

博士論文

論文題目 閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおける抗 RANKL
抗体及びテリパラチドの併用効果に関する研究

氏 名 徳山 直人

目次

		頁
第 1 章	要旨	7
第 2 章	序文	9
第 3 章	実験材料及び方法	15
3-1	実験試薬及び動物	
3-2	マウス破骨細胞の培養	
3-3	破骨細胞の染色	
3-4	実験方法	
3-4-1	破骨細胞分化における抗 RANKL 抗体の影響	
3-4-2	閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおいて抗 RANKL 抗体及び PTH が骨代謝に及ぼす影響	
3-5	放射線学的解析	
3-6	骨代謝マーカー測定	
3-7	組織学的解析	
3-8	統計解析	
第 4 章	結果	21
4-1	抗 RANKL 抗体の破骨細胞分化に関する影響	

In vitro 培養系における破骨細胞分化の抗 RANKL 抗体による抑制効果

4-2 閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおける抗 RANKL 抗体及び PTH が骨密度及び骨代謝回転に及ぼす影響

4-3 組織学的解析及び骨形態計測

第 5 章	考察	25
第 6 章	結語	31
第 7 章	謝辞	32
第 8 章	参考文献	33

略 語

α -MEM; alpha-modified minimum essential medium

BFR; bone formation rate

BMM; bone marrow macrophage

BS; bone surface

BV; bone volume

CT; computed tomography

CTX-I; c-telopeptide-I

DXA; dual-energy X-ray absorptiometry

ELISA; enzyme-linked immune sorbent assay

ES; eroded surface

FBS; fetal bovine serum

GMA; glycol methacrylate

M-CSF; macrophage-colony stimulating factor

MAR; mineral apposition rate

MS; mineralizing surface

ND; not detected

O.Th; osteoid thickness

OPG; osteoprotegerin

OS; osteoid surface

OV; osteoid volume

OVX; ovariectomy

Ob.S; osteoblast surface

Oc N./B. Pm.; osteoclast number/bone perimeter

Oc.S; osteoclast surface

PBS; phosphate-buffered saline

PGE₂; prostaglandine E₂

PTH; parathyroid hormone

RA; rheumatoid arthritis

RANK(L); receptor activator of nuclear factor kappa-B (ligand)

TB; toluidine blue

TNF- α ; tumor necrosis factor- α

TRAP; tartrate-resistant acid phosphatase

Tb.N; trabecular number

Tb.Sp; trabecular separation

Tb.Th; trabecular thickness

WHO; world health organization

第 1 章 要旨

破骨細胞は単球・マクロファージ系前駆細胞から分化した多核巨細胞であり、生体内で骨吸収能を有する唯一の細胞である。これまでに RANKL-RANK 系が破骨細胞分化・活性化にきわめて重要かつ特異的なシグナル経路であることが明らかになり、閉経後骨粗鬆症、関節リウマチ、転移性骨腫瘍では破骨細胞による病的な骨吸収・骨破壊が中心的な病態であるということが判明している。抗 RANKL 抗体・デノスマブは RANKL を阻害することにより破骨細胞分化・活性化を抑制し、病的な骨吸収を抑制する新規治療薬として臨床応用されている。一方、PTH 製剤・テリパラチド（ヒト遺伝子組み換え PTH(1-34)）は、骨形成促進作用を有することから骨粗鬆症に対して骨形成促進薬として臨床的に応用されている。また骨吸収抑制薬であるデノスマブと骨形成促進薬であるテリパラチドの併用によって、臨床的に骨密度の相対的増加を示すことが報告されているが、その詳細な作用機序は未解明である。

本研究では、両側卵巣摘出により作成した閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおける抗 RANKL 抗体単独の効果と、テリパラチドとの相互作用について解析した。3 カ月齢の雌性 C57BL/6 マウスに対して卵巣摘出（OVX）または偽手術を実施し、手術実施 4 週後にマウスを抗 RANKL 抗体単独投与群（Ab

群)、テリパラチド単独投与群 (PTH 群)、抗 RANKL 抗体及びテリパラチド投与群 (Ab+PTH 群) の 3 群に分け、各薬剤を投与した。各群とも手術実施 8 週後に屠殺し、大腿骨及び腰椎の骨密度測定および大腿骨の組織学的解析及び骨形態計測を実施した。これらの薬剤の骨代謝回転に対する影響を調べるため、各群の血清 CTX- I、血清オステオカルシンを測定した。その結果、Ab 群と比較して Ab+PTH 群では海綿骨を多く含む大腿骨遠位部と、皮質骨を多く含む大腿骨骨幹部の両領域において有意に BMD が増加した。また Ab 群と比較して PTH 群及び Ab+PTH 群では有意に皮質骨骨密度が増加した。骨代謝回転については、Ab+PTH 群は Ab 群と同程度に抑制されていた。組織学的解析では、TRAP 陽性破骨細胞数は Ab 群及び Ab+PTH 群において著明に減少していた。これらの結果から、抗 RANKL 抗体と PTH の併用療法は、閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおいてそれぞれ単剤投与の場合と比較して、骨密度増加に対する相加効果が存在することが明らかとなった。

第2章 序文

生体内の骨組織では、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収が、均衡状態を厳密に保ちながら (1, 2, 3) 絶えずリモデリングを繰り返すことで、骨組織としての強度維持やカルシウム代謝調節という骨組織としての恒常性を維持している。破骨細胞は造血幹細胞由来の多核巨細胞で、生理的あるいは病的な骨吸収をつかさどる唯一の細胞である (4, 5, 6, 7)。RANKL は TNF- α ファミリーに属する膜結合型サイトカインであり、活性化 T 細胞に発現誘導され、樹状細胞の活性化・生存をつかさどる因子としてクローニングされた。その後 1998 年に同分子が破骨細胞分化・活性化・生存を担う中心的な分子として再発見されたことによって、それ以降の破骨細胞研究は急速な進歩を遂げた (8, 9)。RANKL はマクロファージ系の前駆細胞に存在する受容体、RANK に結合して細胞内にシグナルを伝えることにより破骨細胞への分化を誘導する。また RANKL は骨芽細胞や骨髄ストローマ細胞において、活性型ビタミン D₃、プロスタグランジン E₂、副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone ; PTH) などの骨吸収促進因子によりその産生が誘導される。一方、オステオプロテジェリン(OPG)は TNF 受容体スーパーファミリーに属する分泌型タンパク質であり、RANK に対して競合的に RANKL と結合し、

RANKL-RANK の結合を競合的にブロックすることで、強力に破骨細胞分化を抑制する。RANKL-RANK-OPG 系の生体における重要性は、RANKL あるいは RANK 受容体を標的としたノックアウトマウスにおいて破骨細胞分化が阻害され大理石骨病を呈すること (10, 11)、また RANKL 阻害因子である OPG ノックアウトマウスにおいては逆に、破骨細胞による骨吸収が亢進し、重度の骨粗鬆症を引き起こす (12) ことによって証明された。このようにして生体における骨吸収は、RANKL-RANK-OPG 系によって厳格に制御されている。

RANKL-RANK-OPG系はまた閉経後骨粗鬆症、関節リウマチ、転移性骨腫瘍といった病的な骨量減少にも関与する (6, 7) ことが明らかになっており、その制御がこれら病的状態に対する有効な治療の一つとなる (13)。中でも世界的に高齢化が進む中、骨粗鬆症および骨粗鬆症に起因する骨折の予防は大きな問題となっている。我が国における総人口に占める65歳以上の高齢者の割合である高齢化率が2014年度には26.0%に達し、年々増加する状況の中、閉経後の女性を中心に1300万人近い骨粗鬆症患者が存在すると推定されている (14)。骨粗鬆症が原因と考えられる大腿骨近位部骨折の発生は年間15万人にも上るとの報告がなされており (15)、WHO (世界保健機関) の報告では欧米と日本を合わせ7500万人以上が骨粗鬆症に罹患し年間890万人以上の骨

折の発生があるとしている(16)。骨粗鬆症患者の増加と骨粗鬆症が原因で生じる椎体圧迫骨折や大腿骨近位部骨折など脆弱性骨折の治療に要する費用や、それらの骨折による移動能力の著明な低下や寝たきり患者の増加による介護費用を含めた国民医療費は近年ますます莫大なものとなっており、医療経済的な観点からも大きな問題となっている。

これらの基礎的研究や疫学研究を背景として、RANKL に対する抗体製剤であるデノスマブが骨粗鬆症治療薬として開発された。デノスマブは IgG₂ isotype の完全ヒト型抗 RANKL モノクローナル抗体であり、ヒト RANKL と特異的に結合することにより破骨細胞分化・活性化を抑制し、その結果骨吸収を抑制するという作用機序が考えられている(17, 18, 19) (図 1)。

健常な閉経後女性に対するデノスマブ単回皮下注射により、12 時間以内に用量依存的に骨吸収マーカーが低下し、また 6~9 カ月間にわたり有効血中濃度が維持され、また一時的な血清カルシウム濃度及び血清リン濃度は共に投与後ごく早期に軽度低下するが経時的に正常レベルに回復し、重篤な有害事象はなかった(17)。この報告以降、デノスマブに関する大規模臨床研究が多方面にわたり進められている。代表的な研究の一つは、閉経後骨粗鬆症患者 7868 例を対象とした”FREEDOM (Fracture REduction Evaluation of Denosumab in Osteoporosis every 6 Months)” 試験であり、デノスマブ 60 mg を 6 か月毎に

皮下投与することにより、投与開始後 36 ヶ月の新規椎体骨折のリスクが偽薬群より有意に減少したという結果であった (20)。また、既存の骨粗鬆症治療薬として現在広く使用されている骨吸収抑制剤のビスホスホネートであるアレンドロネートとの効果を比較した”DECIDE (Determining Efficacy : Comparison of Initiating Denosumab vs. AlEndronate)”試験では、閉経後骨粗鬆症患者 1189 例 を対象とし、6 か月毎のデノスマブ 60 mg 皮下注射投与群とアレンドロネート 70 mg の週 1 回経口投与群による骨密度増加効果を比較したところ、腰椎および大腿骨において、投与開始 12 ヶ月後にデノスマブ投与群で有意に骨密度増加した (21)。これらの大規模臨床試験の結果から、既存の骨吸収抑制薬を上回る作用を有する新しい骨吸収抑制薬として、デノスマブは欧米及び本邦で閉経後骨粗鬆症および各種の転移性骨腫瘍に対して治療薬として臨床投与が広まりつつある。

しかしながらこの新しい骨吸収抑制薬デノスマブが、破骨細胞形成・分化・活性化のいかなる段階でどの程度抑制しているのかなど、生体内における作用機序には不明な点がまだ多く、臨床研究においてもその効果や副作用、他の薬剤との相互作用などにおいて未解明な点が指摘されている。Miller らによる閉経後骨粗鬆症患者に対するデノスマブと既存の骨吸収抑制薬としてアレンドロネートとの効果比較を行った臨床試験において、投与開始後 24 カ月

