

論文要旨

骨形成抑制因子であるスクレロスチン欠損マウスにおける
BMP-2 誘導性異所性骨の解析

中村 圭吾

大学院歯学独立研究科 健康増進口腔科学講座
(主指導教員:吉成 伸夫 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士(歯学)学位申請論文

Analysis of BMP-2-induced ectopic bone in
sclerostin-deficient mice

Keigo Nakamura

Oral Health Science, Department of Oral Health Promotion, Oral Science
Course, Matsumoto Dental University Graduate School of Oral Medicine,

(Chief Academic Adviser : Professor Nobuo Yoshinari)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

要旨

歯周炎は進行に伴い歯槽骨が吸収し、歯の喪失につながる疾患である。しかし現在の歯科治療では、高度に吸収された骨を完全に回復することは困難であり、歯槽骨の再生治療の発展が期待されている。近年、骨細胞から分泌されるスクレロスチンは、Wnt/ β -catenin シグナルを阻害し骨形成を阻害するタンパク質であることが報告された。スクレロスチンをコードする *SOST* 遺伝子の喪失は頭蓋骨における骨の過形成を特徴とする硬結性骨硬化症を引き起こす。スクレロスチンの働きを阻害する抗スクレロスチン抗体は骨形成を促進して骨量を増加することが報告されている。しかし、骨再生におけるスクレロスチン抑制の影響についての詳細は不明である。一方、骨誘導因子 (Bone morphogenetic protein 2, BMP-2) は、骨基質中に存在し、異所性骨形成を誘導するタンパク質である。本研究では、BMP-2 誘導性異所性骨におけるスクレロスチン発現を検討する。更に、スクレロスチン欠損マウスにおいて異所性骨を作製し、その骨量や骨密度が増加するかを検討することを目的とした。

Sost のプロモーター下に造礁サンゴ由来蛍光タンパク質 (Zs-Green) の遺伝子を挿入した *Sost-Green* レポーターマウス (*Sost*^{G/+}) が松本歯科大学総合歯科医学研究所にて作製された。この *Sost*^{G/+} マウスは Exon1 へのノックインマウスである。このノックインにより *Sost* 遺伝子が欠損した *Sost* 遺伝子ホモ欠損マウス (*Sost*^{G/G}) マウスを得た。コントロールマウス (Wild-type, WT) として C57BL/6 マウスを使用した。これらの 8 週齢雄マウスの右側大腿部内側の筋膜下に、BMP-2 を浸漬した直径 2 mm の円柱のコラーゲンペレットを埋入し、14 日、28 日後に誘導された異所性骨を採取した。マイクロ CT および各種染色により、異所性骨の組織学的解析を行った。また、異所性骨における *Sost* 遺伝子発現の経時的変化やスクレロスチン欠損マウスに埋入した異所性骨の骨形成関連遺伝子への影響を検討するために、埋入後 14 日目の異所性骨の mRNA 発現を real-time RT-PCR にて解析した。また、骨芽細胞マーカーとして、アルカリホスファターゼ (Alkaline phosphatase, ALP) の免疫染色を行った。

WT マウスの BMP-2 ペレットを埋入後 14 日目に回収した異所性骨は、直径 3-4 mm の球形の骨が形成された。埋入後 28 日目に回収した WT の異所性骨では、扁平な形状の骨が形成された。*Sost^{G/G}* の異所性骨は WT と同程度の大きさだが、凸凹な形状の骨が形成された。

外殻の骨組織の蛍光観察では、埋入後 14, 28 日目の *Sost^{G/G}* の異所性骨において、Zs-Green 陽性の骨細胞を認めたが、WT のマウスでは、Zs-Green 陽性の骨細胞は認められなかった。スクレロスチンの免疫染色では、BMP-2 ペレット埋入後 14, 28 日目の *Sost^{G/G}* の異所性骨においてスクレロスチン陽性骨細胞は認めなかったが、WT においてスクレロスチン陽性の骨細胞を認めた。以上より、WT マウスの BMP-2 誘導性異所性骨ではスクレロスチン陽性骨細胞が出現するが、*Sost^{G/G}* マウスの異所性骨ではスクレロスチン陽性骨細胞は消失していた。real-time RT-PCR による解析では、WT の異所性骨において *Sost* 遺伝子の発現は、埋入後 7 日目では検出されず、10, 14, 28 日目に検出され、14 日目にピークを示した。

マイクロ CT を用いて、形成された異所性骨の骨量と骨塩量を定量的に解析した。埋入後 14 日目の異所性骨のマイクロ CT 水平断面画像より、異所性骨の外殻に多孔質な石灰化像を認めた。WT と比較して *Sost^{G/G}* の異所性骨の BV/TV (WT=4.59%, *Sost^{G/G}*=9.04%) と BMD (WT=468 mg/cm³, *Sost^{G/G}*=602 mg/cm³) は有意に増加した。埋入後 28 日目の異所性骨のマイクロ CT 水平断面画像より、BMP ペレットを取り囲む外殻に層板様構造の石灰化像を認めた。WT と比較して *Sost^{G/G}* の異所性骨の BV/TV (WT=5.27%, *Sost^{G/G}*=9.58%) と BMD (WT=763 mg/cm³, *Sost^{G/G}*=943 mg/cm³) は有意に増加した。

以上の結果より、BMP-2 ペレット埋入後 14, 28 日目の異所性骨は、*Sost* 遺伝子とスクレロスチンタンパク質が発現していた。スクレロスチン欠損マウスにおいて、BMP-2 ペレット埋入後 14 日、28 日目の異所性骨の骨量が増加した。このことから、歯槽骨の再生治療において、スクレロスチンの抑制は、骨量を増加させる可能性が示された。

学位論文

骨形成抑制因子であるスクレロスチン欠損マウスにおける
BMP-2 誘導性異所性骨の解析

中村 圭吾

大学院歯学独立研究科 健康増進口腔科学講座
(主指導教員:吉成 伸夫 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士(歯学)学位申請論文

Analysis of BMP-2-induced ectopic bone in
sclerostin-deficient mice

Keigo Nakamura

Oral Health Science, Department of Oral Health Promotion, Oral Science
Course, Matsumoto Dental University Graduate School of Oral Medicine,
(Chief Academic Adviser : Professor Nobuo Yoshinari)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

要旨

歯周炎は進行に伴い歯槽骨が吸収し、歯の喪失につながる疾患である。しかし現在の歯科治療では、高度に吸収された骨を完全に回復することは困難であり、歯槽骨の再生治療の発展が期待されている。近年、骨細胞から分泌されるスクレロスチンは、Wnt/ β -catenin シグナルを阻害し骨形成を阻害するタンパク質であることが報告された。スクレロスチンをコードする *SOST* 遺伝子の喪失は頭蓋骨における骨の過形成を特徴とする硬結性骨硬化症を引き起こす。スクレロスチンの働きを阻害する抗スクレロスチン抗体は骨形成を促進して骨量を増加することが報告されている。しかし、骨再生におけるスクレロスチン抑制の影響についての詳細は不明である。一方、骨誘導因子 (Bone morphogenetic protein 2, BMP-2) は、骨基質中に存在し、異所性骨形成を誘導するタンパク質である。本研究では、BMP-2 誘導性異所性骨におけるスクレロスチン発現を検討する。更に、スクレロスチン欠損マウスにおいて異所性骨を作製し、その骨量や骨密度が増加するかを検討することを目的とした。

Sost のプロモーター下に造礁サンゴ由来蛍光タンパク質 (Zs-Green) の遺伝子を挿入した *Sost-Green* レポーターマウス (*Sost*^{G/+}) が松本歯科大学総合歯科医学研究所にて作製された。この *Sost*^{G/+} マウスは Exon1 へのノックインマウスである。このノックインにより *Sost* 遺伝子が欠損した *Sost* 遺伝子ホモ欠損マウス (*Sost*^{G/G}) マウスを得た。コントロールマウス (Wild-type, WT) として C57BL/6 マウスを使用した。これらの 8 週齢雄マウスの右側大腿部内側の筋膜下に、BMP-2 を浸漬した直径 2 mm の円柱のコラーゲンペレットを埋入し、14 日、28 日後に誘導された異所性骨を採取した。マイクロ CT および各種染色により、異所性骨の組織学的解析を行った。また、異所性骨における *Sost* 遺伝子発現の経時的変化やスクレロスチン欠損マウスに埋入した異所性骨の骨形成関連遺伝子への影響を検討するために、埋入後 14 日目の異所性骨の mRNA 発現を real-time RT-PCR にて解析した。また、骨芽細胞マーカーとして、アルカリホスファターゼ (Alkaline phosphatase, ALP) の免疫染色を行った。

WT マウスの BMP-2 ペレットを埋入後 14 日目に回収した異所性骨は、直径 3-4 mm の球形の骨が形成された。埋入後 28 日目に回収した WT の異所性骨では、扁平な形状の骨が形成された。*Sost*^{G/G} の異所性骨は WT と同程度の大きさだが、凸凹な形状の骨が形成された。

外殻の骨組織の蛍光観察では、埋入後 14, 28 日目の *Sost*^{G/G} の異所性骨において、Zs-Green 陽性の骨細胞を認めたが、WT のマウスでは、Zs-Green 陽性の骨細胞は認められなかった。スクレロスチンの免疫染色では、BMP-2 ペレット埋入後 14, 28 日目の *Sost*^{G/G} の異所性骨においてスクレロスチン陽性骨細胞は認めなかったが、WT においてスクレロスチン陽性の骨細胞を認めた。以上より、WT マウスの BMP-2 誘導性異所性骨ではスクレロスチン陽性骨細胞が出現するが、*Sost*^{G/G} マウスの異所性骨ではスクレロスチン陽性骨細胞は消失していた。real-time RT-PCR による解析では、WT の異所性骨において *Sost* 遺伝子の発現は、埋入後 7 日目では検出されず、10, 14, 28 日目に検出され、14 日目にピークを示した。

マイクロ CT を用いて、形成された異所性骨の骨量と骨塩量を定量的に解析した。埋入後 14 日目の異所性骨のマイクロ CT 水平断面画像より、異所性骨の外殻に多孔質な石灰化像を認めた。WT と比較して *Sost*^{G/G} の異所性骨の BV/TV (WT=4.59%, *Sost*^{G/G}=9.04%) と BMD (WT=468 mg/cm³, *Sost*^{G/G}=602 mg/cm³) は有意に増加した。埋入後 28 日目の異所性骨のマイクロ CT 水平断面画像より、BMP ペレットを取り囲む外殻に層板様構造の石灰化像を認めた。WT と比較して *Sost*^{G/G} の異所性骨の BV/TV (WT=5.27%, *Sost*^{G/G}=9.58%) と BMD (WT=763 mg/cm³, *Sost*^{G/G}=943 mg/cm³) は有意に増加した。

