論文の内容の要旨

獣医学専攻
平成 24 年度博士課程入学
氏名　西村　隆慈
指導教員名　望月　学

論文題目　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

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。この疾患は、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。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。しかしながら、その中で実際に治療を行っているのは 200 万人程であり、多くの人が何らかの問題が生じない限り治療を行っていないというのが現状である。

骨粗鬆症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。病態に関しても骨形成と骨吸収の双方が活発となる高回転型（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多岐にわたっており、治療方針も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骨粗鬆症の新規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ジェ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、コラゲナーゼによるコラーゲンの分解が抑制されることが報告されている。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期待され実現したが、合成経路もきわめて煩雑で臨床使用に至ることはなかった。これらの問題点を解消するために、NZ の構造の一部を切断し簡略化した NZ 類似化合物質と

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、骨の無機基質形成に対する TZ の影響、および骨の有機基質に対する TZ の影響の検討を行った。

OVX マウスに対する TZ 経口投与実験では、TZ による骨以外の臓器に影響を調べたところ、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、投与中に異常を示す個体もなく明らかな副作用は認められなかった。OVX マウスではエストラジオール（E2）の欠乏によって子宮の萎縮が生じるが、TZ 投与群はコントロール同様に子宮の萎縮が確認され、E2 様の作用を持たないことが示された。また、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。μCT 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したところ、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したため、骨形成促進に働くことが予想された。

次いで、骨の無機基質形成に対する TZ の影響を検討するため、マウス由来骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を用いて検討した。まず MC3T3-E1 細胞は未分化、分化誘導させたもの 2 つのグループを作製し、TZ 処理による影響を検討した。細胞数では、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。次に石灰化に関する検討を行ったところ、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。一方、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、骨芽細胞マーカーである ALP に対する TZ の影響を検討したところ、未分化、および分化誘導 MC3T3-E1 細胞は TZ 処理で ALP が有意に減少することが確認された。これらの結果から、TZ は骨芽細胞の骨形成に影響し、骨芽細胞の分化初期と後期で異なる作用をすることが示唆された。

そこで、骨芽細胞の分化の初期と後期で骨の無機基質形成に関わる因子に対する TZ の影響を検討するため、Runx2、ALP、OCN、OPN、RANKL について定量的リアルタイム

PCR を行った。その結果、分化誘導 MC3T3-E1 細胞では、ALP は初期の 2、3 日目で TZ 群の有意な抑制が認められた。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。さらに、RANKL は 14 日目において TZ 群での抑制が認められた。また、Runx2 に対する TZ の影響は認められなかった。ALP、OCN の抑制は、TZ が分化誘導骨芽細胞の骨形成を抑制する結果を支持するものであった。OPN、RANKL の抑制することから、TZ が骨芽細胞を介して破骨細胞による骨吸収を抑制することが示唆された。骨の無機基質形成に対して TZ は影響することが示唆されたものの、

骨量減少抑制作用を強く支持するものではなかったため、続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。まず、細胞外マトリックスコラーゲン形成能について、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。その結果、未分化および分化誘導 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が、col1A1 の遺伝子発現量において有意な差は認められなかった。TZ は NZ と同様にコラーゲンの分解を抑制することが報告されているため、今回の結果から 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、これらの遺伝子発現量は TZ によって有意に促進することが示された。以上のことから TZ は骨の有機基質に対して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が示された。

本研究では TZ は骨粗鬆症モデル動物の骨量の減少を抑制することが示された。その作用機序として骨の無機基質ではなく、骨の有機基質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。