で両薬剤を休薬すると、デノスマブ投与群ではアレンドロネート投与群と比較して骨吸収を反映する骨代謝マーカーである血清 CT-x の急激な増加と同時に、骨密度の急激な低下が生じる (22) ことが示されている。この結果はデノスマブの休薬により急激な骨吸収亢進が生じたためリバウンド現象が起きた可能性を示唆するが、その機序の詳細な解析はなされていない。また抗 RANKL 抗体による RANKL の中和によってどのようなタイミングで、破骨細胞や骨芽細胞など骨代謝に関わる細胞や骨代謝マーカーが減少あるいは増加しているのかなどについても生体レベルでの詳細な解析はこれまでなされていない。さらに臨床的な問題点として、既存の骨粗鬆症治療薬による治療が行われている閉経後骨粗鬆症患者に対してデノスマブを投与した場合やデノスマブを先行投与している患者に他の骨粗鬆症治療薬を投与した際の、2 剤の薬剤間の相互作用については未だに解明されていない。

テリパラチド[ヒト遺伝子組み換えPTH(1-34)]の間欠注射は、骨粗鬆症治療薬として現在使用可能な唯一の骨形成促進剤である。PTH製剤が骨形成を促進する作用機序の詳細は未だに解明されていないが、ビスホスホネート製剤の併用によってPTH製剤の骨密度増加作用がむしろ抑制されたことから、骨形成促進作用に破骨細胞が必要である可能性が示唆されている (23, 24, 25, 27) 。またデノスマブと他の骨粗鬆症治療薬との相互作用については、最近

の臨床研究においてテリパラチドとデノスマブの併用によって骨密度増加に対して相加効果があったことが報告されている (26)。しかし動物実験では、Furuyaらにより正常マウスにおいて抗RANKL抗体とPTHを併用した結果、PTHのanabolic effectは阻害されず骨密度の相加的な増加が示され (28)、またSamadfamらにより閉経後骨粗鬆症マウスモデルにおいて骨吸収抑制剤であるアレンドロネートとPTHを併用し同様の骨密度の増加が示されている (29)が、これらは臨床試験において、骨吸収抑制剤であるビスホスホネート製剤とPTHを併用した場合にPTH製剤の持つanabolic effectが抑制されたという結果とは異なっており、これまでにRANKL阻害剤とPTH製剤の併用による相加効果の有無については一定した見解が得られていない。そこで本研究では、疫学的に閉経後骨粗鬆症患者が男性骨粗鬆症患者に比較して圧倒的に有病率が高く (14)、また高齢化がますます進み今後もその傾向が継続していくと考えられることから、閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおいて抗RANKL抗体によるRANKL中和が骨組織に及ぼす影響を詳細に明らかにするとともに、抗RANKL抗体とテリパラチドの併用療法の効果について解析し、その作用機序を解明することを目的とした。本研究は閉経後骨粗鬆症の効率的な治療戦略を考える上で有益な情報を与えるのみならず、より多角的・俯瞰的に骨粗鬆症治療を理解することが可能となることが期待される。

第3章 実験材料及び方法

3-1 実験試薬及び動物

抗マウス RANKL モノクローナル抗体 (OYC1) はオリエンタル酵母工業株式会社 (東京) より提供された。PTH 製剤はテリパラチド酢酸塩 (teriparatide acetate) を使用し、旭化成ファーマ株式会社 (東京) より提供された。 α -MEM は GIBCO BRL and Life Technologies 社より、ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS)、プロスタグランディン E₂ (PGE₂) はシグマ アルドリッチ社より購入した。活性型ビタミン D₃ [1 α ,25 (OH)₂D₃] は Calbiochem 社 (San Diego, CA, USA) より購入した。バクテリアコラゲナーゼは和光純薬工業株式会社 (東京)、ディスパーゼは合同酒精社 (東京) より購入した。

12 週齢雌性 C57/BL6 マウス及び 5 週齢雄性の ddY マウスを三協ラボサービス株式会社 (東京) より購入した。マウスは飼料および飲用水を常時摂取可能な状態で、12 時間毎の明暗サイクルにて飼育ケージ内の自由移動という環境で飼育した。全ての動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「動物実験の飼養及び保管などに関する基準 (総理府告示)」、「東京大学医学部動物実験指針」に従って行った。

3-2 マウス破骨細胞の培養（共存培養法）

In vitro における実験においては、実験系において共存培養法を使用した（図 2）。5 週齢雄性の ddY マウスの長管骨より採取した骨髄細胞を、コラーゲンゲルコートした培養ディッシュ上でマウス初代骨芽細胞とともに培養することで破骨細胞分化を誘導した（30）。培養初日を Day 0 とした。

3-3 破骨細胞の染色

TRAP 染色

3.7% ホルマリンにて固定された破骨細胞にアセトンとエタノールを等量加え細胞膜透過性を高め、酒石酸存在下（pH 5.0）にて、N,N-dimethyl formamide（和光純薬工業株式会社）に溶解した naphthol AS-MX phosphate（シグマ アルドリッチ ジャパン社、東京）を基質として Fast red violet LB salt（シグマ アルドリッチ ジャパン社、東京）で 20 分間染色した。その後、蛍光顕微鏡 BZ-8100（株式会社キーエンス、大阪）で観察した。

3-4 実験方法

3-4-1 破骨細胞分化における抗 RANKL 抗体の影響

破骨細胞共存培養系において培養液中に Day 0 から抗 RANKL 抗体を添加

しない control 群 (C 群) と抗 RANKL 抗体を濃度別に添加した群 (Ab-I 群 : 抗 RANKL 抗体 1 $\mu\text{g/ml}$ in α -MEM、Ab-II 群 : 抗 RANKL 抗体 10 $\mu\text{g/ml}$ in α -MEM) に分け、破骨細胞分化を観察した。コントロール群で破骨細胞が十分成熟した Day 5 に TRAP 染色を行い、各 well 毎の破骨細胞数を計測し比較した。

3-4-2 閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおいて抗 RANKL 抗体及び PTH が骨代謝に及ぼす影響

過去の報告 (28, 32) を参照し閉経後骨粗鬆症マウスモデルの作成方法及び各種薬剤の投与量、投与間隔を検討した上で実験プロトコールを図 3 のごとく定めた。12 週齢雌性 C57/BL6 マウスを 5 群に分け、4 群に対して両側卵巣摘出術 (ovariectomy ; OVX) を施行し、1 群に対して偽手術 (sham operation) を施行した。OVX 4 週間後に、薬剤を投与しない OVX 群 (n=6)、抗 RANKL 抗体 (単回、5 mg/kg) を投与した Ab 群 (n=5)、テリパラチド (4 週間連日、80 $\mu\text{g/kg/day}$) を投与した PTH 群 (n=6)、抗 RANKL 抗体 (単回、5 mg/kg) とテリパラチド (4 週間連日、80 $\mu\text{g/kg/day}$) の両薬剤を投与した Ab + PTH 群 (n=5) 及び偽手術を行った Sham 群 (n=6) の計 5 群を設定した。マウスは全ての群で OVX 及び Sham 手術 8 週後に屠殺した。術後 8 週時に骨密度測

定を行い、後眼窩から血液を採取し、毛細血管採集用採血管 (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD) で血清を採取し、組織学的解析のため大腿骨を採取した。

3-5 放射線学的解析

マウス大腿骨遠位部のマイクロCTスキャンはScanXmate-L090 Scanner (Comscantechno Co., Ltd., 横浜市) を用いて実施した。3次元微細構造の画像データはTRI/3D-BON software (RATOC Systems, 大阪府) を用いて再構成し、骨梁構造の指標を計測した。マウス大腿骨遠位部及び骨幹部と第1～5腰椎の骨密度は、それぞれ骨密度測定装置 (PIXImus Densitometer; GE Medical Systems, Waukesha, WI) を用いてDXA法により測定した。

3-6 骨代謝マーカー測定

血清学的に骨代謝の変化量を定量化するため骨代謝マーカーの測定を行った。術後8週で麻酔下に各個体の後眼窩より採血し、毛細血管採集用採血管 (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD) で血清を採取した。骨吸収マーカーとして血清 CTx-I (RatLaps ELISA; Nordic Bioscience, Herlev, Denmark) を、骨形成マーカーとして血清オステオカルシン (Mouse osteocalcin EIA,

Biomedical Technologies Inc., Stoughton, MA, USA) をそれぞれ ELISA 法にて測定した。

3-7 組織学的解析

大腿骨を 70%エタノール溶液で固定後、GMA 樹脂包埋しマイクロトームにて 3 μm 厚の薄切切片を作成した。各切片に対してトルイジンブルー (TB) 染色及び酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行った。TRAP 染色は採取組織を固定後に、アセトンとエタノールを等量加え酒石酸存在下 (pH 5.0) で、N,N-dimethyl formamide (和光純薬工業株式会社) 中の naphthol AS-MX phosphate (シグマ アルドリッチ ジャパン社) を基質として Fast red violet LB salt (シグマ アルドリッチ ジャパン社) で常温下に 20 分間染色することによって、赤色に染色される破骨細胞を同定した。

骨形態計測は 400 倍拡大で鏡検し、大腿骨遠位部の二次海綿骨領域及び大腿骨骨幹部皮質骨において各種パラメータを計測し算定した (株式会社クレハ分析センターにおいて実施)。また動的パラメータを計測、算定するため、各個体に対してマウス屠殺 4 日前にテトラサイクリン塩酸塩 (20 mg/kg body weight) を 1 回皮下注射し、さらに屠殺 1 日前にカルセイン (16 mg/kg body weight) を 1 回皮下注射し二重ラベリングを実施した。

3-8 統計学的解析

各実験は3回以上繰り返し、同様な結果が得られることを確認した。結果は平均±標準偏差（SD）として表記した。2群間の平均値の有意差の検定には Student の t 検定及び分散分析法（ANOVA ; factorial analysis of variance）を用いて検討した。

第4章 結果

4-1 抗 RANKL 抗体の破骨細胞分化に関する影響

In vitro 培養系における破骨細胞分化の抗 RANKL 抗体による抑制効果

破骨細胞分化における抗 RANKL 抗体による抑制効果を検証するため、破骨細胞を共存培養系にて培養し、破骨細胞分化について解析した。コントロール群で大多数の破骨細胞が成熟に至った Day 5 の時点で、各群とも TRAP 染色を行った (図 4A)。コントロール群で TRAP 陽性破骨細胞が多数存在していたのに対して、同時点で抗 RANKL 抗体添加によって濃度依存性に破骨細胞分化が著明に抑制されていた (図 4A, B)。以上の結果から、*in vitro* で抗 RANKL 抗体は濃度依存性に強力に破骨細胞分化を抑制していることが確認された。

4-2 閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおける抗 RANKL 抗体及び PTH が骨代謝に及ぼす影響

大腿骨遠位部においては、Ab 群及び PTH 群では OVX 群と比較して BMD は有意に増加していた。また Ab + PTH 群では Ab 群及び PTH 群と比較して BMD は有意に増加していた (図 5B)。抗 RANKL 抗体と PTH の相加作用は

マイクロ CT 画像により確認された (図 5A)。大腿骨骨幹部では、PTH 群及び Ab + PTH 群は OVX 群及び Sham 群と比較して有意に骨量が増加していたのに対して、Ab 群では BMD の有意な増加は認めなかった (図 5C)。腰椎では、Ab 群及び Ab + PTH 群では OVX 群、Sham 群と比較して BMD は有意に増加していた (図 5D)。