以上の結果より、BMP-2 ペレット埋入後 14, 28 日目の異所性骨は、*Sost* 遺伝子とスクレロスチンタンパク質が発現していた。スクレロスチン欠損マウスにおいて、BMP-2 ペレット埋入後 14 日、28 日目の異所性骨の骨量が増加した。このことから、歯槽骨の再生治療において、スクレロスチンの抑制は、骨量を増加させる可能性が示された。

緒言

我が国の永久歯の抜歯原因調査（2018年）によると、歯周病は抜歯の主原因で最も多く、37%を占めている¹⁾。歯周病は口腔内常在細菌によって引き起こされる感染症で、歯周組織を破壊する疾患である²⁾。進行すると歯を支持する組織である歯肉結合組織、歯根膜、歯槽骨に炎症が波及し、歯の動揺が重度となり、最終的に抜歯に至る。歯周病治療において、喪失した歯周組織を再生させることが重要な課題である。1900年代から骨移植を中心として、歯周組織を再生させる試みが行われてきた³⁾。現在、歯周組織再生療法として骨移植術⁴⁾、組織再生誘導法（Guided tissue regeneration technique, GTR法⁵⁾、Enamel matrix protein, 線維芽細胞増殖因子（Fibroblast growth factors-2, FGF-2⁶⁾）を応用した術式が普及している。これらの治療法は骨欠損の軽度な2壁性または3壁性骨欠損に対して有効である。しかし、水平性骨吸収等の重度骨欠損症例においては有効性に限界があり、骨形成能を有する治療が望まれている。

Wnt/ β -catenin シグナルは骨芽細胞の分化を促進して、骨形成を促進することが報告されている^{7,8)}。Wnt が受容体に結合すると、細胞質に β -catenin が蓄積して、その β -catenin は核内に移行し、T-cell factor/Lymphoid enhancer factor と結合して、標的遺伝子の転写を活性化する⁹⁾。一方、骨細胞から分泌されるスクレロスチンは、Wnt 共受容体の LRP5 に結合して Wnt/ β -catenin シグナルを阻害し、その結果骨形成を阻害する。スクレロスチンをコードする *SOST* 遺伝子は、2001年にアフリカにおける硬結性骨化症（sclerosteosis）のファミリーより発見された¹⁰⁾。硬結性骨化症とは、進行性の骨格異常増殖を特徴とする常染色体潜性（劣性）遺伝疾患である。臨床的所見として、巨人症、下顎骨の過成長、顔面の歪み、脳神経の圧迫、顔面神経麻痺、難聴、頭蓋冠拡大による頭蓋内圧の亢進、大後頭孔の狭窄による突然死、合指症などがある¹⁰⁾。同様に、*Sost* 遺伝子欠損マウスでは頭蓋骨や長管骨で骨量の増加を呈する¹¹⁾。これらの報告より、スクレロスチンの変異や欠損は Wnt/ β -catenin シグナルを活性化させ、骨量を増加させることが示されている。

抗スクレロスチン抗体は、スクレロスチンの作用を阻害して、骨形成を促進する¹²⁾。抗スクレロスチン抗体は、骨粗鬆症に対する臨床試験の第三相試験としてFRAME試験¹³⁾とARCH試験¹⁴⁾が行われた。FRAME試験では、最初の1年間にプラセボ対照群あるいは抗スクレロスチン抗体が投与され、続く2年間は抗RANKL抗体（デノスマブ）が投与された。抗スクレロスチン抗体投与1年間の時点で、新規椎体骨折の症例数はプラセボ群と比較して有意に低値であった。その後デノスマブ投与1年目の時点において、抗スクレロスチン抗体投与群は、プラセボ群と比較して3倍以上の椎体骨密度増加を示した¹³⁾。ARCH試験では、最初の1年間に抗スクレロスチン抗体またはアレンドロン酸（第二世代ビスホスホネート）が投与され、その後の2年間は両群にアレンドロン酸が投与された。その結果、抗スクレロスチン抗体治療群の新規骨折の患者率は、アレンドロン酸治療群に比較して約半分であり、抗スクレロスチン抗体投与による骨密度は2倍強の増加率を示した¹⁴⁾。日本では新規の骨粗鬆症治療薬として2019年に薬事承認され、臨床応用が開始された。しかし、骨再生におけるスクレロスチン抑制の影響についての詳細は依然として不明である。

骨誘導因子（Bone morphogenetic protein 2, BMP-2）は骨基質中に含まれるタンパク質で、骨芽細胞の分化を促進し、骨形成を誘導する因子であり、1984年にUristによってウシ脱灰骨から発見された¹⁵⁾。In vivoにおいてBMP-2は軟骨の形成を促進し、骨組織を誘導することが報告されている¹⁶⁾。BMP-2を徐放性の担体と共に筋膜下あるいは皮下に埋植すると、血流を介して局所に未分化間葉細胞が誘導され、その後軟骨細胞に分化する。次いで、軟骨組織内に血管侵入が生じ、肥大化した軟骨細胞の吸収と並行して、骨新生が認められる。最後に骨髄が形成され、骨リモデリングを呈する骨の形成に至る¹⁷⁾。このようなメカニズムにより、BMPを生体に移植することで、異所性に骨を形成させることができる。BMPは歯周組織再生に利用する試みがなされている¹⁸⁾。

本研究では、骨再生におけるスクレロスチン抑制の影響を検討するための基礎的研究として、骨新生における*Sost*遺伝子およびスクレロスチンタンパクの発現の経時的変化と、その影響を明らかにすることを目的とした。さらに、

スクレロシン欠損マウスにおいて、骨新生モデルとして BMP-2 誘導性異所性骨を作製し、骨量や骨密度が増加するかを検討した。

実験材料および方法

1. マウスおよび試薬

Sost のプロモーター下に造礁サンゴ由来蛍光タンパク質 (*Zoanthus* sp. green fluorescent protein, Zs-Green) の遺伝子を挿入した *Sost-Green* レポーターマウス (*Sost*^{G/+}) が松本歯科大学総合歯科医学研究所にて作製された。この *Sost*^{G/+} マウスは, Exon1 へのノックインにより *Sost* 遺伝子をヘテロ欠損させたマウスである¹⁹⁾。 *Sost*^{G/+} マウスを交配し, *Sost* 遺伝子ホモ欠損マウス (*Sost*^{G/G}) マウスを得た。コントロールマウス (Wild-type, WT) として C57BL/6 マウス (日本 SLC, 静岡) を使用した。これらのマウスは松本歯科大学ハイテクセンター内の動物飼育室にて飼育し, 8 週齢の雄性マウスを用いた。本研究は松本歯科大学動物実験委員会の承認の上, 同大学動物実験取り扱い規定に基づいて行った (承認番号 371)。異所性骨の作製に用いたコラーゲンシートは Zimmer (東京) より購入した。rhBMP-2 はオリエンタル酵母工業 (東京) より供与を受けた。免疫組織学的解析に使用したヤギ血清は Merck (Darmstadt, Germany), ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin, BSA) は和光純薬工業 (大阪), 内因性ペルオキシダーゼのブロッキング用薬の Dako Real は Dako (Santa Clara, USA) より購入した。次に一次抗体として, 抗スクレロスチン抗体は R&D system (Minneapolis, USA), 抗アルカリホスファターゼ (Alkaline phosphatase, ALP) 抗体は Abcam (Cambridge, UK), 抗 β -catenin 抗体は Cell Signaling Technology (Danvers, USA) より購入した。二次抗体として, ヒストファインシンプルシステムマウス MAX-PO (Rabbit) はニチレイバイオサイエンス (東京), Horseradish peroxidase (HRP) 標識二次抗体の抗ヤギ HRP は Santa cruz (Dallas, USA) より購入した。また, ヒストファインキット DAB 基質キット (DAB) はニチレイバイオサイエンス (東京) より購入した。

2. BMP-2 含有コラーゲンペレットと異所性骨の作製

rhBMP-2 含有コラーゲンペレットは, 生検用パンチ (カイ インダストリーズ,

岐阜) を用いて直径 2 mm, 厚さ 3 mm の円柱として切り出したものに, rhBMP-2 を 5 μ g 浸漬し作製した. *Sost*^{G/+}マウス, *Sost*^{G/G} マウスと C57BL/6 マウス (雄 8 週齢) にセボフルランを使用し全身麻酔を施し, 右側大腿部内側の筋膜下に, rhBMP-2 含有コラーゲンペレットを埋入した. マイクロ CT による解析や組織学的解析のため, 埋入後 14 日 ($n=7$), 28 日 ($n=7$) に 4% Paraformaldehyde (PFA) で灌流固定を行い, BMP-2 誘導性異所性骨を含む組織を摘出した. また, 骨組織の正常コントロールとして大腿骨を採取した. real-time RT-PCR 解析のため, 埋入後 7 日 ($n=3$), 10 日 ($n=3$), 14 日 ($n=6$), 28 日 ($n=4$) に BMP-2 誘導性異所性骨を摘出した. 正常骨組織のコントロールとして 10 週齢の WT の脛骨を採取した.

3. BMP-2 誘導性異所性骨の骨量の計測

BMP-2 誘導性異所性骨の骨量の評価は, マイクロ CT (ScanXmate-A080, コムスキャンテクノ, 東京) を使用した. 撮影は, 管電圧 22 kV, 管電流 250 mA の条件にて行った. BMP-2 誘導性異所性骨の骨量解析は三次元で行い, 骨量体積/組織体積 (bone volume/tissue volume%, BV/TV%), 骨塩量 (bone mineral content, BMC), および骨密度 (bone mineral density, BMD) は, 骨形態計測ソフトの TRI/3D-BON (ラトックシステムエンジニアリング, 東京) を用いて測定した. マイクロ CT の水平断面画像より外殻の断面積と内外周長を計測した. 厚さ 163.5 μ m の水平断面の中央 2 か所を平均して代表値とした. 測定には ImageJ (Rasband WS ImageJ, ver1.4.3.67 NIH, Bethesda, USA) を用いた.

