

骨粗鬆症の予防や治療としては、カルシウムを多く体内に取り込むための食事療法や、骨に負荷をかけてカルシウムを貯蓄させるための運動療法、骨折リスクが上昇するとされる飲酒や喫煙を制限する生活管理などが提唱されている<sup>8</sup>。しかし、これらの方法は患者の生活スタイル

ルに介入するものであり、現実には管理を徹底するのが難しく、実際の臨床的な治療の主体は薬物療法である。骨粗鬆症の治療薬はその作用機序が2種類に大別される。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の2つであり、特に骨吸収の抑制作用を持つ薬剤の方が主に用いられる<sup>9,10</sup>。

骨吸収の抑制を目的として用いられるものには代表的な骨吸収抑制剤であるビスフォスフォネート剤（BP 剤）、抗 RANKL モノクローナル抗体である denosumab、およびホルモン補充を目的としたエストロゲン製剤や選択的エストロゲン受容体モジュレーター（Selective Estrogen Receptor Modulator, SERM）がある<sup>11,12</sup>。しかし、BP 剤には、消化管潰瘍や顎骨壊死のリスクが増大するという重大な副作用が報告されており<sup>13,14</sup>、denosumab でも顎骨壊死や低カルシウム血症が生じる危険性が報告されている<sup>15</sup>。またエストロゲン製剤使用では乳がんや子宮がんの発生リスクが増大することが知られ<sup>16</sup>、SERM では白色帯下や子宮内膜肥大のリスク増大が起こるといわれている<sup>17</sup>。一方の骨形成促進剤としては、副甲状腺ホルモン（parathyroid hormone, PTH）製剤がある。PTH は生理的な作用として破骨細胞を活性化するものだが、間欠的投与によって骨形成が促進されるという作用をもつ<sup>18-20</sup>。しかし PTH 製剤もまた催腫瘍性の懸念から使用期間に制限があり、長期の継続投与は不可能である<sup>21</sup>。実際の臨床現場では、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が、病態に関しても骨形成と骨吸収がどちらも活発な高回転型（閉経後骨粗鬆症）や、どちらの活性も低下している低回転型（加齢性骨粗鬆症）、ステロイド使用による骨粗鬆症など様々な病態が存在するとされ、それぞ

れについて最適な治療法が異なる可能性が指摘されている<sup>22</sup>。これら様々な状況全てを改善し、骨を維持しながら回復を図る理想的な薬物治療は、現時点では確立されたとは言えず、新たな作用機序を持ち、副作用が少なく長期使用できる骨粗鬆症新規治療薬の出現が望まれている。

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<sup>23</sup>。NZ は、骨粗鬆症モデルマウスにおいて骨量や骨パラメータの低下を抑制すること、およびエストロゲン様の作用は示さないことが報告されている<sup>24,25</sup>。その作用機序は骨吸収抑制や骨形成促進ではなく、コラーゲナーゼによるコラーゲンの分解が抑制されることで骨量を維持する可能性が示された<sup>26</sup>。骨コラーゲンは骨の体積のおよそ 50% を占めており、骨質に大きな影響を与える<sup>27</sup>。骨質は骨強度の 30% を担っており、骨密度が正常であっても、骨質の悪化によって骨折リスクが増大することが報告されている<sup>28</sup>。これらのことから、NZ は従来の治療薬とは異なる作用機序を持った骨粗鬆症の新たな治療薬として期待された<sup>24,26</sup>。しかしながら天然の NZ は 5kg のスナギンチャクから 21mg (0.0000042%) 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。そのため治療薬として用いるためには自然物からの抽出ではなく、化学合成による供給が必須である。2004 年には NZ の全合成は成功したが、残念ながら合成の過程がきわめて煩雑であり、化学合成でも大量の供給は事実上不可能であった<sup>29-31</sup>。

これらの問題点を解消するために、NZ 類似化合物として、NZ の構造の一部を切断し簡略化した切断型 NZ (Truncated Norzoanthamine, 以下 TZ) が本学理学系研究科にて開発された<sup>32</sup>。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。構造が簡略化された 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に応えられ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<sup>33</sup>、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。



## 第1章 卵巣摘出マウスにおける TZ 投与による骨量減少抑制効果 の検討

## 緒言

前章において、骨粗鬆症とその治療法に関する概要、およびその解決策としての骨粗鬆症新規治療薬の候補である TZ に関して述べた。TZ は新規治療薬候補である NZ の切断型として合成され、*in vitro* においては NZ と同等のコラーゲン保護作用を持つことが報告されている<sup>32</sup>。しかしながら、*in vivo* における TZ の骨そのものに対する作用の研究はこれまで行われていない。そのため、骨粗鬆症モデル動物に対する TZ の影響を検討する必要がある。本研究の目的は、骨粗鬆症モデル動物に対して TZ を投与した際の骨量減少抑制効果、骨構造および骨強度の変化を検討することである。

骨粗鬆症モデルとしては、大きく分けて骨吸収促進型と骨形成抑制型の 2 種類がある。骨吸収促進型は、閉経後骨粗鬆症と同様にエストロゲン欠乏によって生じる卵巣摘出モデルが一般的である<sup>34-36</sup>。一方、骨形成抑制型としては、動物の老化によって生じさせるものが報告されているが、これは非常に長期の準備期間が必要となる<sup>37</sup>。老化以外のものとしては、ステロイド投与によるモデルが報告されている<sup>38</sup>。また、モデル動物種としてはマウスやラット、犬や霊長類などの大型動物に関する様々なものが報告されている<sup>39-41</sup>。しかし、犬のモデルでは骨量減少が一過性であり、個体間のばらつきが大きいことが知られており、その他の大型動物では投薬期間が 1 年以上に及ぶものが多い。それに対して、マウスなどの小型のモデル動物は個体間のばらつきも比較的少なく、1 ヶ月程度の期間で有意な骨量の差が認められる<sup>33</sup>。そこ

で、本研究では、骨粗鬆症モデル動物として、エストロゲン欠乏を惹起させた卵巢摘出

(OVX) マウスを採用し、これに対する TZ の影響を検討した。

TZ が骨に与える影響に関しては、①TZ が骨構造に与える影響、②TZ が骨芽細胞および破骨細胞に与える影響、③TZ が骨強度に対して与える影響の3点に注目した。また、TZ が骨以外に対しても影響を与えるかどうかを検討した。骨構造に関しては、TZ を投与した OVX マウス大腿骨断面像の観察、さらにより詳細な検討のため、 $\mu$ CT 測定を用いて海綿骨および皮質骨の構造変化について検討した。骨芽細胞および破骨細胞に関しては、TZ を投与した OVX マウス大腿骨の組織学的検査を行い、それぞれの細胞に変化が起きたのか検討した。骨強度に関しては、TZ を投与した OVX マウス大腿骨を用いた3点曲げ試験を行い検討した。

## 材料と方法

### 実験 1-1 TZ 投与による骨粗鬆症モデルマウスにおける骨形態変化の評価

#### 1. Truncated-Norzoanthamine

Truncated-Norzoanthamine (TZ, MW = 355.9) は東京大学理学系研究科の福沢世傑先生から提供されたものを使用した (Fig. 1-1)。TZ は蒸留水で溶解し、5 mg/ml に調整したものを分注して -20 °C で保存した。TZ を使用する際は、-20°C で保存されたものを解凍し、蒸留水で希釈することで濃度調整したものを以下の実験で使用した。

#### 2. 実験動物

本実験では ddy マウス、メス 4 週齢、体重 25~35g を 44 匹用いた。マウスは群ごとに同一のケージで飼育し、一定の環境下で管理した。なお、この実験は東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物委員会の承認を得て行った。

#### 3. 骨粗鬆症モデルマウス (OVX マウス) の作製

マウスにペントバルビタールナトリウム (東京化成工業、東京) 30~50mg/kg を腹腔内投与した後、イソフルラン (和光純薬工業、東京) を吸入させることで手術麻酔期を作成し、腰背部

を剃毛したのち伏臥位に固定した。#11 メスを用いて背部正中を約 1cm 切皮した。ピンセットを用いて切開部を腰椎の右側に移動させ、腹膜下の卵巣を確認した。先鋭曲ピンセットの先端を用いて、卵巣周囲脂肪上の腹膜に鈍的切開を加えた。先鋭曲ピンセットの先端を 1~2mm 程度開いて脂肪を把持し、切開口より引き出した。さらに卵巣、輸卵管、子宮の一部を牽引し、バイポーラ止血ピンセットを用いて卵巣下の輸卵管および血管を焼烙し、卵巣を摘出した。卵巣除去後、子宮は腹膜内へと戻した。左側卵巣についても同様に摘出した後、表皮を吸収糸で単純結紮縫合した。また、偽手術群に関しては、卵巣の引き出しまでは同様に操作を行った後に、卵巣摘出を行わず臓器を腹膜内へと戻して表皮を吸収糸で単純結紮縫合した。

#### 4. 群の設定

設定した群とそのプロトコルを Table 1 に示した。卵巣摘出後に生理食塩水の経口投与を行う陰性コントロールである Vehicle 群 (n = 5)、偽手術後に生理食塩水の経口投与を行う Sham 群 (n = 5)、エストラジオール (和光純薬工業、東京) 溶液を 0.08 mg/kg/day 腹腔内投与する陽性コントロールである E2 群 (n = 5)、TZ を 0.004 mg/kg/day 経口投与する TZ0.004 群 (n = 8)、TZ を 0.02 mg/kg/day 経口投与する TZ0.02 群 (n = 8)、TZ を 0.1 mg/kg/day 経口投与する TZ0.1 群 (n = 8)、TZ を 0.5 mg/kg/day 経口投与する TZ0.5 群 (n = 4) の計 7 群を設定した。

#### 5. 投薬

手術を行った翌日より週 5 回 4 週間の計 20 回の投薬を行った。経口投与実験に関しては Sham 群および Vehicle 群は生理食塩水を 0.3 ml、1 日 1 回経口投与した。E2 群に関してはエストラジオールを 0.6 ml に調整し、1 日 1 回腹腔内投与した。TZ 投与群ではそれぞれ薬剤の濃度を調整のうえ、投与体積を 0.3 ml とし、1 日 1 回経口投与した。エストラジオールと TZ の投与量、投与経路および投与期間は過去の報告をもとに設定した<sup>24</sup>。

## 6. 採材

投与が終了した翌日に、ペントビタールナトリウムおよびイソフルランによる麻酔下にて頸椎脱臼を行い安楽殺した。速やかに開胸、開腹を行い、心臓、腎臓、肝臓、子宮を採取した。メスを用いて右足根部を切皮し、股関節周囲まで切開をすすめた。股関節部分の筋肉、靱帯をメスにて切断し、後肢を分離した。膝関節を鋭的に切断し、大腿骨を分離したのち、大腿骨周囲の軟部組織をトリミングした。トリミング終了後、右大腿骨は 10%ホルマリン緩衝液に浸して保存した。左大腿骨に関しても同様にして採材を行った。

## 7. 臓器重量の測定

採取した心臓、腎臓、肝臓、子宮は生理食塩水に浸し、採取後速やかに湿重量を測定した。

## 8. 骨乾燥重量の測定

左側の大腿骨はインキュベータ内にて 60℃で一晩乾燥させ、翌日、常温にて冷ました後、乾燥重量を測定した。

#### 9. 骨断面の観察

左大腿骨は乾燥重量を測定したのち、砥石を用いて研磨し、正中断面を実体顕微鏡によって肉眼的に観察し、写真撮影を行った。

#### 10. $\mu$ CT を用いた骨密度パラメータ測定

右大腿骨は採取後 10%ホルマリン緩衝溶液に浸して保存し、翌日  $\mu$ CT 撮影装置（inspeXio SMX-90CT、島津製作所、京都）にて撮影を行い、スライスデータを得た。その後、解析ソフト（TRI/3D-BON、ラトックシステムエンジニアリング、東京）を用いて右大腿骨について骨成分領域を抽出し、以下の骨パラメータを測定した。測定領域としては、肉眼的観察において海綿骨の変化が顕著に認められた部位である大腿骨遠位部成長板の下端から 1~2.5mm の間を設定した。また、 $315 \text{ mg/cm}^3$  をカットオフ値として骨の抽出を行った。海綿骨の評価パラメータは、

① 髓腔内の組織量に対する海綿骨の体積の割合（Bone volume / Total volume, BV/TV, %）

② 平均骨梁幅（Trabecular thickness, Tb.Th,  $\mu\text{m}$ ）

③ 単位長さ当たりの平均骨梁数（Trabecular number, Tb.N, 1/mm）

④骨塩濃度 (Bone mineral density, BMD,  $\text{mg}/\text{cm}^3$ )

⑤骨梁間隙 (Trabecular separation, Tb.Sp, mm) を測定した。

また皮質骨の評価パラメータとして、

①骨体積あたりの皮質骨体積 (Cortical volume / All volume, Cv/Av, %)

②皮質骨幅 (Cortical thickness, Ct, mm) を測定した。

## 11. 統計解析

各群間の比較はソフトウェア JMP12 (SAS Institute Japan, 東京) を用い、Dunnett 検定で解析を行った。すべての統計解析において有意水準  $p < 0.05$  とした。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で表示した。



## 実験 1-2 TZ 投与による骨粗鬆症モデルマウスにおける骨組織像および骨強度変化の評価

### 1. Truncated-Norzoanthamine

実験 1-1、1 と同じものを使用した。

### 2. 実験動物

本実験では ddy マウス、メス 4 週齢、体重 25~35g を 24 匹用いた。マウスは群ごとに同一のケージで飼育し、一定の環境下で管理した。なお、この実験は東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物委員会の承認を得て行った。

### 3. OVX マウス

実験 1-1 と同様の方法で OVX マウスを作製した。

### 4. 群の設定

設定した群とそのプロトコールを Table 2 に示した。すなわち、生理食塩水を経口投与する陰性コントロールである Vehicle 群 (n = 4)、卵巣を摘出せず生理食塩水を経口投与する Sham 群 (n = 4)、エストラジオール溶液を 0.08 mg/kg/day 腹腔内投与する陽性コントロールである E2 群 (n = 5)、TZ 群においては、実験 1-1 で骨に対する影響が大きかった TZ を 0.004 mg/kg/day

経口投与する TZ0.004 群 (n = 6) および TZ を 0.02 mg/kg/day 経口投与する TZ0.02 群 (n = 5)

として計 5 群を設定した。

## 5. 投薬

手術を行った翌日より週 5 回 4 週間の計 20 回の投薬を行った。E2 群に関してはエストラジオールを 0.6 ml に調整し、1 日 1 回腹腔投与した。Sham 群と Vehicle 群に関しては生理食塩水を 0.3 ml、1 日 1 回経口投与した。TZ 投与群ではそれぞれ薬剤の濃度を調整のうえ投与体積をすべて 0.3 ml とし、1 日 1 回経口投与した。

## 6. 採材

投与が終了した翌日にペントバルビタールナトリウムおよびイソフルランによる深麻酔下にて心採血を行い、その後頸椎脱臼によって安楽殺した。実験 1 と同様の方法で左右大腿骨の採取を行った。

## 7. 組織学的検査

右大腿骨は  $\mu$ CT の撮影後、EDTA 脱灰液に浸して週二回の液替えを行い 7 日から 10 日間脱灰した。脱灰終了後硫酸ナトリウムに 4℃、12 時間浸して中和を行い、その後パラフィン内に包埋した。包埋後、大腿骨の中央部を含むように正中矢状断を 4  $\mu$ m に薄切した。薄切した切

片に対してヘマトキシリン - エオジン染色（HE 染色）および TRAP 染色を行った。位相差顕微鏡を用いて作成した標本の観察を行い、骨面あたりの骨芽細胞面の割合（Osteoblast surface / Bone surface, ObS/BS, %）および骨面あたりの破骨細胞面の割合（Osteoclast surface / Bone surface, OcS/BS, %）を測定した。測定領域は、 $\mu$ CT で評価した範囲と同じく、成長板の下端から 1~2.5mm の距離内にある海綿骨の範囲（二次海綿骨領域）とした。

#### 8. 骨強度測定

左側大腿骨の採取後、曲げ試験機（Instron-3365, Instron, 神奈川）を用いて速やかに骨 3 点曲げ試験を行った。3 点曲げ試験の模式図を図 2 に示した。測定条件は支点間の距離を 7 mm とし、回転しないよう大腿骨を横向きに設置したのち、大腿骨中央部に 50 mm/min の速度で荷重を行い、荷重 - 変位曲線を得た。この曲線を用いることで最大荷重（Failure load, N）、破断エネルギー（Yield energy, J/m<sup>3</sup>）、剛性（Stiffness, N/mm）を算出した。

#### 9. 統計解析

各群間の比較はソフトウェア JMP12（SAS Institute Japan, 東京）を用い、Dunnett 検定で解析を行った。すべての統計解析において有意水準  $p < 0.05$  とした。結果は平均値 ± 標準誤差で表示した。

## 結果

### 実験 1-1 TZ 投与による骨粗鬆症モデルマウスにおける骨形態変化の評価

#### TZ 経口投与マウスにおける体重、臓器および骨乾燥重量

体重、心臓、腎臓および肝臓に関しては各群で重量に有意な差は認められなかった (Fig. 1-3 A-D)。子宮重量に関しては、Sham 群と E2 群において Vehicle 群と比較して有意に高値を示したが、TZ 投与群は全ての群で Vehicle 群と比較して有意な差はなかった (Fig.1-3 E)。大腿骨の乾燥重量および大腿骨乾燥重量に関しては、各群間に統計的有意差は認められなかった (Fig. 1-3 F)。

#### TZ 経口投与マウス的大腿骨骨断面像

Fig. 1-4 に各群の大腿骨断面像を示した。特に大腿骨遠位骨幹端の部位 (赤枠で囲った領域は二次海綿骨領域) で Sham、E2、TZ 投与群で海綿骨量が Vehicle 群と比較して増加している様子が観察された。

#### 骨密度パラメータ

骨断面像において特に骨量の差が認められた大腿骨二次海綿骨領域付近に着目して  $\mu$  CT による解析を行った。まず、海綿骨に関して、海綿骨量/組織量 (BV/TV) は Sham 群、E2 群、

TZ0.004 群、TZ0.02 群で Vehicle 群と比較して有意に高値を示した (Fig. 1-5 A)。平均骨梁幅 (Tb.Th) は Sham 群、E2 群で有意に高値を示したが、TZ を投与した群では有意な差は見られなかった (Fig. 1-5 B)。平均骨梁数 (Tb.N) は Sham 群、E2 群、TZ0.004 群、TZ0.02 群で有意に高値を示した (Fig. 1-5 C)。また、骨塩濃度 (BMD) において、Sham 群および TZ0.004 群が Vehicle 群と比較して有意な上昇を示した (Fig. 1-5 D)。さらに骨梁間隙 (Tb.Sp) においては、Sham 群、E2 群および全ての TZ 群が Vehicle 群と比較して有意な減少を示した (Fig. 1-5 E)。次に、皮質骨に関する評価として皮質骨体積/骨体積 (CV/AV) および皮質骨幅 (Ct) は Sham 群、E2 群で有意に高値を示したが、TZ を投与した群では有意な差は見られなかった (Fig. 1-6)。

## 実験 1-2 TZ 投与による骨粗鬆症モデルマウスの骨強度変化の評価

### 組織学的検査

HE 染色および TRAP 染色を行った大腿骨遠位部の組織像を Fig. 1-7、1-8 に示した。これらの画像から算出した骨面あたりの骨芽細胞面の割合 (ObS/BS) は E2 群、TZ0.004 群、TZ0.02 群、TZ0.1 群においてそれぞれ Vehicle 群に対して有意に高い値を示した (Fig. 1-9 A)。骨面あたりの破骨細胞面の割合 (OcS/BS) は Sham 群、E2 群において Vehicle 群に対して有意に低い値を示し、TZ0.02 群、TZ0.1 群においてそれぞれ Vehicle 群に対して有意に高い値を示した

(Fig. 1-9 B)。

#### 血液検査

血液検査の結果を Table 3 に示した。ALP、IP、Ca は全ての群で有意な差は認められなかった。

#### 骨強度測定

TZ 投与群は骨の形態変化において強い作用を示した低用量群を用いて実験を行った。最大荷重は Sham 群、E2 群で Vehicle 群に対して有意に高値を示したが、TZ 群では有意な差は認められなかった (Fig.1-10 A)。破断エネルギーおよび剛性は Sham 群、E2 群、TZ0.02 群で Vehicle 群に対して有意に高値を示した (Fig.1-10 B,)。は Sham 群、E2 群、TZ0.004 群で Vehicle 群に対して有意に高値を示した (Fig.1-10 C)。

## 考察

今回の実験においては、骨粗鬆症モデル動物として過去の報告を基に、約 1 ヶ月という早期で骨量減少が得られる OVX マウスを用いて実験を行った<sup>33</sup>。データには示していないが、本実験に先駆けて OVX マウスに TZ 腹腔投与を行ったところ、OVX マウス大腿骨の骨断面像および  $\mu$ CT 所見において TZ が骨量減少を抑制することが確認された。しかしながら、臨床応用における現実的な使用では、経口投与による効果の確認が必須となるため、本実験では OVX マウスに対する TZ の経口投与を行った。

TZ が骨以外の臓器に影響を与えていないか調べるために体重、各種臓器重量を測定したが、TZ 群はコントロール群と比較して差は認められなかった (Fig.1-3 A-E)。OVX マウスでは E2 の欠乏によって子宮の萎縮が生じるが、今回の陽性コントロールとして用いた E2 群では子宮の萎縮が抑制されていた。しかしながら、TZ 投与群の子宮はコントロール同様に萎縮しており、TZ が E2 様作用を持たないことが確認された。また、全ての臓器は TZ 濃度によらず肉眼的な異常は認められなかったことや、投与中に臨床的な異常を示す個体も認められなかったため、TZ の使用によって臨床的な副作用が出現する可能性は低いものと考えられた。

大腿骨の乾燥重量に関しては、TZ 投与群においてわずかな増加傾向が認められたものの、Vehicle 群と比較して有意な差は認められなかった (Fig.1-2 F)。陽性コントロールである E2 群に関しても Vehicle 群との差は認められなかった。これはマウス的大腿骨自体が非常に小さく骨

量減少による構造が変化しても、骨重量の変化としては非常に小さなものであり測定に反映されないものであったと考えられた。

骨断面像では、大腿骨の遠位部 2 次海綿骨領域において Vehicle 群は海綿骨がほとんど認められないのに対して、TZ の低用量群（TZ 0.004、TZ 0.02）では E2 群と同様に肉眼的に明らかな海綿骨減少の抑制が認められた（Fig. 1-4）。この結果から、大腿骨遠位部の二次海綿骨領域を  $\mu$ CT の画像で評価してみると、いくつかの骨パラメータにおいて TZ 群と Vehicle 群の間で有意な差が認められた。骨密度の指標となる海綿骨量/組織量（BV/TV）は TZ の低濃度群（TZ 0.004、TZ 0.02）で Vehicle と比べて有意に増加しており Sham や E2 群と同等の値を示した（Fig. 1-5 A）。また、骨粗鬆症の指標となる骨梁間隙（Tb.Sp）は Vehicle 群と比較して全ての TZ 群で有意に減少していた（Fig. 1-5 E）。さらに、骨塩濃度（BMD）に関しても TZ は Vehicle 群と比較して有意に増加していた（Fig. 1-5 D）。これらの所見は骨断面像で得られた海綿骨の減少抑制を支持する結果であった。さらに、海綿骨の骨梁に関しては、平均骨梁幅（Tb.Th）は Sham および E2 群は Vehicle 群と比べ有意に増加していたのに対し、TZ 群は有意な差は認められなかった。しかしながら、平均骨梁数（Tb.N）においては TZ の低用量群（TZ 0.004、TZ 0.02）が Sham および E2 群同様に有意な増加が確認された。これらの結果は、TZ の骨量減少抑制作用は海綿骨の骨梁幅には影響しないが、骨梁数の減少を抑えることによって生じていることを示唆している。

