

学位論文内容の要約

愛知学院大学

甲 第 659 号	論文提出者 吉 廻 守
論文題目 若年性骨ペーজেット病の病態に類似する OPG knockout mice (OPG KO mice)の 全身的な骨構造、機械的強度の検討	

図、表、写真を使用した学術論文の投稿を予定しており、不利益が生じるおそれがあるため全文の公表を不可とし、「内容を要約したもの」を公表する。

I. 緒言

矯正歯科治療は、成長発育が盛んな混合歯列期より治療を開始することが多く、この時期は骨の成長を利用して骨格的な改善が期待できる時期であることから、器械的な力や装置から発生するメカニカルストレスを利用し、顎骨の骨代謝を促進あるいは抑制させて成長のコントロールを行なっている。上顎は、上顎骨とそれに隣接する顔面骨で鼻上顎複合体を構成し、骨吸収と骨添加を繰り返し、さらに縫合性成長により成長する。一方、下顎骨は、骨膜性成長と歯槽性成長、および下顎頭における内軟骨性骨形成により成長することが知られている。一般的に、成長における骨化には成長機序から、大きく分けて軟骨内骨化と膜性骨化の2つに大別される。膜性骨化とは、軟骨を経由することなく未分化間葉系細胞が直接骨芽細胞に分化して骨組織を形成する。一方、軟骨内骨化は、未分化間葉系細胞が軟骨細胞へ分化し、軟骨組織が形成され、その軟骨が骨組織に置換される。このように、顎顔面骨は、膜性骨化と軟骨内骨化が複雑に混在して成長することが知られている。

破骨細胞は、石灰化した組織を破壊する唯一の細胞であり、破骨細胞の分化・成熟・機能は、骨芽細胞あるいは骨髄間質細胞の細胞膜上に発現す

る RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) によって厳格に調整されている。骨芽細胞が産生する Osteoprotegerin (OPG) は、TNF receptor superfamily の一員で、RANKL のデコイ受容体であり、OPG は、RANKL と RANK の相互作用を強力に抑制することで、破骨細胞の分化と機能発現を抑制する。In vivo においては、マウスに OPG を過剰発現させると骨吸収が抑制された重篤な大理石骨病を呈する。一方、OPG 遺伝子欠損マウス (OPG KO マウス) は、出生時には正常だが、成長に伴い破骨細胞活性が亢進していき、成長後の OPG KO マウスは Wild type マウス (WT マウス) と比較し、骨量が疎で骨密度が低く重篤な高回転型骨粗鬆症を呈している。また、OPG KO マウスの所見は、ヒトにおける若年性骨ペーজেット病の所見と極めて類似しており、OPG KO マウスは、若年性骨ペーজেット病の病態を呈している。

本研究では、OPG KO マウスを用い全身的な骨構造、機械的強度の比較、検討を行うことにより、OPG 遺伝子が欠損することで軟骨内骨化と膜性骨化にどのような影響を及ぼすかを精査することを目的とし、軟骨内骨化を経る腰椎、四肢骨において膜性骨化と軟骨内骨化を経る大腿骨と、膜性骨化を経る頭頂骨について比較、検討することにより、OPG KO マウスと類似していると報告されている若年性骨ペーজেット病の病態の解明にもつながると考え、実験を行った。

II. 実験材料および方法

1. 動物および試薬

本研究の実験動物には、生後 8、12、16 週齢の雄性 OPG KO マウス (n=18) および対照群として WT マウス (C57BL/6 J) (n=18) を使用した。8、12、16 週齢時にジエチルエーテル麻酔下にて血液を採取し、その後、大腿骨と第 2 および第 6 腰椎、頭頂骨を摘出した。

