

53. 骨恒常性と老化・生活習慣病の連関

根岸 貴子

昭和大学 歯学部 歯科薬理学

Key words : 骨代謝, 骨粗鬆症, 破骨細胞, RANKL, デノスマブ

緒言

骨粗鬆症は、加齢や閉経が原因となるもの（原発性）と、糖尿病や慢性腎臓病といった生活習慣病、関節リウマチなどの自己免疫疾患に付随するものや、疾患治療に用いたステロイド薬によっておこる続発性骨粗鬆症に大きく分けられる。骨粗鬆症の骨量減少の原因細胞となる破骨細胞は骨髄に存在する単球/マクロファージ系の前駆細胞と共通の前駆細胞から、破骨細胞分化因子 RANKL の刺激に依存して分化する。近年、RANKL の機能を抑制する抗 RANKL 中和抗体デノスマブが閉経後骨粗鬆症や多発性骨髄腫やがんの骨転移による骨病変の予防や治療に臨床応用されるようになり、功を奏している。しかし、デノスマブは完全ヒト型抗体であり、げっ歯類の RANKL には交差しないため、臨床前動物実験で得られた知見は少ないまま、妊婦への使用は禁忌とされている。そこで、抗マウス RANKL 抗体を妊娠マウスに投与して、出産後の母マウスと新生仔の骨組織および全身の恒常性への影響について検討した。また、高齢者ではアルツハイマー型認知症やパーキンソン病といった疾患が急増するが、同時に骨量減少が多くみられることが知られている。しかし、これらの疾患の関連性は知られていない。このことを明らかにするために、アルツハイマーモデルマウスやパーキンソンモデルマウスを作製し、中枢神経障害と骨代謝の関連について検討している。本報告書では高齢化社会の骨疾患の理解と治療法に関する研究として、前者の結果について報告する。

方法および結果

1. 妊娠マウスの骨構造に対する抗マウス RANKL 抗体投与の影響

マウスの RANKL の作用を中和する抗 RANKL 抗体 (OYCI、オリエンタル酵母工業株式会社) 5 mg/kg を、11 週齢の C57BL/6J の妊娠マウスに交配 7 日後に一回、腹腔投与した¹⁾。対照として、同じく妊娠マウスに生理食塩水を投与した群と、同週齢の非妊娠マウスに抗 RANKL 抗体または生理食塩水を投与した群とを作製した。妊娠マウスの出産日 (投与からおおよそ 12 日後) に母マウスと非妊娠対照マウスの右後肢を摘出し、 μ CT による骨構造解析 (図 1A) および骨組織切片を用いた組織学的解析 (図 1B および C) を実施した。また、妊娠期間中の骨代謝の動態を検討する目的で、破骨細胞が産生する酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) の血中濃度を ELISA 法により測定した。 μ CT 解析の結果から、妊娠の有無にかかわらず抗 RANKL 抗体は骨量を増加させる効果を持つことが確認された (図 1A)。しかし、骨組織解析の結果、非妊娠マウスに抗 RANKL 抗体を投与した群では、一次海綿骨領域における顕著な破骨細胞の減少が見られたのに対し¹⁾ (図 1B および C)、生理食塩水を投与した妊娠マウスでは非妊娠マウスより多くの TRAP 陽性破骨細胞が検出され、また、その数は、抗 RANKL 抗体を投与した妊娠マウス群で変わらなかった (図 1B および C)。この結果と一致して、血中 TRAP 濃度は非妊娠マウスの抗 RANKL 抗体投与群で、投与後から出産日に相当する投与後 12 日後まで、検出不能レベルにまで低下していたのに対し (図 2D)、妊娠マウスの抗 RANKL 抗体投与群では、投与直後に血中 TRAP の濃度低下がみられるものの、出産日の投与後 12 日後には生理食塩水投与群と同等かまたはそれ以上のレベルにまで回復していた (図 2D)。