骨粗鬆症の治療薬や新規治療薬候補となっている薬剤は、主に骨吸収抑制剤か骨形成促進剤



に作用が分かれている。骨吸収抑制剤に代表されるビスフォスフォネート剤（BP 剤）や E2 は成熟した古い骨の破壊を抑制することで、骨幅の維持や皮質骨の改善を行っている<sup>42-44</sup>。一方、PTH 製剤に代表される骨形成促進剤は、骨芽細胞の活性を促進し幼若な細い骨を増加させるが、骨幅や皮質骨への影響は骨吸収抑制剤と比べて小さいと言われている<sup>44,45</sup>。これらの知見と今回の  $\mu$ CT 結果を照らし合わせると、TZ は骨芽細胞による骨形成を促進するが、破骨細胞による骨吸収に対してはあまり強い作用を持たないことが示唆された。さらに、 $\mu$ CT の皮質骨のパラメータの結果では、Sham や E2 が皮質骨量/全骨量（CV/AV）および皮質骨幅（Ct）において Vehicle 群と比較して有意な増加を示したのに対し、TZ 群では有意な差は認められなかった（Fig. 1-6）。この結果から、TZ は皮質骨に対しては影響を与えておらず、ここでも先ほどの結果を支持するものとなっている。

血中の ALP、IP、Ca の値は BP 製剤や PTH 製剤において変化することが報告されているが、TZ 投与群は全ての値で有意な差は認められず長期的な投与においても臨床的な副作用は認められなかった（Table 3）。

HE 染色および TRAP 染色による組織学的な評価では、Sham 群が Vehicle 群と比べ有意に破骨細胞面/骨面（Ocs/Bs）が減少していた（Fig. 1-9 B）。これは Vehicle 群では卵巣摘出によって E2 欠乏が生じ破骨細胞が活性化していることを示唆しており、OVX マウスが本実験の目的通りに機能している事が示されている。E2 群では、Vehicle 群と比較して Ocs/Bs が抑制されており Sham 群と同程度の値を示した。これは卵巣摘出による欠乏した E2 が補充され、E2 が破骨

細胞を抑制したことを示している。また、E2 群の骨芽細胞面/骨面 (Obs/Bs) は Vehicle 群と比較して有意に高い値を示した (Fig1-9 A)。一般的に E2 の骨への働きとしては、破骨細胞に働きアポトーシスを誘導させることで骨吸収抑制作用を示すことが知られており<sup>46,47</sup>、閉経後の骨粗鬆症はこの E2 の働きが弱くなることで生じる<sup>48</sup>。しかしながら、E2 は骨芽細胞にも働いて活性化することも報告されている<sup>49,50</sup>。今回の E2 の所見はこれらの報告と合致するものであった。

TZ 群では Obs/Bs が Vehicle 群と比較して有意に増加しており、 $\mu$ CT の結果から予想された骨芽細胞を活性化するという考えを支持するものであった。一方、Ocs/Bs の値においても TZ 群は Vehicle 群と比較して有意な増加を示しており、これは TZ が破骨細胞を活性化することを示唆した。しかしながら、骨断面や  $\mu$ CT の結果から TZ が骨量減少抑制作用を持つことは明らかである。そのため、TZ は骨芽細胞と破骨細胞のどちらも活性化するものの、骨芽細胞に対する活性化がより強いために、骨量減少を抑制したと考えられた。

これまでの結果から TZ の投与により骨量減少の抑制が確認されたが、この骨形態の変化が骨の強度も改善したのかを検討するため、大腿骨の 3 点曲げ試験を行った。TZ を投与した群は最大荷重では Vehicle 群と比較して有意な差を示さなかった (Fig. 1-10 A) しかし、TZ0.02 群は破断エネルギーで Vehicle 群に対して有意に高い値を示し、TZ 0.004 群では剛性が Vehicle 群と比較して有意に増加しており、Sham 群と同程度まで改善していた (Fig. 1-10 B, C)。これらのデータから OVX マウスに TZ を投与することで、骨強度が増大し大腿骨の外力による抵抗性が

正常程度に維持されること示唆され、骨粗鬆症の治療薬としての有効性が期待された。しかし、最大荷重に対する影響は認められず骨強度の改善の程度は決して大きなものではない。これは  $\mu$ CT での結果で TZ は骨梁数を改善するものの皮質骨の構造に影響がなかったことと矛盾しない結果となった。

今回の実験の TZ の濃度設定は過去の NZ の報告と TZ の腹腔内投与実験を参考にして決定した<sup>24,25</sup>（文献）。1999 年の山口らの論文では、NZ の 0.02mg/kg 腹腔内投与が、最も効果があったとされており、TZ の腹腔内投与実験でも同様の結果が得られた<sup>24</sup>。今回はより臨床応用に近い経口投与を選択したため、予想される最適な投与量をその 5 倍の 0.1mg/kg と推測し、その前後に投与量（0.004, 0.02, 0.1, 0.5mg/kg）を設定した。骨断面や  $\mu$ CT の結果から TZ の低濃度群でより高い効果が得られたため、組織的評価および骨強度評価では設定した 4 群の内 TZ 低濃度の 2 群を使用した。

一般的に、薬剤にはある一定の濃度以上は効果が変わらず天井効果を示すものと、一定の至適濃度を超えると効果が低下するベル型曲線の反応を示すものがある。 $\mu$ CT 撮影ではその多くが TZ の低濃度群で認められたが TZ0.1 群および TZ0.5 群では効果があまり見られなかった。

また骨強度試験では破断エネルギーは TZ0.02 群で、剛性については TZ0.004 群で有意差が認められた。以上の結果を総合すると、TZ は 0.004-0.02 mg/kg 付近に至適濃度をもっており、それ以上の用量では効果が減弱するベル型曲線の反応-用量曲線を描く可能性が高いと考えられる。

しかしながら、0.004 mg/kg 以下の濃度については、今回は検討を加えておらず、不明なままと

なっている。また今回直接の比較は行っていないが TZ は、NZ の報告と比べてより低い濃度で十分な効果を発揮した。この理由としては TZ それ自身が、NZ よりも強い活性を持つ可能性、もしくは TZ の分子量が NZ の 68%程度と小さいため<sup>32</sup>、同じ投与重量でも高いモル濃度を有しているためことが考えられた。

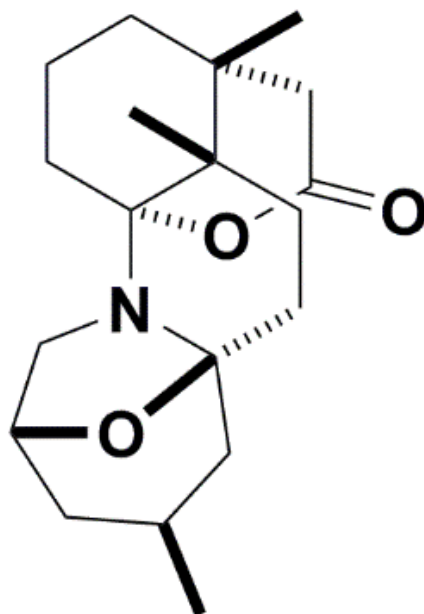


Fig. 1-1. Chemical structure of truncated norzoanthemine (TZ).

群	卵巣摘出	投薬
Vehicle	○	生理食塩水 0.3 ml を経口投与
Sham	×	生理食塩水 0.3 ml を経口投与
E2	○	E2 溶液 (0.08 mg/kg/day) を腹腔内投与
TZ 0.004	○	TZ 溶液 (0.004 mg/kg/day) を経口投与
TZ 0.02	○	TZ 溶液 (0.02mg/kg/day) を経口投与
TZ 0.1	○	TZ 溶液 (0.1 mg/kg/day) を経口投与
TZ 0.5	○	TZ 溶液 (0.5 mg/kg/day) を経口投与

#### 各群の設定およびプロトコール

##### 経口投与方法：

卵巣摘出術の翌日より 5 日間/週で 4 週間、計 20 日間にわたって各薬剤溶液を 0.3 ml/day 経口投与した。

##### 腹腔内投与方法：

卵巣摘出術の翌日より 5 日間/週で 4 週間、計 20 日間にわたって E2 溶液を 0.6 ml/day 腹腔内投与した。

Table 1

群	卵巣摘出	投薬
Vehicle	○	生理食塩水 0.3 ml を経口投与
Sham	×	生理食塩水 0.3 ml を経口投与
E2	○	E2 溶液（0.08 mg/kg/day）を腹腔内投与
TZ 0.004	○	TZ 溶液（0.004 mg/kg/day）を経口投与
TZ 0.02	○	TZ 溶液（0.02mg/kg/day）を経口投与

各群の設定およびプロトコール

経口投与方法：

卵巣摘出術の翌日より 5 日間/週で 4 週間、計 20 日間にわたって各薬剤溶液を 0.3 ml/day 経口投与した。

腹腔内投与方法：

卵巣摘出術の翌日より 5 日間/週で 4 週間、計 20 日間にわたって E2 溶液を 0.6 ml/day 腹腔内投与した。

Table 2

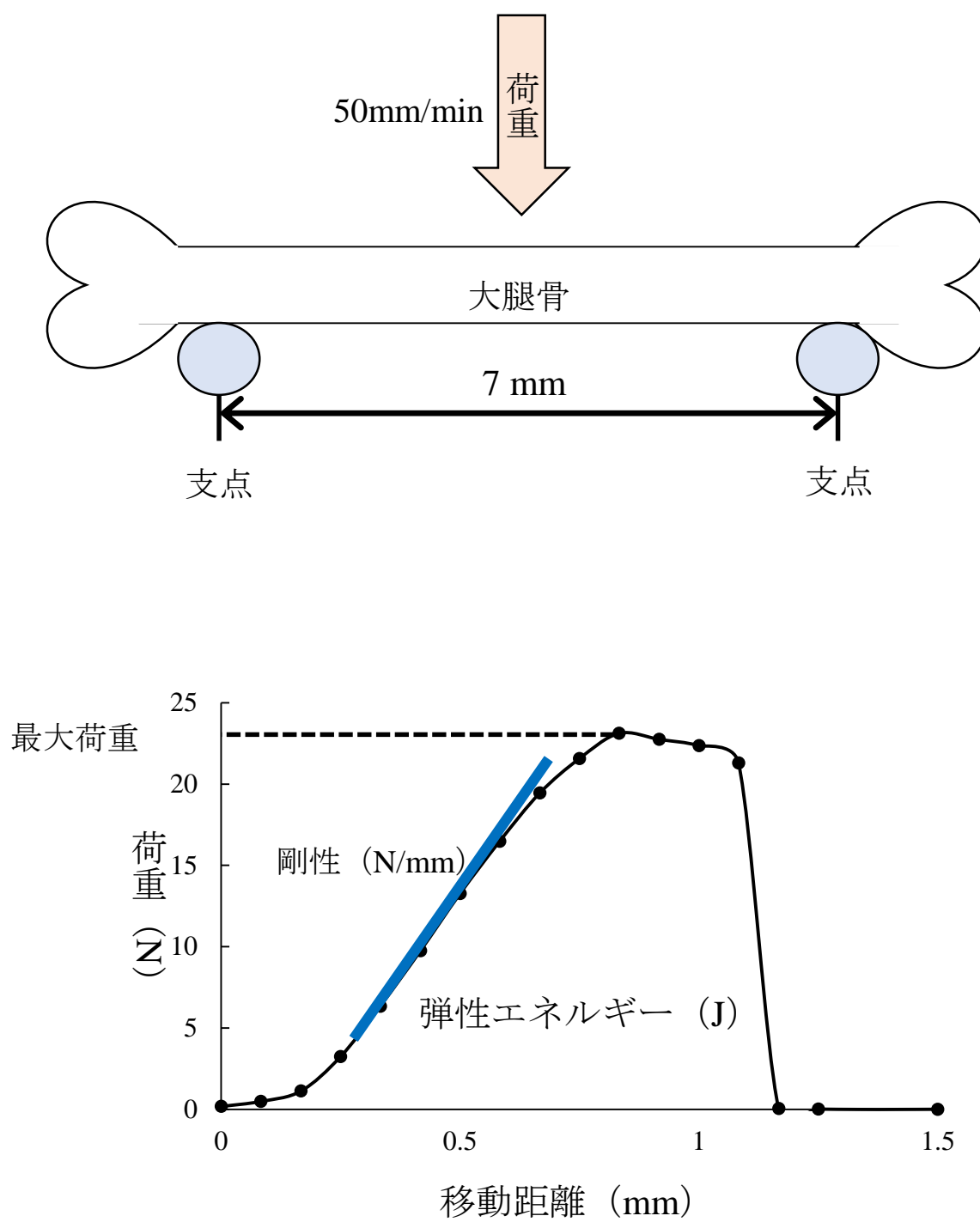


Fig. 1-2 大腿骨 3 点曲げ試験模式図およびグラフ



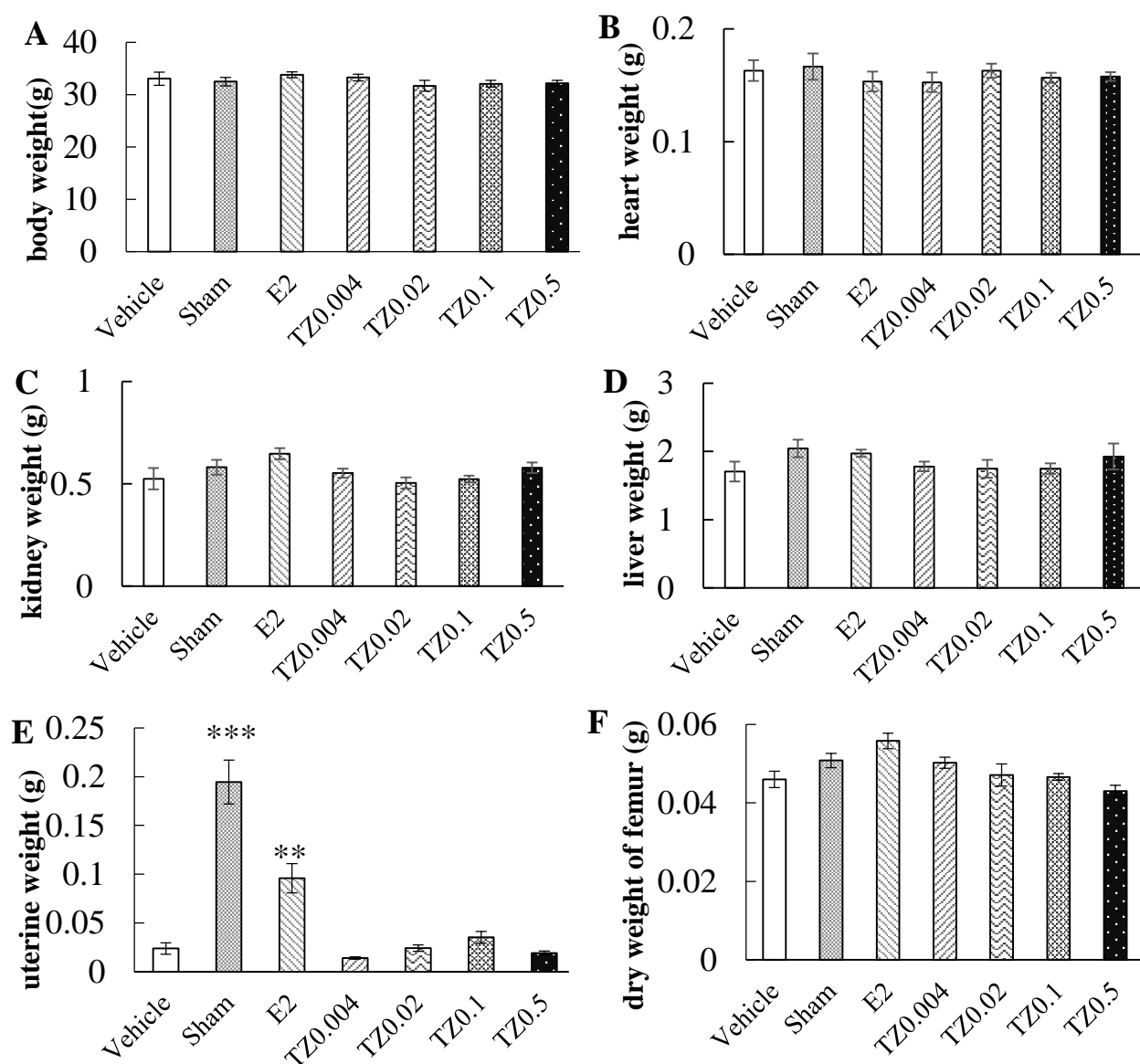


Fig. 1-3. Effect of TZ on body weight, organ weight and dry femur weight in OVX mice or Sham operated mice. Each group of OVX mice were oral administered saline, or TZ (0.004, 0.02, 0.1, 0.5 mg / kg), or intraperitoneal administrated E2 (0.08 mg / kg). A) body weight, B) heart weight, C) kidney weight, D) liver weight, E) uterine weight were measured 4 weeks after the operations. Vehicle (n = 5): negative control group, Sham (n = 5): sham-operated group, E2 (n = 5): treatment with E2 group, TZ0.004 (n = 8), TZ0.02 (n = 8), TZ0.1 (n = 8), TZ0.5 (n = 4): treatment with TZ group. Each group was expressed as mean  $\pm$  S.E.M., \*\*\*P < 0.001. \*\*P < 0.01 compared with Vehicle.

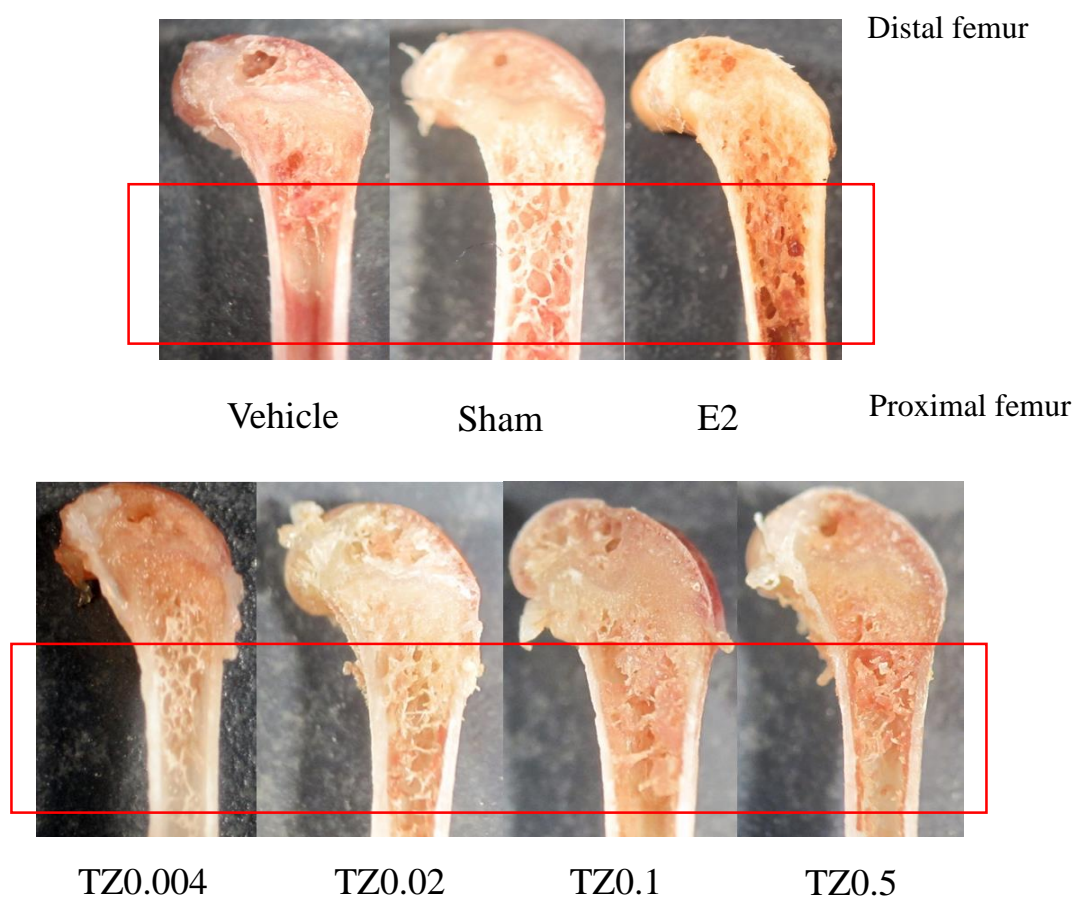


Fig. 1-4 Effect of TZ on femur bone in OVX mice. Each group of OVX mice were oral administered saline, or TZ (0.004, 0.02, 0.1, 0.5 mg / kg), or intraperitoneal administrated E2 (0.08 mg / kg).. Vehicle (n = 5): negative control group, Sham (n = 5): sham-operated group, E2 (n = 5): treatment with E2 group, TZ0.004 (n = 8), TZ0.02 (n = 8), TZ0.1 (n = 8), TZ0.5 (n = 4): treatment with TZ group. The morphology change of dry femur in OVX mice were observed. The red frame indicates secondary spongiosa trabecular bone..