2. 評価方法

第 2 腰椎椎体部、右側大腿骨骨幹部、右側頭頂骨は、マイクロ CT (SMX 225CT-SV 3, Shimadzu, Kyoto, Japan) にて撮影を行い、骨体積/組織体積 (BV/TV) と骨梁数 (Tb. N) を算出した。さらに、右側大腿骨骨幹部は、描出された皮質骨の厚さを計測し、右側頭頂骨については、中央部の厚さの計測を行った。すべての解析は、ソフト TRI/3D-BON (RATOC SYSTEM ENGINEERING CO., LTD, Tokyo, Japan) を用いて行った。

力学的解析は、第 6 腰椎、左側大腿骨、左側頭頂骨にて行われた。第 6 腰椎は圧縮試験、左側大腿骨は三点曲げ試験、左側頭頂骨はヌープ硬さ試験が行われた。第 6 腰椎は、椎体を切り離し、柱状に整え、直ちに圧縮試験を行った。左側大腿骨は、支点間距離 5 mm の台座に乗せ、左側大腿骨中央部にて前方側から三点曲げ試験を行った。第 6 腰椎、左側大腿骨の試験は材料試験機 (EZ Test, Shimadzu, Kyoto, Japan) を用い、試験速度はクロスヘッドスピード 1 mm/分の速度で行い、最大試験力を解析した。また、左側頭頂骨は、微小硬さ試験機試験 HMV (MODEL-MVK Akashi, Tokyo, Japan) を用いてヌープ硬さを計測した。試験部位は、頭頂骨外面中央部で、試験

荷重 25g を 30 秒間付加し、計測した。

組織学的解析は、第 2 腰椎と右側頭頂骨にて行われた。採取後、10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、10%EDTA (pH7.2) で約 4 週間、4℃の条件下で脱灰し、通法に従ってパラフィン包埋を行った。第 2 腰椎は、厚さ 5 mm の長軸方向の連続切片、右側頭頂骨は矢状断方向の連続切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色(H. E. 染色)、酒石酸塩耐性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色を行った。その後、第 2 腰椎における H. E. 染色では、骨梁構造を観察した。破骨細胞数計測は、ランダムに選択した領域内で行い、Parfitt らによる定義に従って、骨面における破骨細胞数 (Oc. N/BS) を計測した。右側頭頂骨は、中央部において頭頂骨全層の厚み、外板と内板の厚みの総和を計測し、破骨細胞数計測は、頭頂骨表面、骨髓腔内骨表面の破骨細胞を計測した。

3. 統計的処理

得られた実験データは平均値と標準誤差で示し、統計的な有意差検定は一元配置分散分析 (Tukey' s multiple comparison test) を用いた。全ての統計解析は、GraphPad Prism v. 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) を用いて行った。 $p < 0.05$ を統計的有意差ありと判定した。

III. 結果

1. 血清骨代謝マーカーの測定

血中 TRAP 値は、8、12、16 週齢全てにおいて WT マウスと比較し、OPG KO

マウスは有意な差をもって血中 TRAP 値は高い値を示していた。血清 ALP 値は、8、12、16 週齢全てにおいて WT マウスと比較して OPG KO マウスは有意な差をもって血清 ALP 値は高い値を示していた。

2. 第2腰椎、大腿骨の海綿骨密度、骨梁数の比較

WT マウスでは、腰椎、大腿骨において OPG KO マウスと比較して骨密度は高いが、OPG KO マウスは、骨梁が粗であった。骨形態計測より、腰椎において BV/TV は、8 週から 12 週において有意に減少を示した。大腿骨においても BV/TV、Tb.N 共に有意に低い値を示し、8 週から 12 週にかけて有意に減少を示した。

3. マイクロ CT による大腿骨皮質骨と頭頂骨の厚さの比較

大腿骨皮質骨の厚さは、8、12、16 週齢全てにおいて WT マウスと比較して OPG KO マウスは有意な差をもって低い値を示していたが、頭頂骨の厚さは、8、12、16 週齢全てにおいて WT マウスと比較して OPG KO マウスは有意な差をもって高い値を示していた。