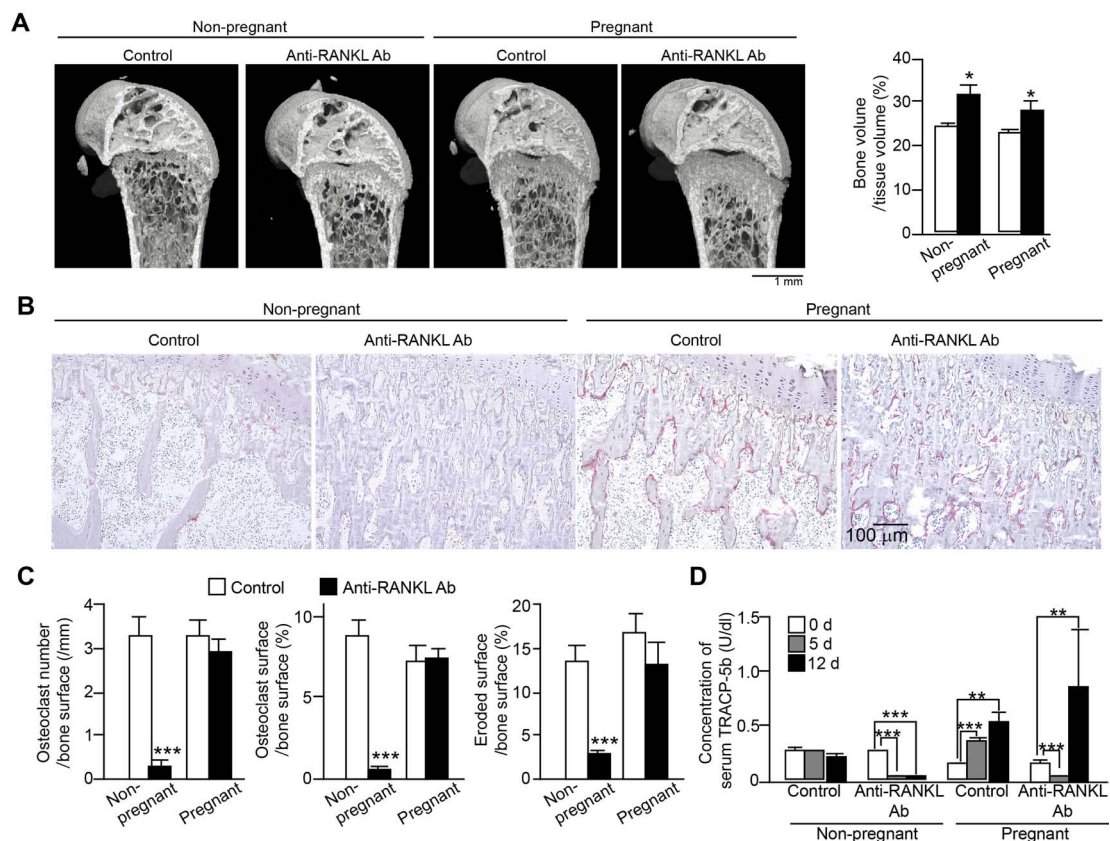


図 1. 妊娠および非妊娠マウスにおける抗 RANKL 抗体の骨構造に対する効果

(A) μ CT による抗 RANKL 抗体 (Anti-RANKL) または生理食塩水 (Control) を投与したマウスの右後肢大腿骨の 3D イメージ。非妊娠マウスおよび妊娠マウスともに、抗 RANKL 抗体投与により、関節軟骨下部の成長板直下の一次海綿骨が顕著に増加しているのが認められる。Bone volume/tissue volume: 骨量。

(B) 骨組織学的解析による抗 RANKL 抗体または生理食塩水を投与したマウスの右後肢脛骨一次海綿骨領域の TRAP 染色像。妊娠マウス群では非妊娠マウス群に比較して、TRAP 陽性 (赤く染まった細胞) の破骨細胞が多くみられる。

(C) 骨組織学的解析による破骨細胞のパラメータ。非妊娠抗 RANKL 投与群では破骨細胞数 (Osteoclast number/bone surface)、破骨細胞面 (Osteoclast surface/bone surface)、骨吸収穿 (Eroded surface/bone surface) が顕著に減少しているが、妊娠マウスでは抗 RANKL 抗体の効果は見られない。

(D) 抗 RANKL 抗体 (Anti-RANKL Ab) または生理食塩水 (Control) を投与したマウスの血中 TRAP 濃度。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.005$; the error bars: SEM。

2. 妊娠中における抗 RANKL 抗体の胎児骨組織への影響

妊娠マウスの子宮内で抗 RANKL 抗体に曝された胎児の骨形成・骨代謝を解析するために、出生直後の仔マウスの骨組織を用いた μ CT 解析および骨組織学的解析を実施した。抗 RANKL 抗体を投与された妊娠マウスから生まれた仔の全長、体重、長管骨の長さなどに差は見られなかったが、 μ CT および骨組織学的解析の結果から、骨組織の破骨細胞が顕著に減少して、骨量が有意に増加していることが明らかになった (図 2)。