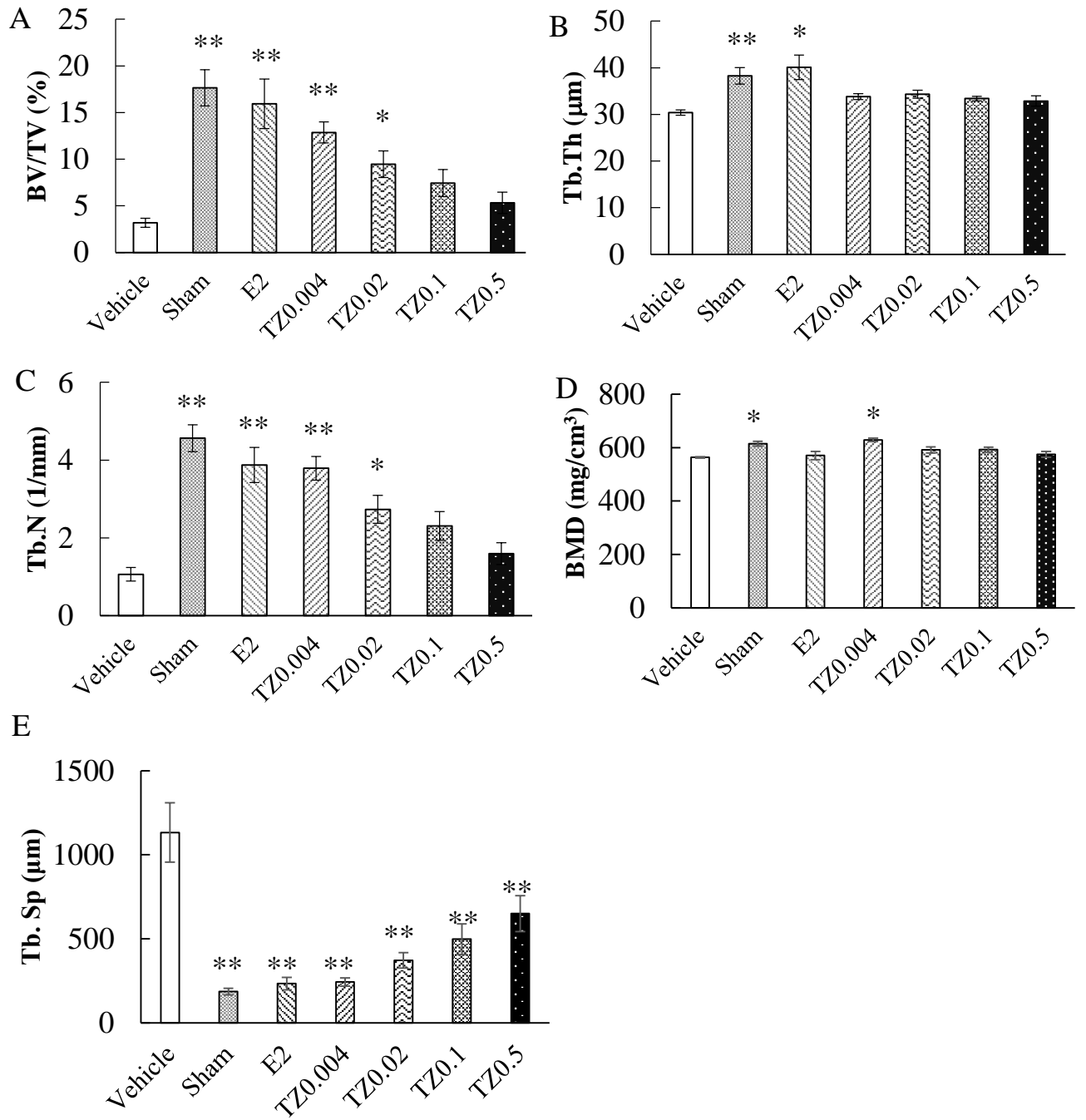


Fig. 1-5 Effect of TZ on trabecular architecture parameter of femur bone. Each group of OVX mice were oral administered saline, or TZ (0.004, 0.02, 0.1, 0.5 mg / kg) or intraperitoneal administrated E2 (0.08 mg / kg). The femur bones were collected from OVX mice after the sacrifice. Vehicle (n = 5): negative control group, Sham (n = 5): sham-operated group, E2 (n = 5): treatment with E2 group, TZ0.004 (n = 8), TZ0.02 (n = 8), TZ0.1 (n = 8), TZ0.5 (n = 4): treatment with TZ group. A) BV/TV, B) Tb.Th, C) Tb.N, D) BMD, and E) Tb.Sp were measured by micro-CT. Each point was expressed as mean  $\pm$  S.E.M. \*\*P < 0.01. \*P < 0.05 compared with Vehicle

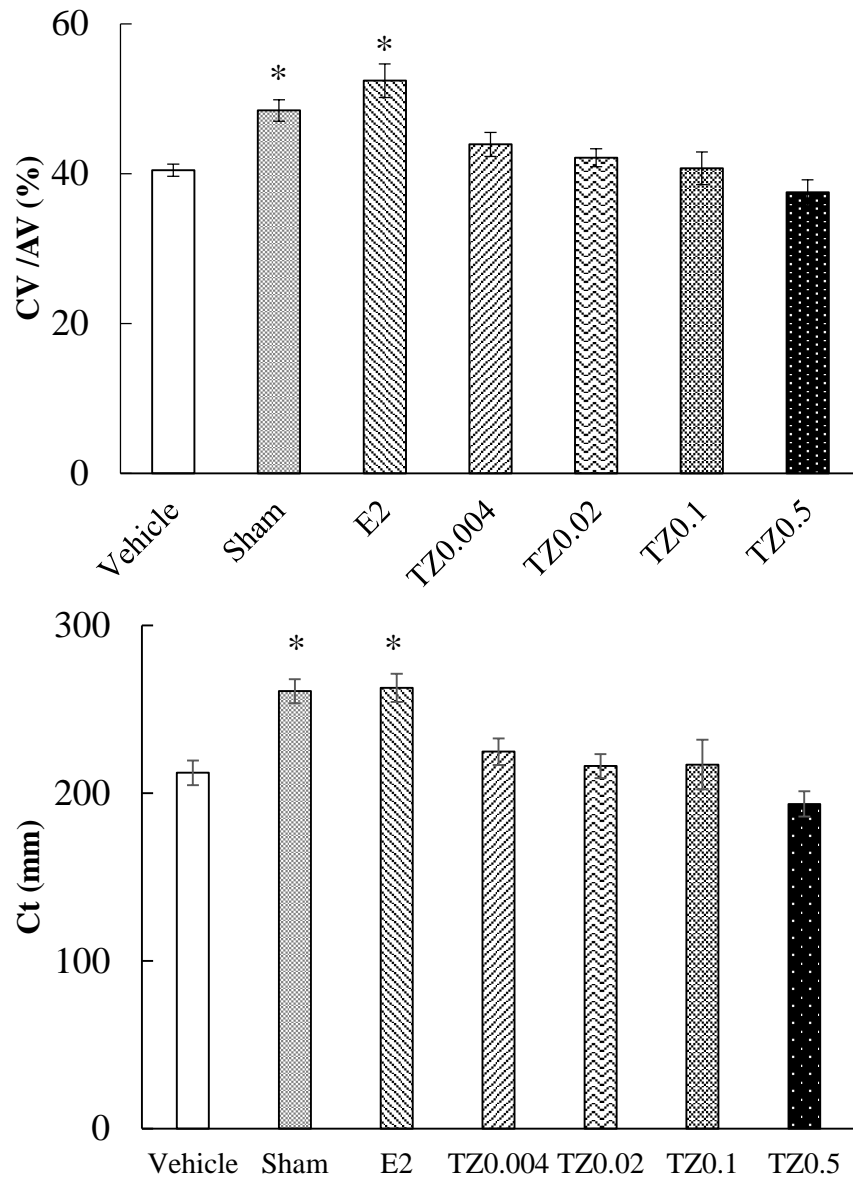
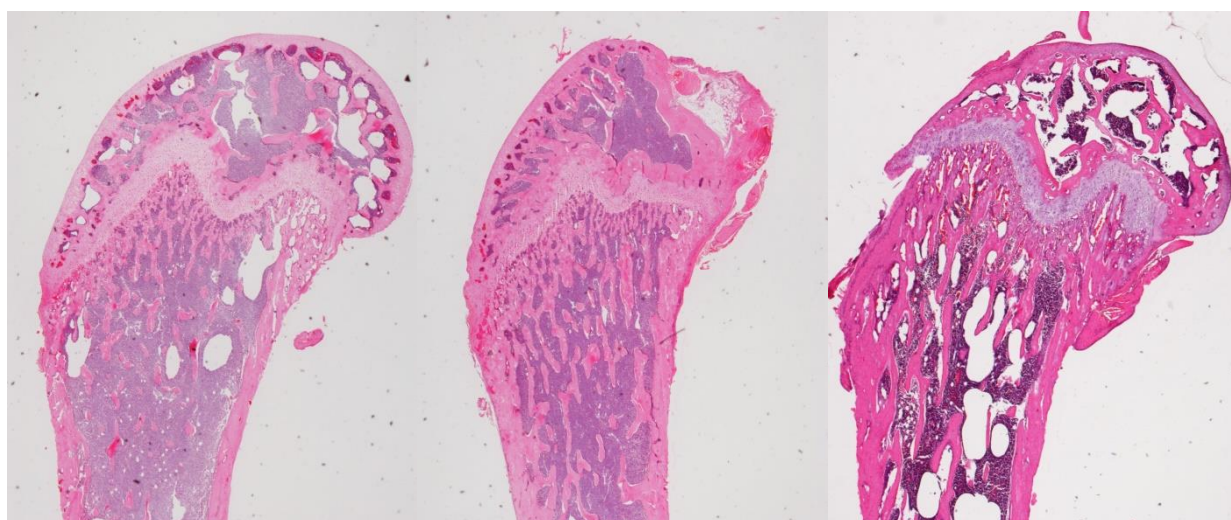


Fig. 1-6 Effect of TZ on cortical architecture parameter of femur bone. Each group of OVX mice were oral administered saline, or TZ (0.004, 0.02, 0.1, 0.5 mg / kg) or intraperitoneal administrated E2 (0.08 mg / kg).. The femur bones were collected from OVX mice after the sacrifice. Vehicle (n = 5): negative control group, Sham (n = 5): sham-operated group, E2 (n = 5): treatment with E2 group, TZ0.004 (n = 8), TZ0.02 (n = 8), TZ0.1 (n = 8), TZ0.5 (n = 4): treatment with TZ group. A) CV/AV, B) Ct were measured by micro-CT. Each point was expressed as mean  $\pm$  S.E.M. \*P < 0.05 compared with Vehicle.

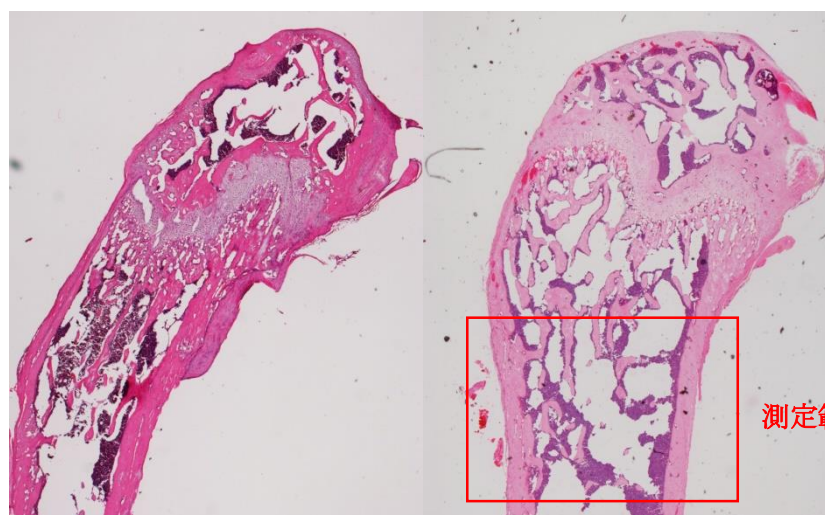


Vehicle

Sham

E2

Distal femur



測定範囲

Proximal femur

TZ0.004

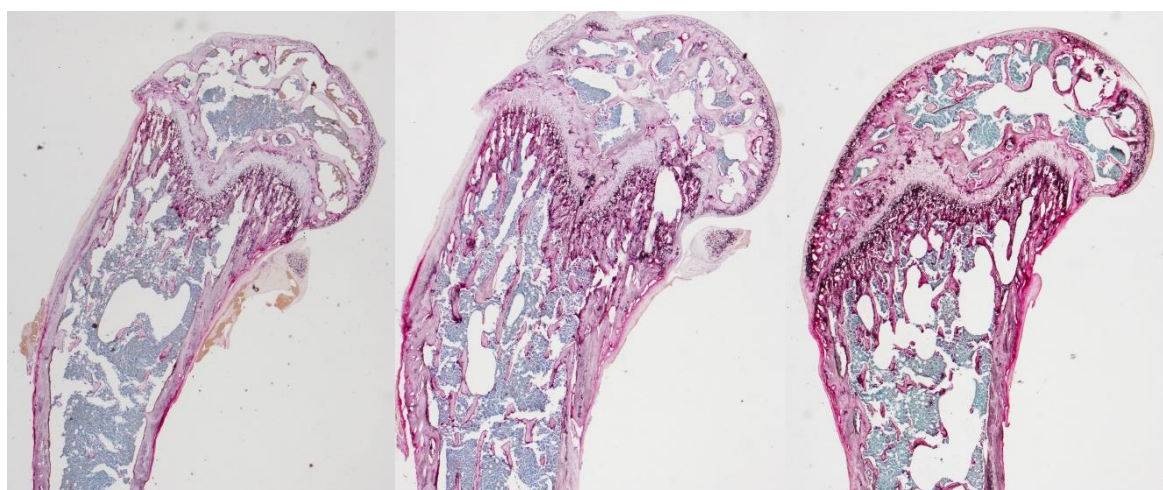
TZ0.02

Fig. 1-7 HE 染色組織像

各群の大腿骨遠位部 HE 染色組織像写真を示す。

測定領域は  $\mu$ CT 検査と同様に赤枠で囲った成長板の下端から 1 -2.5 mm の二次海綿骨領域として骨芽細胞面/骨面 (Obs/Bs) を測定した。

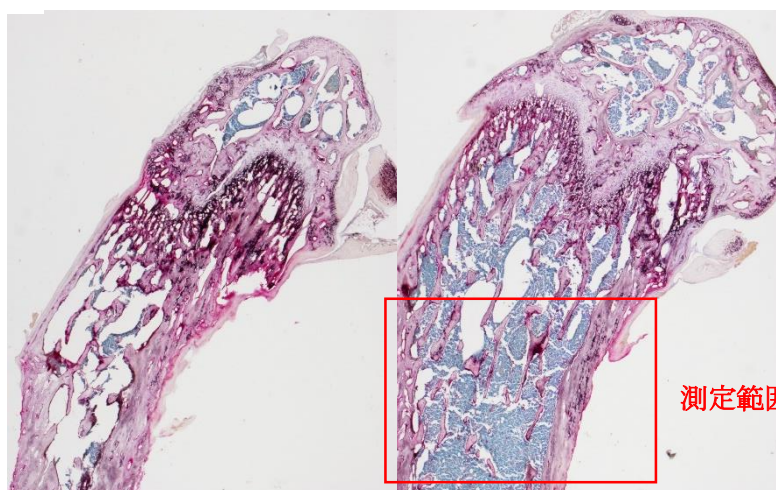




Vehicle

sham

E2



Distal femur

TZ0.004

TZ0.02

Proximal femur

Fig. 1-8 TRAP 染色組織像

各群の大腿骨遠位部 TRAP 染色組織像写真を示す。

測定領域は  $\mu$ CT 検査と同様に赤枠で囲った成長板の下端から 1 -2.5 mm の二次海綿骨領域として破骨細胞面/骨面 (Ocs/Bs) を測定した。

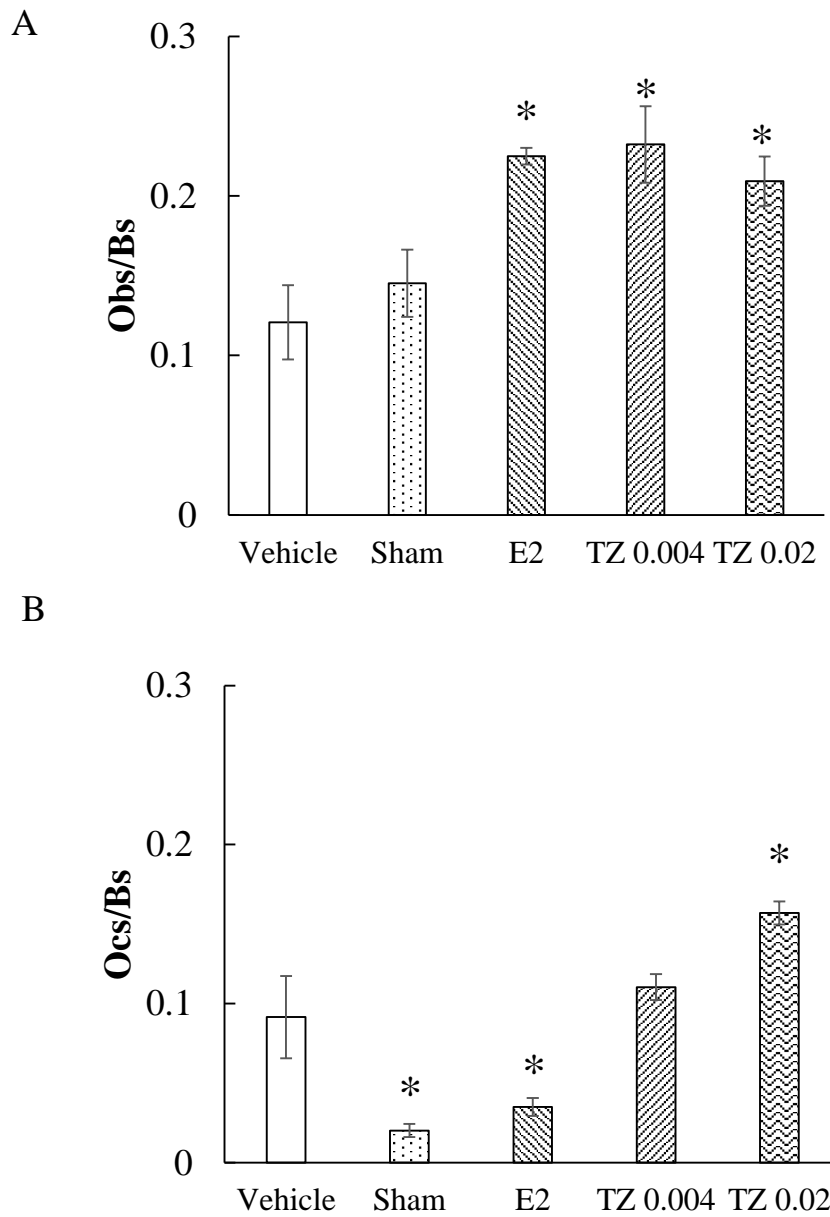


Fig. 1-9 Effect of TZ on osteoblast cell and osteoclast cell in secondary spongiosa trabecular of femur bone. Each group of OVX mice were oral administered saline, or TZ (0.004, 0.02, 0.1, 0.5 mg / kg) or intraperitoneal administered E2 (0.08 mg / kg).. The femur bones were collected from OVX mice after the sacrifice. Vehicle (n = 5): negative control group, Sham (n = 5): sham-operated group, E2 (n = 5): treatment with E2 group, TZ0.004 (n = 8), TZ0.02 (n = 8), TZ0.1 (n = 8), TZ0.5 (n = 4): treatment with TZ group. A Osteoblast surface (Obs/BS), B) Osteoclast surface (Ocs/BS) were measured by phase-contrast microscopy. Each point was expressed as mean  $\pm$  S.E.M. \*P < 0.05 compared with Vehicle.

	Vehicle	Sham	E2	TZ0.02	TZ0.004
IP (mg/dl)	10.00 ± 0.47	9.75 ± 1.16	10.16 ± 0.55	12.06 ± 0.50	11.91 ± 0.59
Ca (mg/dl)	11.27 ± 0.44	11.50 ± 0.49	10.82 ± 0.38	11.18 ± 0.26	11.11 ± 0.37
ALP (U/l)	380.75 ± 34.03	438.00 ± 64.41	318.20 ± 35.34	413.80 ± 41.10	418.83 ± 24.00

Table 3. Effect of TZ on calcium, inorganic phosphorus, and ALP in blood level in

OVX mice. Each group was expressed as mean ± S.E.M. n = 5.



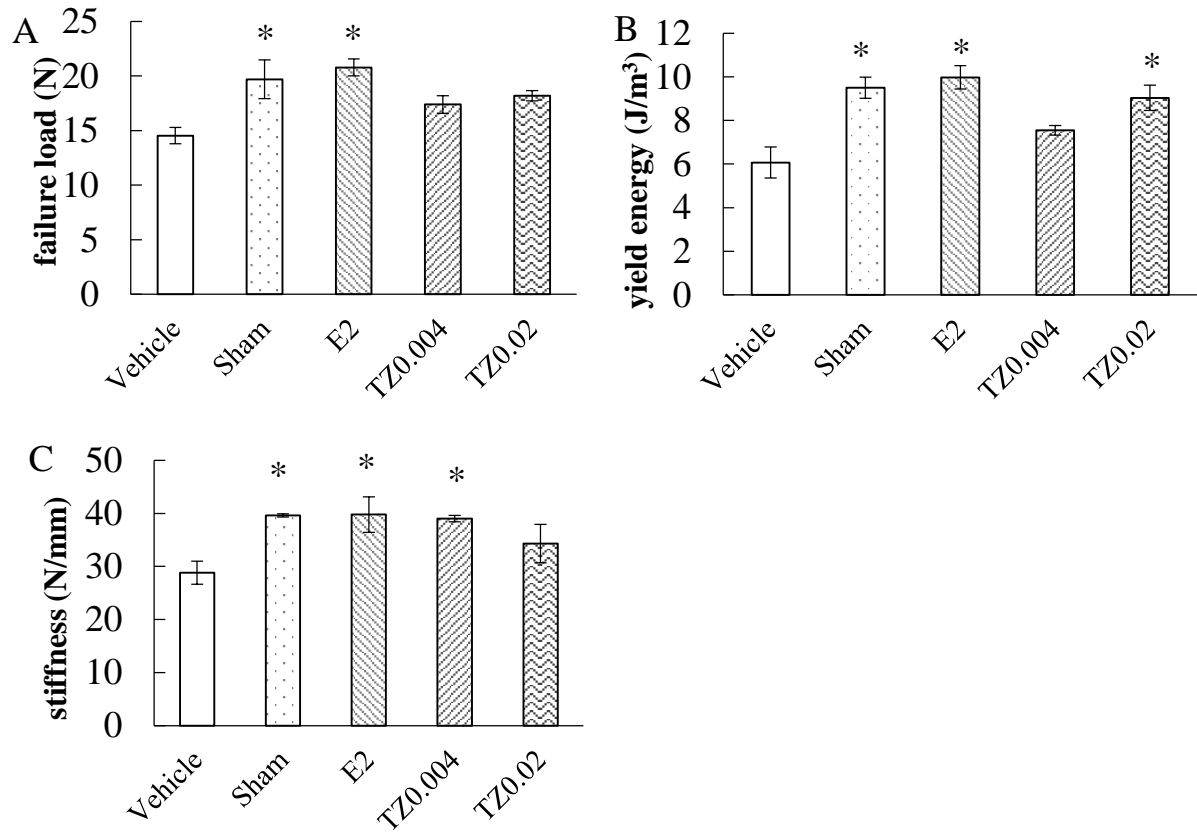


Fig.1-10 Effect of TZ on bone mechanical parameter in OVX mice. Each group of OVX mice were administered saline, E2 (0.08 mg / kg), or TZ (0.004, 0.02 mg / kg). Vehicle (n = 5): negative control group, Sham (n = 5): sham-operated group, E2 (n = 5): treatment with E2 group, TZ0.004 (n = 5), and TZ0.02 (n = 5): treatment with TZ group. A) failureload, B) yield energy, and C) stiffness were measured. Each point was expressed as mean  $\pm$  S.E.M. \*P < 0.05 compared with Vehicle.