4. BMP-2 誘導性異所性骨の蛍光観察

BMP-2 誘導性異所性骨は, 摘出後に 4% PFA で固定し, 10% Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 溶液で 1 週間 4°C にて脱灰後, 矢状断面で半分に分割した. 脱灰組織を, 4°C の 10%, 20%, 30% スクローズ溶液に順にそれぞれ 3 時間浸漬した. その後, 5% カルボキシメチ

ルセルローズ（セクションラボ，広島，日本）で埋入し， -80°C で凍結し凍結ブロックを作製した．包埋した組織は $10\ \mu\text{m}$ の厚さに薄切した．ヘキスト 33342（同仁堂研究所，熊本）で核染色し，蛍光顕微鏡にて観察した．

5. BMP-2 誘導性異所性骨の免疫組織化学染色

矢状断面で半分に分割したもう一方の脱灰組織は，上昇エタノール系列にて脱水を行い，パラフィンで包埋した．包埋した組織は， $4\ \mu\text{m}$ の厚さに薄切した．組織学的観察のため，組織切片をヘマトキシリンエオジン（Hematoxylin-eosin, H.E.）染色した．

ALP および β -catenin 染色にはパラフィンに包埋した組織切片を，スクレロスチン染色にはパラフィンに包埋した組織切片と凍結ブロックより作製した組織切片を使用した．ALP および β -catenin 染色においては 60°C のクエン酸（ $\text{pH}6.0$ ）で 3 時間処理し賦活化した．内因性ペルオキシターゼを除去するため，すべての組織切片を Dako Real ペルオキシダーゼブロッキング試薬で 30 分間処理した．非特異的結合を防ぐため，ALP および β -catenin 染色においては 10% ヤギ血清で，スクレロスチン染色においては 1% BSA で 45 分間ブロッキング処理した．一次抗体として，50 倍希釈した抗スクレロスチン抗体，800 倍希釈した抗 ALP 抗体，800 倍希釈した抗 β -catenin 抗体で 18 時間， 4°C にて処理した．二次抗体として，ALP 染色と β -catenin 染色においてはヒストファインシンプルシステインマウス MAX-PO (Rabbit)，スクレロスチン染色においては抗ヤギ HRP を 30 分間処理した．DAB 染色にはヒストファインキット DAB 基質キットを使用した．核染色として，ALP 染色と β -catenin 染色ではヘマトキシリンを，スクレロスチン染色ではヘマトキシリンまたはメチルグリーンを用いた．

6. BMP-2 誘導性異所性骨の破骨細胞観察

破骨細胞の観察のために，酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ（Tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP）染色を行った．TRAP 反応液は基質である 0.01% naphthol AS-BI phosphate を N,N ジメチルホルムアミドに溶解し，酒石酸（50 mM）を含む Sodium acetate buffer

(0.2 M) に色素である Fast red violet LB salt (0.06%) を添加し作製した。組織切片に TRAP 反応液を滴下し, 37°C で 20 分間反応させ染色を行った後, ヘマトキシリンで核染色を行った。

7. real-time RT-PCR 解析

異所性骨における *β-actin*, *Sost*, *Sp7*, *Alpl*, *Colla1*, *Acp5*, *Ctsk* の遺伝子発現を real-time RT-PCR にて解析した。異所性骨は摘出直後に, 脛骨は骨髓細胞を洗い流した後に, TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) に浸漬し, TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany) を使用して組織を粉碎した。その後, RNA 分離キット (Nucleo Spin, MACHEREY NAGEL, Düren, Germany) を使用し Total RNA を回収し, oligo (dT) 12-18 primers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) と Rever Tra Ace (東洋紡, 大阪) を使用して total RNA を逆転写し, cDNA を合成した。cDNA の定量は, Fast SYBR Green (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) と StepOnePlus システム (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) を使用した real-time RT-PCR で行った。PCR 反応は 95°C で 20 秒間, 続いて 95°C で 3 秒間および 60°C で 30 秒間を 40 サイクル行った。各 PCR 実験で melting curve を確認した。カスタムオリゴ合成したプライマーは, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) より購入した。プライマーの配列は *β-actin* (For: CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC, Rev: ATGGAGCCACCGATCCACA), *Sost* (For: TCCTGAGAAGAACCAGACCA, Rev: GCAGCTGTACTCGGACACATC), *Sp7* (For: CGCATCTGAAAGCCCACTTG, Rev: CAGCTCGTCAGAGCGAGTGAA), *Alpl* (For: ACACCTTGACTGTGGTACTGCTGA, Rev: CCTTGTAGCCAGGCCCGTTA), *Colla1* (For: CCTGGCAAAGACGGACTCAAC, Rev: GCTGAAGTCATAACCGCCACTG), *Acp5* (For:

TTGCGACCATTGTTAGCCACATA, Rev:
TCAGATCCATAGTGAAACCGCAAG), *Ctsk* (For:
CAGCAGAACGGAGGCATTGA, Rev:
CTTTGCCGTGGCGTTATACATACA) である。発現レベルは、相対標準
曲線 (relative standard curve) によって計算された。正規化の内部コ
ントロールとして、*β-actin* を使用した。

8. 統計解析

結果は 3 サンプル以上の平均値 ± 標準偏差 (standard deviation,
SD) として示した。2 群間の差の分析には、対応のない両側の t 検定を用い
た。3 群以上の差の分析には One-way ANOVA の後、多重比較検定とし
て Dunnett's multiple comparisons test または Sidak's multiple
comparisons test を用いた。 p 値は $p < 0.05$ を*, $p < 0.01$ を**として示し、
 $p < 0.05$ を有意とした。

結果

1. BMP-2 誘導性異所性骨における *Sost* 遺伝子とスクレロスチンタンパク質の発現解析

異所性骨における *Sost* 遺伝子とスクレロスチンタンパク質の発現を観察するために、*Sost* 遺伝子の発現を Zs-Green の緑の蛍光で検出できる *Sost*^{G/+}レポーターマウスを用いた。このマウスに、BMP-2 ペレットを埋入し、14、28 日後に回収した異所性骨を蛍光顕微鏡にて観察した。14、28 日の異所性骨の外観は扁平な球形で骨髄の形成による赤褐色をていしていた (図 1A)。異所性骨の各断面は、矢状断面と水平断面と定義して観察した (図 1B)。トリジンブルー染色による組織学的観察では、14、28 日目の異所性骨の外殻部の内側に青色に染まる骨芽細胞が観察され、骨組織の形成を認めた (図 1C)。14、28 日の異所性骨の外殻の骨組織中において、蛍光観察で Zs-Green 陽性の骨細胞が数個認められ (図 1D)、スクレロスチンの免疫染色でもスクレロスチン陽性の骨細胞を認めた (図 1E)。マイクロ CT の水平断面像では外殻部に不透過像が認められ、石灰化が確認された (図 1F)。これらの結果より、*Sost*^{G/+}マウスの異所性骨の骨細胞において *Sost* 遺伝子とスクレロスチンタンパクの両方が発現していた。

2. *Sost* 欠損マウスにおける BMP-2 誘導性異所性骨の組織学的解析

BMP-2 誘導性異所性骨におけるスクレロスチンの役割を調べるために、*Sost* 遺伝子を欠損させた *Sost*^{G/G} マウスに BMP-2 ペレットを埋入して、その異所性骨を解析した。BMP-2 ペレットを埋入後 14 日目に回収した WT の異所性骨では、直径 3-4 mm の扁平な球形の骨が形成された。*Sost*^{G/G} の異所性骨は、同程度の大きさであり、WT と比較して *Sost*^{G/G} では表面が凸凹した球形を示す傾向があった (図 2A)。埋入後 28 日目に回収した WT の異所性骨では、扁平な形状の骨が形成された。*Sost*^{G/G} の異所性骨は WT の異所性骨と同様に扁平な形状の骨が形成された。14 日目と比較し、WT と *Sost*^{G/G} の異所性骨はともに小さくなる傾向を示した。湿重量は、*Sost*^{G/G} の異所性骨で、14 日目と比較して 28 日目で減少した (図 2B)。し

かし、14日目と28日目の両方でWTと*Sost^{G/G}*の間に有意な差は認めなかった。H.E.染色による組織学的観察で、外殻部に好酸性の硬組織が形成されており、14日目では外殻部に多孔質の厚い骨組織がWTと*Sost^{G/G}*の両方で認められた(図2C)。28日目には外殻部に薄い緻密な骨形成が認められた。外殻の骨組織の蛍光観察では、埋入後14, 28日の*Sost^{G/G}*の異所性骨において、Zs-Green陽性の骨細胞を認めたが、WTのマウスでは、Zs-Green陽性の骨細胞は認められなかった(図2D)。スクロスチンの免疫染色では、BMP-2ペレット埋入14, 28日後の*Sost^{G/G}*の異所性骨においてスクロスチン陽性骨細胞は認めなかったが、WTにおいてスクロスチン陽性の骨細胞を認めた(図2E)。これらの結果より、*Sost^{G/G}*マウスのBMP-2誘導性異所性骨の骨細胞ではスクロスチン発現が消失していた。

3. *Sost^{G/G}*マウスにおけるBMP-2誘導性異所性骨の骨量と骨塩量の定量的解析

スクロスチン欠損マウスにおける、BMP-2誘導性異所性骨の石灰化に及ぼす影響を検討するため、異所性骨をマイクロCTで撮影し、異所性骨の三次元構築画像及び断面像を比較検討した。WTと*Sost^{G/G}*のどちらも、BMPペレットを取り囲む外殻に多孔質な石灰化像を認めた。三次元構築画像より、WTでは表面の石灰化部が薄い層として観察され、*Sost^{G/G}*では、表面全体が石灰化しており、14日から28日にかけて不透過性が亢進した(図3A)。水平断面画像より、埋入後14日の断面像では、WTで外殻に多孔性の薄い石灰化の層が観察された。*Sost^{G/G}*では外殻に、WTよりも厚い石灰化層が観察された。埋入後28日の断面像では、WTで薄く密な外殻の層が観察された。*Sost^{G/G}*では、WTより厚く密な外殻の層が観察された(図3B)。次に、異所性骨の骨量を三次元で定量化した。マイクロCTで検出される異所性骨の骨体積(BV)と組織体積に占める骨体積の割合(BV/TV)は、WTと比較し、*Sost^{G/G}*で有意に増加した(図3C, D)。また、形成された骨組織のBMCとBMDはWTと比較し、*Sost^{G/G}*で有意に増加した(図3E, F)。更に、マイクロCTの水平断面画像にて検出された骨組織の内周長、外周長および断面積を定量化し比較した。埋入後28日の異所

性骨において、WTと比較し、*Sost*^{G/G}の内周長は減少し（図 3G）、断面積は有意に増加した（図 3H）。一方、WTと*Sost*^{G/G}の外周長は同程度であった（図 3G）。これらの結果より、WTよりと比較して、*Sost*^{G/G}は内側方向へ骨量が増加した。