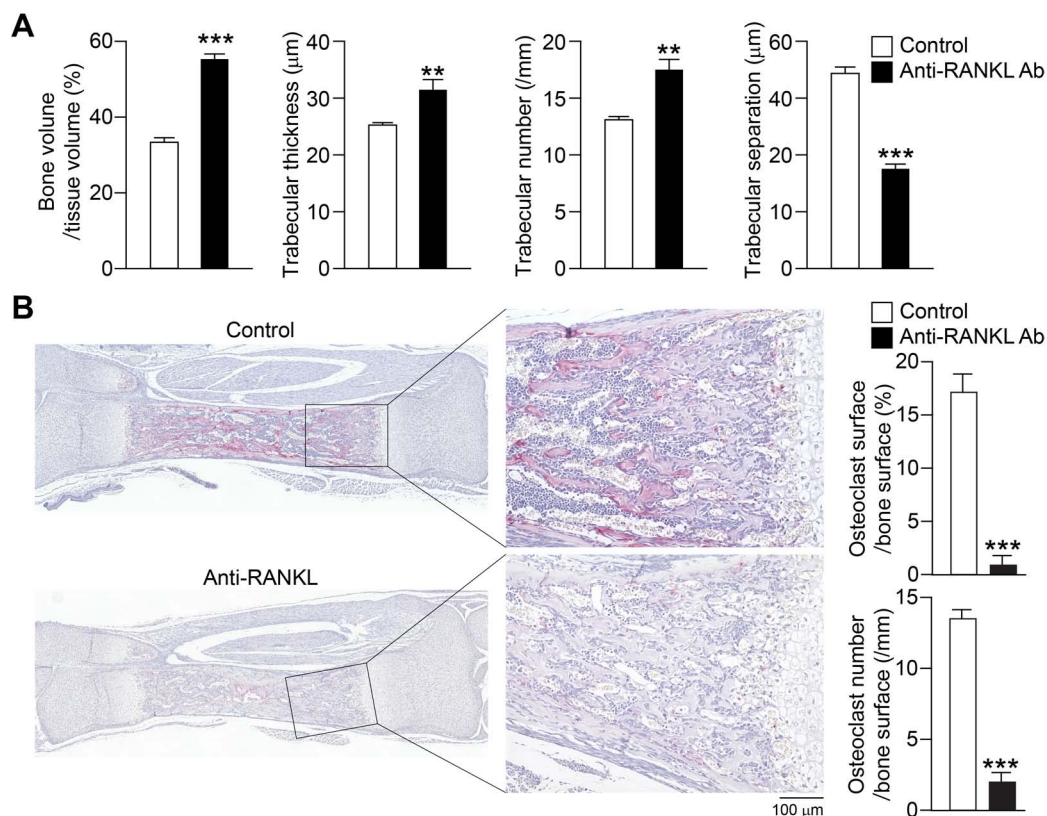


図2. 妊娠期間中の抗 RANKL 抗体投与の胎児骨組織に及ぼす影響

(A) μ CT による骨構造の解析。骨量 (Bone volume/tissue volume)、骨梁の幅 (Trabecular thickness)、骨梁の数 (Trabecular number) は抗 RANKL 抗体に曝された仔マウスで増加した。骨梁間隙 (Trabecular separation: 骨の疎密程度を表す) は減少した。

(B) 骨組織学的解析。TRAP 陽性の破骨細胞が顕著に減少した。** $P < 0.01$; *** $P < 0.005$; the error bars: SEM.

3. 妊娠マウスの乳腺の発達と育児に対する抗 RANKL 抗体の影響

RANKL シグナルは妊娠中の乳腺の発達に重要な役割を果たしており、RANKL ノックアウトマウスではこれが障害され、授乳不能になることが知られている²⁾。そのため、抗 RANKL 抗体でも妊娠マウスの乳腺発達に影響するか否かを検討した。その結果、RANKL ノックアウトマウスと同様、抗 RANKL 抗体を投与したマウスでは乳腺が未発達 (図3) で、仔はすべて出生後 48 時間以内に死亡した。しかし、RANKL ノックアウトマウスでの報告とは異なり²⁾、育児行動自体を放棄している現象が見られた。また、抗 RANKL 抗体に暴露された仔マウスは、健康な仮親に育てさせてもその 33% 程度しか生存しなかった。