## 第2章 骨芽細胞の骨無機基質形成能に対する TZ の影響の検討

## 緒言

第1章では骨粗鬆症モデルマウスにおいて、TZが骨量減少抑制作用を示すことを明らかにした。その中で、骨構造においては、TZは皮質骨に対する影響はほとんど見られず、海綿骨の骨梁数を維持することで骨量減少を抑制することが示された。この結果は、TZは骨吸収抑制ではなく、骨形成を強く促進することを示唆するものであった。また、組織学的検査においてTZは、骨芽細胞だけではなく破骨細胞も活性化することが示唆され、骨のターンオーバーを活性化することが考えられた。以上の結果からは、TZの骨量減少抑制作用が骨形成促進による可能性が高いことが予想された。近年において骨強度における骨密度の寄与率は70%であり、残りの30%は骨質によって決まると考えられている<sup>28</sup>。骨質は骨の微細構造や、代謝回転、微細骨折の集積などの骨環境によって変化すると考えられている。また、骨質を決定する因子として、骨基質の性状も重要であると考えられており、その中でコラーゲンは特に重要視されている<sup>27</sup>。そこで、TZの骨量減少抑制効果の作用機序を明らかにするためには、骨の無機基質形成に対する影響と有機基質形成に対するTZの影響を検討する必要があると考えられた。

骨吸収抑制剤として一般的であるBP剤は、破骨細胞のアポトーシスを誘導することで破骨細胞を抑制する。しかし、構造上窒素を含まない第一世代のBP剤は、ATPと競合することでアポトーシスを誘導するが、窒素を含む第二世代以降はメバロン酸を阻害することでアポトーシスを誘導する<sup>51</sup>。また、臨床的に使用可能な唯一の骨形成促進薬であるPTH製剤は間欠的に

作用させることで、骨芽細胞数を増加させることが明らかとなっている<sup>45,52</sup>。NZ に関しては間葉系幹細胞および骨芽細胞株を用いた検討は行われているものの、骨の無機基質形成に強い影響は見られないことが報告されている<sup>26</sup>。しかし、*in vitro* における TZ の細胞に対する影響に関する報告はまだない。そこで、第 2 章では、TZ が骨芽細胞株の骨の無機基質形成に与える効果について検討を行った。また、骨芽細胞は破骨細胞の分化に必須である receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANKL) を発現、分泌することで破骨細胞分化に影響する。この骨芽細胞由来である RANKL に対して TZ が関与するのかについても検討した。

まず、TZ が骨芽細胞の細胞数、石灰化能および活性化に与える影響を検討し、さらにそれらに関する遺伝子発現量として、Runx2、OCN、OPN および ALP について検討した。また、TZ が RANKL に与える影響として、骨芽細胞の RANKL 遺伝子発現量の変化および RANKL による破骨細胞株の分化に対する影響を検討した。

## 材料と方法

### 実験 2 骨芽細胞の骨形成機能に対する TZ の影響の検討

#### 1. Truncated-Norzoanthamine

実験 1-1、1 と同じものを使用した。

#### 2. 骨芽細胞株

培養細胞として、マウス新生児頭蓋冠細胞由来である MC3T3-E1 細胞（RIKEN Cell Bank、筑波）を用いた。培養条件としては 37℃、5 % CO<sub>2</sub> にてインキュベートし、培地は 10 % FBS（Gibco BRL, Grand Island, NY, USA）および 1 % Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B（和光純薬工業、大阪）を含有した  $\alpha$ -MEM 培地（Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA）を用いて、培地交換の際は培地をアスピレーターで除去した後、Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> free phosphate buffer saline（PBS（－））で 3 回 wash を行った後に新たな培地を加えた。TZ を添加する際は継代後 24 時間経過したものを使用し、培養期間は 1 日から 2 週間までとした。また、培地交換は 3 日毎に行い、その都度 TZ を添加した。また、分化誘導を行う際は上記の培地に L-アスコルビン酸（50  $\mu$ g/ml）および 5 mM  $\beta$  グリセロリン酸を加えることで行った（Fig. 2-1 を参照）。

#### 3. 破骨細胞株

培養細胞として RAW264.7 細胞（RIKEN Cell Bank）を用いた。培養条件として培地は 10 % FBS（Gibco BRL）および 1 % Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B（和光純薬工業）を含有した DMEM 培地（Thermo Fisher Scientific Inc.）を用いた。培地交換の際は培地をアスピレーターで除去した後、PBS（－）で 3 回 wash を行った後に新たな培地を加えた。実験に用いる際には、上記の培地にマウス可溶性 RANKL（和光純薬工業）およびマウス M-CSF（和光純薬工業）をそれぞれ 10 ng/ml で加えることで破骨細胞へと分化させて使用した（Fig.2-2 を参照）。

#### 4. 群の設定

過去の報告を基にして TZ の濃度毎に以下の 5 群を設定した。

TZ 0: TZ を含まない陰性コントロール群。

TZ 0.01: TZ 0.01  $\mu$ M

TZ 0.1: TZ 0.1  $\mu$ M

TZ 1: TZ 1  $\mu$ M

TZ 10: TZ 10  $\mu$ M

また、MC3T3-E1 細胞を用いた各試験では分化誘導の有無による検討も行った。

#### 5. 総細胞数試験

総細胞数の計測には cell counting kit-8（CCK-8）（同仁化学研究所、熊本）を用いて行った。

MC3T3-E1 細胞を 96 ウェルプレートに  $5 \times 10^3$  cells/well となるように播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  にて TZ 添加後 24 時間から 2 週間の培養を行った。培養終了後、CCK-8 溶液を各ウェルに 10  $\mu\text{l}$  ずつ加えて  $37^\circ\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  にて 2 時間インキュベートした。インキュベート後、マイクロプレートリーダーで 450 nm の波長を測定した。

## 6. 石灰化定量試験

石灰化の定量には石灰化評価セット (PG Reserch、東京) を用いて行った。

MC3T3-E1 細胞を 24 ウェルプレートに  $2 \times 10^4$  cells/well となるように播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  にて TZ 添加後 2 週間の培養を行った。培養終了後に各ウェルからアスピレーターによって培地を除去し、PBS (ー) で 1 回 wash を行った。

次にウェル内の細胞を中性緩衝ホルマリン溶液 200  $\mu\text{l}$  ずつ加えて固定した。固定後、ウェル内の中性緩衝ホルマリン溶液を除去し、精製水にてウェル内を洗浄した。その後、ウェル内の精製水を完全に除去し、アリザリンレッド溶液を 500  $\mu\text{l}$ /well 加えて室温にて 30 分間インキュベートした。インキュベート終了後、精製水でウェル内を洗浄して精製水を除去した後に石灰化結節溶解液を 0.5  $\mu\text{l}$ /well 加えて 10 分間インキュベートした。最後に色素が溶出した溶解液を 100  $\mu\text{l}$  ずつ 96 ウェルプレートに移して、マイクロプレートリーダーにて 450 nm の波長を測定した。

## 7. ALP 測定試験

ALP 測定にはラボアッセイ<sup>TM</sup>ALP（和光純薬工業）を用いた。MC3T3-E1 細胞を 96 ウェルプレートに  $5 \times 10^3$  cells/well となるように播種し、37°C、5 % CO<sub>2</sub> にて TZ 添加後 24 時間から 2 週間の培養を行った。培養終了後、各ウェルの培地の除去を行い、PBS（－）にて wash を行った。次に PBS（－）を除去し、各ウェルに Cellytic<sup>TM</sup>M（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）を 100  $\mu$ l/well 加えた後、4°C にて 15 分間インキュベートした。続いて上清を回収し、15000 rpm、4°C にて 15 分間遠心分離を行った。遠心分離後、得られた上清を精製水で 2 倍希釈したものを 20  $\mu$ l ずつ 96 ウェルに移し、pNPP を 100  $\mu$ l ずつ加えて 37°C にて 30 分間インキュベートした。インキュベート終了後、各ウェルに反応停止液を 80  $\mu$ l ずつ添加してマイクロプレートリーダーにて 405 nm の波長を測定した。

## 8. 破骨細胞分化誘導試験

破骨細胞の測定には TRAP Staining kit（和光純薬工業）を用いて行った。まず、RAW264.7 細胞を 96 ウェルプレートに  $5 \times 10^3$  cells/well となるように播種し、37°C、5 % CO<sub>2</sub> にて 2 インキュベートした。インキュベートから 24 時間後、培地に RANKL、M-CSF および TZ を添加して 1 週間の培養を行った。培養終了後、培養液を除去し PBS（－）にて各ウェルを wash した。続いて中性緩衝ホルマリンを 50  $\mu$ l/well 加えて 5 分間固定を行った。固定液を除去し、各ウェルを精製水にて wash した後、発色液を加えて 37°C にて 30 分から 60 分インキュベートした。反



応終了後、各ウェルを精製水で wash して、顕微鏡下にて TRAP 陽性の細胞をすべて計測した。

## 9. RNA 抽出

RNA の抽出には TRI Reagent<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich) を用いた。まず、6 ウェルのプレートに MC3T3-E1 細胞を  $2 \times 10^4$  cells/well で播種した後に、TZ を各濃度添加して 24 時間から 14 日間まで培養した。培養終了後、各ウェルの培養液を除去し、TRI Reagent<sup>®</sup> を 1 ml/well を各ウェルに加えて室温で 5 分間静置した。その後、抽出液をよくピペッティングして 1.5 ml チューブへ回収した。次にクロロホルムを 0.5 ml 加えて転倒混和した後、室温にて 10 分間インキュベートした。インキュベート終了後、1.5 ml チューブを 12000 g、4℃の条件で 15 分間遠心分離した。遠心分離後、上清を 0.4 ml ずつ回収して新たな 1.5 ml チューブへと移した。さらに、イソプロパノール 0.5 ml を加えて転倒混和を行い、室温にて 10 分間静置した。次に、12000 g、15 分の条件で 4 分間遠心分離した。続いて、上清を全て除去し 75 % エタノールを 1 ml 加え 12000 g、4℃で 5 分間遠心分離をする工程を 2 回行った。二回目の遠心分離終了後、上清を除去し、1.5 ml チューブを 5 分間乾燥させた。最後に 1.5 ml チューブへ蒸留水を 20  $\mu$ l 加え、60℃で 15 分間インキュベートしたものを RNA として使用した。濃度測定は分光光度計（ナノドロップ、スクラム、東京）を使用して測定した。

## 10. cDNA 作製

逆転写には ReverTra Ace (R) (東洋紡、大阪) を使用して実験を行った。まず、8 で作製した RNA テンプレート 0.5  $\mu\text{g}$  を 65°C で 5 分間インキュベートして RNA 変性を行った。次に氷上にて変性した RNA テンプレートに Nuclease free water を加えて全体量を 6  $\mu\text{l}$  に調節した後、4 $\times$ DN master mix を 2  $\mu\text{l}$  加えて、37°C で 5 分間インキュベートすることでゲノム DNA を除去した。インキュベート終了後、氷上にて RNA テンプレートに 5 $\times$ RT Master mix 2  $\mu\text{l}$  加えたものを、①37°C、15 分間、②50°C、5 分間、③98°C、5 分間の条件下で反応させて逆転写を行い cDNA が得られた。実験終了後 cDNA は -20°C にて保存した。

## 11. プライマー作製

Table 4 に示した Runx2、osteocalcin (OCN)、osteopontin (OPN)、ALP および RANKL の primer は過去の報告を基にして設計した<sup>53-55</sup>。各種プライマーは設計後にグラジエント PCR を行い PCR 産物ができたことを確認した後に、後述のリアルタイム PCR に用いた。

## 12. リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (東洋紡) を用いて行った。まず、氷上にて反応液として蒸留水 3.6  $\mu\text{l}$ 、SYBR mix 10  $\mu\text{l}$ 、forward primer 1  $\mu\text{M}$ 、reverse primer 1  $\mu\text{M}$ 、50 $\times$ ROX 0.4  $\mu\text{l}$  の比で作製した。この反応液を MicroAmp® Fast Optical 96-Well

Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific Inc.) の各ウェルに 18  $\mu$ l ずつ加えた後、9 で作製した cDNA テンプレートを 2  $\mu$ l ずつ加えた。PCR サイクルは全てのプライマーにおいて、Table 5 に示した条件下で StepOne™ リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて行われた。反応終了後、付属のソフトウェアから得られた各遺伝子蛍光量を GAPDH 蛍光量によって標準化したものを相対的な遺伝子発現量とした。

### 13. 統計解析

各群間の比較はソフトウェア JMP12 (SAS Institute Japan, 東京) を用い、Dunnett 検定で解析を行った。すべての統計解析において有意水準  $p < 0.05$  とした。結果は平均値  $\pm$  標準誤差で表示した。

## 結果

### 総細胞数試験

TZ がマウス骨芽細胞の増殖に影響を与えるかどうか検討を行うために、TZ 処理を行った MC3T3-E1 細胞の総細胞数を 2 週間まで観測した。その結果、14 日目の未分化 MC3T3-E1 細胞において、TZ 0.1、TZ 1 および TZ 10 群でコントロール群と比較して有意に細胞数の増加が確認された (Fig. 2-3 A)。また 14 日目の分化誘導 MC3T3-E1 細胞においても、TZ 10 群がコントロール群と比較して有意な細胞数増加が確認された (Fig. 2-3 B)。データには示していないが、未分化、分化誘導のどちらにおいても培養 2 日目から TZ 群の細胞数増加が確認された。

### 石灰化評価試験

骨芽細胞の石灰化に対する TZ の影響を検討するために、TZ 処理を行った MC3T3-E1 細胞を 2 週間培養した後、石灰化量の定量化を行った。その結果、未分化 MC3T3-E1 細胞では TZ 処理を行った全ての群がコントロール群と比較して石灰化量が有意に増加していた (Fig. 2-4 A)。一方、分化誘導 MC3T3-E1 細胞では TZ 1 および TZ 10 群においてコントロール群と比較して有意に石灰化量が減少していた (Fig. 2-4 B)。

### ALP 測定試験

TZ がマウス骨芽細胞の活性化に対して影響を与えるかどうか検討するために、MC3T3-E1 細胞を 2 週間まで培養し、骨芽細胞の初期マーカーである ALP の測定を行った、その結果、未分化 MC3T3-E1 細胞では TZ 処理を行った全ての群で ALP がコントロール群と比較して有意に減少していることが確認された (Fig. 2-5 A)。同様に分化誘導 MC3T3-E1 細胞においても、全ての TZ 群で ALP がコントロール群と比較して有意に減少していた (Fig. 2-5 B)。さらに、未分化細胞の TZ0 群と比較して分化誘導細胞の TZ0 群では ALP が 4 倍ほど増加していた。TZ 添加群においても分化誘導処理によりほぼ同等の ALP の増加が確認できた為、TZ は分化誘導そのものに影響を与えていないと考えられた。また、データには示していないが、この結果は未分化および分化誘導のどちらの群でも、2 日目から同様の結果が得られた。

#### 破骨細胞分化誘導試験

マウス骨芽細胞由来の RANKL による破骨細胞の分化誘導に対する TZ の影響を検討するため、RAW264.7 細胞に TZ 処理を行い 7 日間培養した後、TRAP 染色を行った。データには示していないが、分化誘導を行わずに TZ 処理を行った結果全ての群において TRAP 陽性細胞は認められず、TZ 自体に破骨細胞分化誘導能がないことが確認された。続いて分化誘導を行った RAW264.7 細胞では全ての群で TRAP 陽性細胞が確認された。その中でも、TZ 0.01 群ではコントロールと比較して有意に TRAP 陽性細胞数が増加していた (Fig. 2-6)。

## 定量的リアルタイム PCR

骨芽細胞の各種遺伝子発現量に対する TZ の影響を検討するため、未分化および分化誘導 MC3T3-E1 細胞を 2 週間まで培養（1、2、3、7、14 日）し、Runx2、OCN、OPN、ALP、および RANKL の発現量を調べた。

TZ 処理群の Runx2 は、未分化 MC3T3-E1 細胞の全ての日数においてコントロール群と比較して有意な差は認められなかった（Fig. 2-7 A）。また、分化誘導 MC3T3-E1 細胞に関しても有意な差は認められなかった（Fig. 2-7 B）。

ALP は未分化 MC3T3-E1 細胞の全ての日数において、TZ 処理群とコントロールとの間に有意な差が認められなかった（Fig. 2-8 A）。一方、分化誘導 MC3T3-E1 細胞では 2 日目の全ての TZ 群でコントロール群と比較して有意な減少が認められた。3 日目においても、TZ 0.01 群がコントロールと比べて有意な減少が確認された（Fig. 2-8 B）。

OCN は未分化 MC3T3-E1 細胞の全ての日数において TZ 処理群はコントロール群と比較して差は認められなかった（Fig. 2-9 A）。一方、分化誘導 MC3T3-E1 細胞において 2 日目までは有意な差は認められなかったが、3 日目において全ての TZ 群がコントロール群と比較して有意に減少していた（Fig. 2-9 B）。7 日目は有意な差は認められなかったが、14 日目においても全ての TZ 群でコントロール群と比較して有意な減少が確認された。

OPN は未分化 MC3T3-E1 細胞の全ての日数において、TZ 処理群とコントロールとの間に有

意な差は認められなかった (Fig. 2-10 A)。一方、分化誘導 MC3T3-E1 細胞では 7 日目まで有意な差は認められなかったが、14 日目において、全ての TZ 群でコントロールと比較して有意に減少していた (Fig. 2-10 B)。

RANKL に関しては、未分化 MC3T3-E1 細胞は全ての日数において遺伝子発現量が少なく検出することができなかった。一方、分化誘導 MC3T3-E1 細胞では 7 日目までは全ての群で有意な差は認められなかったが、14 日目には全ての TZ 群でコントロールと比較して有意な減少が認められた (Fig. 2-11)。

## 考察

第1章でTZがOVXマウスに対して骨量減少抑制作用を持つことが確認された。その中でもTZは骨芽細胞に対する影響が強いことが予想されたため、第2章では、まず、MC3T3-E1細胞の骨の無機基質形成能に対するTZ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、これは高濃度TZにおいても確認された (Fig. 2-4)。骨形成能を示すPTH製剤は骨芽細胞の生存期間を延長させることで骨芽細胞の機能を活性化することが報告されている<sup>52</sup>。過去の報告では、*in vitro*の実験においてNZの $IC_{50} = 3.8 \text{ mM}$ と非常に高濃度を示しており、NZは毒性が低いものと考えられている<sup>26</sup>。また、NZはスナギンチャク (*Zoanthus. sp*) の表層に存在しており、紫外線からの保護作用を持つことが報告されているため、生理的な作用としては細胞保護作用を持つことが予想されている<sup>56</sup>。今回の結果からは、TZがNZと同様に細胞保護作用を示し、骨芽細胞の生存期間を延長することで骨芽細胞数を増加させる可能性が考えられた。

次にMC3T3-E1細胞による石灰化に関してTZが影響するか検討を行った。その結果、未分化MC3T3-E1細胞ではTZの濃度依存性に石灰化が有意に増加していた (Fig. 2-5 A)。これは、TZによる細胞増加によって石灰化量も増加したものであると考えられた。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 1 および TZ 10 群で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 (Fig. 2-5 B) この原因としては TZ が MC3T3-E1 細胞の石灰化を直接抑制する、あるいは TZ が MC3T3-E1 の分化誘導を抑制していることによって石灰化が抑制されることが考えられた。そこで、TZ の骨芽細胞の活性および分化に対する影響を検討するため、骨芽細胞の初期分化マーカーである ALP の測定を行った。その結果、未分化 MC3T3-E1 細胞では TZ によって ALP が有意に減少することが確認された (Fig. 2-6 A)。分化誘導 MC3T3-E1 細胞においても同様に TZ 群がコントロール群に比べて有意に ALP が減少していた (Fig. 2-6 B)。以上の結果から TZ は骨芽細胞の活性を抑制することが示唆された。また、TZ によって ALP は減少していたが、未分化 MC3T3-E1 細胞と比べると分化誘導 MC3T3-E1 細胞の ALP は 5 倍程度の高値を示しており、TZ は分化誘導そのものには大きな影響を与えていないことが示唆された。ALP は骨芽細胞の分化により上昇し、骨芽細胞周囲の環境での石灰化を促進する役割を果たしていると言われている<sup>57</sup>。そのため、未分化 MC3T3-E1 細胞における TZ 処理による石灰化量の増加は、TZ による細胞数増加の影響が ALP 活性の抑制の影響を上回ったことによると考えられるが、分化誘導 MC3T3-E1 細胞では細胞数の増加の影響に対して ALP 活性が大きく抑制されたため、石灰化が抑制されたものと考えられた。

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、定量的リアルタイム PCR を行った。骨芽細胞の分化に関する Runx2 において、全ての日数において TZ 群とコントロールの間に有意な差は認められなかった (Fig. 2-7)。Runx2 は骨芽細胞のマスター転写

因子であるが、骨芽細胞前駆細胞に対しては分化促進に対して働き、成熟した骨芽細胞においては逆に分化抑制の方向に働くことが知られている<sup>58</sup>。このデータから、TZは分化誘導の前後においてRunx2に影響を与えず、MC3T3-E1細胞の分化シグナルに対しては影響を与えないことが示唆された。

骨芽細胞の活性に関するALP、OPNおよびOCNにおいては、未分化MC3T3-E1細胞においてTZ群は全ての日数でコントロールと比較して有意な差は認められなかった（Fig. 2-8 A、9 A、10 A）。このことから、TZは未分化MC3T3-E1細胞の骨形成の活性に与える影響はほとんど影響しないことが考えられた。一方、分化誘導MC3T3-E1細胞では、ALPは初期の2、3日目ではTZ群の有意な抑制が認められた（Fig. 2-8 B）。また、OCN、OPNはALPとは異なり、培養後期の3から14日において発現量の有意な低下が認められた（Fig. 2-9 B、10 B）。ALPは前述のように、骨芽細胞分化の初期から多く発現して骨の石灰化を促進する。OCNおよびOPNは骨芽細胞分化の中期から後期にかけて多く発現する<sup>59,60</sup>。以上のことから、TZは分化誘導MC3T3-E1細胞の分化誘導が進むにつれて活性化する因子の発現を抑制することが示唆された。また、OPNノックアウト動物において大理石病を呈することや、破骨細胞の骨への接着には、OPNとインテグリンの結合が必須であるということが報告されている<sup>61</sup>。これらの報告と今回の結果から、TZは破骨細胞の骨吸収を抑制する可能性が考えられた。しかしながら、本研究においては、破骨細胞の骨吸収能に関するTZの影響は検討しておらず、今後の課題であると考えられた。

RANKL は骨芽細胞および骨細胞において発現、分泌される因子であり、M-CSF によって発現した RANK と結合することで破骨細胞の分化を促進する<sup>62,63</sup>。そこで、骨芽細胞由来である RANKL に対する TZ の影響を検討した。RAW264.7 細胞を RANKL によって分化誘導する際に TZ を添加したところ、TZ 0.01 群においてのみコントロールと比較して有意に TRAP 陽性細胞数が増加していた (Fig. 2-6)。このことは TZ が RANKL を介した破骨細胞の分化を促進することを示しており、TZ が破骨細胞前駆細胞の RANK 発現を高める可能性が考えられた。一方、分化誘導 MC3T3-E1 細胞における RANKL 遺伝子の発現量は培養後期において強く抑制されていた (Fig. 2-11) RANKL の発現を促進する因子としては炎症性サイトカインである IL-1 や IL-6 が報告されており<sup>64</sup>、IL-6 およびそのレセプターは骨芽細胞に存在することが確認されている<sup>65</sup> また、NZ は IL-6 を抑制することが示唆されており<sup>25</sup>、今回の TZ による RANKL 発現の低下は IL-6 を介している可能性が考えられた。しかしながら今回の結果では、TZ は RANKL による破骨細胞株の分化促進と骨芽細胞株の RANKL 発現抑制と一貫した結果は得られなかったため、今後破骨細胞と TZ の関連について、より詳細な検討が必要であると考えられた。

以上のことから、TZ は骨芽細胞株の骨の無機基質形成能に対して影響を与えることが確認された。また、TZ は骨芽細胞由来の破骨細胞活性化因子である RANKL や OPN を抑制することが示唆しており、骨芽細胞を介して破骨細胞を抑制することが考えられた。しかしながら、今回の検討では、TZ の骨量減少抑制効果の作用機序として骨の無機基質形成を強く支持する結果は示されなかった。生体内では骨芽細胞と破骨細胞が共存した環境で骨吸収と形成を行ってお