次に骨代謝回転について検討するため、血清骨代謝マーカーを測定した。骨吸収マーカーとして血清 CTx-I、骨形成マーカーとして血清オステオカルシンを卵巣摘出術後 8 週の時点で測定した。血清 CTx-I は Ab 群において PTH 群及び OVX 群と比較して有意に抑制されていた。また Ab + PTH 群においても同様に OVX 群、PTH 群と比較して有意に抑制されていたが、Ab 群との有意な差はなかった (図 6A)。血清オステオカルシンは PTH 群において OVX 群と比較して有意に増加していたが、Ab 群及び Ab + PTH 群の両群ともに OVX 群と比較して有意な上昇は認めなかった (図 6B)。これらの骨代謝マーカー測定による結果から、閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおける骨代謝回転は抗 RANKL 抗体によって高度に抑制され、さらに抗 RANKL 抗体にテリパラチドを追加投与しても、テリパラチド単独投与した場合と異なり骨吸収は低いレベルに抑制されることが示唆された。

4-3 組織学的解析及び骨形態計測

図 7A に示すように、組織学的解析では大腿骨遠位部の TB 染色において、Ab 群及び PTH 群ともに黄四角線で区切られた骨幹端の海綿骨領域で骨量が増加していた。Ab 群では主に一次海綿骨領域の骨量が増加していたのに対して、PTH 群では主に二次海綿骨領域で骨量が、Ab + PTH 群では一次海綿骨及び二次海綿骨領域の両領域で骨量が増加していた (図 7A)。大腿骨遠位部の TRAP 染色では、Ab 群及び Ab + PTH 群で TRAP 陽性破骨細胞は著明に減少していたのに対して PTH 群では増加していた (図 7B)。

骨形態計測の結果を図 8 に示す。骨形態計測では、大腿骨遠位部の海綿骨領域における骨量 (BV/TV) は Ab 群、PTH 群で有意に増加し、Ab + PTH 群では相加的な増加を示していた。Ab 群では破骨細胞パラメータである浸食面 (ES/BS)、破骨細胞数 (OcN/BS)、破骨細胞面 (Oc.S/BS) と同様に、骨芽細胞パラメータである類骨量 (OV/BV)、類骨面 (OS/BS)、骨芽細胞面 (Ob.S/BS)、骨石灰化速度 (MAR)、骨石灰化面 (MS/BS)、骨形成速度 (BFR/BS) は著明に減少していた。そしてそれらのパラメータは Ab+PTH 群でも同様に減少していた (図 8A)。皮質骨 (大腿骨骨幹部) の外側骨膜表面 (periosteal surface) において PTH 群では MAR、MS/BS、BFR/BS は著明に増加していたのに対して、Ab + PTH 群では強力に抑制されていた。一方、皮質骨の内側骨

膜表面 (endosteal surface) においても Ab + PTH 群では MAR、MS/BS、BFR/BS が有意に減少しており、皮質骨では periosteal surface と endosteal surface の両領域ともに Ab と PTH 併用の相加効果は認めなかった (図 8B)。標識物質によるラベル (図中の緑色の線) は、骨芽細胞によって形成された類骨に石灰沈着が起こったことを意味し、二重ラベル間の距離は骨形成に関する動的パラメータである骨石灰化速度、骨石灰化面、骨形成速度を正比例の関係で反映するが、図 8C に示すように PTH 群において二重ラベル間の距離が大きい のに対して、Ab 群及び Ab+PTH 群においてはラベルそのものがほぼ観察されなかった。代表的な二重ラベリング画像を図 8C に示す。

第5章 考察

現在骨粗鬆症治療においては、ビスホスホネートなどの骨吸収抑制薬が主として用いられ、骨密度増加作用のみならず骨折の予防にも高いエビデンスで有効性が示されており、治療の中心となっている。また近年、やはり骨吸収抑制薬である抗 RANKL 抗体デノスマブがビスホスホネートに勝る骨密度増加効果を有することが報告され、注目されている。これらの骨吸収抑制薬に加えて、重症な骨粗鬆症に対しては骨形成促進薬であるテリパラチドが使用され、海綿骨をはじめとした骨密度の著明な増加作用が示されている。骨形成促進薬の作用機序としては、骨芽細胞の分化・増殖に対する直接の効果が示されているが、ビスホスホネート投与を行った患者に対してはテリパラチドの作用が減弱すること、また PTH 製剤である PTH(1-84)とアレンドロネートとの併用によって、むしろ PTH(1-84)の骨密度増加作用が打ち消されたという臨床研究などから、PTH 製剤による骨形成促進作用の少なくとも一部は骨吸収から骨形成へのカップリング促進を介すると考えられている。また、ビスホスホネート以外の骨吸収抑制薬である選択的エストロゲン受容体と PTH 製剤による併用療法に関しては、ラロキシフェンとテリパラチドの併用による臨床試験が行われ、テリパラチド単独と比較して併用療法では、椎体

と大腿骨頸部では骨密度の有意な増加は認めず、股関節全体の骨密度のみが有意に増加したとの報告がなされているがその理由は明らかとはなっていない (31)。

このように骨吸収抑制薬と骨形成促進薬の併用療法の有効性については、未だに結論が出ていない。本研究に関連するこれまでの動物実験では、アレンドロネートやゾレドロネートといったビスホスホネート製剤に骨形成促進薬としてテリパラチドを併用した場合に、テリパラチドの骨形成作用を抑制せず相加効果を認められたとする報告 (29, 33) がある一方、先ほども述べたように、ビスホスホネート製剤に骨形成促進薬として PTH 製剤を併用した場合に、相加的効果は見られないということがこれまでの研究から示されてきている (23-25, 27, 34)。この理由として、ビスホスホネート製剤が骨吸収を抑制することにより、骨吸収に依存している骨基質からのカップリングファクターの放出を少なくとも部分的に阻害することが考えられている。しかしながら、いくつかの動物実験では PTH が骨吸収抑制剤薬の存在下でも骨形成作用を発揮したという報告がなされている。Pierroz らは破骨細胞が完全に欠如した RANK ダブルノックアウトマウスを用いた実験で、高濃度の PTH により血清オステオカルシンと海綿骨の骨密度が増加したことを示している (36)。さらに、近年の臨床研究でヒト抗 RANKL 抗体・デノスマブと PTH

の併用により、骨密度における相加効果が示された (26)。

これまでに Furuya らは抗 RANKL 抗体 OYCI の単回投与により、正常マウスにおいて血清カルシウム濃度は変化せず、骨密度が著明に増加すること、またテリパラチド間欠投与と抗 RANKL 抗体の 2 剤併用療法の相加的な効果を報告している (28)。今回申請者は、マウス OVX モデルを用いてテリパラチドと抗 RANKL 抗体との併用効果を検証し、これらが大腿骨遠位部において相加的な骨密度増加作用を示すことを明らかにした。この結果は併用療法に関する近年の臨床研究を裏付けるものである。しかし大腿骨遠位部とは対照的に、大腿骨骨幹部では抗 RANKL 抗体は骨密度を増加させず、またテリパラチドとの併用による相加効果も認めなかった。以上の結果から、OVX マウスにおける抗 RANKL 抗体と PTH の併用による相加効果は、海綿骨のみで認められる可能性が示唆された。一方臨床的には、デノスマブはテリパラチドと異なり、皮質骨が優位である大腿骨頸部や橈骨遠位部の BMD を増加させるだけでなく、それらの部位の骨折抑制効果も存在することが知られている。またデノスマブとテリパラチドの併用によって、大腿骨頸部の BMD は相加的に増加することも報告されており、本研究の大腿骨骨幹部のデータと矛盾する。本研究と臨床データとのこのような相違の原因の一つは、マウスとヒトという種差に起因する可能性がある。またマウスは生涯を通じて成長

を続けるため、骨幹部の **BMD** 測定部位に問題があった可能性も存在する。

今後、**RANKL** 阻害および **PTH** 製剤の皮質骨に対する作用については、組織学的、細胞生物学的にさらに詳細な解析が必要である。

興味深いことに、本研究における組織学的な検討から、抗 **RANKL** 抗体とテリパラチドはそれぞれ特定の領域の骨密度を増加させることが示された。すなわち抗 **RANKL** 抗体は主として一次海綿骨の骨密度を増加させるのに対して、テリパラチドは主として二次海綿骨領域の骨量を増加させた。さらに両者の併用では、一次海綿骨と二次海綿骨ともに増加していた。一般的に一次海綿骨は、軟骨内骨化の過程において最初に形成される石灰化軟骨基質を有している骨梁であり、二次海綿骨はこの一次海綿骨がリモデリングにより成熟した骨梁とされる。一次海綿骨形成は、骨吸収に依存しない骨形成（モデリング）が主たる働きをされると考えられており、今回の結果は、デノスマブはリモデリングを強力に抑制するが、モデリングに対しては抑制作用を有さない可能性を示唆する（図 9）。アレンドロネートなどのビスホスホネートの **BMD** 増加作用が数年で頭打ちになるのに対して、デノスマブは 8 年以上直線的に骨密度を増加させることが報告されている（35）が、そのメカニズムとしてモデリングを阻害しないことが想定される。

本研究において、皮質骨領域においてテリパラチドは外側骨膜表面で骨形

成増加作用を有していたが、このような作用は内側骨膜では認められず、またこれらの両領域とも抗 RANKL 抗体の併用により骨形成作用は完全に抑制されていた。皮質骨内側骨膜においては、抗 RANKL 抗体は骨形成と骨吸収の両者を抑制しているのに対して、テリパラチドは骨形成も骨吸収も増加させていなかった。これらの実験結果から、抗 RANKL 抗体とテリパラチドはそれぞれが標的とする領域に対しての骨量増加効果において、全く異なる特性を有するということが示唆された。Pierroz らはヒト RANKL 遺伝子導入マウスにデノスマブとテリパラチドの併用療法を行ったところ、デノスマブ単独と比較して BMD 増加に相加効果はなかったことを報告しており、この理由として骨吸収が著明に抑制されたため、テリパラチドの骨形成作用が損なわれた可能性があるとして指摘している (36)。Pierroz らの結果と本研究の結果が異なっている理由は明確ではないが、ヒト RANKL 遺伝子導入マウスと OVX マウスとでは骨代謝の動態という点において何らかの違いが存在している可能性を推測している。

本研究により、海綿骨が主体の大腿骨遠位部においては抗 RANKL 抗体とテリパラチドにより、それぞれ相対的に一次海綿骨と二次海綿骨という異なる領域の骨密度が増加し、両薬剤の併用療法により一次海綿骨と二次海綿骨の両領域が増加していることが明らかになった。一方で皮質骨が主体の大腿

骨幹部の特に外側骨膜でテリパラチドにより骨形成が増加していたが、抗 RANKL 抗体との併用によって骨形成が抑制されることが明らかとなった。

以上から、抗 RANKL 抗体を先行投与している場合に、PTH を追加投与することで相加的効果が閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおいて得られることが本研究により明らかとなった。

本研究の限界として、マウスモデルによる実験結果であり、直接的にヒトに適用できない可能性があること、抗 RANKL 抗体とテリパラチドの部位特異的な作用の違いについて組織学的には明らかとなったが、機序に関して分子レベルでは明らかとなっていないということが挙げられ、将来的にヒト骨組織における併用療法の作用機序の詳細をより明らかにしていくためにはさらに詳細な検討・解析が必要である。しかし本研究の成果は、今後ますます増加の一途をたどるとされる骨粗鬆症の効率的な治療戦略を考える上で重要な情報を与えるものである。