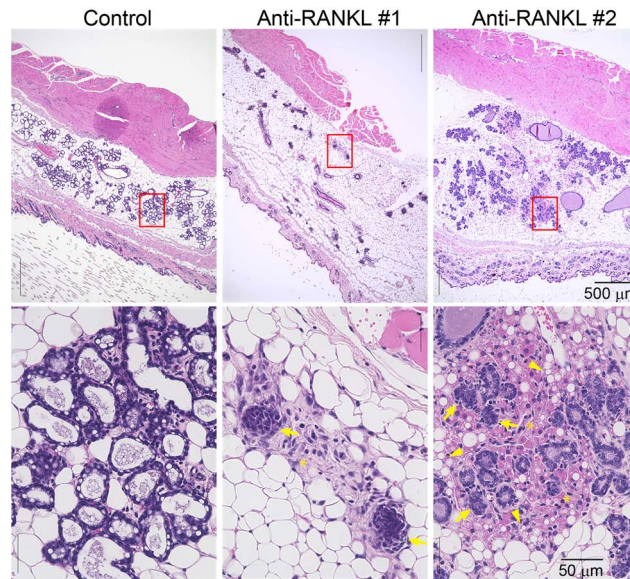


図 3. 妊娠マウスの乳腺の発達に及ぼす抗 RANKL 抗体投与の影響

抗 RANKL 抗体 (Anti-RANKL #1 および #2) および生理食塩水 (Control) を投与した妊娠マウスの出産直後の乳腺の組織切片像 (ヘマトキシリン/エオジン染色)。下段：上段の赤枠で囲った領域の拡大図。黄色矢印：未熟な乳腺腺房、間腔構造が欠如。黄色矢頭：サイズの不揃いな異常な脂肪細胞群。黄色*：結合組織の異常な侵入。

考 察

抗 RANKL 抗体は妊娠中にも骨量増加効果をもつ。しかし、妊娠中の骨代謝は、非妊娠中と挙動が異なり、破骨細胞による骨吸収とそれに引き続く骨形成のおこる頻度 (骨代謝回転) が加速している可能性がある³⁾。このことは、抗 RANKL 抗体を投与した妊娠マウスの骨組織解析や血中 TRAP 濃度の変化が示したように、一度抗 RANKL 抗体で抑制されても、破骨細胞が回復する時間が早くなることを意味する。したがって、非妊娠時に適応される濃度の抗 RANKL 抗体濃度では不十分である可能性がある。

しかし、妊婦の骨代謝への効果を優先させるよりも、重要な情報が本研究から得られた。抗 RANKL 抗体の投与は妊娠中における乳腺の発達を障害するだけでなく、仔はそれによる哺乳障害に起因する死亡だけでなく、原因不明の出生後死亡を引き起こすことが示唆された。母マウスの育児に関するホルモン制御に及ぼす影響や、仔の体温低下などの現象が原因と見られた。これらのことは、RANKL ノックアウトマウスやデノスマブを用いたサル臨床前実験の結果⁴⁾からは得られなかった知見であり、本研究は、すでに臨床応用されている抗体薬デノスマブの安全性を検証するにあたり、新たな視点からの検証の必要性を提唱することにつながった。

共同研究者

本研究を遂行するにあたり、昭和大学歯学部歯科薬理学の坂井信裕講師、同所属唐川亜希子助教、大学院生の岡松信明の共同研究として実施しました。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Furuya Y, Mori K, Ninomiya T, Tomimori Y, Tanaka S, Takahashi N, et al. 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: 37023-37031. doi: 10.1074/jbc.M111.246280. PubMed PMID :21862583

- 2) Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA. et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 2000; 103: 41-50. PubMed PMID: 11051546
- 3) Negishi-Koga T, Takayanagi H. Bone cell communication factors and Semaphorins. *Bonekey Rep.* 2012; 183 (1). doi: 10.1038/bonekey.2012.183. PubMed PMID:24171101
- 4) Bussiere JL, Pyrah I, Boyce R, Branstetter D, Loomis M, Andrews-leavenger D et al. Reproductive toxicity of denosumab in cynomolgus monkeys. *Reprod Toxicol* 2013; 42: 27-40. doi: 10.1016/j.reprotox.2013.07.018. PMID: 23886817