り、本研究の様に単独の細胞では存在していない。そのため、骨芽細胞と破骨細胞の共培養条件での検討が骨の無機基質形成に対する TZ の影響がより詳細に明らかになると考えられた。

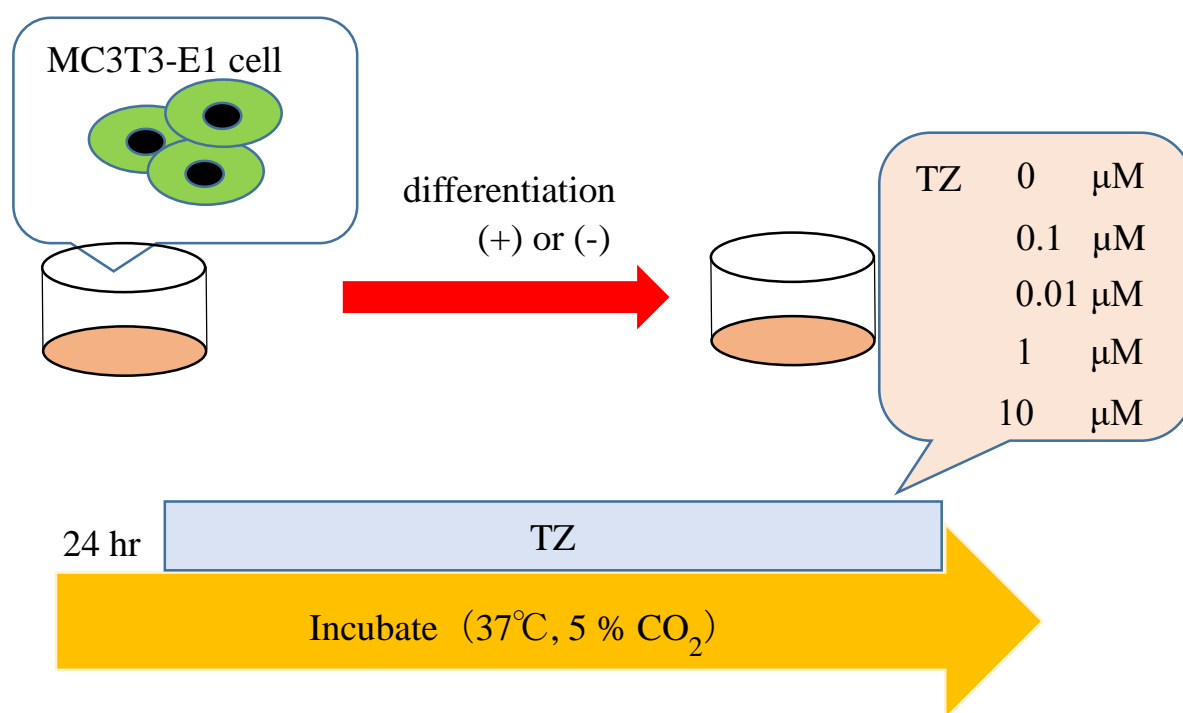


Fig. 2-1 MC3T3-E1 細胞培養

MC3T3-E1 細胞は 37°C、5 % CO<sub>2</sub> で継代し、24 時間後に接着した様子を確認してから TZ を添加した。分化誘導を行う際は培地に L-アスコルビン酸 (50 μg/ml) および 5 mM β グリセロリン酸を加えたものを使用した。培地の交換は 3 日毎に交換し、その度に TZ を再度添加した。

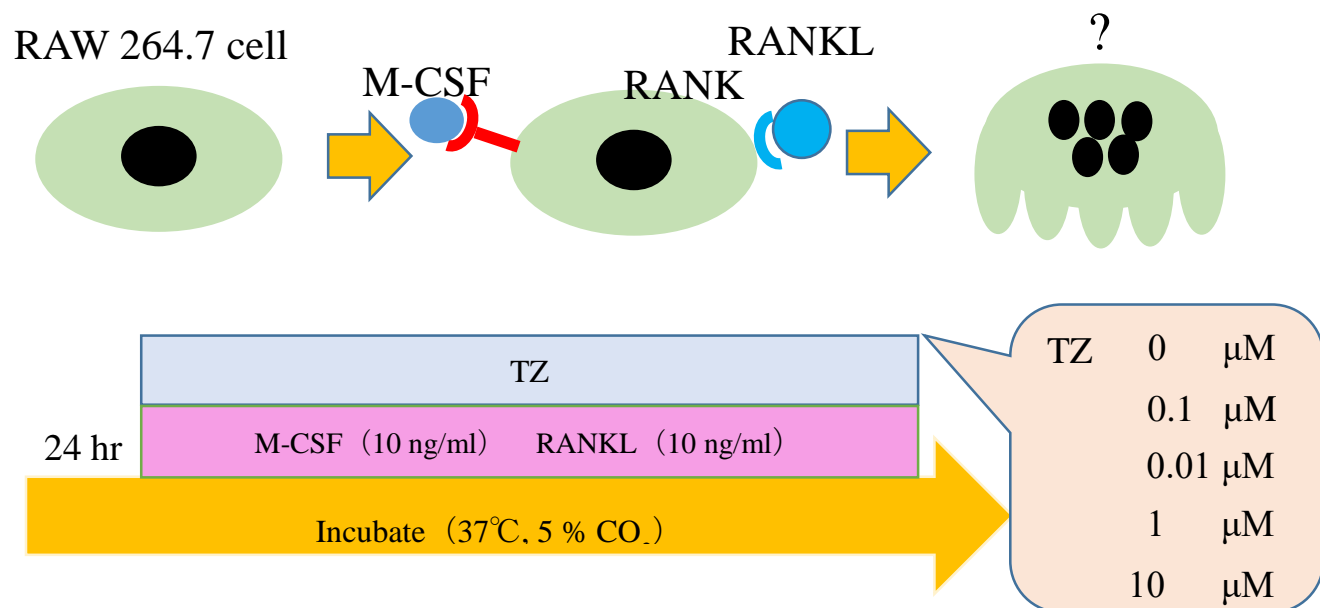


Fig. 2-2 RAW264.7 細胞培養

RAW264.7 細胞は 37°C、5 % CO<sub>2</sub> で継代し、24 時間後に接着した様子を確認してから

TZ を添加した。分化誘導は培地に M-CSF (10 ng/ml)、RANKL (10 ng/ml) を加えたものを

使用した。培地の交換は 3 日毎に交換し、その度に TZ を再度添加した。

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')	Product size (bp)
Runx2	GCCGGGAATGATGAGAACTA	GGACCGTCCACTGTCACTTT	200
OCN	AAGCAGGAGGGCAATAAGGT	TTTGTAGGCGGTCTTCAAGC	156
OPN	CGATGATGATGACGATGGAG	TGGCATCAGGATACTGTTCATC	241
RANKL	CCTGAGGCCCCAGCCATTT	CTTGGCCCAGCCTCGAT	108
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	423

Table 4 リアルタイム PCR に用いたプライマー

Step		temperature	Time (sec)
Initial denaturation		95.0 °C	600
PCR	denaturation	95.0 °C	15
	annealing	58.7 °C	30
	elongation	72.0 °C	60

Table 5 リアルタイム PCR のサイクル条件



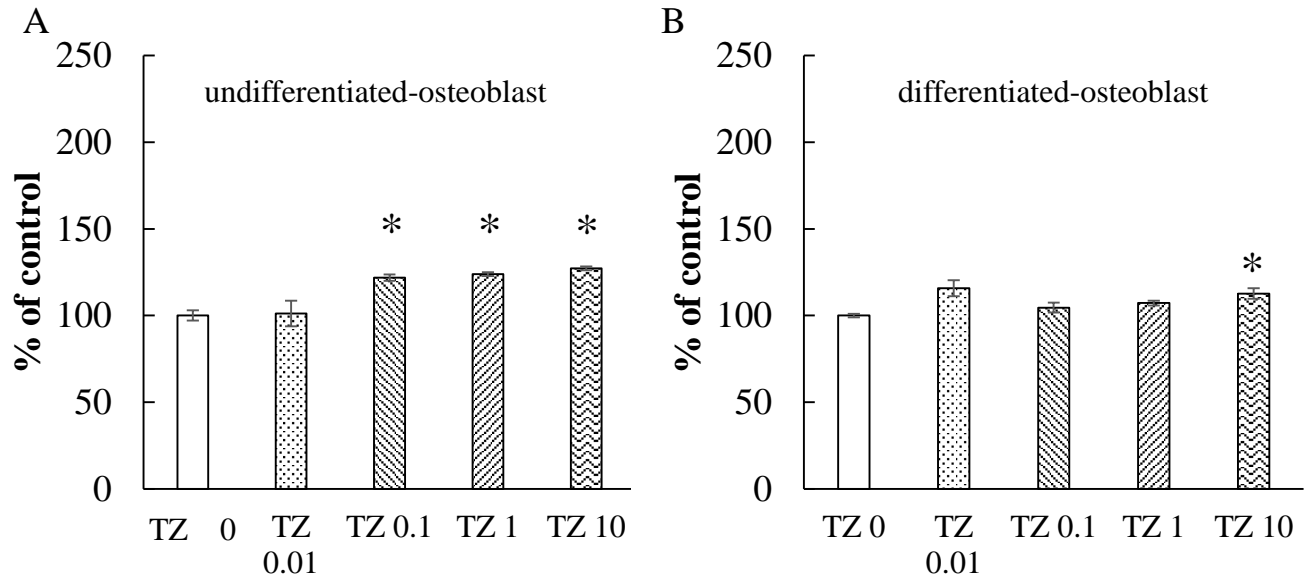


Fig. 2-3 Cell proliferation test of undifferentiated osteoblastic and differentiated osteoblastic MC3T3-E1 cells. Osteoblastic differentiation was induced by culturing in medium containing 50  $\mu\text{g/ml}$  ascorbic acid and 10 nM  $\beta$ -glycerol phosphate. MC3T3-E1 cells were treated with TZ (0, 0.01, 0.1, 1, 10  $\mu\text{M}$ ) for 14 days. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.. (undifferentiated group  $n = 10$ , differentiated group = 10). \*  $P < 0.05$  compared with TZ 0.

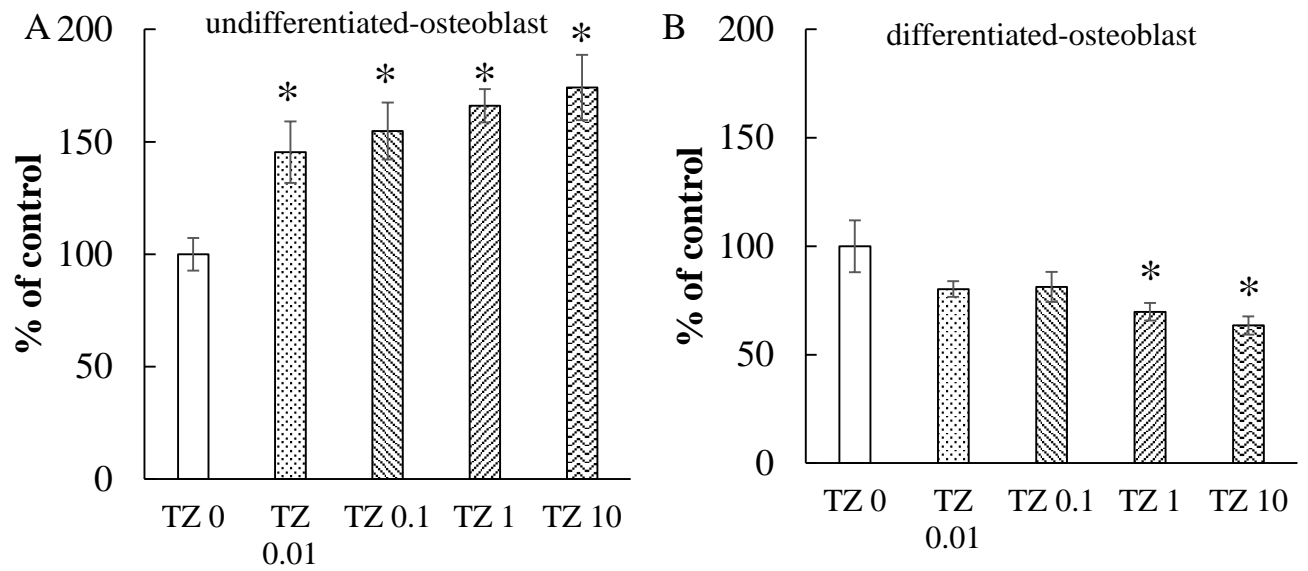


Fig. 2-4 Calcification test of undifferentiated osteoblastic and differentiated osteoblastic MC3T3-E1 cells. Osteoblastic differentiation was induced by culturing in medium containing 50  $\mu\text{g/ml}$  ascorbic acid and 10 nM  $\beta$ -glycerol phosphate. MC3T3-E1 cells were treated with TZ (0, 0.01, 0.1, 1, 10  $\mu\text{M}$ ) for 14 days. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.. (undifferentiated group  $n = 5$ , differentiated group = 12). \*  $P < 0.05$  compared with TZ 0.

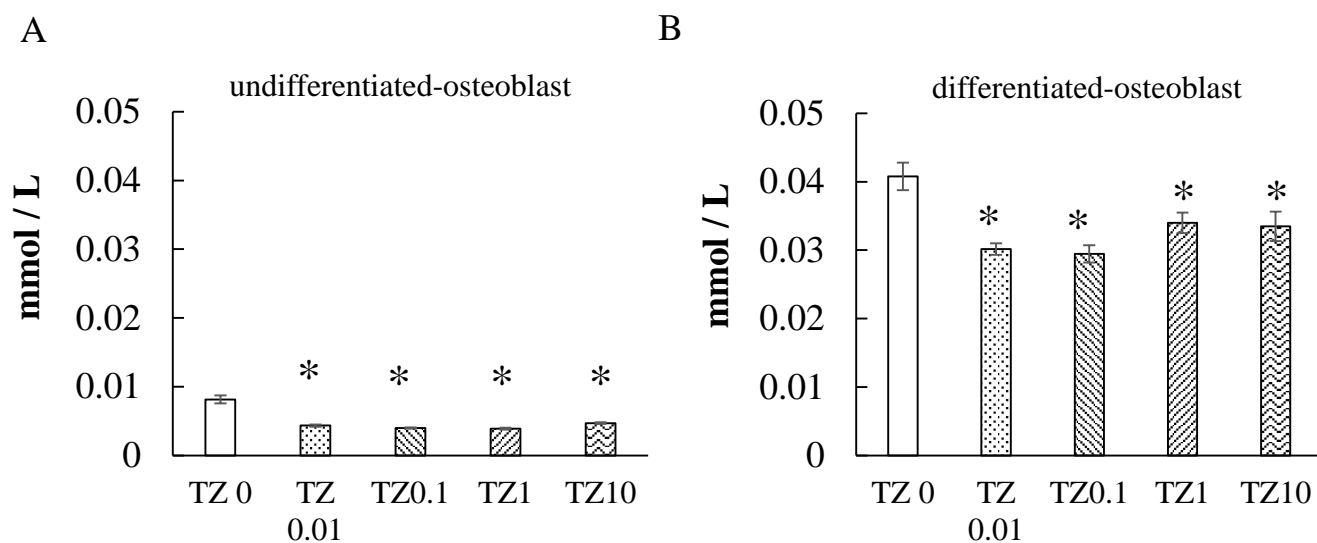


Fig. 2-5 Alkaline phosphatase (ALP) activity test of undifferentiated osteoblastic and differentiated osteoblastic MC3T3-E1 cells. Osteoblastic differentiation was induced by culturing in medium containing 50  $\mu\text{g/ml}$  ascorbic acid and 10 nM  $\beta$ -glycerol phosphate. MC3T3-E1 cells were treated with TZ (0, 0.01, 0.1, 1, 10  $\mu\text{M}$ ) for 14 days. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 10). \*  $P < 0.05$  compared with TZ 0.

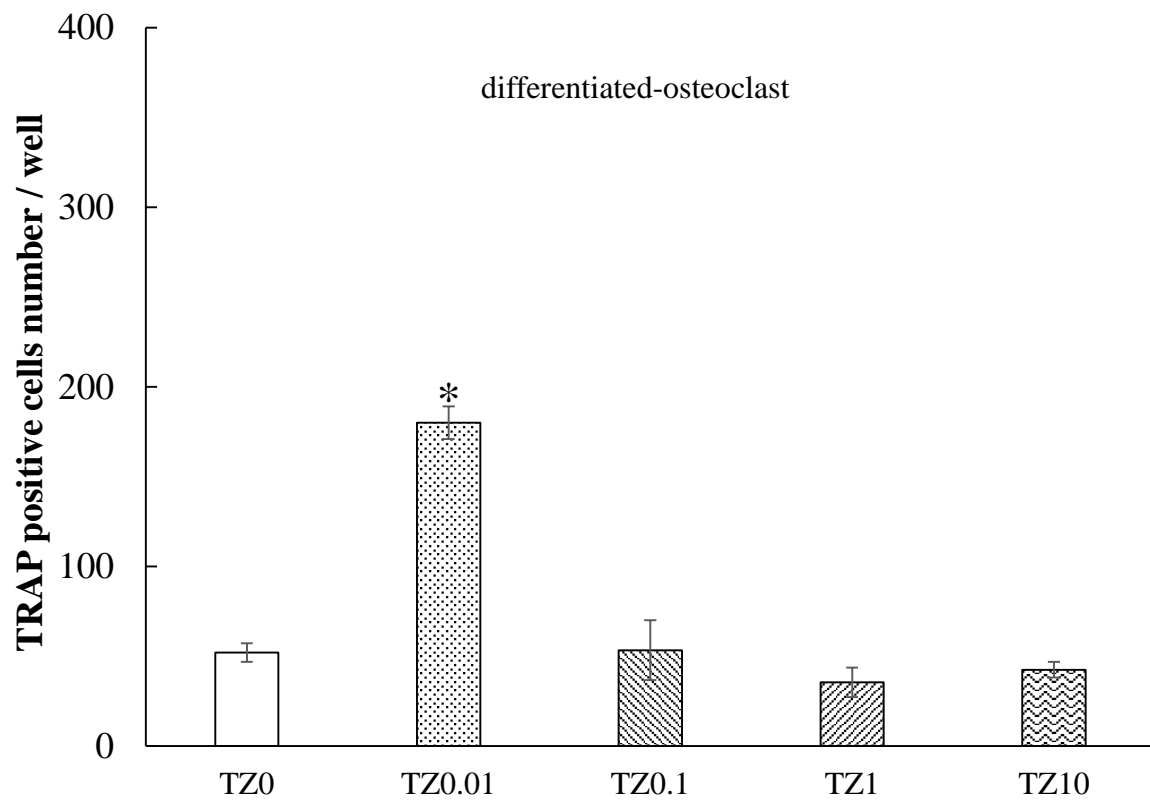


Fig. 2-6 TRAP positive cells number of differentiated osteoclastic RAW264.7 cells. Osteoblastic differentiation was induced by culturing in medium containing 10 ng/ml mouse RANKL and 10 ng/ml mouse M-CSF. RAW 264.7 cells were treated with TZ (0, 0.01, 0.1, 1, 10  $\mu$ M) for 7 days. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 10).

\* P < 0.05 compared with TZ 0.

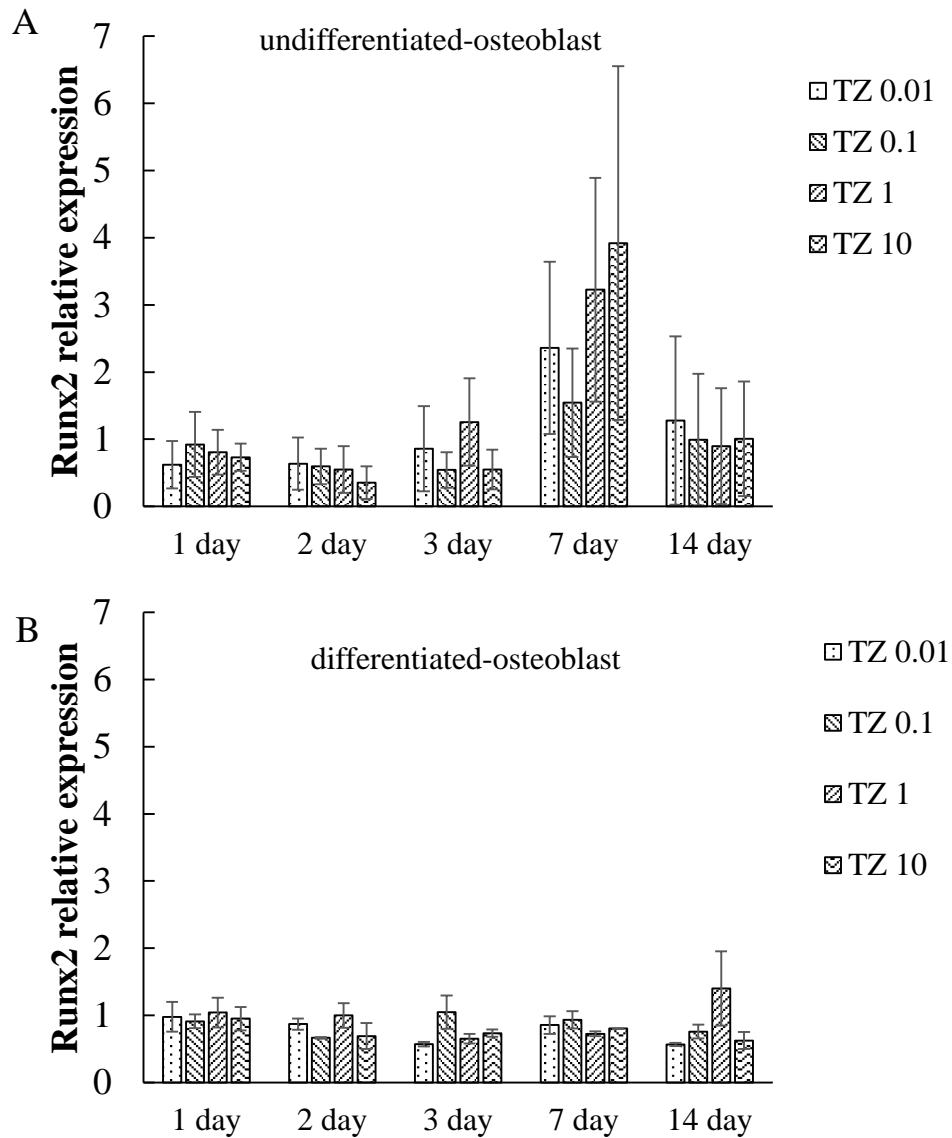


Fig. 2-7 Effect of TZ on Runx2 expression in undifferentiated and differentiated MC3T3-E1 cells. Osteoblastic differentiation was induced by culturing in medium containing 50  $\mu\text{g/ml}$  ascorbic acid and 10 nM  $\beta$ -glycerol phosphate. MC3T3-E1 cells were treated with TZ (0, 0.01, 0.1, 1, 10  $\mu\text{M}$ ) for 14 days. Values were normalized to expression of GAPDH and expressed relative to data from TZ 0. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M..(n = 3). \*  $P < 0.05$  compared with TZ 0.