4. *Sost*^{G/G}マウスの BMP-2 誘導性異所性骨における骨芽細胞マーカーの遺伝子発現解析

異所性骨における*Sost*遺伝子発現の経時的変化を調べるため、WTマウスの埋入後 7, 10, 14, 28 日の異所性骨の*Sost*遺伝子発現量を real-time RT-PCR にて解析した。陽性対照として 10 週齢の WT マウスより採取した脛骨を使用した。埋入後 7 日の異所性骨において、*Sost*遺伝子は検出されず、10 日、14 日と経時的に増加した。埋入後 14 日の異所性骨では、有意に*Sost*遺伝子の発現増加が認められた。28 日の異所性骨の*Sost*発現は、10 日と同程度であった（図 4A）。*Sost*^{G/G}マウスの埋入後 14 日の異所性骨では、*Sost*遺伝子が発現していないことを確認した（図 4B）。次に、異所性骨の骨形成に対するスクレロスチンの影響を検討するために、埋入後 14 日の WT マウスと*Sost*^{G/G}マウスの異所性骨の骨芽細胞マーカー遺伝子（*Sp7*, *Alpl*, *Colla1*）発現を real-time RT-PCR にて解析した。脛骨と比較し、異所性骨において *Sp7*, *Alpl* および *Colla1* の mRNA 発現は有意ではないが増加していた（図 4C）。また、WT と比較しても、*Sost*^{G/G}において *Sp7*, *Alpl* および *Colla1* の mRNA 発現は有意な増加を示さなかった。

5. *Sost*^{G/G}マウスの BMP-2 誘導性異所性骨における骨形成関連タンパク質発現解析

異所性骨の骨形成に対するスクレロスチンの影響を検討するために、骨芽細胞マーカーとして ALP, Wnt/ β -catenin シグナルとして β -catenin の発現を免疫組織学的に解析した。ALP の免疫染色では、ALP 陽性骨芽細胞を異所性骨の外殻内側に認めた（図 4D）。埋入後 14, 28 日目の異所性骨の ALP 陽性骨芽細胞数は、WT と比較し *Sost*^{G/G}において、有意な増

加を示さなかった. WTと *Sost^{G/G}*の両方において, ALP 陽性骨芽細胞数は14日目と比較し28日目で減少した. β -cateninの免疫染色では, β -catenin核内陽性骨芽細胞を外殻内側に認めた(図4E). 埋入後14, 28日目の異所性骨の β -catenin核内陽性骨芽細胞数は, WTと比較し *Sost^{G/G}*において, 有意な増加を示さなかった. WTと *Sost^{G/G}*の両方において, β -catenin核内陽性骨芽細胞数は14日目と比較し28日目で減少した.

6. *Sost^{G/G}*マウスのBMP-2誘導性異所性骨における破骨細胞マーカーの遺伝子発現解析と破骨細胞の組織所見

骨吸収に対するスクレロシン欠損の影響を検討するために, 埋入後14日目の異所性骨の破骨細胞マーカー遺伝子 (*Acp5*, *Ctsk*) を real-time RT-PCRにて解析した. 脛骨と比較し, 異所性骨において *Acp5*, *Ctsk*は増加した(図5A). 埋入後14日目の異所性骨における *Acp5*と *Ctsk*の mRNA発現は, WTと比較し *Sost^{G/G}*において, 有意な増加を示さなかった. 次に, TRAP染色で, 異所性骨の破骨細胞を組織学的に検討した. WTの埋入後14日目の異所性骨において, 外殻の内側にTRAP陽性の破骨細胞を認めた(図5B). *Sost^{G/G}*の異所性骨においても同様に, 外殻の内側にTRAP陽性の破骨細胞を認めた. WTの埋入後28日目の異所性骨において, 外殻の外側にTRAP陽性の破骨細胞を認めた. *Sost^{G/G}*の異所性骨においても同様に, 外殻の外側にTRAP陽性の破骨細胞を認めた. 埋入後14, 28日目の異所性骨において, 破骨細胞数はWTと *Sost^{G/G}*で同程度に観察された(図5B). 埋入後28日目の異所性骨においては, 14日目と比較し, WTと *Sost^{G/G}*の両方においてTRAP陽性の破骨細胞数の減少傾向が観察された. これらの結果より, 28日目と比較して14日目のBMP-2誘導性異所性骨は, 骨リモデリングの活性が高いことが示唆された.

考察

Sost 遺伝子の転写は、胎生期の軟骨等の軟組織で検出されるが、成体においては石灰化した骨組織にのみで検出される²⁰⁾と報告されている。げっ歯類の長管骨の骨幹部におけるスクレロスチンの発現は、生後数日で検出されることが報告されている^{21, 22)}。また、げっ歯類の長管骨の骨幹端骨梁におけるスクレロスチンの発現は、生後 4 週以降で検出され、成長に伴いその発現は強くなることが報告されている^{21, 22)}。松下²³⁾は BMP-2 誘導性異所性骨において、埋入後 7 日目の軟骨細胞および 14 日目の骨細胞でスクレロスチンタンパクが発現していると報告している。本研究では、異所性骨における *Sost* 遺伝子の発現と経時的変化を検討した。*Sost* 遺伝子レポーターマウスより、埋入後、14, 28 日目の BMP-2 誘導性異所性骨において、*Sost* 遺伝子とスクレロスチンタンパク質が発現していることが確認された。WT の異所性骨の real-time RT-PCR の結果より、7 日目の異所性骨において *Sost* 遺伝子の発現は検出されず、10 日から 28 日目の異所性骨において *Sost* 遺伝子の発現を認めた。以上のことから、異所性骨において *Sost* 遺伝子は、軟骨形成期ではほとんど発現しておらず、骨組織が形成され、骨細胞が出現する骨形成期や成熟期で発現すると考えられる。

スクレロスチンの欠損や変異は骨量を増加することが示されている¹⁰⁾。Mosey²⁴⁾らは、*Sost* 欠損マウスの脛骨骨幹部において、皮質骨の厚みが増加し骨髄腔が減少すると報告している。Li¹¹⁾らは、*Sost* 欠損マウスの大腿骨において、骨外膜の周長が増加して、骨内膜の周長が減少することを報告している。Stolina²⁵⁾らは、卵巣を摘出したラットに抗スクレロスチン抗体を投与後 6 週目において、脛骨骨幹部の内周長は減少するが外周長は変化せず、皮質骨量が増加したと報告している。本研究では、WT と比較し、*Sost* 遺伝子欠損マウスより得られた異所性骨の BV/TV や外殻の水平断面の断面積が増加していた。さらに、外殻の内周長が減少し、ALP 陽性の骨芽細胞は内側部に豊富に存在していた。以上のことは、異所性骨において、スクレロスチンが形成された骨の内側への成長を抑制することを示唆している。また、Li¹¹⁾らは、*Sost* 欠損マウスの脛骨骨幹部において、BMD が増加する

と報告している。卵巣を摘出したラットに抗スクレロスチン抗体を投与した研究では、投与後 6 週目において、腰椎 BMD が増加し、圧縮試験での最大荷重が増加したと報告されている²⁶⁾。本研究では、WT と比較し *Sost*^{G/G} で BMC と BMD が増加していた。これらのことより、異所性骨において、形成された骨の骨質をスクレロスチンが負に調節していると考えられる。

Sost 欠損や機能障害は、Wnt/ β -catenin シグナルの亢進を介して、骨形成を促進することが示されている^{11, 12)}。Lin²⁷⁾らは、*Sost* 欠損マウスの大腿骨において、骨芽細胞分化マーカーである *Colla1* や *Osteocalcin* が有意に増加すると報告している。脊髄損傷モデルマウスに抗スクレロスチン抗体を投与した研究では、*ex vivo* で骨芽細胞の ALP 活性が有意に増強することが報告されている²⁸⁾。本研究では、*Sost* 欠損マウスの異所性骨の mRNA 解析において、骨芽細胞マーカー遺伝子である *Sp7*, *Alpl*, *Colla1* は、WT と *Sost*^{G/G} で同程度であった。また、免疫組織学的解析において、骨芽細胞マーカータンパク質である ALP は WT と比較して *Sost*^{G/G} で有意な増加は認められなかった。BMP-2 誘導性異所性骨は、埋入から 7 日目までに軟骨が生じ、14 日まで骨形成が盛んになり、以降リモデリングによって成熟する¹⁷⁾。よって埋入後 14 日目の異所性骨は大腿骨と比較して、骨組織が未熟であり、成熟程度の個体差が大きい可能性がある。また、異所性骨内部には、造血組織が誘導されており、それらの細胞を含めて RNA 発現の解析を行っているため、骨芽細胞マーカーの有意な発現の変化が観察できなかった可能性もある。今後、骨表面の細胞で ALP の発現強度を定量するなどの詳細な検討が必要である。

骨折治癒過程における *Sost* 欠損の治癒促進効果が報告されている²⁹⁾。*Sost* 欠損マウスにおいて、形成された仮骨が増大し、成熟骨への移行が促進されることが報告されている²⁹⁾。本研究では、*Sost* 欠損マウスの異所性骨における Wnt/ β -catenin シグナルの変化を検討した。免疫組織学的解析において、核内に β -catenin が移行した骨芽細胞数は WT と比較して *Sost*^{G/G} で有意な増加は認められなかった。埋入後 14 日目の異所性骨において、WT と比較し *Sost*^{G/G} は成熟化が進んでおり、観察時の発育ステージに差があった可能性が考えられる。また、スクレロスチンの他に、

Wnt/ β -catenin シグナル阻害因子として、Dickkopf1 (Dkk1) が報告されている³⁰⁾。Dkk1 は、スクレロスチンと同様に LRP5 受容体のアンタゴニストとして作用し、Wnt/ β -catenin シグナルを阻害する骨形成抑制因子である³¹⁾。Stolina²⁵⁾らは、卵巣を摘出したラットに抗スクレロスチン抗体を投与後 6 週目において、*Dkk1* 遺伝子の発現が代償的に増加すると報告している。本研究では、埋入後 14 日目の異所性骨において、*Dkk1* 遺伝子の発現は WT と比較し *Sost*^{G/G} で増加する傾向を示した。以上のことより、*Sost* 欠損マウスの異所性骨における Wnt/ β -catenin シグナルは、Dkk1 の代償的な増加によって正常範囲に保たれている可能性が考えられる。

