

論文要旨等報告書

氏	佐藤 晃子
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3585 号
学位授与の日付	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医歯学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	骨粗鬆症モデルマウスにおける1,4-dihydroxy-naphthoic acid(DHNA)の骨吸収抑制効果についての研究

論文審査委員 教授 福井 一博 教授 菅原 利夫 准教授 上岡 寛

学位論文内容の要旨

〔目的〕骨はリモデリングによって常に骨量が一定に保つよう調節機構が働いている。しかし、骨芽細胞と破骨細胞のバランスが崩れると骨代謝異常から骨粗鬆症を引き起こす。骨粗鬆症の発症に関与する因子として、加齢及び性ホルモンの低下、ステロイドホルモンや免疫抑制剤の投与による副作用等が挙げられる。Fukunagaらは、臓器移植患者への免疫抑制剤投与により、骨粗鬆症が発症することに注目し、免疫抑制剤 FK506 を一定量連日投与することで、再現性のある骨粗鬆症モデルマウスを確立した。一方、プロピオン酸菌 (*Propionibacterium freudenreichii* ET-3) の発酵産物から、1,4-dihydroxy-naphthoic acid (DHNA) が見出された。この DHNA は、一般的に臨床で骨粗鬆症治療に使われているビタミン K₂ と同じナフトキノン骨格を有している。そこで、骨粗鬆症モデルマウスに DHNA を投与し、DHNA の骨吸収抑制効果について検証した。

〔方法〕実験動物として6週齢雄性マウス各10匹を対照群、実験群1、実験群2の3群に分けた。対照群に生理食塩水を腹腔内投与し、実験群1、実験群2に骨粗鬆症モデルマウスを作製するためにFK506を腹腔内に投与した。さらに、対照群、実験群1には、0.002%DMSO,実験群2には0.002%DMSOで溶解したDHNAを経口投与した。各群5週間の連日投与を行い、骨吸収抑制効果を確認するために、組織学的検討、血液生化学的検討、骨密度測定をした。また、骨粗鬆症モデルマウスではB細胞の関与により、破骨細胞の形成が促進されるという報告から、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色とB細胞観察のためにCD45R/B220モノクローナル抗体を用い免疫組織化学的染色を行った。なお、TRAP染色、免疫組織化学的染色には大腿骨遠位骨幹端部の連続切片を用いて観察した。また、TRAP陽性細胞とB細胞をそれぞれ5枚の標本にて一視野あたりの平均細胞数を計測し有意差検定を行った。さらに、骨粗鬆症モデルマウスでのDHNAの骨吸収抑制と免疫系の効果を検討する目的で、フローサイトメーターを用いてB220抗体でB細胞、CD3抗体でT細胞をそれぞれ標識し各群のリンパ球に占めるB細胞とT細胞の割合を計測し検討を行った。

〔結果〕実験群1は対照群、実験群2と比較して組織学的には骨端軟骨から骨髄側へ延びる骨梁および骨髄内の骨梁が少ない傾向を認めた。それに伴い、骨密度は実験群1では対照群、実験群2と比較して減少を認めた。また、実験群1では、対照群、実験群2と比較してTRAP陽性破骨細胞が多く観察され、免疫組織化学的検討ではB細胞が多く観察された。また、TRAP陽性破骨細胞数、B細胞数は有意に増加していた。さらに、実験群1ではTRAP陽性破骨細胞の近傍にB細胞が集積することが観察された。血液生化学的検討では実験群1では、対照群、実験群2と比較して血清中のTRAP濃度、RANKL濃度は増加した。さらに、フローサイトメーターを用いてリンパ球に占めるB細胞、T細胞の割合を計測したところ、実験群1では、有意にB細胞が高い値を示し、逆にT細胞は低い値を示したが、対照群、実験群2では、T細胞が高い値を示し、B細胞は低い値を示した。

〔考察〕本研究で、骨粗鬆症モデルマウスにDHNAを投与するとFK506による骨粗鬆症を改善する効果があることが明らかとなった。

これは、メナキノン類（ビタミンK2=MK-n）の前駆物質であるDHNAの投与により体内でDHNAがメナキノン-4（MK-4）に一部変換されることで、骨形成が促進されたのではないかと考えられた。また、骨粗鬆症モデルマウスの場合、骨吸収にB細胞が関与している可能性が示唆された。T細胞が抑制された状態では、リンパ球も占めるT細胞自身の割合も減少していたことから、B細胞の関与を考え、TRAP陽性破骨細胞とB細胞の局在の結果から、B細胞と歯骨細胞の間にシグナル伝達が存在する可能性を示唆した。

〔結語〕FK506投与により発症した骨粗鬆症モデルマウスにDHNAを投与すると、骨梁減少が改善され、骨吸収の抑制傾向を認めた。FK506投与によるT細胞の減少、B細胞の増加という免疫状態の変化をDHNAが補正することにより骨吸収を抑制する可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

骨粗鬆症の発症に関与する因子として、加齢及び性ホルモンの低下、ステロイドホルモンや免疫抑制剤の投与による副作用等が挙げられる。その中で、免疫抑制剤 FK506 による骨粗鬆症に注目し、免疫抑制剤 FK506 を一定量連日投与することで、再現性のある骨粗鬆症モデルマウスが確立された。一方、プロピオン酸菌 (*Propionibacterium freudenreichii ET3*) の発酵産物から、1,4-dihydroxy-naphthoic acid (DHNA) が見出された。この二つの報告から、DHNA は、メナキノンの前駆物質で、構造式から、ビタミン K₂ と同じナフトキノン骨格を持っていることに注目した。このビタミン K₂ は一般的に骨粗鬆症治療薬にも使用されている。そこで、本研究では骨粗鬆症モデルマウスに DHNA を投与し、DHNA の骨吸収抑制効果について検証し、以下の結論を得ている。

1. 本研究で、骨粗鬆症モデルマウスに DHNA を投与すると FK506 による骨粗鬆症を改善する効果があることが明らかとした。これは、メナキノン (ビタミン K₂=MK-n) の前駆物質である DHNA の投与により、体内でメナキノン-4 に一部変換されることで、破骨細胞活性を抑制することで骨形成が促進されたと考えている。

2 骨粗鬆症モデルマウスの場合、骨吸収に B 細胞が関与している可能性を示唆している。T 細胞が抑制された状態では、リンパ球に占める T 細胞自身の割合も減少していたことから、B 細胞の関与を考え、TRAP 陽性破骨細胞と B 細胞の局在を確認している。これは、B 細胞と破骨細胞の間にシグナル伝達が存在する可能性を推測している。

これらの知見は、DHNA が骨吸収抑制効果を示し、免疫細胞も関与している可能性を明らかとした研究である。よって、本論文は上記学位申請者(歯学)の学位論文に値するものと認めた。