4. 第6腰椎椎体部、大腿骨、頭頂骨における力学的性質の比較

腰椎椎体部の圧縮試験、大腿骨の三点曲げ試験共に 8、12、16 週齢全てにおいて WT マウスと比較して OPG KO マウスは有意な差をもって最大試験力は低い値を示していた。頭頂骨のヌープ硬さ試験では、8、12、16 週齢全てにおいて WT マウスと OPG KO マウスの間に有意な差は認められなかった。

5. 第2腰椎のH.E.染色組織所見

WT マウスは8、12、16週と骨梁は維持されていたが、OPG KO マウスは、WT マウスと比較して、8週で既に骨梁は粗であり、12、16週と日数を経るごとにさらに骨梁が喪失する所見を認めた。

6. 頭頂骨のH.E.染色による厚さの比較

頭頂骨全層の厚さ、頭頂骨内板、外板の厚みの総和共に、8、12、16週齢全てにおいてWT マウスと比較してOPG KO マウスは有意な差をもって高い値を示していた。

7. 破骨細胞数の計測

第2腰椎では、8、12、16週齢全てにおいてWT マウスと比較してOPG KO マウスは有意な差をもって破骨細胞数は多かった。右側頭頂骨では、8、12、16週齢全てにおいてWT マウスとOPG KO マウスの間に有意な差は認められなかった。

IV. 考察

1. 軟骨内骨化と膜性骨化について

頭蓋顔面において膜性骨化を経る組織と軟骨内骨化を経る組織では、骨形成、成長、発育に関して、異なる点があると考えられた。

2. OPG KO マウスと若年性骨ページェット病について

今回、OPG KO マウスは、骨代謝回転の亢進、長骨における骨粗鬆症と脆弱性が認められ、若年性骨ページェット病と同様の所見が認められた。OPG

KO マウスと若年性骨ページェット病の所見が極めて類似していることから、若年性骨ページェット病患者においても頭頂骨の組織において、内板、外板の肥厚が認められ、それに伴い全層が厚い所見が認められる可能性が考えられる。

3. 若年性骨ページェット病患者に対するビスフォスフォネート投与について

ビスフォスフォネートを投与した場合、頭蓋顔面を除く全身的には正常に近づくが、頭蓋顔面の膜性骨化の成長様式をとる部位、特に頭頂骨は、大理石病のような状態となり、結果として、頭頂骨の異常な肥厚や骨硬化、マイクロクラックの出現などの副作用が起こる可能性が考えられる。つまり、OPG KO マウスと若年性骨ページェット病が極めて類似していることを考慮すると、ヒトにおける若年性骨ページェット病の頭頂骨においても同様のことが起こる可能性が考えられ、ビスフォスフォネートを使用し、治療を行う際には注意が必要であり、特に、頭頂骨において今後、詳細にわたる検討が必要と考えられる。

V. 結論

本研究は、OPG KO マウスを用い全身的な骨構造、機械的強度の比較、検討を行うことにより、OPG 遺伝子が欠損することで軟骨内骨化と膜性骨化にどのような影響を及ぼすかを精査することを目的とし、腰椎、大腿骨と、頭頂骨について OPG KO マウスと WT マウスで比較、検討を行った。

(内 容 の 要 約)

No. 8

愛知学院大学

その結果、OPG が欠損することは、破骨細胞が多数形成されることを意味するが、頭蓋顔面において膜性骨化を示す頭頂骨よりも、軟骨内骨化を経る腰椎、四肢骨において膜性骨化を示す大腿骨に、より大きく影響を与え、特に頭頂骨は他の部位と異なる組織学的な差異が認められた。これらのことから、OPG が欠損することによる影響は、軟骨内骨化と膜性骨化で異なり、さらに膜性骨化の中でも顔面頭蓋や四肢骨など部位特異的に異なる影響を及ぼすことが示唆された。