Sost の機能阻害は、骨吸収抑制効果を示す。ヒトやサルへの抗スクレロスチンの投与は、血清骨吸収マーカーを低下させることが報告されている³²⁾。この抑制機序は Wnt/ β -catenin シグナルの活性化による OPG 発現の上昇であると考えられている^{7, 25)}。一方、Li¹¹⁾らは、骨吸収マーカーである血清 TRAP5b が *Sost* 欠損マウスと WT で同程度であったと報告している。本研究では、*Sost* 欠損マウスの異所性骨におけるリモデリング活性の変化を検討するため、骨吸収について検討した。異所性骨の mRNA 解析において、破骨細胞マーカー遺伝子である *Acp5*, *Ctsk* は、WT と *Sost*^{G/G} で同程度であった。さらに、TRAP 染色による組織学的解析において、TRAP 陽性の破骨細胞は WT と比較して *Sost*^{G/G} で同程度であった。以上のことより、*Sost* 欠損による破骨細胞への作用は、直接作用でなく、間接的な骨吸収の抑制作用であると考えられる。次に、破骨細胞の局在を観察したところ、埋入後 14 日目の異所性骨において、破骨細胞は外殻の内側に主に出現した。一方、埋入後 28 日目の異所性骨において、破骨細胞は外殻の外側に主に出現した。この結果より、埋入後 14 日目の異所性骨では外殻内側で骨リモデリングが活発となり、骨の成熟途上であることが伺われる。また、異所性骨の湿重量が 14 日目と比較し 28 日目で減少していることから、埋入後 28 日目の異所性骨では、外殻外側より形成された骨が吸収され始めていると考えられる。

本研究の実験結果より、BMP-2 誘導性異所性骨において、スクレロスチンの欠損は骨形成を正に調節する可能性が示された。しかし、遺伝子学的

なスクレロスチンの生涯欠損と、中和抗体による一時的なスクレロスチンの阻害では骨形成への影響の程度に差がある可能性がある。この知見を歯周組織再生療法へ応用するため、今後は抗スクレロスチン中和抗体によるスクレロスチンの抑制が骨形成ならびに骨再生に有効かを明らかにすることが必要である。更に、歯周組織再生療法として臨床応用されている **Enamel matrix protein** や **FGF-2** による歯槽骨再生におけるスクレロスチンの発現や骨再生への関与を解明することも重要な課題である。今後、スクレロスチンを標的とする骨形成促進薬が歯周治療へ応用されることが期待される。

結論

本研究より、BMP-2 誘導性の異所性骨の骨細胞において Zs-Green による *Sost* 遺伝子の発現を認めた。スクレロスチン欠損マウスの異所性骨において、骨量、骨密度、外殻断面積が増加した。以上の結果より、異所性骨において、スクレロスチンの欠損は骨形成を正に調節する可能性が示された。

謝辞

本研究に際し、終始御懇意なるご指導を賜りました松本歯科大学大学院歯学独立研究科健康増進口腔科学講座 吉成伸夫教授，大学院歯学独立研究科硬組織疾患制御再建学講座 宇田川信之教授，ならびに小出雅則准教授に謹んで謝意を申し上げます。また，本研究に多大なるご指導，ご助言を賜りました松本歯科大学歯科保存学講座 増田宜子教授，公益財団法人ライオン歯科衛生研究所 石原裕一先生に厚く感謝申し上げます。本研究の遂行にあたり，rhBMP-2 の御供与を頂きましたオリエンタル酵母工業株式会社長浜生物科学研究所長 保田尚孝博士に感謝申し上げます。また，本研究の遂行ならび論文の作成にあたり，御助言，御協力頂きました松本歯科大学歯科保存学講座，口腔生化学講座ならびに松本歯科大学総合歯科医学研究所の諸先生方に御礼申し上げます。

最後に本研究を遂行するのに際して絶えず励ましてくれました両親（父元則，母実知子），妹（まみ，まこ）に心から感謝致します。

文献

1. (公財) 8020 推進財団, 第 2 回 永久歯の抜歯原因調査報告書. 東京: 8020 推進財団; 2018.
https://www.8020zaidan.or.jp/pdf/Tooth-extraction_investigation-report-2nd.pdf (accessed 2020-10-29)
2. Darveau RP (2010) Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 8:481-90.
3. Garrett S (1996) Periodontal regeneration around natural teeth. *Ann Periodontol.* 1:621-66.
4. Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL (2010) Regeneration of periodontal tissue: bone replacement grafts. *Dent Clin North Am* 54:55-71.
5. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H (1982) New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 9:290-6.
6. Kitamura M, Akamatsu M, Kawanami M, Furuichi Y, Fujii T, Mori M, Kunimatsu K, Shimauchi H, Ogata Y, Yamamoto M, Nakagawa T, Sato S, Ito K, Ogasawara T, Izumi Y, Gomi K, Yamazaki K, Yoshie H, Fukuda M, Noguchi T, Takashiba S, Kurihara H, Nagata T, Hamachi T, Maeda K, Yokota M, Sakagami R, Hara Y, Noguchi K, Furuuchi T, Sasano T, Imai E, Ohmae M, Koizumi H, Watanuki M, Murakami S (2016) Randomized Placebo-Controlled and Controlled Non-Inferiority Phase III Trials Comparing Trafermin, a Recombinant Human Fibroblast Growth Factor 2, and Enamel Matrix Derivative in Periodontal Regeneration in Intrabony Defects. *J Bone Miner Res.* 31:806-14.
7. Glass DA 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo MM, Long F, McMahon AP, Lang RA,

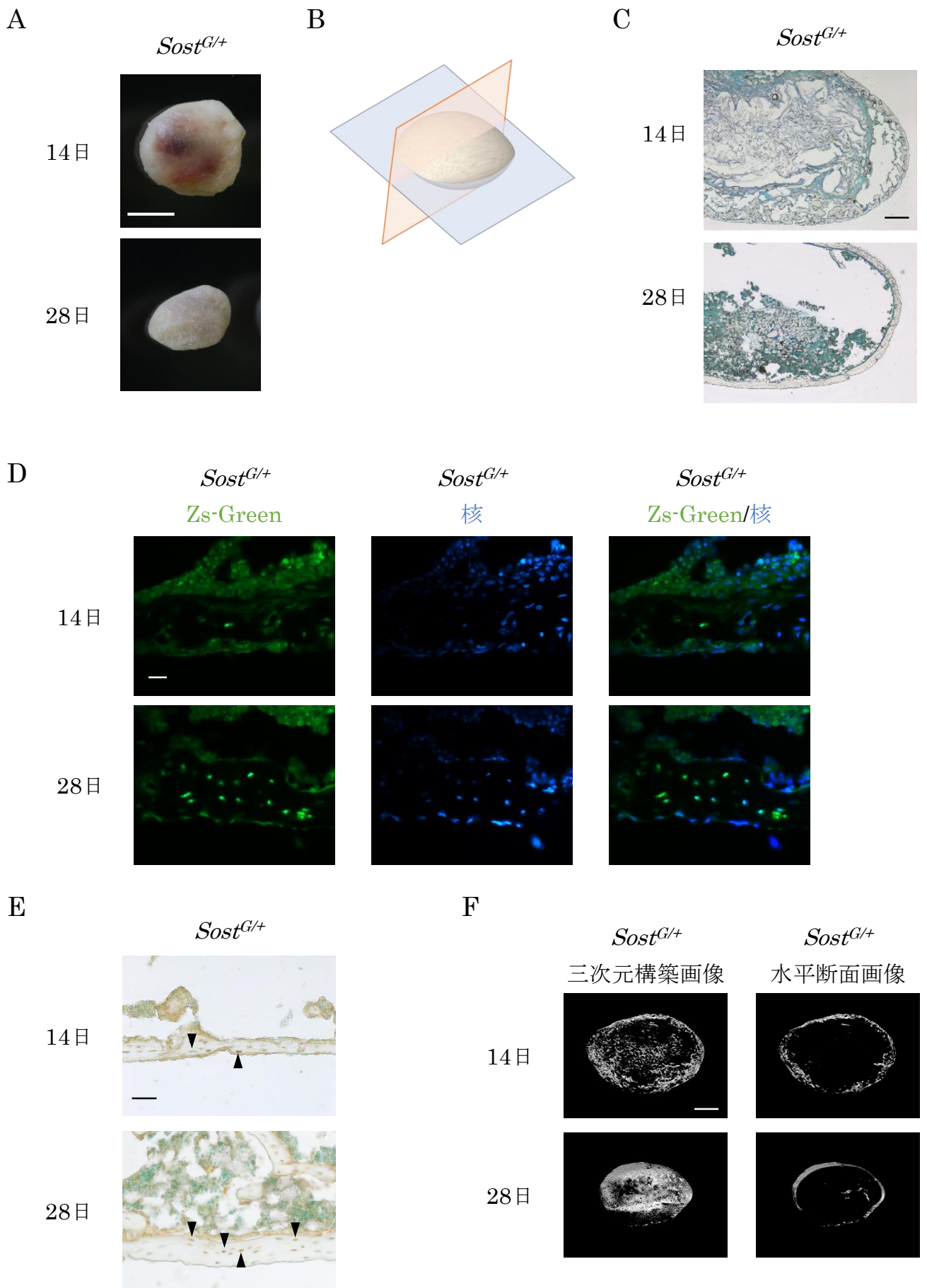
- Karsenty G (2005) Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 8:751-64.
8. Ahmadzadeh A, Norozi F, Shahrabi S, Shahjehani M, Saki N (2016) Wnt/ β -catenin signaling in bone marrow niche. *Cell Tissue Res* 363:321-35.
 9. Eastman Q, Grosschedl R (1999) Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr Opin Cell Biol* 11:233-40.
 10. Brunkow ME, Gardner JC, Van Ness J, Paepers BW, Kovacevich BR, Proll S, Skonier JE, Zhao L, Sabo PJ, Fu Y, Alisch RS, Gillett L, Colbert T, Tacconi P, Galas D, Hamersma H, Beighton P, Mulligan J (2001) Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am J Hum Genet* 68:577-89.
 11. Li X, Ominsky MS, Niu QT, Sun N, Daugherty B, D'Agostin D, Kurahara C, Gao Y, Cao J, Gong J, Asuncion F, Barrero M, Warmington K, Dwyer D, Stolina M, Morony S, Sarosi I, Kostenuik PJ, Lacey DL, Simonet WS, Ke HZ, Paszty C (2008) Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J Bone Miner Res* 23:860-9.
 12. Li X, Warmington KS, Niu QT, Asuncion FJ, Barrero M, Grisanti M, Dwyer D, Stouch B, Thway TM, Stolina M, Ominsky MS, Kostenuik PJ, Simonet WS, Paszty C, Ke HZ (2010) Inhibition of sclerostin by monoclonal antibody increases bone formation, bone mass, and bone strength in aged male rats. *J Bone Miner Res* 25:2647-56.
 13. Cosman F, Crittenden DB, Adachi JD, Binkley N, Czerwinski

