

論文の内容の要旨

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

【背景】

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保つことで恒常性を維持している。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。RANKL (receptor activator of nuclear factor κ B ligand) 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発見された。これまでの基礎研究からRANKLが破骨細胞分化・活性化にきわめて重要かつ特異的な役割を果たすことが明らかとなった。

臨床的な側面からは、閉経後骨粗鬆症、関節リウマチ、転移性骨腫瘍などにおいて、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。したがってこれらの病態において、RANKLの制御は有効な治療法の一つであると考えられる。骨粗鬆症は、超高齢社会を迎えた我が国をはじめ、その患者数は世界的に増加の一途をたどり、我が国では現在、閉経後女性を中心に1300万人近い患者が存在し、骨粗鬆症が原因となる大腿骨近位部骨折の発生は年間15万人にも上る。このような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、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その対策は大きな課題となっている。

これらの背景のもと、近年ヒト型抗RANKL抗体であるデノスマブが開発され、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。骨粗鬆症による脆弱性骨折の予防に対しても、デノスマブが有効な治療薬であることが報告されている。しかしデノスマブの生体内における作用機序には未解明な部分がまだ多く、他の薬剤との相互作用にも未解明な点が残されている。

現在の骨粗鬆症治療薬のほとんどは、ビスホスホネートなどの骨吸収抑制薬であるが、PTH製剤であるテリパラチド[ヒト遺伝子組み換えPTH(1-34)]の間欠注射は、現在使用可能な唯一の骨形成促進薬として臨床的に応用されている。新規の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、骨密度が相加的に増加することが臨床的に報告さ

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による効果について詳細に解析した。

【方法】

まず、抗 RANKL 抗体の破骨細胞分化に関する影響を検証するため、*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を、破骨細胞を共存培養系にて培養し解析した。抗 RANKL 抗体を添加しない通常の培養液のみで培養したコントロール群、培養開始から一定濃度で抗 RANKL 抗体を添加した群を設定し、破骨細胞共存培養系にてコントロール群において大多数の破骨細胞が成熟に至った Day 5 の時点で TRAP 染色を行ったところ、コントロール群で破骨細胞が多数存在していたのに対して、抗 RANKL 抗体を添加した群ではコントロール群に比して濃度依存性に破骨細胞分化が有意に抑制されていた。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判明した。

次に閉経後骨粗鬆症モデルマウス (OVX マウス) における抗 RANKL 抗体及び PTH が骨代謝に及ぼす影響を解析した。3 カ月齢の雌性 C57BL/6 マウスに対して両側卵巣摘出術または偽手術を実施しそれぞれ OVX 群、Sham 群とした。OVX 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、Sham 群と合わせて合計 5 群を設定した。各群とも手術実施 8 週後に屠殺し、大腿骨遠位部、大腿骨骨幹部及び腰椎の骨密度測定を行った。また同時点で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、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測定した。

【結果】

骨密度は大腿骨遠位部においては、Ab 群及び PTH 群では OVX 群と比較して有意に増加し、Ab +PTH 群では Ab 群及び PTH 群と比較し有意に増加していた。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 Ab 群より有意に骨密度が増加した。また皮質骨を多く含む大腿骨骨幹部では、Ab 群と比較して PTH 群及び Ab+PTH 群では有意に骨密度が増加した。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、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。骨代謝回転に関しては骨代謝マーカー測定結果から、閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおいて抗 RANKL 抗体によって高度に骨代謝回転は抑制され、テリパラチドを併用しても、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。

組織学的解析では大腿骨遠位部の Toluidine-Blue 染色において、Ab 群、PTH 群、Ab+PTH 群では OVX 群に比較して骨幹部領域で骨量が増加していた。骨量が増加した領域に着目すると、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

綿骨領域の骨量が増加し、さらに Ab+PTH 群では一次海綿骨及び二次海綿骨領域の両領域で共に骨量が増加していた。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。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。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。

【考察】

閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおいては組織学的解析から海綿骨を多く含む大腿骨遠位部では、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が示唆された。アレンドロネートなどのビスホスホネートの骨密度増加作用が数年で頭打ちになるのに対して、デノスマブは臨床研究で 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が、そのメカニズムとして、リモデリングは阻害するがモデリングを阻害しないことが想定される。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、そして抗 RANKL 抗体を投与している場合にテリパラチドを追加投与することで、相加的な骨密度増加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。