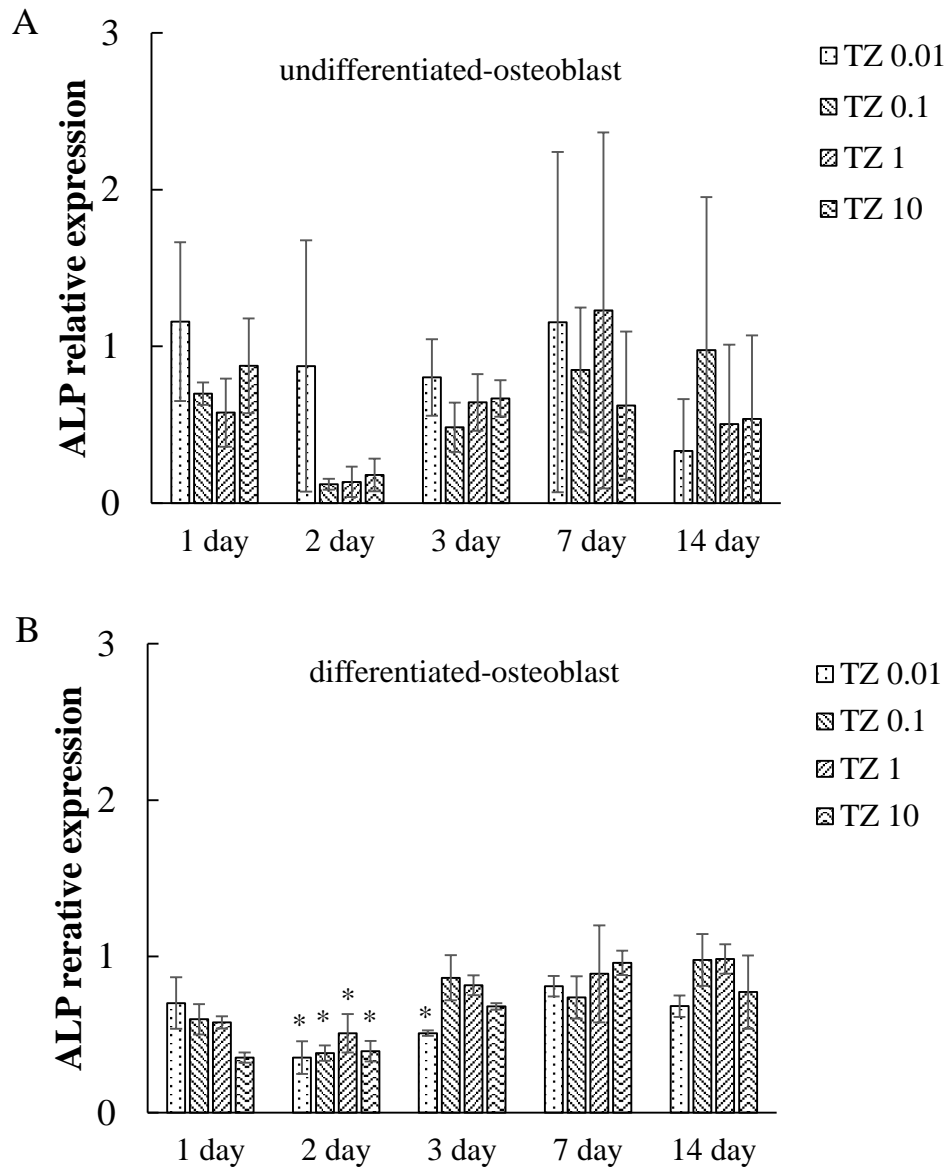


Fig. 2-8 Effect of TZ on ALP expression in undifferentiated and differentiated MC3T3-E1 cells. Osteoblastic differentiation was induced by culturing in medium containing 50  $\mu\text{g/ml}$  ascorbic acid and 10 nM  $\beta$ -glycerol phosphate. MC3T3-E1 cells were treated with TZ (0, 0.01, 0.1, 1, 10  $\mu\text{M}$ ) for 14 days. Values were normalized to expression of GAPDH and expressed relative to data from TZ 0. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M..(n = 3). \*  $P < 0.05$  compared with TZ 0.

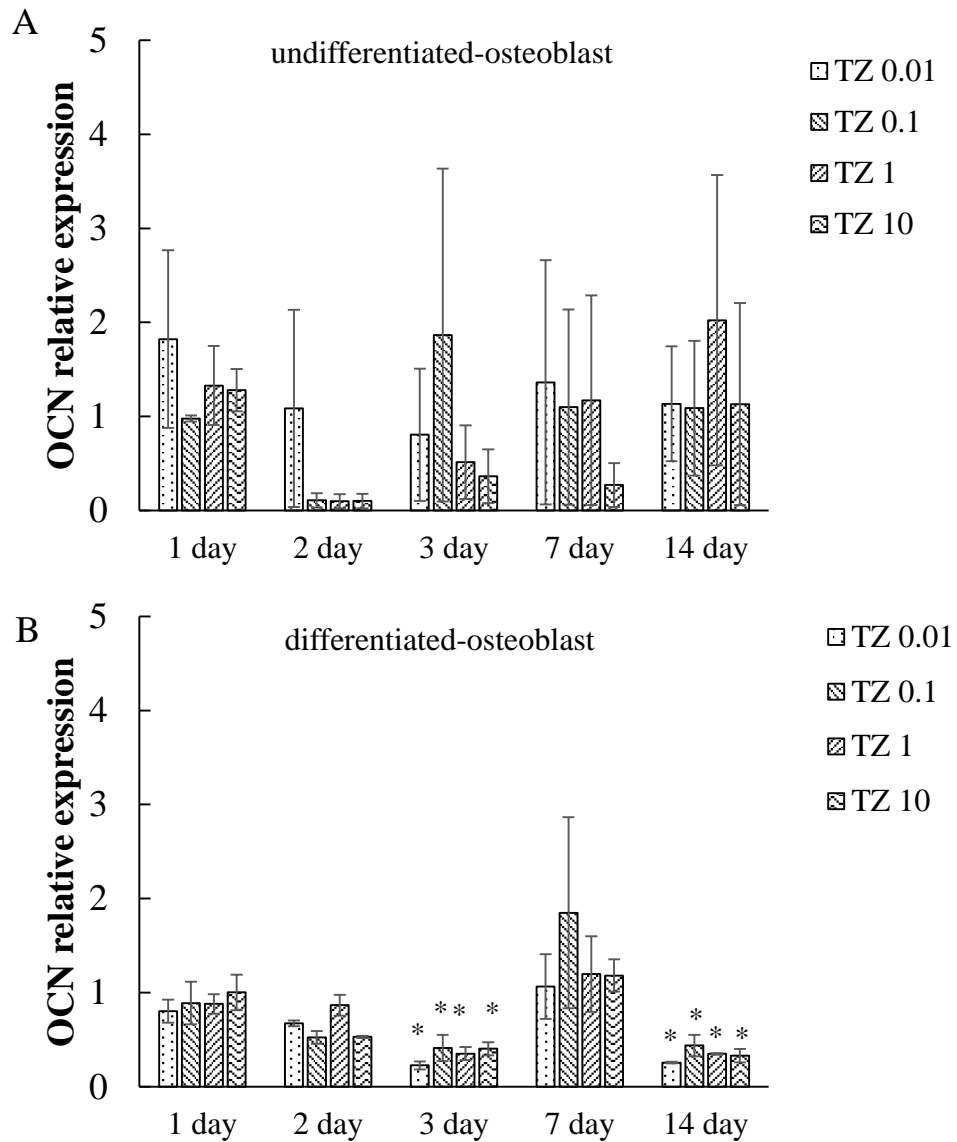


Fig. 2-9 Effect of TZ on OCN expression in undifferentiated and differentiated MC3T3-E1 cells. Osteoblastic differentiation was induced by culturing in medium containing 50  $\mu\text{g/ml}$  ascorbic acid and 10 nM  $\beta$ -glycerol phosphate. MC3T3-E1 cells were treated with TZ (0, 0.01, 0.1, 1, 10  $\mu\text{M}$ ) for 14 days. Values were normalized to expression of GAPDH and expressed relative to data from TZ 0. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3). \* P < 0.05 compared with TZ 0.

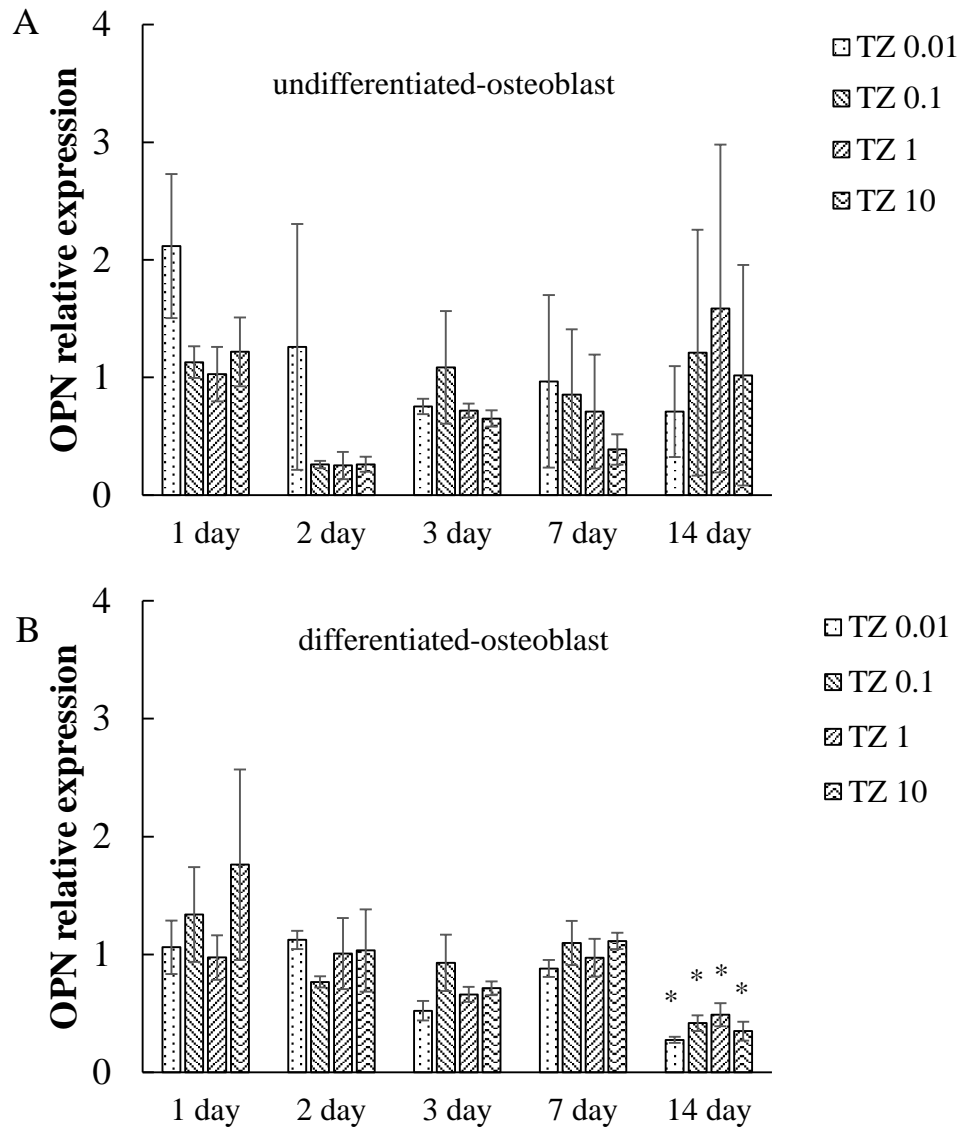


Fig. 2-10 Effect of TZ on OPN expression in undifferentiated and differentiated MC3T3-E1 cells. Osteoblastic differentiation was induced by culturing in medium containing 50  $\mu\text{g/ml}$  ascorbic acid and 10 nM  $\beta$ -glycerol phosphate. MC3T3-E1 cells were treated with TZ (0, 0.01, 0.1, 1, 10  $\mu\text{M}$ ) for 14 days. Values were normalized to expression of GAPDH and expressed relative to data from TZ 0. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M..(n = 3). \*  $P < 0.05$  compared with TZ 0.



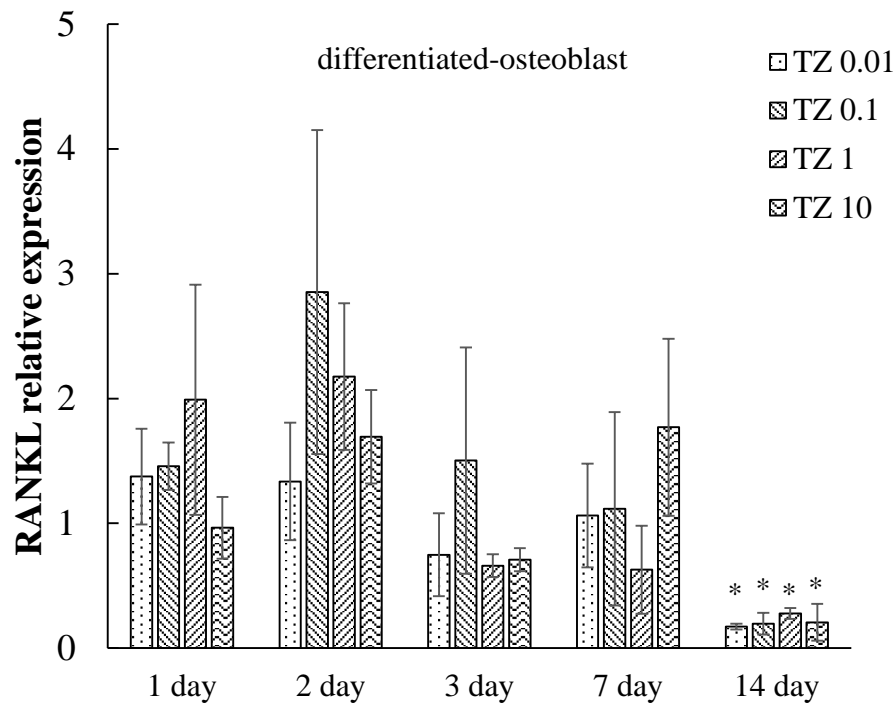


Fig. 2-11 Effect of TZ on RANKL expression in undifferentiated and differentiated MC3T3-E1 cells. Osteoblastic differentiation was induced by culturing in medium containing 50  $\mu\text{g/ml}$  ascorbic acid and 10 nM  $\beta$ -glycerol phosphate. MC3T3-E1 cells were treated with TZ (0, 0.01, 0.1, 1, 10  $\mu\text{M}$ ) for 14 days. Values were normalized to expression of GAPDH and expressed relative to data from TZ 0. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3). \*  $P < 0.05$  compared with TZ 0.

### 第3章 骨芽細胞由来細胞外マトリックスコラーゲンに対する TZ の効果に関する検討

## 緒言

第2章で、TZの骨量減少抑制作用は骨芽細胞の骨の無機基質形成能を促進することによると仮定して実験を行った。その結果、TZは骨芽細胞を介した骨の無機基質形成能に影響することが確認されたが、TZの骨量減少抑制効果を強く支持するものではないと推測された。

骨粗鬆症は骨強度の低下に伴う骨折リスクが増加する病態と定義されており、その骨強度は骨密度によるものだと考えられてきていた。しかしながら、近年において骨強度における骨密度の寄与率は70%であり、残りの30%は骨質によって決まると考えられている<sup>28</sup>。骨質は骨の微細構造や、代謝回転、微細骨折の集積などの骨環境によって変化すると考えられている。また、骨質を決定する因子として、骨基質の性状も重要であると考えられており、その中でコラーゲンは特に重要視されている<sup>27</sup>。コラーゲンは骨重量の20%を、また体積の50%を占めている。コラーゲンは30から40歳代をピークに加齢性に減少することが報告されており、また生活習慣病などで分子間の架橋構造が劣化すると考えられている<sup>66</sup>。コラーゲンの架橋構造に関しては、生理的な架橋と非生理的な架橋の2種類が関与する。生理的な架橋構造に関しては、lysyl oxidase (LOX) や lysyl hydroxylase (LH) がコラーゲンの翻訳後修飾において、コラーゲンの成熟架橋を増加させると考えられている (Fig. 3-1)<sup>67,68</sup>。また、非生理的な架橋に関しては終末糖化産物 (advanced glycation end products、AGEs) の増加によって非生理的な架橋構造が増加すると考えられている<sup>66</sup>。実際、2型糖尿病患者においては、骨密度が正常であるにもかかわらず骨折リスクが増大するが<sup>69</sup>、血中AGEが増加することからコラーゲンの非生理的架

橋の増加が示唆されている<sup>70</sup>。また、NZはコラゲナーゼによるコラーゲン分解を抑制することが示唆されており、TZに関しても同様の効果を持つ可能性が示されている<sup>26,32</sup>。

そこで、本研究では、骨の有機基質であるコラーゲン形成やコラーゲン架橋構造に対するTZの影響を検討した。

細胞外マトリックスコラーゲン形成能に関しては、TZを作用させたMC3T3-E1細胞における細胞外マトリックスコラーゲン量の定量化とcol1A1の遺伝子発現の定量化を行った。また、コラーゲンの架橋構造に関する検討に関しては、TZを作用させたMC3T3-E1細胞において、LOX、LH2およびLH3の遺伝子発現の定量化による検討を行った。

## 材料と方法

### 実験 3 骨芽細胞由来細胞外マトリックスコラーゲンに対する TZ の効果に関する検討

#### 1. Truncated-Norzoanthamine

実験 1-1、1 と同じものを使用した。

#### 2. 骨芽細胞株

実験 2、2 と同様の手順で行った。

#### 3. 群の設定

実験 2、3 と同じ群を設定した

#### 4. 細胞外マトリックスコラーゲン定量化試験

実験には Sircol™ Soluble Collagen Assay (biocolor life science assay, antrium, UK) を使用した。

まず、MC3T3-E1 細胞を  $5 \times 10^3$  cells/well で 96 ウェルに播種し、14 日間培養した。培養終了

後、各ウェルから培養液を除去し、PBS (－) で wash を 3 回行った。PBS (－) を除去後、各

ウェルにペプシン 0.1 mg/ml 含有の 0.5 N 酢酸を 400  $\mu$ l/well 加えて 4℃にて 24 時間 over night す

ることで細胞外マトリックスコラーゲンを抽出した。各ウェルの酢酸を 1.5 ml チューブへ回収

し、Acid Neutralising Reagent を 100  $\mu$ l ずつ加えて転倒混和した。次に Isolation & Concentration Reagent を 200  $\mu$ l ずつ加えて再び転倒混和した後、各 1.5 ml チューブを氷上で 24 時間 over night した。各チューブを 12000 g、室温、10 分間の条件で遠心分離を行い、遠心終了後に上清を除去した。上清除去後、各チューブへ Sircol dye Reagent を 1 ml ずつ加え、10 分毎に転倒混和を行いつつ室温で 30 分間静置した。次に 12000 g、室温、10 分間の条件で遠心分離を行った。遠心後、各チューブの上清を除去し、氷冷した Acid-Salt Wash Reagent を 750  $\mu$ l ずつ加え、12000 g、室温、10 分間の条件で遠心分離した。上清を完全に除去し、Alkali Reagent を 250  $\mu$ l ずつ各チューブへ加えて色素が抽出されたことを確認した。最後に各チューブから 200  $\mu$ l ずつ 96 ウェルプレート移し、マイクロプレートリーダーで 490 nm の波長を測定した。検量線はラットコラーゲンのスタンダードを用いて作製した。

## 5. RNA 抽出

実験 2、8 と同様の手順で行った。

## 6. cDNA 作製

実験 2、9 と同様の手順で行った。

## 7. プライマー作製

Table 5 に示した col1A1、Lysyl oxidase (LOX)、Lysyl hydroxylase 2 (LH2) および Lysyl hydroxylase 3 (LH3) の primer は過去の報告を基にして設計した<sup>67,71</sup>。各種プライマーは設計後にグラジエント PCR を行い PCR 産物ができたことを確認した後に、後述のリアルタイム PCR に用いた。

## 8 リアルタイム PCR

実験 2、11 と同様の手順で行った。

## 8. 統計解析

各群間の比較はソフトウェア JMP12 (SAS Institute Japan, 東京) を用い、Dunnett 検定で解析を行った。すべての統計解析において有意水準  $p < 0.05$  とした。結果は平均値±標準誤差で表示した。

## 結果

### 実験3 骨芽細胞由来細胞外マトリックスコラーゲンに対する TZ の効果に関する検討

#### 細胞外マトリックスコラーゲン定量試験

TZ が骨芽細胞の形成する細胞外マトリックスコラーゲンに与える影響を検討するために、TZ 処理した MC3T3-E1 細胞を 2 週間培養した後、コラーゲンの定量を行った。その結果、未分化 MC3T3-E1 細胞において TZ 0.1、TZ 1 および TZ 10 群がコントロール群と比較して有意に細胞外マトリックスコラーゲン量が増加していた。さらに、分化誘導 MC3T3-E1 細胞では全ての TZ 群で細胞外マトリックスコラーゲン量が増加しており、その中でも TZ 0.01、TZ 0.1 および TZ 1 群はコントロールと比べて有意に増加していた (Fig. 3-2)。

#### 定量的リアルタイム PCR

TZ が骨芽細胞由来のコラーゲン発現に影響を与えるかどうかを検討するため、col1A1 の遺伝子発現量を検討した。その結果、未分化および分化誘導 MC3T3-E1 細胞のどちらにおいても TZ 処理群はコントロールと比較して有意な差は認められなかった (Fig. 3-3)。

続いて、TZ が骨芽細胞由来コラーゲンの架橋構造に与える影響を検討するため、TZ 処理した MC3T3-E1 細胞の LOX、LH2、LH3 の遺伝子発現量を検討した。尚、この実験では細胞外マ



トリックスコラーゲン量が顕著に増加していた分化誘導 MC3T3-E1 細胞でのみ実験を行った。

LOX は、2 日目までは全ての群でコントロール群と比較して差は認められなかった。3 日目では TZ 0.01 群がコントロール群と比較して有意な増加を示した。7 日目においては TZ 0.01 および TZ 0.1 群がコントロールと比較して有意な増加を示した。さらに、14 日目においても TZ 0.01 群は有意な増加を示した (Fig. 3-4)。

LH2 は 1 日目では TZ 0.01 群でコントロールと比較して有意な増加が認められた。2 日目は全ての TZ 群でコントロールと差は認められなかったが、3 日目では TZ 0.1 群が有意に増加していた。7 日目では、TZ 0.01、TZ 0.1 および TZ 10 群がコントロールと比較して有意な増加を示した (Fig. 3-5)。

LH3 は二日目までは、全ての TZ 処理群でコントロールと有意な差は認められなかった。3 日目では全ての TZ 群がコントロールと比較して有意な増加を示した。また 7 日目においても TZ 1 および TZ 10 群がコントロールと比較して有意な増加を示した (Fig. 3-6)。

## 考察

コラーゲンは骨の有機成分の中で最も多くの割合を占めており、その中でも骨芽細胞由来のものが I 型コラーゲンである。骨内のコラーゲンはプロコラーゲンとして骨芽細胞で生成された後に、酵素による修飾を受けて I 型コラーゲンとなる。骨形成においては、骨密度だけではなく、このコラーゲンが関与する骨質も強度の維持において重要な役割を果たしている。