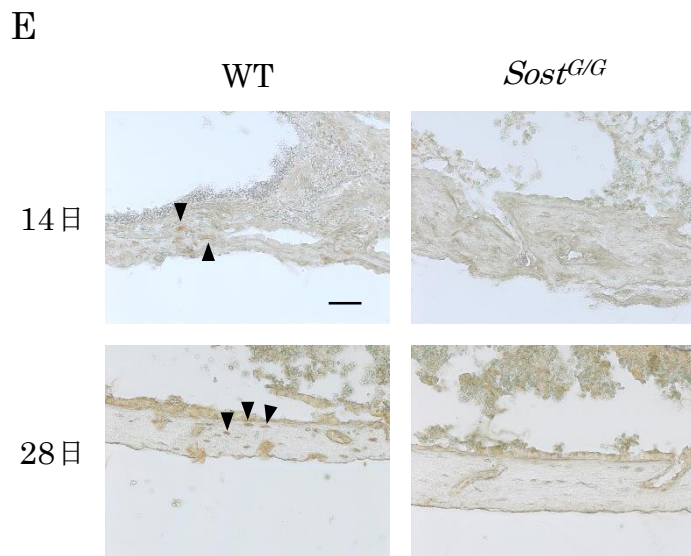
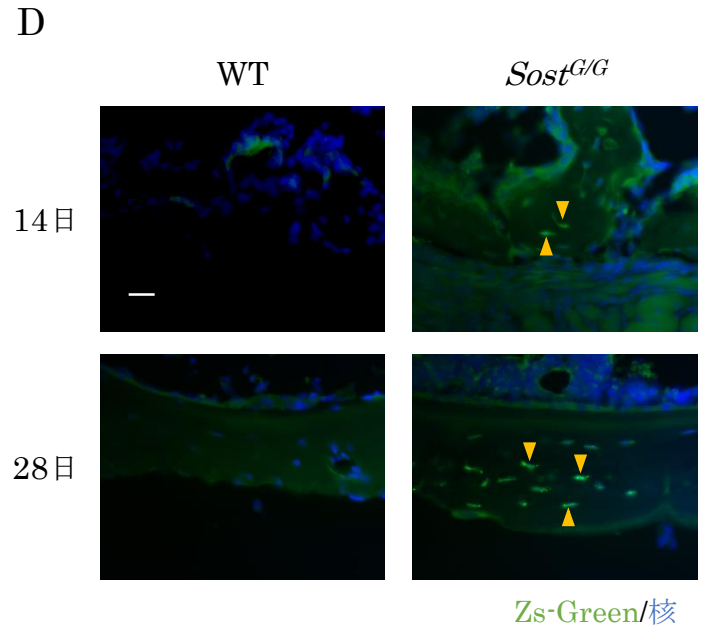
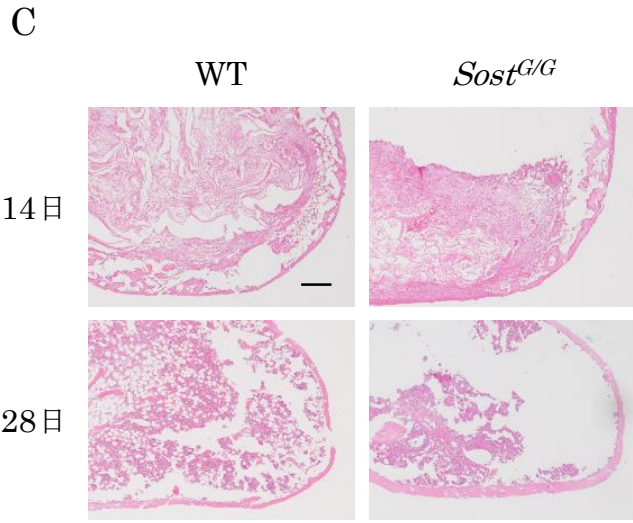
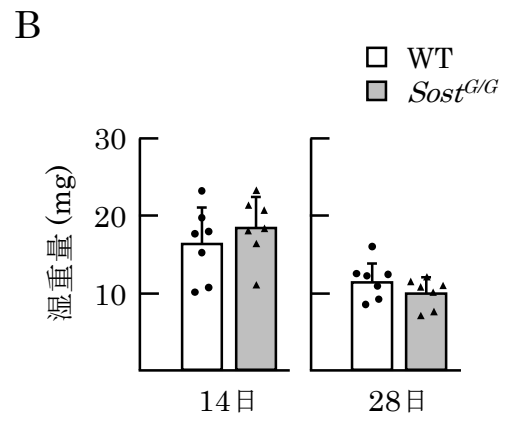
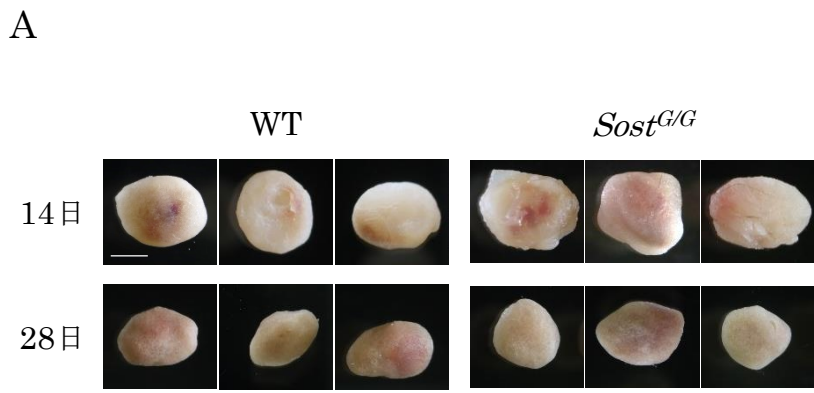
- E, Ferrari S, Hofbauer LC, Lau E, Lewiecki EM, Miyauchi A, Zerbini CA, Milmont CE, Chen L, Maddox J, Meisner PD, Libanati C, Grauer A (2016) Romosozumab Treatment in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *N Engl J Med* 375:1532-43.
14. Saag KG, Petersen J, Brandi ML, Karaplis AC, Lorentzon M, Thomas T, Maddox J, Fan M, Meisner PD, Grauer A (2017) Romosozumab or Alendronate for Fracture Prevention in Women with Osteoporosis. *N Engl J Med* 377:1417-27.
 15. Urist MR, Huo YK, Brownell AG, Hohl WM, Buyske J, Lietze A, Tempst P, Hunkapiller M, DeLange RJ (1984) Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:371-5.
 16. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242:1528-34.
 17. Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, et al (1990) Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2220-4.
 18. Tan J, Zhang M, Hai Z, Wu C, Lin J, Kuang W, Tang H, Huang Y, Chen X, Liang G (2019) Sustained Release of Two Bioactive Factors from Supramolecular Hydrogel Promotes Periodontal Bone Regeneration. *ACS Nano* 13:5616-22.
 19. Koide M, Yamashita T, Murakami K, Uehara S, Nakamura K, Nakamura M, Matsushita M, Ara T, Yasuda H, Penninger JM, Takahashi N, Udagawa N, Kobayashi Y (2020) Sclerostin expression in trabecular bone is downregulated by osteoclasts. *Sci Rep* 10:13751.

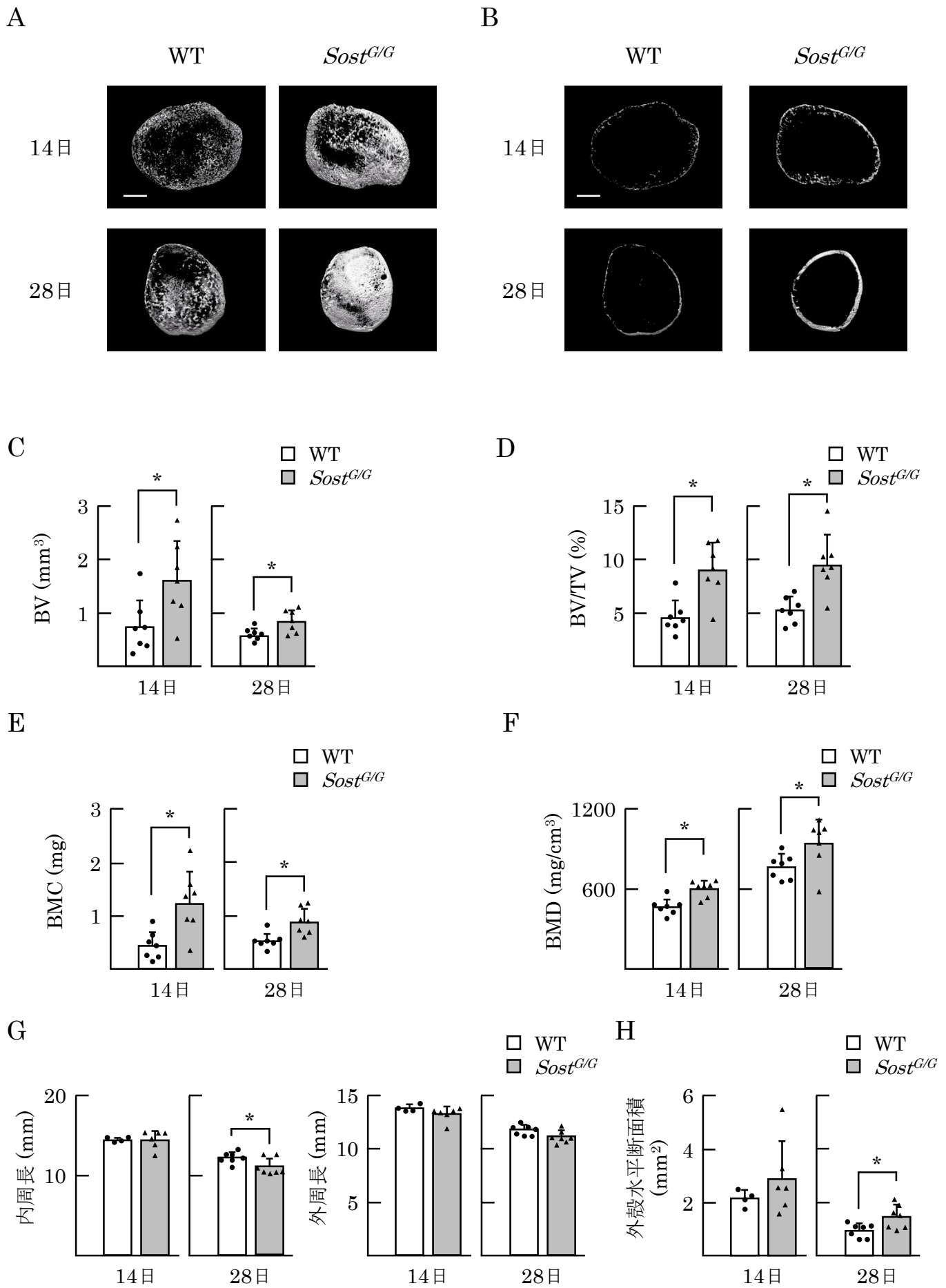
20. van Bezooijen RL, Deruiter MC, Vilain N, Monteiro RM, Visser A, van der Wee-Pals L, van Munsteren CJ, Hogendoorn PC, Aguet M, Mummery CL, Papapoulos SE, Ten Dijke P, Löwik CW (2007) SOST expression is restricted to the great arteries during embryonic and neonatal cardiovascular development. *Dev Dyn* 236:606-12.
21. Watanabe T, Tamamura Y, Hoshino A, Makino Y, Kamioka H, Amagasa T, Yamaguchi A, Iimura T (2012) Increasing participation of sclerostin in postnatal bone development, revealed by three-dimensional immunofluorescence morphometry. *Bone* 51:447-58.
22. Sakurai A, Hasegawa T, Kudo A, Shen Z, Nagai T, Abe M, Yoshida T, Hongo H, Yamamoto T, Yamamoto T, Oda K, Freitas PHL, Li M, Sano H, Amizuka N (2017) Chronological immunolocalization of sclerostin and FGF23 in the mouse metaphyseal trabecular and cortical bone. *Biomed Res* 38(4):257-67.
23. 松下雅衣 (2020) BMP 誘導性の異所性骨における骨形成抑制因子 スクレロスチンの発現解析 (学位論文). 松本歯科大学大学院歯学独立研究科 甲第 231 号.
24. Mosey H, Núñez JA, Goring A, Clarkin CE, Staines KA, Lee PD, Pitsillides AA, Javaheri B (2017) *Sost* Deficiency does not Alter Bone's Lacunar or Vascular Porosity in Mice. *Front Mater* 4:27.
25. Stolina M, Dwyer D, Niu QT, Villasenor KS, Kurimoto P, Grisanti M, Han CY, Liu M, Li X, Ominsky MS, Ke HZ, Kostenuik PJ (2014) Temporal changes in systemic and local expression of bone turnover markers during six months of sclerostin antibody administration to ovariectomized rats. *Bone* 67:305-13.