第6章 結語

抗RANKL抗体単独投与と比較して抗RANKL抗体とPTHの併用投与では、海綿骨を多く含む大腿骨遠位部と、皮質骨を多く含む大腿骨骨幹部において有意にBMDが増加した。骨代謝回転については抗RANKL抗体とPTHの併用投与は抗RANKL抗体単独投与と同程度に骨吸収及び骨形成とも抑制されていた。組織学的解析により、破骨細胞数は抗RANKL抗体単独投与と、抗RANKL抗体とPTHの併用投与の両方で著明に減少していることが明らかとなった。これらの結果から抗RANKL抗体とPTHの併用療法は、閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおいて抗RANKL抗体単独投与と比較して、骨密度における相加効果が存在することが明らかとなった。

第7章 謝辞

本研究は主に、東京大学大学院医学系研究科外科学専攻感覚・運動機能医学講座整形外科学教室において、平成22年4月から平成26年3月の間に行なわれた。

研究は整形外科第1研究室を中心として、多くの研究者による指導や支援を頂いて行われた。本研究の立案・遂行及び本論文の作成にあたり、終始多大なご指導を賜りました東京大学整形外科学教室教授 田中 栄先生に心より深く感謝致します。また本研究に従事する貴重な機会を与えて下さった東京大学整形外科学教室前教授 中村 耕三先生に深く感謝致します。

日々の実験の実施にあたっては同僚の大学院の先生方に様々なアドバイスや手技を、また実験・研究室助手 河原 元氏、山口 礼子氏、杉田 順子氏には細部に渡る温かい支援を頂き、心より感謝致します。

本研究は多くの方々の多大なご指導や支援のもとに成し得たものであり、改めて皆様に深く感謝致します。

最後に東京大学大学院医学系研究科における研究生生活の4年という月日を、共に過ごし支えてくれた家族、妻 新津江、長男 晴太郎、二男 遼介、長女 真百合に感謝の意を示したい。

第 8 章 参考文献

1. Baron R. Molecular mechanisms of bone resorption by the osteoclast. *The Anatomical Record*. 1989;224:317-24.
2. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423:337-42.
3. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*. 2003;423:349-55.
4. Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. *Experimental Hematology*. 1999;27:1229-41.
5. Tanaka S. Signaling axis in osteoclast biology and therapeutic targeting in the RANKL/RANK/OPG system. *American Journal of Nephrology*. 2007;27:466-78.
6. Takayanagi H, Iizuka H, Juji T, Nakagawa T, Yamamoto A, Miyazaki T, Koshihara Y, Oda H, Nakamura K, Tanaka S. Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 2000;43:259-69.

7. Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. *The New England Journal of Medicine*. 2004;350:1655-64.
8. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93:165-76.
9. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95:3597-602.
10. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ, Schuh J. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes & Development*. 1999;13:2412-24.
11. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S,

Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 1999;397:315-23.

12. Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Ozawa H. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998;247:610-5.

13. Tanaka S, Nakamura K, Takahasi N, Suda T. Role of RANKL in physiological and pathological bone resorption and therapeutics targeting the RANKL-RANK signaling system. *Immunological Reviews*. 2005;208:30-49.

14. 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会. 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2015 年版. 東京: ライフサイエンス出版. 2015.

15. Orimo H, Yaegashi Y, Onoda T, et al. Hip fracture incidence in Japan: estimates of new patients in 2007 and 20-year trends. *Archives and Osteoporosis*. 2009;4:71-7.

16. Assessment of fracture risk and its application to screening for

postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. World Health Organ Technical Report Series. 1994;843:1-129.

17. Bekker PJ, Holloway DL, Rasmussen AS, Murphy R, Martin SW, Leese PT, Holmes GB, Dunstan CR, DePaoli AM. A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2004;19(7):1059-66.

18. McClung MR, Lewiecki EM, Cohen SB, Bolognese MA, Woodson GC, Moffett AH, Peacock M, Miller PD, Lederman SN, Chesnut CH, Lain D, Kivitz AJ, Holloway DL, Zhang C, Peterson MC, Bekker PJ. Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *The New England Journal of Medicine*. 2006;354:821-31.

19. Lewiecki EM, Miller PD, McClung MR, Cohen SB, Bolognese MA, Liu Y, Wang A, Siddhanti S, Fitzpatrick LA. Two-year treatment with denosumab (AMG 162) in a randomized phase 2 study of postmenopausal women with low BMD. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2007;22(12):1832-41.

20. Cummings SR, San Martin J, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, Delmas P, Zoog HB, Austin M, Wang A, Kutilek S, Adami S, Zanchetta J, Libanati C, Siddhanti S, Christiansen C. Denosumab for prevention of fractures in

postmenopausal women with osteoporosis. *The New England Journal of Medicine*. 2009;361:756-65.

21. Brown JP, Prince RL, Deal C, Recker RR, Kiel DP, de Gregorio LH, Hadji P, Hofbauer LC, Álvaro-Gracia JM, Wang H, Austin M, Wagman RB, Newmark R, Libanati C, San Martin J, Bone HG. 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. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2009;24(1):153–61.

22. Miller PD, Bolognese MA, Lewiecki EM, McClung MR, Ding B, Austin M, Liu Y, San Martin J, Amg Bone Loss Study Group. Effect of denosumab on bone density and turnover in postmenopausal women with low bone mass after long-term continued, discontinued, and restarting of therapy: a randomized blinded phase 2 clinical trial. *Bone*. 2008;43(2):222–29.

23. Black DM, Greenspan SL, Ensrud KE, Palermo L, McGowan JA, Lang TF, Garnero P, Bouxsein ML, Bilezikian JP, Rosen CJ. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *The New England Journal of Medicine*. 2003;349:1207-15.

24. Finkelstein JS, Hayes A, Hunzelman JL, Wyland JJ, Lee H, Neer RM. The

effects of parathyroid hormone, alendronate, or both in men with osteoporosis. *The New England Journal of Medicine*. 2003;349:1216-26.

25. Finkelstein JS, Leder BZ, Burnett SM, Wyland JJ, Lee H, de la Paz AV, Gibson K, Neer RM. Effects of teriparatide, alendronate, or both on bone turnover in osteoporotic men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2006;91(8):2882-7.

26. Tsai JN, Uihlein AV, Lee H, Kumbhani R, Siwila-Sackman E, McKay EA, Burnett-Bowie SA, Neer RM, Leder BZ. Teriparatide and denosumab, alone or combined, in women with postmenopausal osteoporosis: the DATA study randomised trial. *Lancet*. 2013;382:50-6.

27. Ettinger B, Martin JS, Crans G, Pavo I. Differential effect of teriparatide on BMD after treatment with raloxifene or alendronate. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2004;19(5):745-51.

28. Furuya Y, Mori K, Ninomiya T, Tomimori Y, Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Uchida K, Yasuda H. 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. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(42):37023-31.

29. Samadfam R, Xia Q, Goltzman D. Pretreatment with anticatabolic agents blunts but does not eliminate the skeletal anabolic response to parathyroid hormone in oophorectomized mice. *Endocrinology*. 2007;148(6):2778-87.
30. Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley JM, Martin TJ, Suda T. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology*. 1988;123(5):2600-2.
31. Deal C, Omizo M, Schwartz EN, Eriksen EF, Cantor P, Wang J, Glass EV, Myers SL, Krege JH. Combination teriparatide and raloxifene therapy for postmenopausal osteoporosis: results from a 6-month double-blind placebo-controlled trial. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2005;20(11):1905-11.
32. Yang X, Chan YH, Muthukumaran P, DasDe S, Teoh SH, Lee T. Ibandronate does not reduce the anabolic effects of PTH in ovariectomized rat tibiae: A microarchitectural and mechanical study. *Bone*. 2011;48(5):1154–63.
33. Li YF, Zhou CC, Li JH, Luo E, Zhu SS, Feng G, Hu J. The effects of combined human parathyroid hormone (1-34) and zoledronic acid treatment on fracture healing in osteoporotic rats. *Osteoporosis International : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for*

Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA. 2012;23(4): 1463-74.

34. Cosman F, Eriksen EF, Recknor C, Miller PD, Guanabens N, Kasperk C, Papanastasiou P, Readie A, Rao H, Gasser JA, Bucci-Rechtweg C, Boonen S. Effects of intravenous zoledronic acid plus subcutaneous teriparatide [rhPTH(1-34)] in postmenopausal osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2011;26(3):503-11.

35. Papapoulos S, Lippuner K, Roux C, Lin CJ, Kendler DL, Lewiecki EM, Brandi ML, Czerwiński E, Franek E, Lakatos P, Mautalen C, Minisola S, Reginster JY, Jensen S, Daizadeh NS, Wang A, Gavin M, Libanati C, Wagman RB, Bone HG. The effect of 8 or 5 years of denosumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis: results from the FREEDOM Extension study. *Osteoporosis International*. 2015;26(12):2773-83.

36. Pierroz DD, Bonnet N, Baldock PA, Ominsky MS, Stolina M, Kostenuik PJ, Ferrari SL. Are osteoclasts needed for the bone anabolic response to parathyroid hormone? A study of intermittent parathyroid hormone with denosumab or alendronate in knock-in mice expressing humanized RANKL. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(36):28164-73.