第 2 章で、骨芽細胞の無機基質形成を促進することが TZ の主な作用機序である可能性は低いことが考えられたため、TZ が骨の有機基質であるコラーゲンに対する影響を検討した。

まず初めに、TZ を作用させた MC3T3-E1 細胞の細胞外マトリックスコラーゲン量を測定した。その結果、未分化 MC3T3-E1 細胞では TZ 群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 (Fig. 3-2 A) TZ は NZ と同様にコラーゲンの分解を抑制することが過去にも報告されており、今回の結果からも TZ によるコラーゲン分解抑制作用が再確認された<sup>32</sup>。分化誘導 MC3T3-E1 細胞では、分化誘導の影響で全体としてコラーゲン量が未分化のそれと比べて大きく増加していた。その中でも、TZ 群はコントロール群と比較して有意なコラーゲン量の増加が認められた。また、分化誘導 MC3T3-E1 細胞の TZ 群におけるコラーゲン量増加の割合が、未分化 MC3T3-E1 細胞の TZ 群でのコラーゲン量増加の割合よりも高くなっていた。

そのため、分化誘導 MC3T3-E1 細胞において、TZ はコラーゲン分解抑制作用以外にも作用を持つと考えられた。その要因としては、TZ によってコラーゲンの発現量の増加、あるいは TZ

が架橋構造を増強に関与しているのではないかと考えた。そこで、リアルタイム PCR で

coll1A1 の遺伝子発現量の検討を行った。

coll1A1 の遺伝子発現量の定量化を行ったところ、未分化 MC3T3-E1 細胞においてはすべての日数で TZ 群はコントロール群と比べて有意な差は認められなかった (Fig. 3-3 A)。続いて、分化誘導 MC3T3-E1 細胞で coll1A1 を調べたところ、こちらにおいても全ての日数で TZ 群はコントロール群と有意な差は認められなかった (Fig. 3-3 B)。この結果から、TZ は分化誘導前、分化誘導後のどちらにおいてもコラーゲンの発現量には影響しないことが示され、やはりコラーゲンの分解抑制作用による保護作用が主体であると考えられた。次いで、TZ は分化誘導後 MC3T3-E1 細胞において生理的コラーゲン架橋を促進する可能性を考慮し、LOX、LH2 および LH3 の遺伝子発現量を検討した。なお、未分化 MC3T3-E1 細胞に関しては、架橋構造に関する影響が小さいと考えられたため、分化誘導 MC3T3-E1 細胞に限定して実験を行った。

まず、LOX の遺伝子発現を定量化したところ、3 日目から 14 日目まで TZ 群において LOX の遺伝子発現量が有意に増加していることが確認された (Fig. 3-4)。LOX は直接的にコラーゲン架橋量を決定し、また Fig. 3-1 に示すように、コラーゲンの N 末端と C 末端に対して部位特異的に糖鎖修飾を行う<sup>72</sup>。LOX を阻害することで、コラーゲンの架橋構造は抑制され、骨形成に異常が生じることが報告されている<sup>73</sup>。このことから、TZ により LOX の発現量が増加することでコラーゲン量が増加することが示唆された。次に LH2 の発現量に関して定量化したところ、1 日目の培養初期から TZ 群での有意な増加がみられ、3 日目と 7 日目においても有意な増

加が認められた (Fig. 3-5)。LH2 も LOX 同様に TZ による発現量の増加がみられたが、LOX よりもより早期から遺伝子発現量の増加が認められた。LOX はコラーゲンの N 末端および C 末端においても、LH2 により修飾された Hyl を修飾する (Fig. 3-1)。このことから TZ による LH2 の早期からの遺伝子発現量の増加は、間接的に LOX 発現量の増加に関与したことが考えられた。さらに、LH3 においても 3 日目と 7 日目において有意な発現量の増加が認められた。LH3 は LOX や LH2 とは異なり、コラーゲンの helix 部位でコラーゲン修飾に関与している<sup>72</sup>。LH3 の発現量を抑制した MC3T3-E1 細胞においては架橋の成熟が抑制されるとともに、LOX の作用が制御されることが示唆されている<sup>72,74</sup>。このことから、本研究において TZ による LH3 の遺伝子発現量の増加は、コラーゲン架橋量の増加および LOX の作用を促進させることが示唆された。

以上のことから、本研究において、TZ は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。これは、未分化骨芽細胞においては TZ によるコラーゲン分解抑制作用によることが示唆された。また、分化誘導後の骨芽細胞においては、TZ のコラーゲン分解抑制作用だけではなく、コラーゲンの生理的架橋に関わる酵素の発現量を増加による影響が示唆された。TZ は従来の骨粗鬆症治療と全く異なる作用機序を持つ新規治療薬と成り得る可能性が示唆された。しかしながら、実際のコラーゲン架橋の部位特異的な修飾、またコラーゲンの未熟/成熟架橋の割合など詳細については、今回の研究では検討できていない。TZ が、骨コラーゲンを特異的に改善するメカニズムを明らかにするためには、これらの点に関するさらなる検

討が必要不可欠であると考えられた。

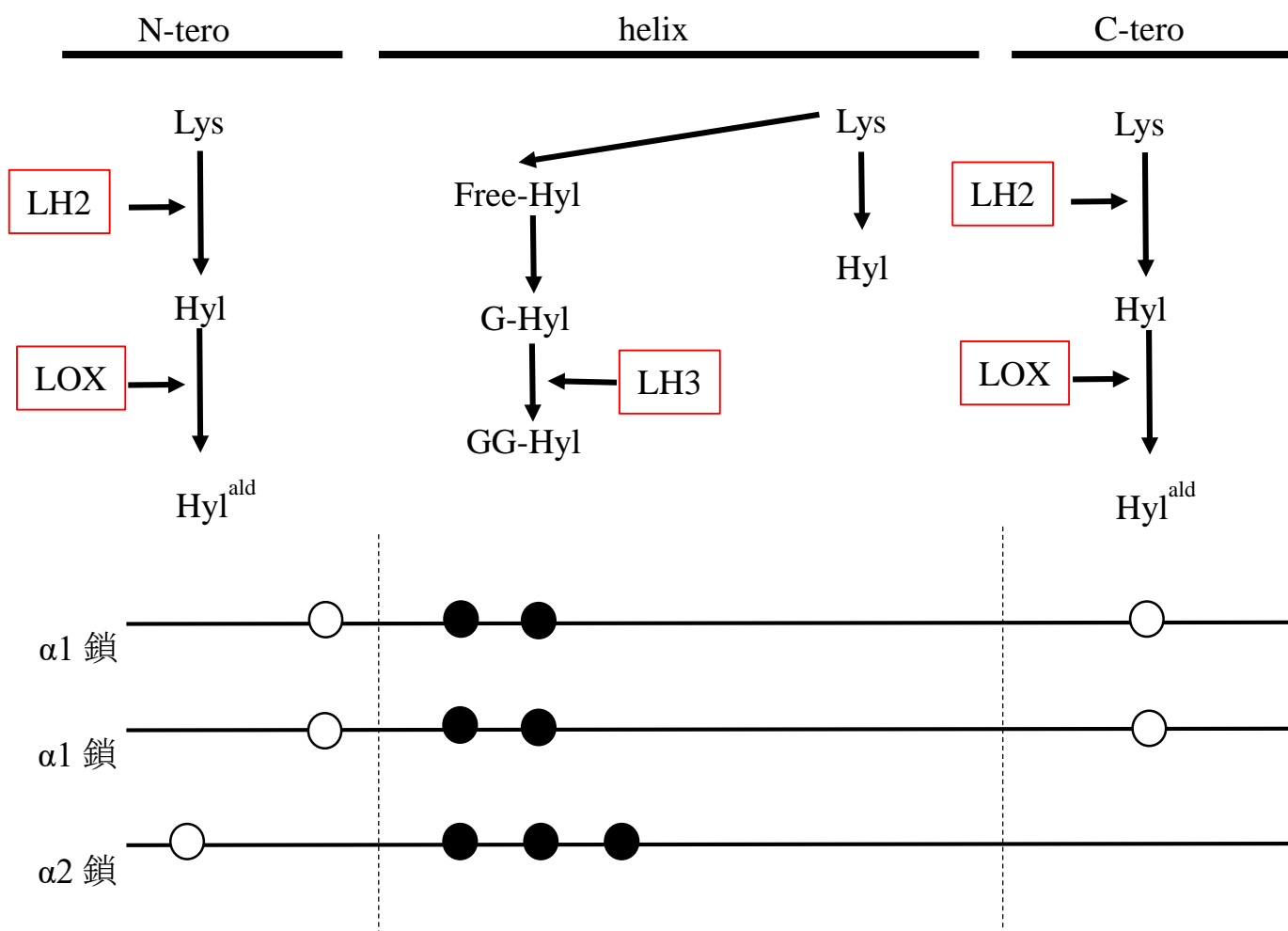


Fig. 3-1 MC3T3-E1 細胞の骨基質におけるコラーゲン架橋形成に関する翻訳後修飾

LOX、LH2 および LH3 の部位特異的な修飾を模式図で示した。LOX および LH2 は図で示した N 末端と C 末端の○部分（N 末端の  $\alpha 1$ -9 と  $\alpha 2$ -5、C 末端の  $\alpha 1$ -16）の  $\text{Hyl}^{\text{ald}}$  に、LH3 は helix 構造の●部分（helix 構造の  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ -87 と  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ -174 と  $\alpha 2$ -219）の GG-Hyl である。

（文献より改変<sup>72</sup>）

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')	Product size (bp)
collA1	CCCCAACCCTGGAAACAGAC	GGTCACGTTTCAGTTGGTCAAAGG	155
LOX	TTCAGCCACTATGACCTGCTG	AGTCTGATTCAGGCACCAGG	271
LH2	GAGGGAAGCTTTTAACATCAC	GGGGTTGGTTGTTCAATAA	315
LH3	TGTCCCCAATGGCTGGACTC	CCAGGCTAAAGTAGAACTCACA	371

Table 6 リアルタイム PCR に用いたプライマー

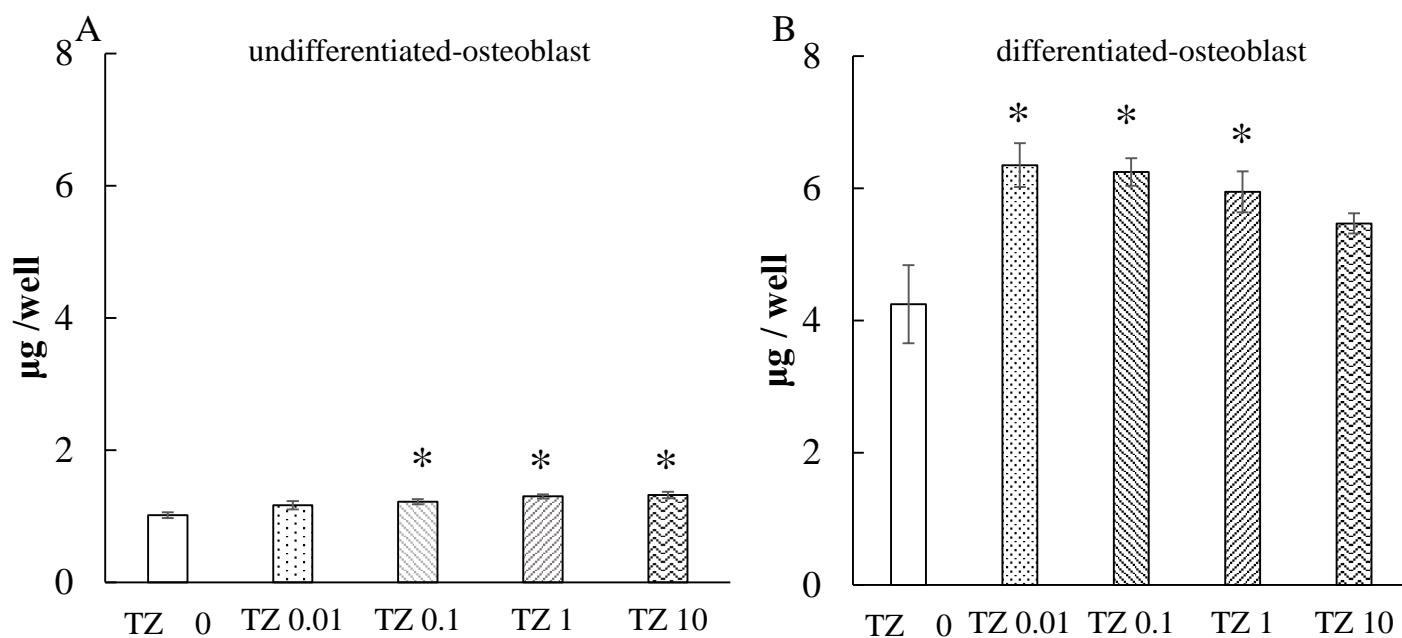


Fig. 3-2 Extracellular collagen in undifferentiated and differentiated MC3T3-E1 cells. Osteoblastic differentiation was induced by culturing in medium containing 50 µg/ml ascorbic acid and 10 nM β-glycerol phosphate. MC3T3-E1 cells were treated with TZ (0, 0.01, 0.1, 1, 10 µM) for 14 days. Data are expressed as mean ± S.E.M..(n = 10). \* P < 0.05 compared with TZ 0.



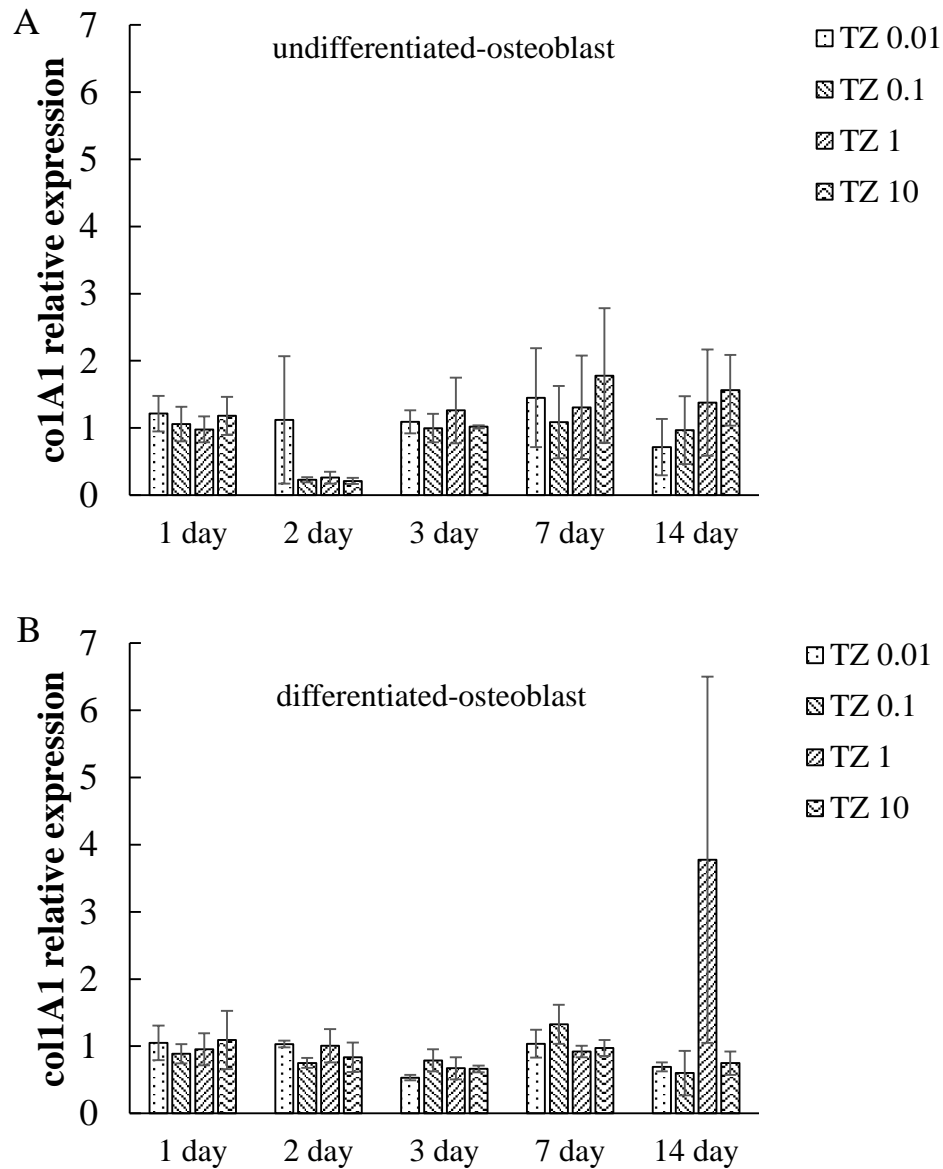


Fig. 3-3 Effect of TZ on col1A1 expression in undifferentiated and differentiated MC3T3-E1 cells. Osteoblastic differentiation was induced by culturing in medium containing 50  $\mu\text{g/ml}$  ascorbic acid and 10 nM  $\beta$ -glycerol phosphate. MC3T3-E1 cells were treated with TZ (0, 0.01, 0.1, 1, 10  $\mu\text{M}$ ) for 14 days. Values were normalized to expression of GAPDH and expressed relative to data from TZ 0 Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M..(n = 3). \* P < 0.05 compared with TZ 0.

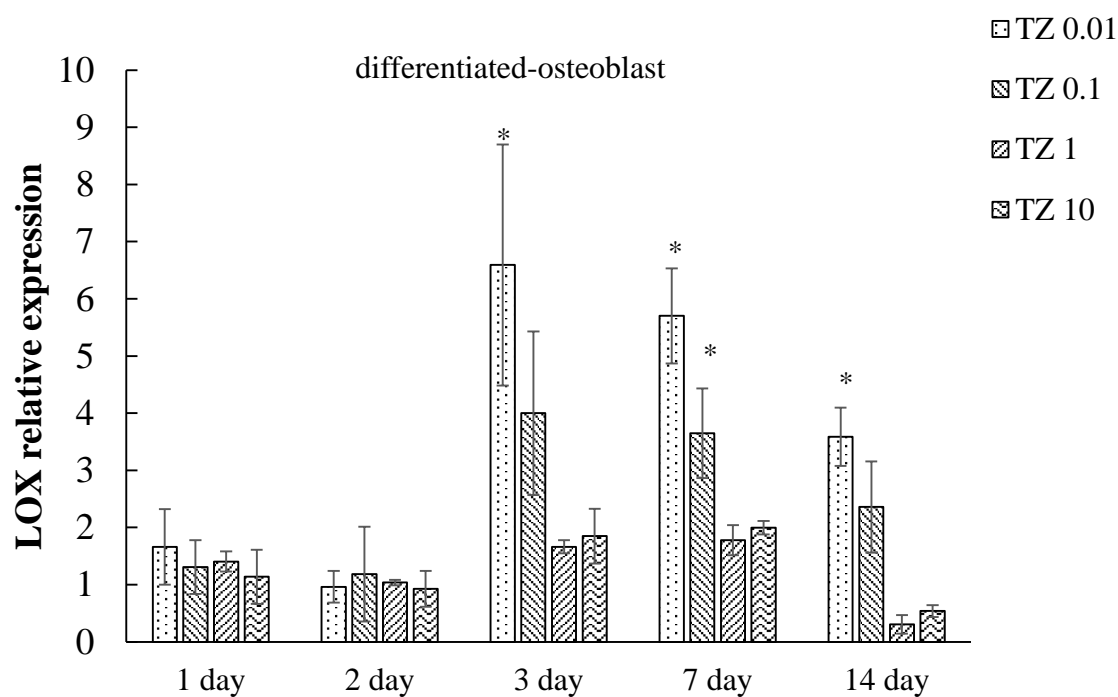


Fig. 3-4 Effect of TZ on LOX expression in differentiated MC3T3-E1 cells. Osteoblastic differentiation was induced by culturing in medium containing 50  $\mu\text{g/ml}$  ascorbic acid and 10 nM  $\beta$ -glycerol phosphate. MC3T3-E1 cells were treated with TZ (0, 0.01, 0.1, 1, 10  $\mu\text{M}$ ) for 14 days. Values were normalized to expression of GAPDH and expressed relative to data from TZ 0. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3). \*  $P < 0.05$  compared with TZ 0.

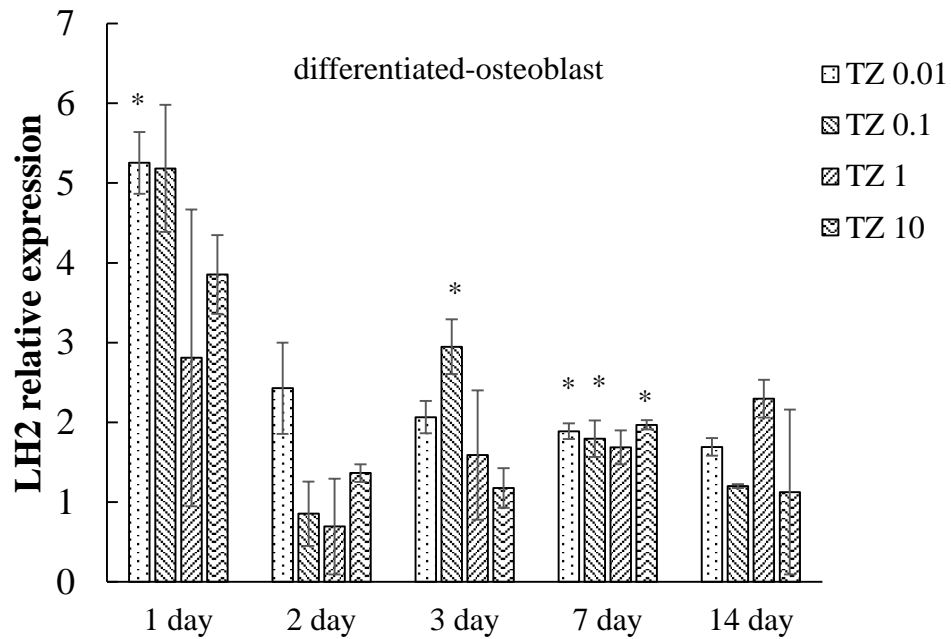


Fig. 3-5 Effect of TZ on LH2 expression in differentiated MC3T3-E1 cells. Osteoblastic differentiation was induced by culturing in medium containing 50  $\mu\text{g/ml}$  ascorbic acid and 10 nM  $\beta$ -glycerol phosphate. MC3T3-E1 cells were treated with TZ (0, 0.01, 0.1, 1, 10  $\mu\text{M}$ ) for 14 days. Values were normalized to expression of GAPDH and expressed relative to data from TZ 0. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3). \*  $P < 0.05$  compared with TZ 0.