26. Li X, Ominsky MS, Warmington KS, Niu QT, Asuncion FJ, Barrero M, Dwyer D, Grisanti M, Stolina M, Kostenuik PJ, Simonet WS, Paszty C, Ke HZ (2011) Increased bone formation and bone mass induced by sclerostin antibody is not affected by pretreatment or cotreatment with alendronate in osteopenic, ovariectomized rats. *Endocrinology* 152:3312-22.
27. Lin C, Jiang X, Dai Z, Guo X, Weng T, Wang J, Li Y, Feng G, Gao X, He L (2009) Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/beta-catenin signaling. *J Bone Miner Res* 24:1651-61.
28. Qin W, Li X, Peng Y, Harlow LM, Ren Y, Wu Y, Li J, Qin Y, Sun J, Zheng S, Brown T, Feng JQ, Ke HZ, Bauman WA, Cardozo CC (2015) Sclerostin antibody preserves the morphology and structure of osteocytes and blocks the severe skeletal deterioration after motor-complete spinal cord injury in rats. *J Bone Miner Res* 30:1994-2004.
29. Li C, Ominsky MS, Tan HL, Barrero M, Niu QT, Asuncion FJ, Lee E, Liu M, Simonet WS, Paszty C, Ke HZ (2011) Increased callus mass and enhanced strength during fracture healing in mice lacking the sclerostin gene. *Bone* 49:1178-85.
30. Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C (1998) Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391:357-62.
31. Bourhis E, Tam C, Franke Y, Bazan JF, Ernst J, Hwang J, Costa M, Cochran AG, Hannoush RN (2010) Reconstitution of a frizzled8.Wnt3a.LRP6 signaling complex reveals multiple Wnt and Dkk1 binding sites on LRP6. *J Biol Chem* 285:9172-9.

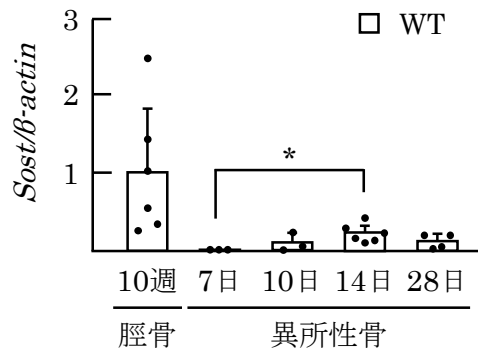
32. Padhi D, Jang G, Stouch B, Fang L, Posvar E (2011) Single-dose, placebo-controlled, randomized study of AMG 785, a sclerostin monoclonal antibody. *J Bone Miner Res* 26:19-26.
33. Ominsky MS, Vlasseros F, Jolette J, Smith SY, Stouch B, Doellgast G, Gong J, Gao Y, Cao J, Graham K, Tipton B, Cai J, Deshpande R, Zhou L, Hale MD, Lightwood DJ, Henry AJ, Popplewell AG, Moore AR, Robinson MK, Lacey DL, Simonet WS, Paszty C (2010) Two doses of sclerostin antibody in cynomolgus monkeys increases bone formation, bone mineral density, and bone strength. *J Bone Miner Res* 25:948-59.