図 1

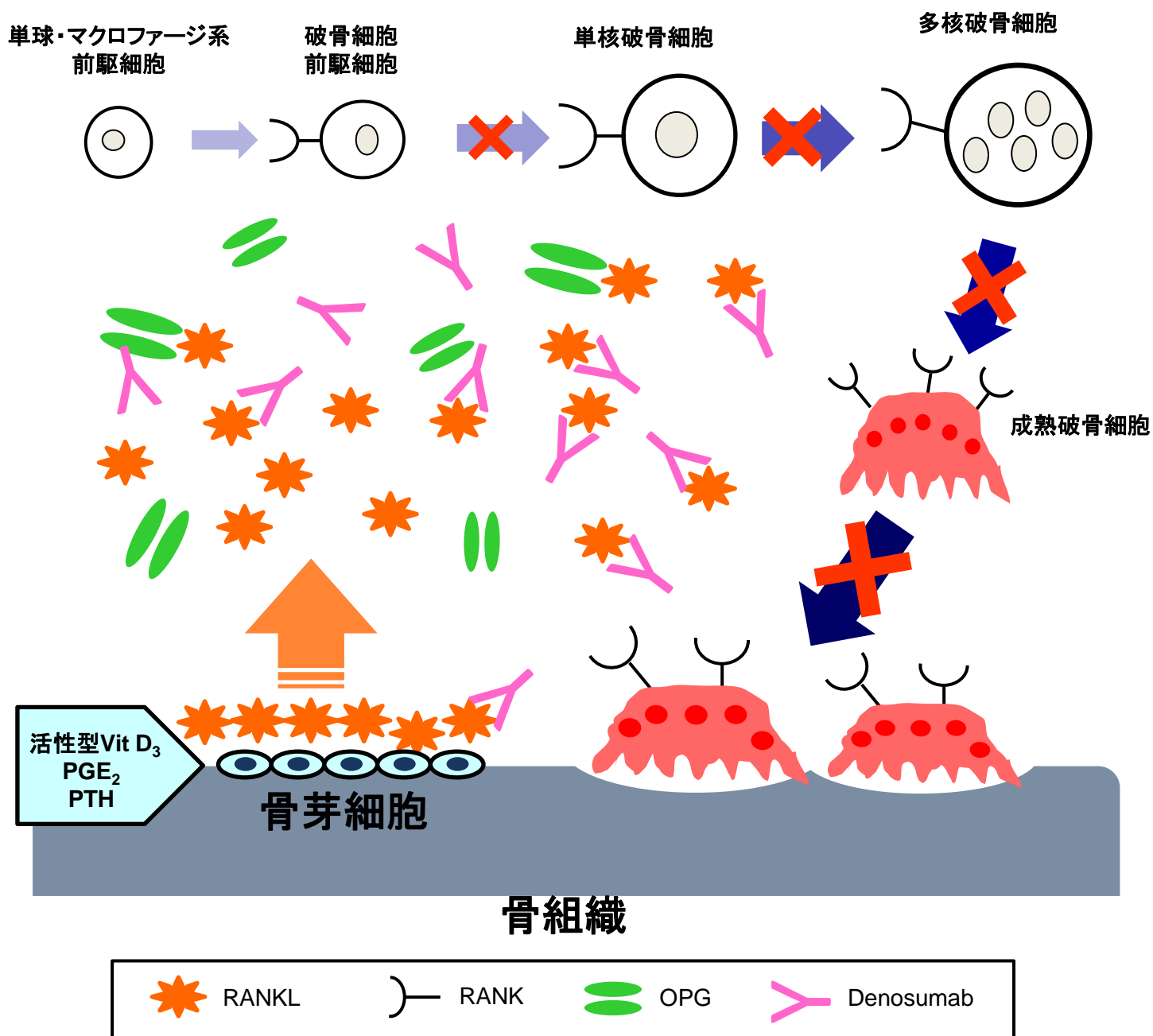


図1 抗RANKL抗体の破骨細胞分化における作用機序

破骨細胞は単球・マクロファージ系前駆細胞に由来しており、骨芽細胞などとの細胞間接触によって分化が誘導される。破骨細胞分化・活性化にきわめて重要な役割を果たしているのがRANKLである。RANKLは、活性型ビタミンD₃、PGE₂、PTHなどによって骨芽細胞における発現が促進され、単球・マクロファージ系前駆細胞に存在するレセプターRANKに結合することにより破骨細胞への分化を誘導する。成熟後の破骨細胞もRANKを発現しておりRANKLはその骨吸収活性も誘導する。一方、骨芽細胞はRANKLのデコイ受容体であるオステオプロテジェリン(OPG)の産生も行っている。OPGは、RANKLに対して特異的に結合することにより、RANKLとその受容体であるRANKとの結合を競合的に阻害し破骨細胞分化を抑制する。抗RANKL抗体は破骨細胞分化過程においてRANKLと結合することによりその作用を阻害する。

図 2

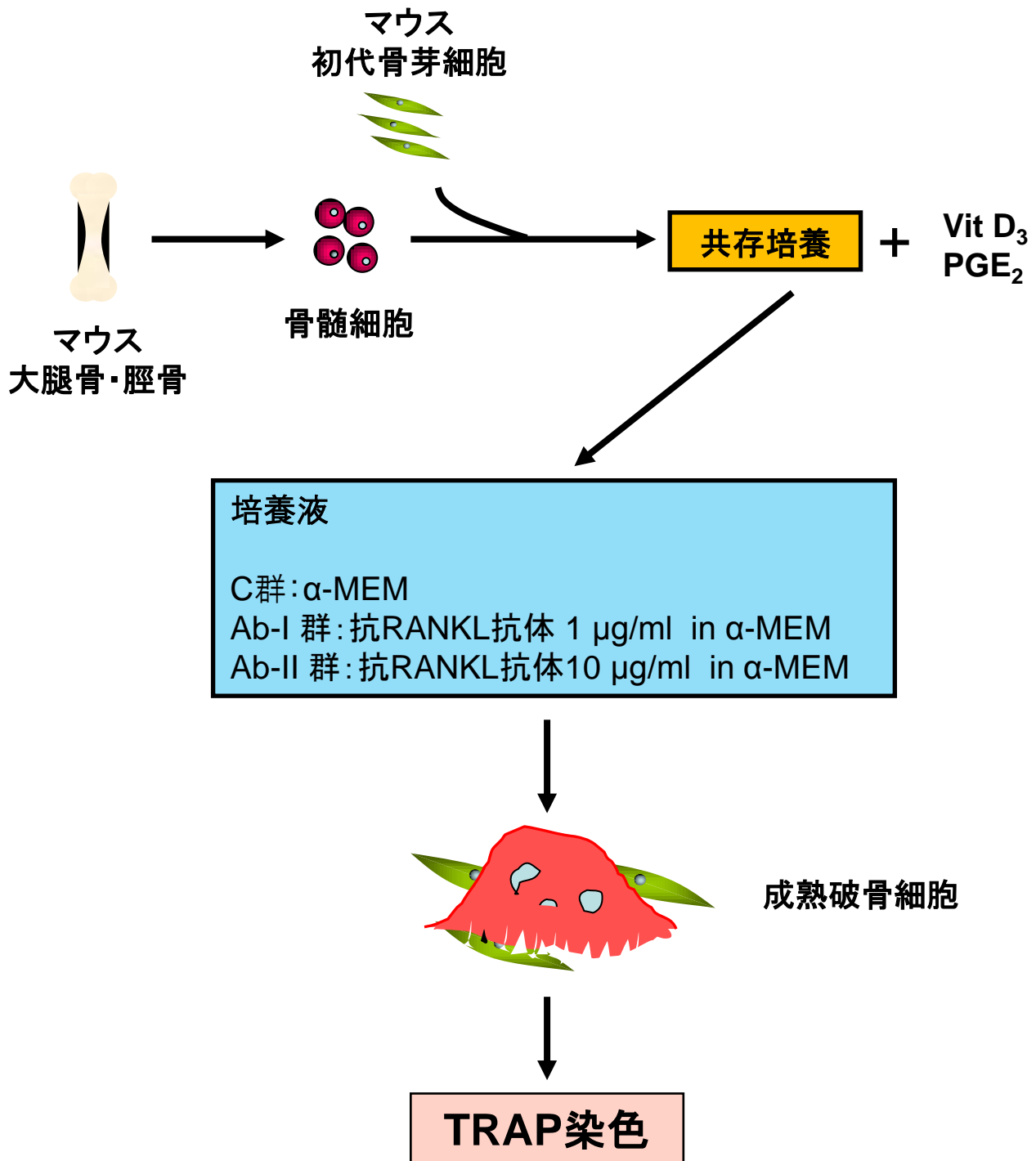


図2 マウス破骨細胞共存培養法

5週齢雄性のddYマウスの長管骨より採取した骨髓細胞を、コラーゲンゲルコートした培養ディッシュ上でマウス初代骨芽細胞とともに培養することで破骨細胞へと分化させる。培養初日をDay 0とする。

図 3

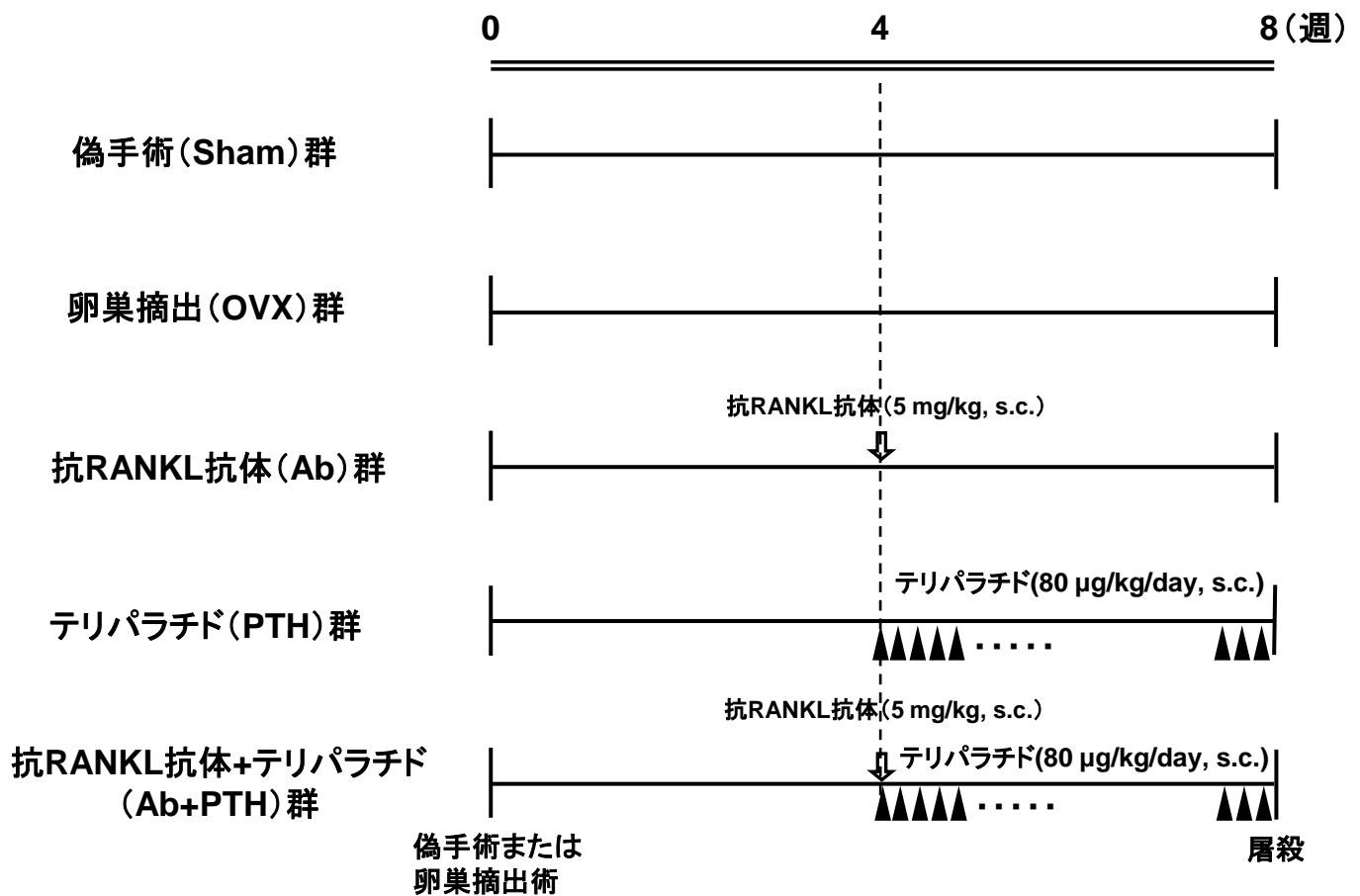
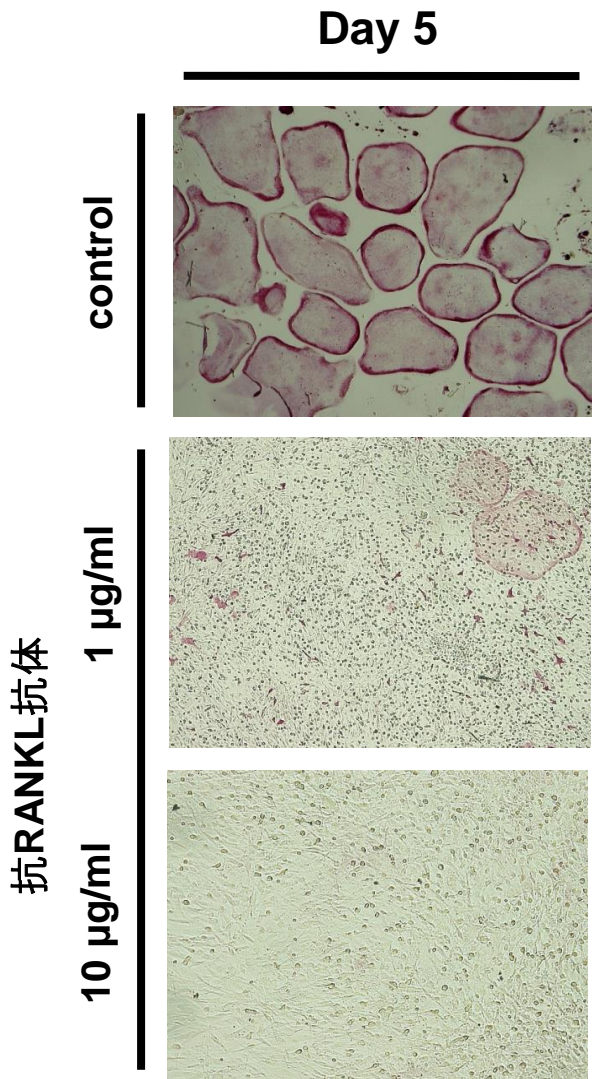