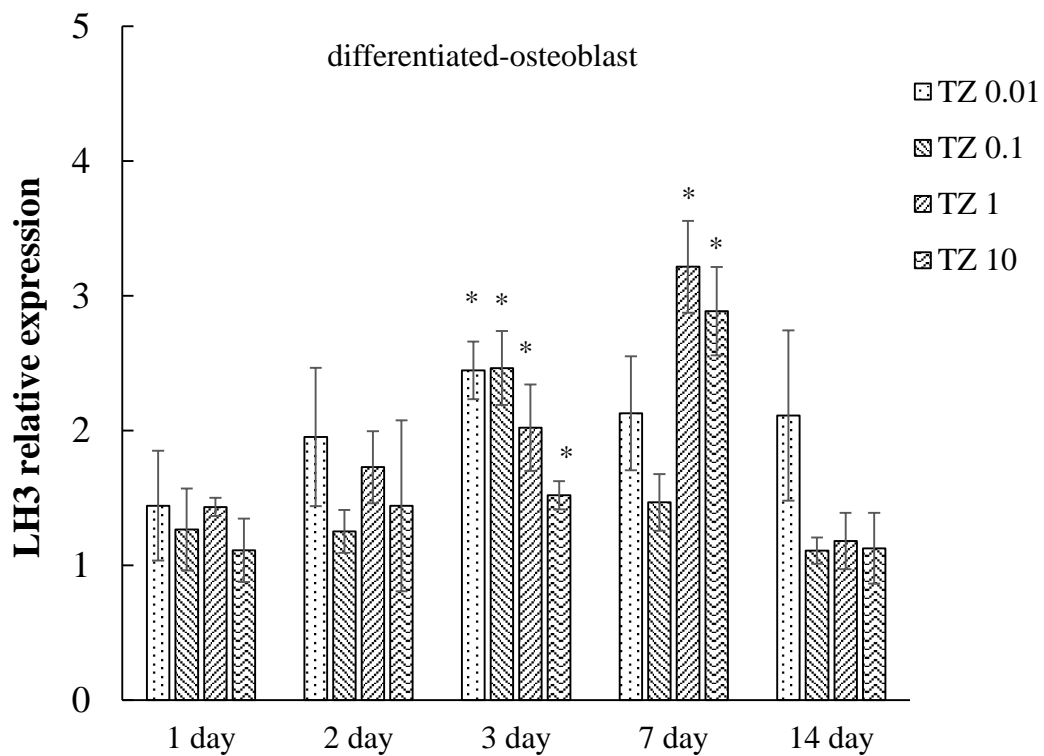


Fig. 3-6 Effect of TZ on LH3 expression in differentiated MC3T3-E1 cells. Osteoblastic differentiation was induced by culturing in medium containing 50  $\mu\text{g/ml}$  ascorbic acid and 10 nM  $\beta$ -glycerol phosphate. MC3T3-E1 cells were treated with TZ (0, 0.01, 0.1, 1, 10  $\mu\text{M}$ ) for 14 days. Values were normalized to expression of GAPDH and expressed relative to data from TZ 0. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3). \* P < 0.05 compared with TZ 0.

総括

## 総括

本研究は、3つの実験を行うことでTZの骨粗鬆症に対する有用性を示した。まず、第1章では骨粗鬆症モデルマウスに対する、TZの影響を検討したところ、TZが量減少抑制作用を示し、特に海綿骨に対する作用が強いことが明らかとなった。また、TZが骨強度を改善することも示され、NZと同様にTZは骨粗鬆症において骨強度の改善が期待できる物質であることが示された。第2章においては、TZの骨の無機基質形成に対する影響を骨芽細胞株および破骨細胞株において検討した。第1章の検討から、骨芽細胞の無機基質形成を促進することが期待されたが、未分化細胞においては石灰化促進が認められるものの、分化誘導後の細胞では、その効果がみられなかった。しかしながら、TZは破骨細胞の骨吸収や分化誘導に関与する骨芽細胞由来の因子であるOPNやRANKLを抑制することが明らかとなり、TZは破骨細胞を抑制する可能性が示唆された。今回の結果と同じく、*in vivo*と*in vitro*の実験結果において、大きな矛盾を抱える骨粗鬆症薬としては、ビタミンDがある。ビタミンDは、生体において、腸管や腎臓からのカルシウム吸収を促進することや、破骨細胞の骨吸収を抑制することが古くから知られていた。しかしながら、*in vitro*においては、破骨細胞数を増加し、骨吸収を促進するという生体内と全く逆の結果が報告されていた<sup>75</sup>。この矛盾点に関してはバイオイメージングを用いることで、ビタミンDが破骨細胞の細胞遊走因子であるS1Pの受容体であるS1PR2の発現を抑制することで、破骨細胞の骨吸収を防ぐことが近年明らかとなった<sup>76</sup>。今回のTZにおける*in*

*vivo* と *in vitro* の結果の矛盾は、その環境に違いによるものもあるが、一般的に予想されるものとは異なる新たなメカニズムを持つ可能性も考えられる。

第3章において、骨の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。その結果、TZ によって骨芽細胞由来の細胞外マトリックスコラーゲンが増大することが示された。また、未分化骨芽細胞では TZ によってコラーゲン分解が抑制されることが原因であると明らかになった。さらに、分化誘導後の骨芽細胞においては、TZ によるコラーゲン分解抑制作用に加えて、コラーゲンの生理的架橋に関与する LOX、LH2 および LH3 の遺伝子発現量が増加することを明らかとした。このことから、TZ は骨基質内のコラーゲンを保護し、より成熟した安定状態の維持に貢献している可能性が示された。

以上の結果から、TZ の骨量減少作用を示し、その作用メカニズムとしては、主にコラーゲンに対する保護作用、架橋構造の増強作用が示唆された。実際の骨粗鬆症患者は、コラーゲン代謝のピークを過ぎた高齢者に多く、また、糖尿病などの生活習慣病を有する患者などではコラーゲンの非生理的架橋の増加が生じている<sup>69</sup>。そのため、このような患者に対する TZ の使用は、骨質の改善や維持に働き有効であると考えられた。しかし、今回用いた骨粗鬆症モデルマウスは成長期の個体を使用しており、エストロジェンの欠乏による破骨細胞の骨吸収亢進以外の骨代謝は活発なものであり、コラーゲン代謝も正常であると考えられる。そこで、今後は高齢性や2型糖尿病モデル動物の骨に対する TZ の効果を調べることで、より詳細な TZ の効果が得られ、臨床応用に向けての検討ができると考えられた。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、適切な指導と励ましを下された東京大学大学院農学生命科学研究科  
附属動物医療センター高度医療科学研究室 望月学教授に心より御礼申し上げます。

染色組織の顕微鏡写真の解析にあたりまして助言いただきました、東京大学大学院農学生命  
科学研究科獣医病理学研究室 内田和幸准教授に厚く御礼申し上げます。

また、多大な支援と協力をくださいました株式会社ファンケル 山口宏二 先生、日本電子株  
式会社 福沢世傑先生、東京大学大学院農学生命科学研究科附属動物医療センター 本阿彌宗  
紀特任助教および藤田直己特任助教に深く感謝いたします。

研究を遂行するにあたり、たびたび激励をしてくださいました東京大学大学院農学生命科学  
研究科獣医外科学研究室 西村亮平教授、中川貴之准教授に感謝いたします。

東京大学大学院農学生命科学研究科附属動物医療センター獣医外科学研究室 佐伯亘平先生  
には遺伝子解析の際にご指導くださり、励まし続けていただいたことに深謝いたします。

研究生活を送るにあたり、私を支えてくれました、東京大学大学院農学生命科学研究科高度  
医療科学研究室のみなさま、この場を借りて感謝の意を表します。

最後に、私の父と母をはじめとする親族の皆様我心から御礼申し上げます。



## 参考文献

1. A Report of a WHO Study Group. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: Synopsis of a WHO report. *World Heal Organ Tech Rep Ser.* 1994;843:1-129. doi:10.1007/BF01622200.
2. Seeman E. Reduced bone formation and increased bone resorption: rational targets for the treatment of osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2003;14 Suppl 3:S2-S8. doi:10.1007/s00198-002-1340-9.
3. Yoshimura N, Muraki S, Oka H, et al. Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *J Bone Miner Metab.* 2009;27(5):620-8. doi:10.1007/s00774-009-0080-8.
4. Orimo H, Yaegashi Y, Onoda T, Fukushima Y, Hosoi T, Sakata K. Hip fracture incidence in Japan: Estimates of new patients in 2007 and 20-year trends. *Arch Osteoporos.* 2009;4(1-2):71-77. doi:10.1007/s11657-009-0031-y.
5. Sakamoto K, Nakamura T, Hagino H, et al. Report on the Japanese Orthopaedic Association's 3-year project observing hip fractures at fixed-point hospitals. *J Orthop Sci.* 2006;11(2):127-34. doi:10.1007/s00776-005-0998-1.

6. Haentjens P, Magaziner J, Colón-Emeric CS, et al. Meta-analysis: excess mortality after hip fracture among older women and men. *Ann Intern Med.* 2010;152(6):380-390. doi:10.1059/0003-4819-152-6-201003160-00008.Meta-analysis.
7. Holroyd C, Cooper C, Dennison E. Epidemiology of osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008;22(5):671-685. doi:10.1016/j.beem.2008.06.001.
8. Nieves JW, Komar L, Cosman F, Lindsay R. Calcium potentiates the effect of estrogen and calcitonin on bone mass: review and analysis. *Am J Clin Nutr.* 1998;67(1):18-24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9440370>.
9. Orimo H, Nakamura T, Hosoi T, et al. Japanese 2011 guidelines for prevention and treatment of osteoporosis-executive summary. *Arch Osteoporos.* 2012;7(1-2):3-20. doi:10.1007/s11657-012-0109-9.
10. Rodan GA. Therapeutic Approaches to Bone Diseases. *Science (80- ).* 2000;289(5484):1508-1514. doi:10.1126/science.289.5484.1508.
11. Das S, Crockett JC. Osteoporosis - a current view of pharmacological prevention and treatment. *Drug Des Devel Ther.* 2013;7:435-48. doi:10.2147/DDDT.S31504.
12. Hanley D a, Adachi JD, Bell a, Brown V. Denosumab: mechanism of action and clinical outcomes. *Int J Clin Pract.* 2012;66(12):1139-46. doi:10.1111/ijcp.12022.

13. Peng Y-L, Hu H-Y, Luo J-C, Hou M-C, Lin H-C, Lee F-Y. Alendronate, a bisphosphonate, increased upper and lower gastrointestinal bleeding: risk factor analysis from a nationwide population-based study. *Osteoporos Int*. 2014;25(5):1617-23. doi:10.1007/s00198-014-2647-z.
14. Woo S-B, Hellstein JW, Kalmar JR. Narrative [corrected] review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med*. 2006;144(10):753-761. Available at: [papers3://publication/uuid/AB066CEB-DFE6-4A7E-94F8-ADF7004D8DB6](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16481111/).
15. Khan A a, Morrison A, Hanley D a, et al. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. *J Bone Miner Res*. 2015;30(1):3-23. doi:10.1002/jbmr.2405.
16. Trial RC. Risks and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women. *JAMA*. 2002;288(3):321-333.
17. Goldstein SR, Nanavati N. Adverse events that are associated with the selective estrogen receptor modulator levormeloxifene in an aborted phase III osteoporosis treatment study. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;187(3):521-527. doi:10.1067/mob.2002.123938.
18. Dempster DW, Cosman F, Kurland ES, et al. Effects of daily treatment with parathyroid hormone on bone microarchitecture and turnover in patients with osteoporosis: a paired biopsy study. *J Bone Miner Res*. 2001;16(10):1846-53. doi:10.1359/jbmr.2001.16.10.1846.

19. Hodsman A, Kisiel M, Adachi J. evidence for increased bone turnover without change in cortical thickness or porosity after 2 years of cyclical hPTH (1-34) therapy in women with severe osteoporosis. *Bone*. 2000;27(2):311-8. doi:10.1016/S8756-3282(00)00316-1.
20. Kraenzlin ME, Meier C. Parathyroid hormone analogues in the treatment of osteoporosis. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(11):647-56. doi:10.1038/nrendo.2011.108.
21. Hodsman AB, Bauer DC, Dempster DW, et al. Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use. *Endocr Rev*. 2005;26(5):688-703. doi:10.1210/er.2004-0006.
22. Weinstein RS. Glucocorticoid-Induced Bone Disease. *N Engl J Med*. 2011;365:62-70.
23. Fukuzawa S, Hayashi Y, Uemura D, Nagatsu A, Yamada, K, Ijuin Y. THE ISOLATION AND STRUCTURES OF FIVE NEW ALKALOIDS, NORZOANTHAMINE, OXYZOANTH AMINE, NORZOANTHAMINONE, CYCLOZOANTHAMINE AND EPINORZOANTHAMINE. *Heterocycl Commun*. 1995;1(2-3). doi:10.1515/HC.1995.1.2-3.207.
24. Yamaguchi K, Mika Y, Tomoko T, Makoto K, Daisuke U. Suppressive effect of norzoanthamine hydrochloride on experimental osteoporosis in ovariectomized mice. *Biol Phamaceutical Bull*. 1999;22(9):920-924. doi:10.1248/bpb.22.920.

25. Kuramoto M, Hayashi K, Yamaguchi K, Yada M, Tsuji T, Uemura D. Structure-activity relationship of norzoanthamine exhibiting significant inhibition of osteoporosis. 1998;71:771-779. doi:10.1246/bcsj.71.771.
26. Kinugawa M, Fukuzawa S, Tachibana K. Skeletal protein protection: the mode of action of an anti-osteoporotic marine alkaloid, norzoanthamine. *J Bone Miner Metab.* 2009;27(3):303-14. doi:10.1007/s00774-009-0049-7.
27. Saito M, Marumo K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporos Int.* 2010;21(2):195-214. doi:10.1007/s00198-009-1066-z.
28. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *NIH Consens Statement.* 17(1):1-45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11525451>. Accessed October 2, 2015.
29. Miyashita M, Sasaki M, Hattori I, Sakai M, Tanino K. Total synthesis of norzoanthamine. *Science.* 2004;305(5683):495-9. doi:10.1126/science.1098851.
30. Yamashita D, Murata Y, Hikage N, Takao K-I, Nakazaki A, Kobayashi S. Total synthesis of (-)-norzoanthamine. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009;48(8):1404-6. doi:10.1002/anie.200804546.
31. Murata Y, Yamashita D, Kitahara K, Minasako Y, Nakazaki A, Kobayashi S. Synthetic study of (-)-norzoanthamine: construction of the ABC ring moiety. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009;48(8):1400-3. doi:10.1002/anie.200804544.

32. Inoue H, Tokita K, Fukuzawa S, Tachibana K. Structure-activity relationships of the truncated norzoanthamines exhibiting collagen protection toward anti-osteoporotic activity. *Bioorg Med Chem*. 2014;22(13):3455-64. doi:10.1016/j.bmc.2014.04.040.
33. Yamaguchi K, Hayama T, Makita T, Tsuji T. Time course of bone biomechanical parameters in ovariectomized mice. *J Bone Miner Metab*. 1997;15(3):138-144. doi:10.1007/BF02489946.
34. Miller SC, Bowman BM, Miller MA, Bagi CM. Calcium absorption and osseous organ-, tissue-, and envelope-specific changes following ovariectomy in rats. *Bone*. 1991;12(6):439-46.  
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1797059>. Accessed December 2, 2015.
35. Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone*. 1995;17(4 Suppl):125S-133S. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8579908>. Accessed December 2, 2015.
36. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner*. 1991;15(3):175-91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1773131>. Accessed October 27, 2015.
37. Weiss A, Arbell I, Steinhagen-Thiessen E, Silbermann M. Structural changes in aging bone: osteopenia in the proximal femurs of female mice. *Bone*. 1991;12(3):165-72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1910958>. Accessed December 2, 2015.

38. Shen V, Birchman R, Liang XG, Wu DD, Lindsay R, Dempster DW. Prednisolone alone, or in combination with estrogen or dietary calcium deficiency or immobilization, inhibits bone formation but does not induce bone loss in mature rats. *Bone*. 1997;21(4):345-51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9315338>. Accessed December 2, 2015.
39. Miller SC, Bowman BM, Jee WS. Available animal models of osteopenia--small and large. *Bone*. 1995;17(4 Suppl):117S-123S.
40. Martin RB, Butcher RL, Sherwood LL, et al. Effects of ovariectomy in beagle dogs. *Bone*. 1987;8(1):23-31. doi:10.1016/8756-3282(87)90128-1.
41. Jerome CP, Carlson CS, Register TC, et al. Bone functional changes in intact, ovariectomized, and ovariectomized, hormone-supplemented adult cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) evaluated by serum markers and dynamic histomorphometry. *J Bone Miner Res*. 1994;9(4):527-40. doi:10.1002/jbmr.5650090413.
42. Balena R, Toolan BC, Shea M, et al. The effects of 2-year treatment with the aminobisphosphonate alendronate on bone metabolism, bone histomorphometry, and bone strength in ovariectomized nonhuman primates. *J Clin Invest*. 1993;92(6):2577-86. doi:10.1172/JCI116872.

43. Gasser JA, Ingold P, Venturiere A, Shen V, Green JR. Long-Term Protective Effects of Zoledronic Acid on Cancellous and Cortical Bone in the Ovariectomized Rat. *J Bone Miner Res.* 2007;23(4):544-551. doi:10.1359/jbmr.071207.
44. von Stechow D, Zurakowski D, Pettit AR, et al. Differential transcriptional effects of PTH and estrogen during anabolic bone formation. *J Cell Biochem.* 2004;93(3):476-90. doi:10.1002/jcb.20174.
45. Jerome CP, Burr DB, Van Bibber T, Hock JM, Brommage R. Treatment with human parathyroid hormone (1-34) for 18 months increases cancellous bone volume and improves trabecular architecture in ovariectomized cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Bone.* 2001;28(2):150-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11182372>. Accessed December 3, 2015.
46. Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- $\beta$ . *Nat Med.* 1996;2(10):1132-1136. doi:10.1038/nm1096-1132.
47. Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, et al. Estrogen Prevents Bone Loss via Estrogen Receptor  $\alpha$  and Induction of Fas Ligand in Osteoclasts. *Cell.* 2007;130(5):811-823. doi:10.1016/j.cell.2007.07.025.



48. Zebaze RMD, Ghasem-Zadeh A, Bohte A, et al. Intracortical remodelling and porosity in the distal radius and post-mortem femurs of women: a cross-sectional study. *Lancet (London, England)*. 2010;375(9727):1729-36. doi:10.1016/S0140-6736(10)60320-0.
49. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology*. 1999;140(9):4367-70. doi:10.1210/endo.140.9.7131.
50. Tobias JH, Compston JE. Does estrogen stimulate osteoblast function in postmenopausal women? *Bone*. 1999;24(2):121-4. doi:10.1016/S8756-3282(98)00156-2.
51. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(9):1032-45. doi:10.4065/83.9.1032.
52. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt M, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest*. 1999;104(4):439-446. doi:10.1172/JCI6610.
53. Cao J, Venton L, Sakata T, Halloran BP. Expression of RANKL and OPG correlates with age-related bone loss in male C57BL/6 mice. *J Bone Miner Res*. 2003;18(2):270-7. doi:10.1359/jbmr.2003.18.2.270.

54. Kim J, Lee H, Kang KS, Chun K-H, Hwang GS. Protective effect of Korean Red Ginseng against glucocorticoid-induced osteoporosis in vitro and in vivo. *J Ginseng Res.* 2015;39(1):46-53. doi:10.1016/j.jgr.2014.06.001.
55. Jang H, Kim E-J, Park J-K, et al. SMILE inhibits BMP-2-induced expression of osteocalcin by suppressing the activity of the RUNX2 transcription factor in MC3T3E1 cells. *Bone.* 2014;61:10-18. doi:10.1016/j.bone.2013.12.028.
56. Genji T, Fukuzawa S, Tachibana K. Distribution and possible function of the marine alkaloid, norzoanthamine, in the zoanthid *Zoanthus* sp. using MALDI imaging mass spectrometry. *Mar Biotechnol (NY).* 2010;12(1):81-7. doi:10.1007/s10126-009-9202-5.
57. Golub EE, Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Curr Opin Orthop.* 2007;18(5):444-448. doi:10.1097/BCO.0b013e3282630851.
58. Carbonare LD, Innamorati G, Valenti MT. Transcription Factor Runx2 and its Application to Bone Tissue Engineering. *Stem Cell Rev Reports.* 2012;8:891-897. doi:10.1007/s12015-011-9337-4.
59. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P KG. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell.* 2007;130(3):456–469.

60. Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(3):279-303.  
doi:10.1177/10454411000110030101.
61. Chellaiah M a, Hruska K a. The integrin alpha(v)beta(3) and CD44 regulate the actions of osteopontin on osteoclast motility. *Calcif Tissue Int*. 2003;72(3):197-205. doi:10.1007/s00223-002-1025-6.
62. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(7):3597-602. doi:10.1073/pnas.95.7.3597.
63. Takayanagi H. Osteoclast differentiation and activation. *Clin Calcium*. 2007;17(4):484-492.  
doi:10.1038/nature01658.
64. Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(1):49-60. doi:10.1016/j.cytogfr.2003.10.005.
65. Udagawa N. Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. *J Exp Med*. 1995;182(5):1461-1468. doi:10.1084/jem.182.5.1461.

66. Stange R, Kronenberg D, Timmen M, et al. Age-related bone deterioration is diminished by disrupted collagen sensing in integrin  $\alpha 2\beta 1$  deficient mice. *Bone*. 2013;56(1):48-54. doi:10.1016/j.bone.2013.05.003.
67. Aoki C, Uto K, Honda K, et al. Advanced glycation end products suppress lysyl oxidase and induce bone collagen degradation in a rat model of renal osteodystrophy. *J Ginseng Res*. 2005;113(3):1042-6. doi:10.1074/jbc.M112.343954.
68. Aoki C, Uto K, Honda K, Kato Y, Oda H. Advanced glycation end products suppress lysyl oxidase and induce bone collagen degradation in a rat model of renal osteodystrophy. *Lab Invest*. 2013;93(11):1170-83. doi:10.1038/labinvest.2013.105.
69. de Liefde II, van der Klift M, de Laet CEDH, van Daele PLA, Hofman A, Pols HAP. Bone mineral density and fracture risk in type-2 diabetes mellitus: the Rotterdam Study. *Osteoporos Int*. 2005;16(12):1713-1720. doi:10.1007/s00198-005-1909-1.
70. Schwartz A V, Garnero P, Hillier TA, et al. Pentosidine and increased fracture risk in older adults with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(7):2380-2386. doi:10.1210/jc.2008-2498.
71. Takashi M, Tsubaki S, Tsuzuki T, Duarte WR, Yamauchi M, Sato H. Differential gene expression of collagen-binding small leucine-rich proteoglycans and lysyl hydroxylases, during mineralization by MC3T3-E1 cells cultured on titanium implant material. *Eur J Oral Sci*. 2005;113(3):225-31. doi:10.1111/j.1600-0722.2005.00208.x.

72. Sricholpech M, Perdivara I, Yokoyama M, et al. Lysyl Hydroxylase 3-mediated Glucosylation in Type I Collagen. *J Biol Chem*. 2012;287(27):22998-23009. doi:10.1074/jbc.M112.343954.
73. Oxlund H, Barckman M, Ortoft G, Andreassen TT. Reduced concentrations of collagen cross-links are associated with reduced strength of bone. *Bone*. 1995;17(4):365S-371S. doi:10.1016/8756-3282(95)00328-B.
74. Cronlund AL, Smith BD, Kagan HM. Binding of lysyl oxidase to fibrils of type I collagen. *Connect Tissue Res*. 1985;14(2):109-119. doi:10.3109/03008208509015017.
75. Suda T, Takahashi F, Takahashi N. Bone effects of vitamin D - Discrepancies between in vivo and in vitro studies. *Arch Biochem Biophys*. 2012;523(1):22-9. doi:10.1016/j.abb.2011.11.011.
76. Kikuta J, Kawamura S, Okiji F. Sphingosine-1-phosphate-mediated osteoclast precursor monocyte migration is a critical point of control in antibone-resorptive action of active vitamin D. *Proc ....* 2013;110(17):7009-7013. doi:10.1073/1218799110.