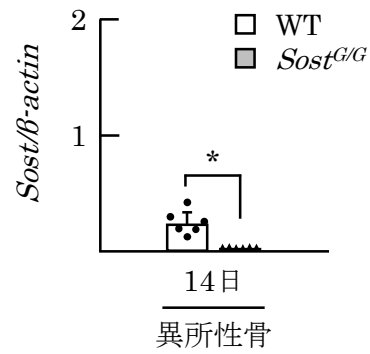




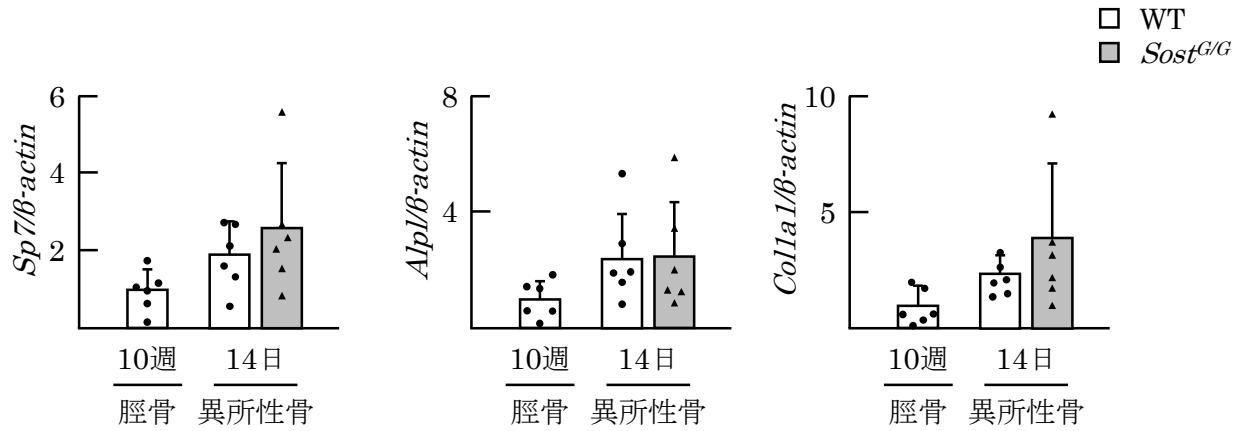
A



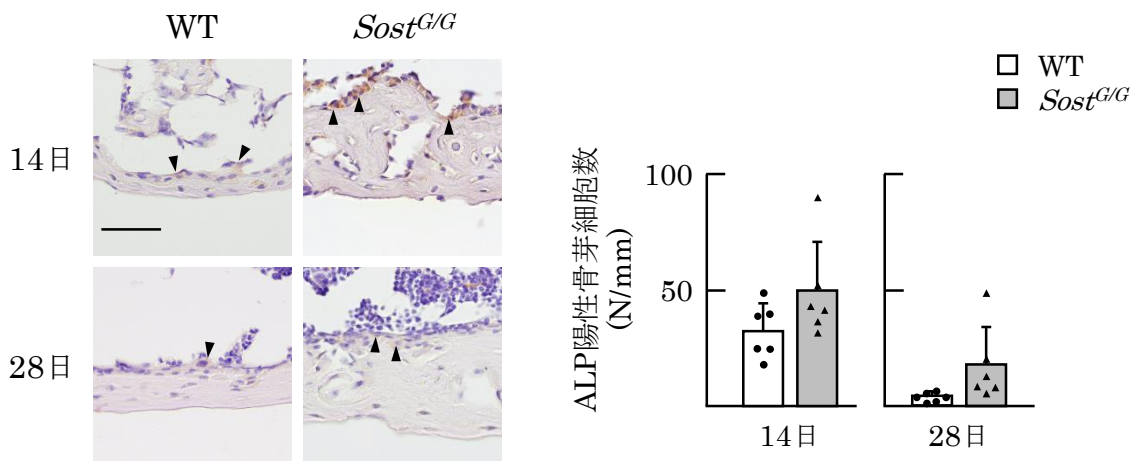
B



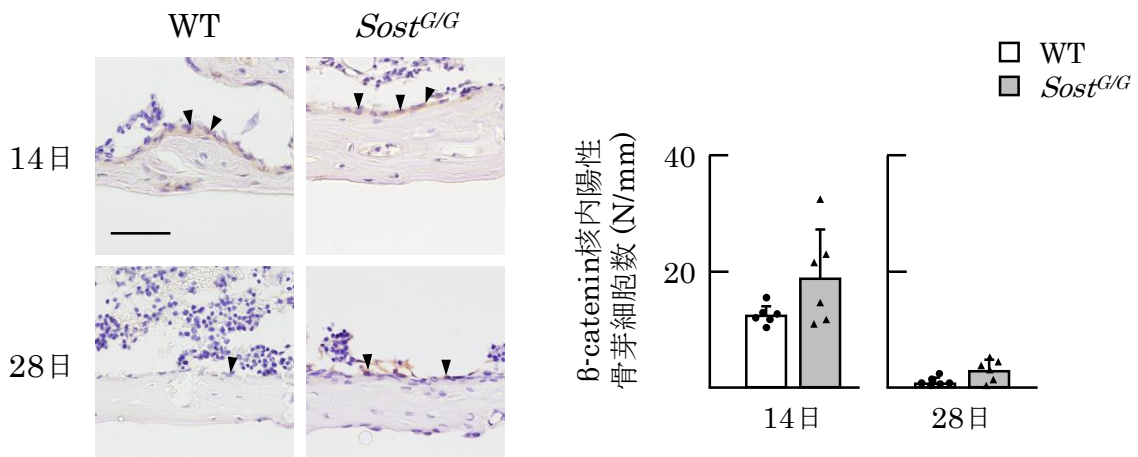
C



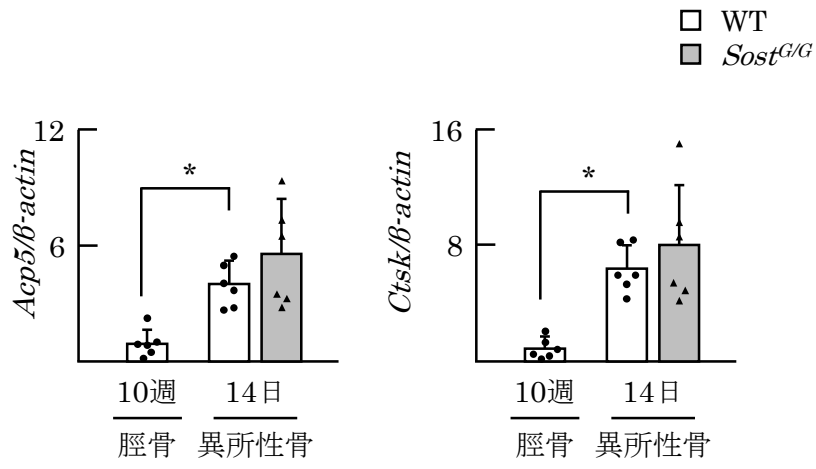
D



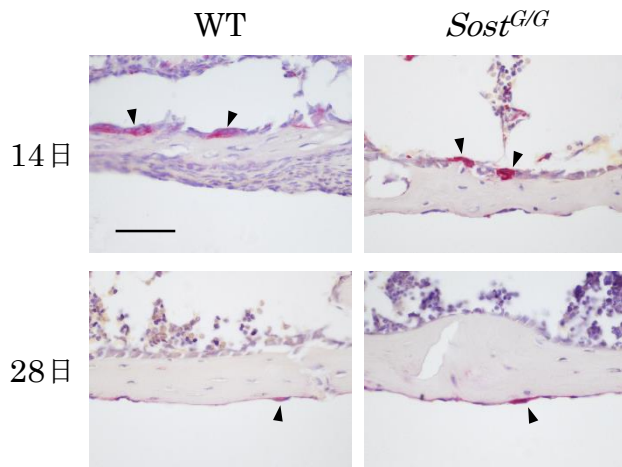
E



A



B



図の説明

図 1. *Sost*^{G/+}マウスにおける異所性骨の *Sost* 遺伝子発現の解析

- (A) *Sost*^{G/+}マウスに埋入後 14 日, 28 日目の BMP-2 誘導性異所性骨の実体顕微鏡像. スケールバー, 2 mm.
- (B) 異所性骨の断面の定義. 青色の面は水平断面を, 橙色の面は矢状断面を示す.
- (C) *Sost*^{G/+}マウスに埋入後 14 日, 28 日目の BMP-2 誘導性異所性骨のトルイジンブルー染色像 (矢状断面). スケールバー, 200 μ m.
- (D) *Sost*^{G/+}マウスに埋入後 14 日, 28 日目の BMP-2 誘導性異所性骨の蛍光顕微鏡画像. 緑は Zs-Green による *Sost* 遺伝子の発現を示す. 青は核を示す. スケールバー, 20 μ m.
- (E) *Sost*^{G/+}マウスに埋入後 14 日, 28 日目の BMP-2 誘導性異所性骨におけるスクレロスチンの免疫染色像. 骨基質中の茶色の骨細胞がスクレロスチン陽性 (矢頭) を示す. スケールバー, 50 μ m.
- (F) *Sost*^{G/+}マウスに埋入後 14 日, 28 日目の BMP-2 誘導性異所性骨のマイクロ CT の三次元構築画像と水平断面画像. スケールバー, 1 mm.

図 2. *Sost*^{G/G} マウスにおける異所性骨のスクレロスチン発現の解析

- (A) WT および *Sost*^{G/G} マウスに埋入後 14 日, 28 日目の BMP-2 誘導性異所性骨の実体顕微鏡像. スケールバー, 2 mm.
- (B) WT および *Sost*^{G/G} マウスに埋入後 14 日, 28 日目の BMP-2 誘導性異所性骨の湿重量の定量結果を示す ($n=7$, * $p<0.05$).
- (C) WT および *Sost*^{G/G} マウスに埋入後 14 日, 28 日目の BMP-2 誘導性異所性骨の H.E. 染色像 (矢状断面). スケールバー, 200 μ m.
- (D) WT および *Sost*^{G/G} マウスに埋入後 14 日, 28 日目の BMP-2 誘導性異所性骨の蛍光顕微鏡画像. 緑は Zs-Green による *Sost* 遺伝子の発現 (黄色矢頭) を示す. 青は核を示す. スケールバー, 20 μ m.
- (E) WT および *Sost*^{G/G} マウスに埋入後 14 日, 28 日目の BMP-2 誘導性

異所性骨におけるスクレロスチンの免疫染色像．骨基質中の茶色の骨細胞はスクレロスチン陽性（矢頭）を示す．スケールバー，50 μm ．

図 3. *Sost*^{G/G} マウスにおける異所性骨の外殻の骨量，骨塩量と水平断面積の定量的解析

- (A) WT および *Sost*^{G/G} マウスに埋入後 14 日，28 日目の BMP-2 誘導性異所性骨の三次元構築画像．スケールバー，1 mm．
- (B) WT および *Sost*^{G/G} マウスに埋入後 14 日，28 日目の BMP-2 誘導性異所性骨の水平断面画像．スケールバー，1 mm．
- (C) WT および *Sost*^{G/G} マウスに埋入後 14 日，28 日目の BMP-2 誘導性異所性骨の骨量の定量結果．異所性骨の骨量を三次元的に計測した ($n=7$, * $p<0.05$)．
- (D) WT および *Sost*^{G/G} マウスに埋入後 14 日，28 日目の BMP-2 誘導性異所性骨の BV/TV の定量結果．異所性骨の組織体積あたりの骨量を三次元的に計測した ($n=7$, * $p<0.05$)．
- (E) WT および *Sost*^{G/G} マウスに埋入後 14 日，28 日目の BMP-2 誘導性異所性骨の BMC の定量結果．異所性骨の骨塩量を三次元的に計測した ($n=7$, * $p<0.05$)．
- (F) WT および *Sost*^{G/G} マウスに埋入後 14 日，28 日目の BMP-2 誘導性異所性骨の BMD の定量結果．異所性骨の組織体積あたりの骨塩量（骨密度）を三次元的に計測した ($n=7$, * $p<0.05$)．
- (G) WT および *Sost*^{G/G} マウスに埋入後 14 日，28 日目の BMP-2 誘導性異所性骨の外殻水平段面の内外周長の定量結果．水平断面における異所性骨外殻の内外周長を計測した (WT 14 日 $n=4$, WT 28 日 $n=7$, *Sost*^{G/G} 14 日 $n=6$, *Sost*^{G/G} 28 日 $n=7$, * $p<0.05$)．
- (H) WT および *Sost*^{G/G} マウスに埋入後 14 日，28 日目の BMP-2 誘導性異所性骨の外殻水平断面積の定量結果．水平断面における異所性骨外殻の水平断面積を計測した (WT 14 日 $n=4$, WT 28 日 $n=7$, *Sost*^{G/G} 14 日 $n=6$, *Sost*^{G/G} 28 日 $n=7$, * $p<0.05$)．

図 4. *Sost*^{G/G} マウスにおける異所性骨の骨芽細胞マーカー遺伝子と骨形成関連タンパク質の発現解析

- (A) WT に埋入した BMP-2 誘導性異所性骨における *Sost* 遺伝子の経時的変化. WT に埋入後 7, 10, 14, 28 日目の異所性骨における *Sost* 遺伝子の発現を測定した (7 日 $n=3$, 10 日 $n=3$, 14 日 $n=6$, 28 日 $n=4$, * $p<0.05$).
- (B) *Sost*^{G/G} に埋入した異所性骨における *Sost* 遺伝子発現. WT および *Sost*^{G/G} マウスに埋入後 14 日目の異所性骨における *Sost* 遺伝子の発現を測定した ($n=6$, * $p<0.05$).
- (C) *Sost*^{G/G} に埋入した異所性骨における骨芽細胞マーカー遺伝子発現. WT および *Sost*^{G/G} マウスに埋入後 14 日目の異所性骨における骨芽細胞マーカー遺伝子 (*Sp7*, *Alpl*, *Colla1*) の発現を測定した ($n=6$, * $p<0.05$). 対照として, 10 週齢の脛骨における遺伝子発現を測定した.
- (D) WT および *Sost*^{G/G} マウスに埋入後 14 日, 28 日目の BMP-2 誘導性異所性骨における ALP の免疫染色像. 骨表面の茶色の骨芽細胞が ALP 陽性 (矢頭) を示す. スケールバー, 50 μm . 骨表面あたりの ALP 陽性骨芽細胞数の定量結果を示す ($n=6$, * $p<0.05$).
- (E) WT および *Sost*^{G/G} マウスに埋入後 14 日, 28 日目の BMP-2 誘導性異所性骨における β -catenin の免疫染色像. 骨表面の茶色の骨芽細胞の核が β -catenin 陽性 (矢頭) を示す. スケールバー, 50 μm . 骨表面あたりの β -catenin 核内陽性骨芽細胞数の定量結果を示す ($n=6$, * $p<0.05$).

図 5. *Sost*^{G/G} マウスにおける異所性骨の破骨細胞マーカー遺伝子発現と破骨細胞の組織学的解析

- (A) *Sost*^{G/G} に埋入した異所性骨における破骨細胞マーカー遺伝子発現. WT および *Sost*^{G/G} マウスに埋入後 14 日目の異所性骨における破骨細胞マーカー遺伝子 (*Acp5*, *Ctsk*) の発現を測定した ($n=6$, * $p<0.05$). 対照として, 10 週齢の脛骨における遺伝子発現を測定し

た.

(B) WT および *Sost*^{G/G} マウスに埋入後 14 日, 28 日目の BMP-2 誘導性異所性骨における TRAP 染色像. 骨表面の赤色の細胞が TRAP 陽性破骨細胞 (矢頭) を示す. スケールバー, 50 μm .