図3 実験プロトコール

12週齢雌性・C57/BL6マウスを5群に分け、4群に対して両側卵巣摘出術 (ovariectomy; OVX) を施行し、1群に対して偽手術 (sham operation) を施行した。OVX術後4週間後に、薬剤を投与しないOVX群、抗RANKL抗体 (単回皮下注射、5 mg/kg) を投与したAb群、テリパラチド (4週間連日皮下注射、80 µg/kg/day) を投与したPTH群、抗RANKL抗体 (単回皮下注射、5 mg/kg) とテリパラチド (4週間連日皮下注射、80 µg/kg/day) の両薬剤を投与したAb + PTH群及び偽手術を行ったSham群の計5群を設定した。全ての群でOVX及びSham術後8週後に屠殺した。術後8週時に骨密度の測定、後眼窩から採血、骨組織として大腿骨を採取した。

A



B

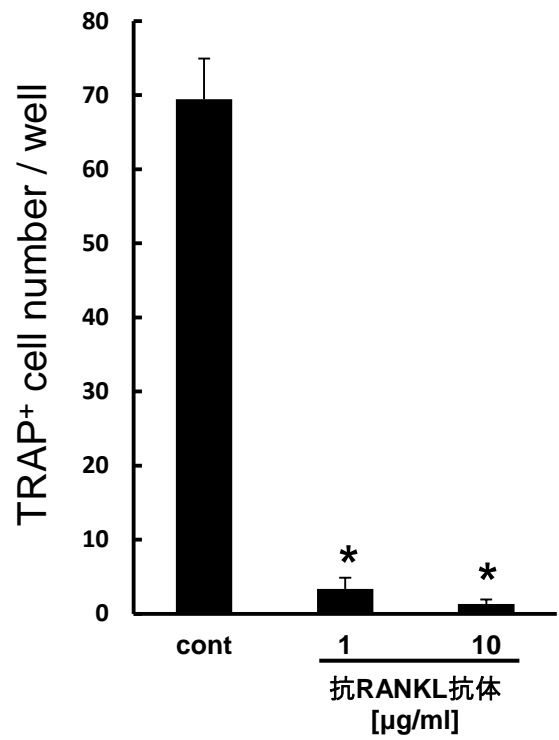
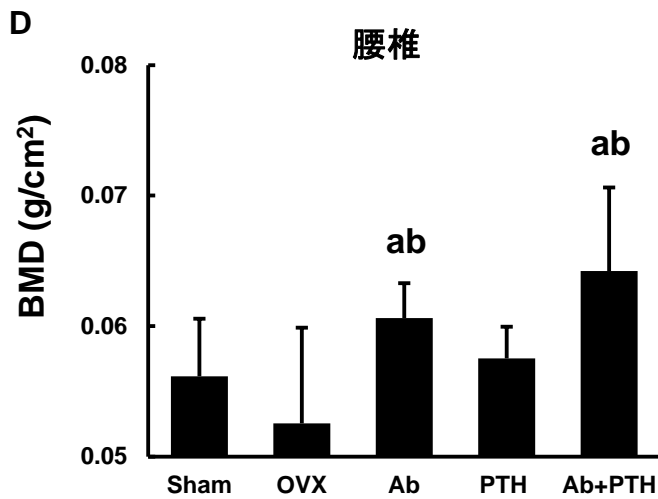
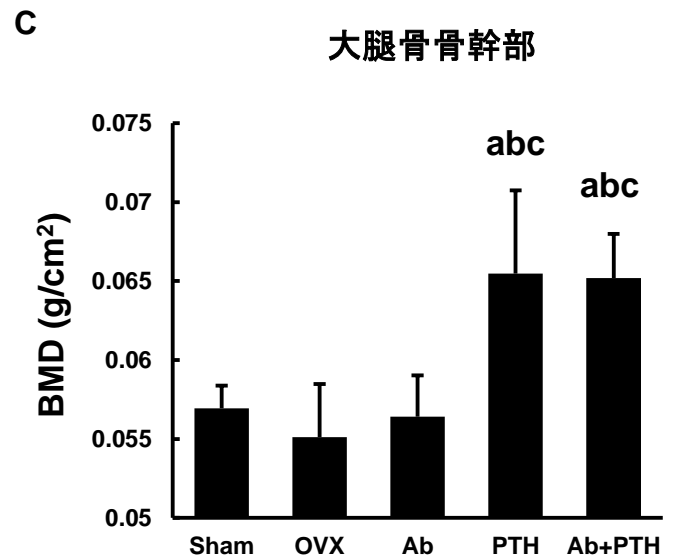
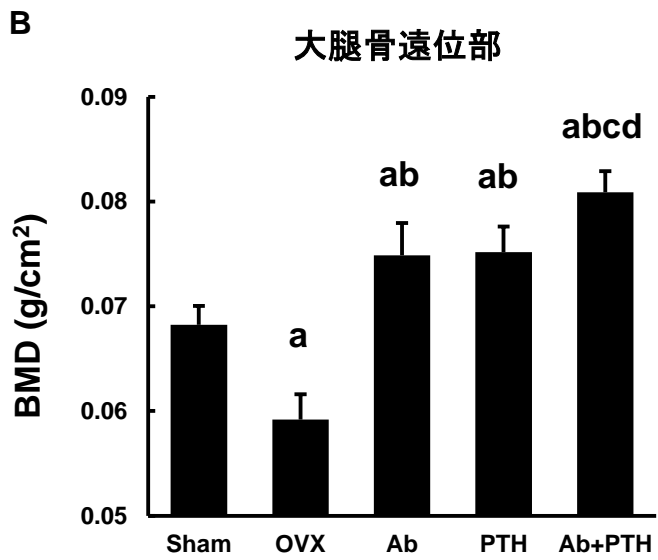
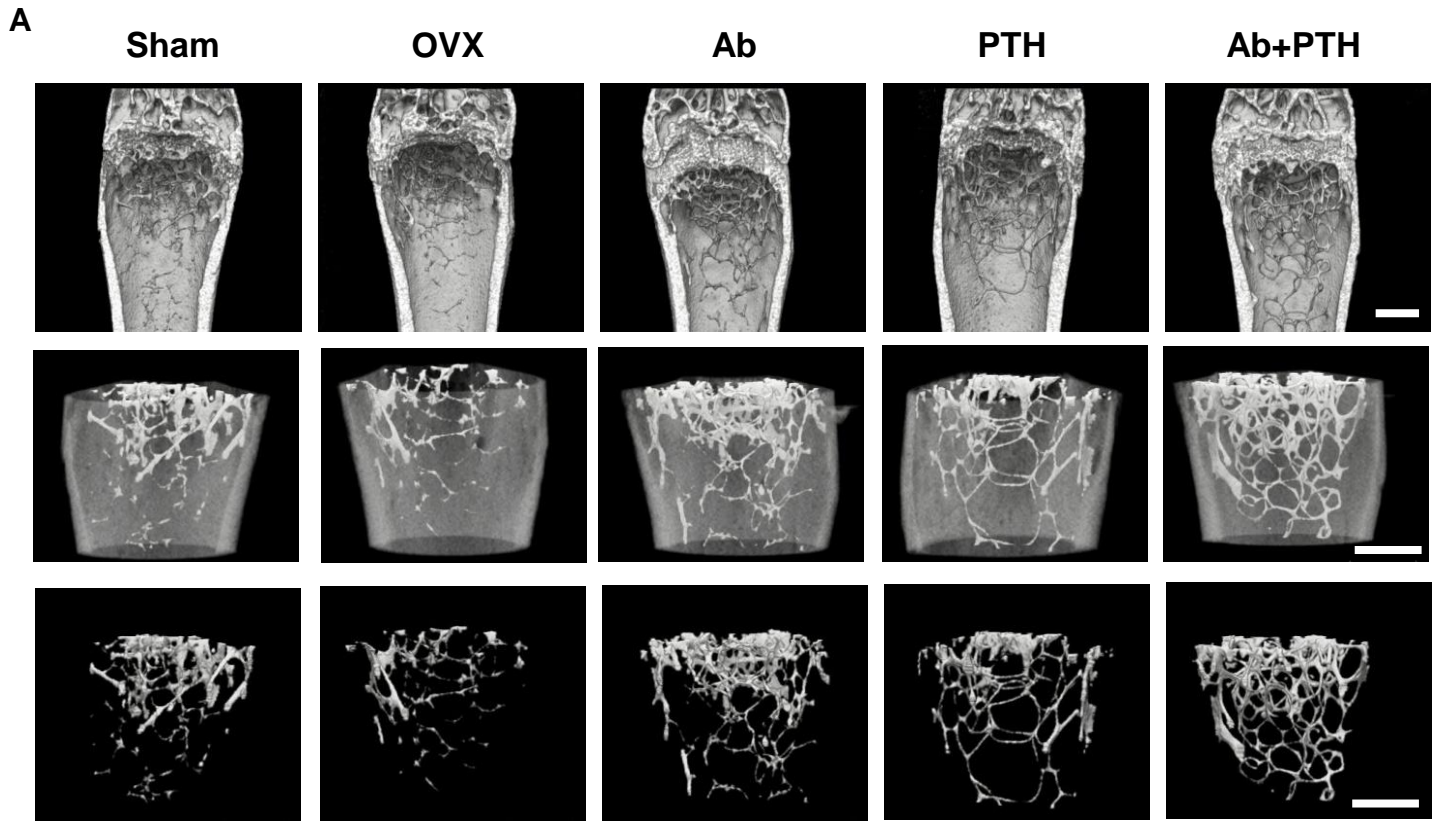


図5 破骨細胞分化における抗RANKL抗体の影響

A TRAP染色 (Day 5)による破骨細胞分化の比較。抗RANKL抗体添加により破骨細胞分化が抑制されていることが分かる。

B Day 5における1 well毎の成熟破骨細胞数。 * $p < 0.01$ vs control.

图 5



(a) $p < 0.01$ vs. Sham,
 (b) $p < 0.01$ vs. OVX,
 (c) $p < 0.01$ vs. Ab,
 (d) $p < 0.01$ vs. PTH.

図5 閉経後骨粗鬆症マウスモデルにおける抗RANKL抗体及びPTHの影響

A Sham群、OVX群、Ab群、PTH群、Ab+PTH群における術後8週時の典型的なマイクロCT画像。Scale bars: 800 μ m。

B 術後8週時、すなわち抗RANKL抗体及びPTH投与開始4週後の大腿骨遠位部骨密度。(a) $p < 0.01$ vs. Sham, (b) $p < 0.01$ vs. OVX, (c) $p < 0.01$ vs. Ab, (d) $p < 0.01$ vs. PTH.

C 術後8週時、すなわち抗RANKL抗体及びPTH投与開始4週後の大腿骨骨幹部骨密度。(a) $p < 0.01$ vs. Sham, (b) $p < 0.01$ vs. OVX, (c) $p < 0.01$ vs. Ab.

D 術後8週時、すなわち抗RANKL抗体及びPTH投与開始4週後の腰椎骨密度。(a) $p < 0.05$ vs. Sham, (b) $p < 0.05$ vs. OVX. データを平均値と標準偏差で示す。

図6

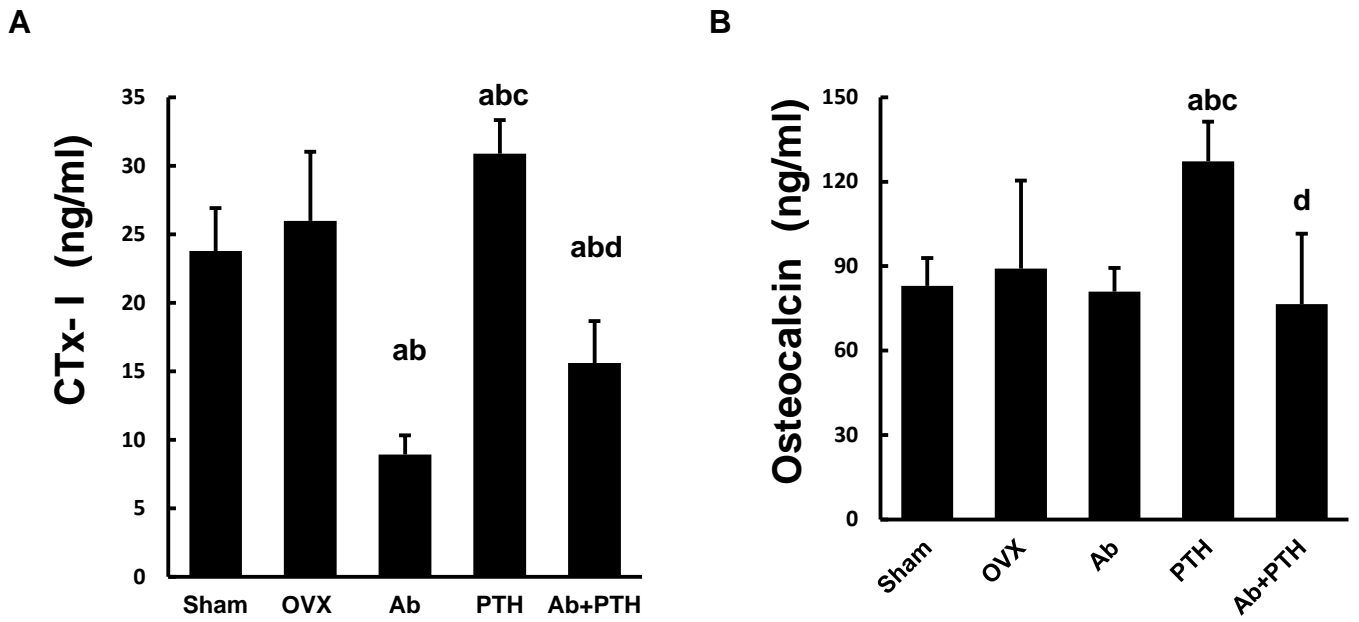


図6 血清骨代謝マーカー

A 血清CTx-I

B 血清オステオカルシン

(a) $p < 0.01$ vs. Sham, (b) $p < 0.01$ vs. OVX, (c) $p < 0.01$ vs. Ab, (d) $p < 0.01$ vs. PTH. データを平均値と標準偏差で示す。

図7

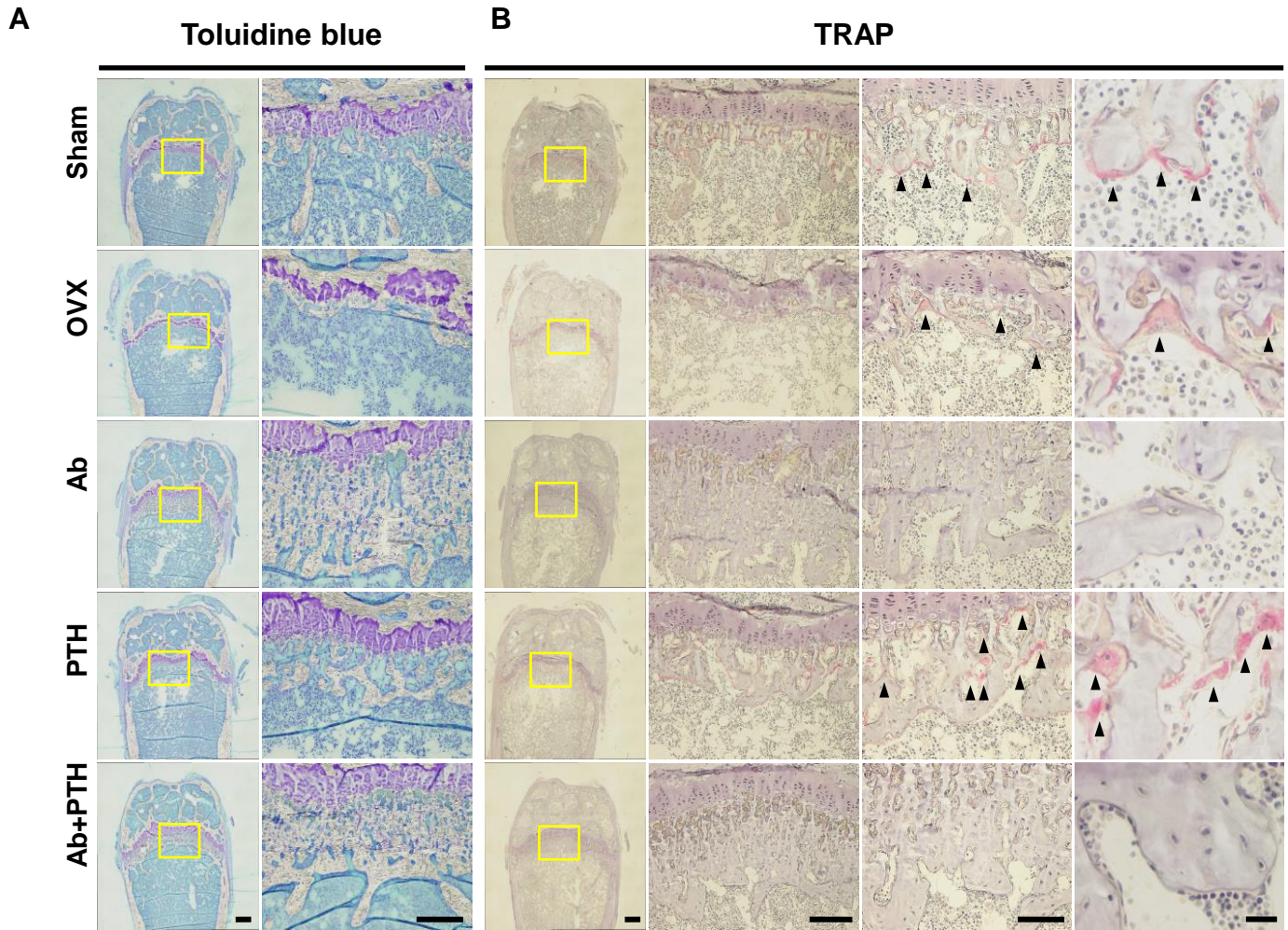


図7 大腿骨遠位部組織像 トルイジンブルー染色及びTRAP染色

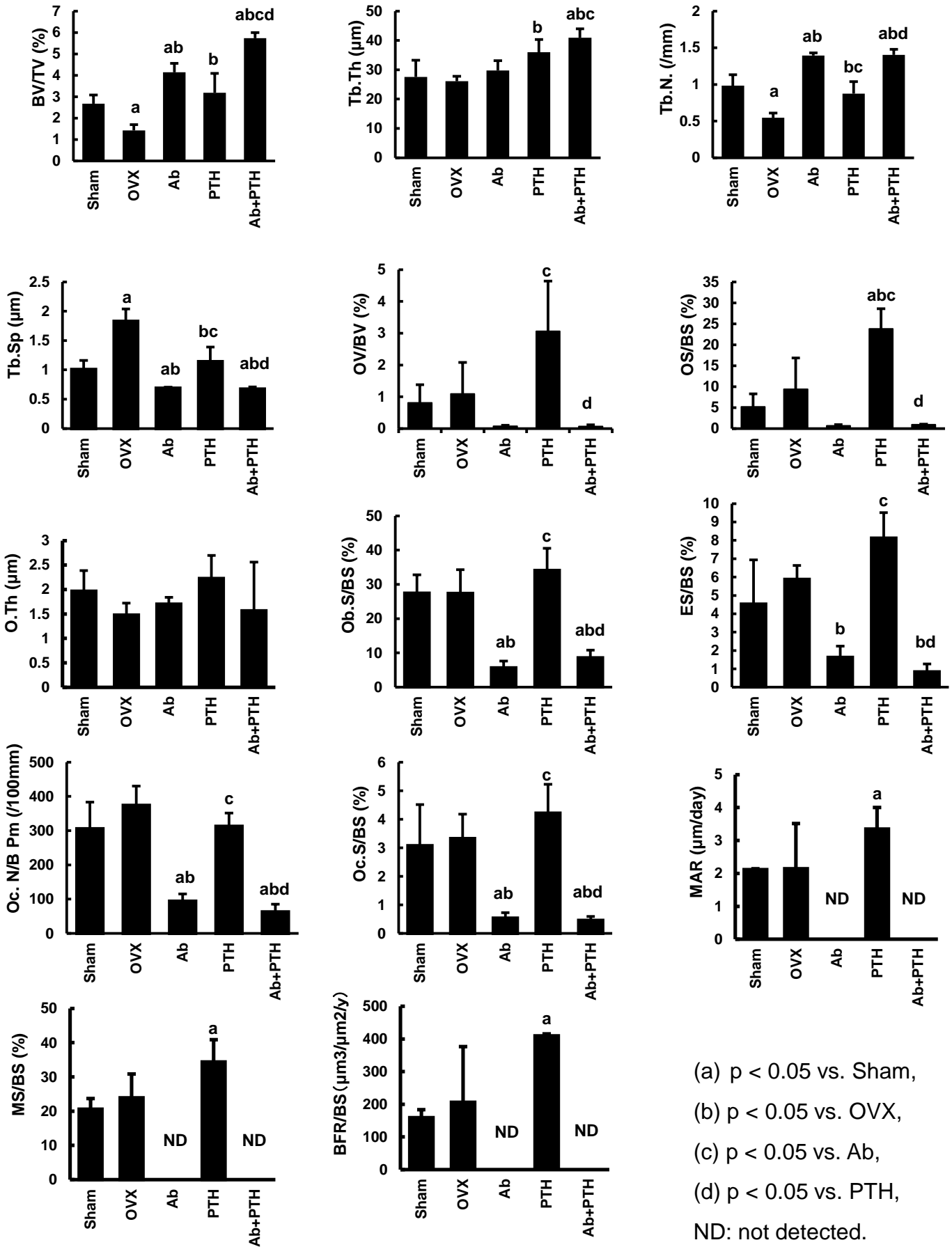
A トルイジンブルー染色

各群とも左側:弱拡大(Bars: 100 μ m)、右側:強拡大(Bars: 50 μ m)。

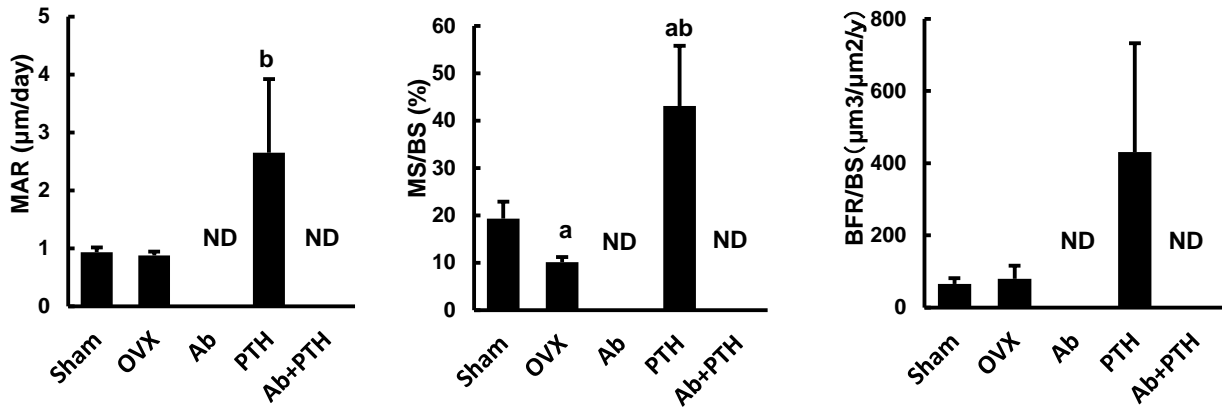
B TRAP 染色

各群とも左側:弱拡大(Bars: 100 μ m)、中央:強拡大(Bars: 50 μ m)、右側:強拡大(Bar: 20 μ m)。黒色の矢印()は破骨細胞を示す。

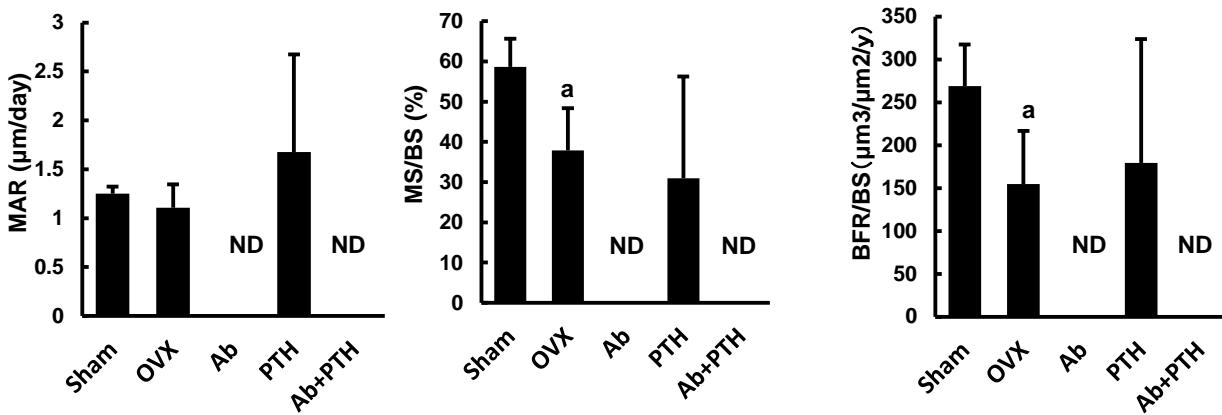
A



Periosteal surface of cortical bone



Endosteal surface of cortical bone



(a) $p < 0.05$ vs. Sham, (b) $p < 0.05$ vs. OVX, ND: not detected.

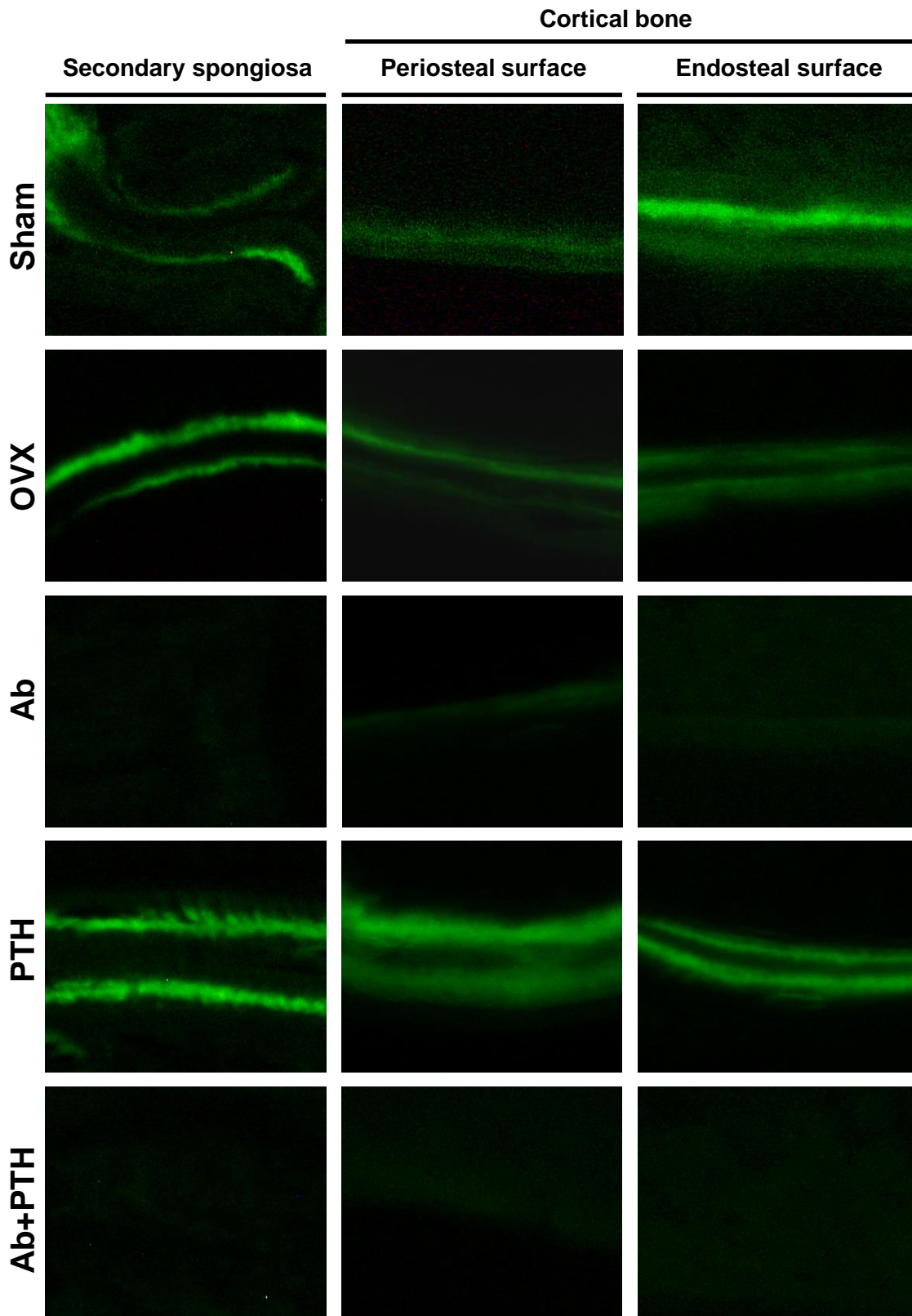


図8 大腿骨遠位部及び大腿骨骨幹部の骨形態計測

A 大腿骨遠位部骨形態計測

骨形態計測パラメータ: 骨量(BV/TV, %), 骨梁幅(Tb.Th, μm), 骨梁数 (Tb. N./mm), 骨梁間隙 (Tb.S., μm), 類骨量(OV/BV, %), 類骨面(OS/BS, %), 類骨幅(O.Th, μm), 骨芽細胞面 (Ob.S/BS, %), 吸収面(ES/BS, %), 破骨細胞数(Oc N./B. Pm./100 mm), 破骨細胞面 (Oc.S/BS, %), 骨石灰化速度(MAR, $\mu\text{m}/\text{day}$), 骨石灰化面(MS/BS, %), 骨形成速度(BFR/BS, $\text{mm}^3/\text{mm}^2/\text{year}$). ND: not detected. (a) $p < 0.05$ vs. Sham, (b) $p < 0.05$ vs. OVX, (c) $p < 0.05$ vs. Ab, (d) $p < 0.05$ vs. PTH. データを平均値と標準偏差で示す.

B 大腿骨骨幹部骨形態計測

ND: not detected. (a) $p < 0.05$ vs. Sham, (b) $p < 0.05$ vs. OVX. データを平均値と標準偏差で示す.

C 典型例における二重ラベル像(テトラサイクリン及びカルセインによる)

標識物質によるラベル(図中の緑色の線)は、骨芽細胞によって形成された類骨に石灰沈着が起こったことを意味し、二重ラベル間の距離は骨石灰化速度、骨石灰化面、骨形成速度を正比例の関係で反映する。PTH群において二重ラベル間の距離が大きいものに対して、Ab群及びAb+PTH群においてラベルそのものがほぼ観察されない。

図 9

	分化・活性化への影響		骨量に影響した領域		骨密度
	破骨細胞	骨芽細胞	1次海綿骨	2次海綿骨	
Ab	↓↓	→	増加	変化なし	+
PTH	↑	↑	変化なし	増加	+
Ab+PTH	↓↓	↑	増加	増加	++

↑:促進 ↓:抑制

図 9 抗RANKL抗体とPTHの併用による破骨細胞・骨芽細胞への作用機序

抗RANKL抗体(Ab)は、破骨細胞分化を強力に抑制する一方、骨芽細胞の持つ破骨細胞を介さない直接的な骨形成(モデリング)は阻害せず、組織学的には1次海綿骨の増加により骨密度を上昇させる。PTHは破骨細胞・骨芽細胞の両者の分化・活性化を促進し、それらのカップリングによる骨形成(リモデリング)が亢進し、組織学的には2次海綿骨の増加により骨密度を上昇させる。Ab+PTHでは、Abによる破骨細胞分化の強力な抑制とPTHによる骨芽細胞分化促進が起きた結果、1次海綿骨及び2次海綿骨の増加し、相加的に骨密度を上昇させると考えられる。