

氏名	木 全 正 崇
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 3 1 1 4 号
学位授与の日付	平 成 1 8 年 3 月 2 4 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	免疫抑制剤FK506投与骨粗鬆症モデルマウスにおける骨吸収機序の検討

論文審査委員 教授 山本 敏男 教授 北山 滋雄 教授 菅原 利夫

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

### [緒言]

近年、骨免疫学では、T細胞に注目が集まり、活性化されたT細胞により receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)が発現され、破骨細胞が増加し骨破壊をひき起こすとされている。一方、T細胞の活性化を抑制する免疫抑制剤を使用した場合においても、破骨細胞が増加し骨破壊が進行し、重篤な骨粗鬆症がひき起こされる。これら両者は、T細胞の役割に矛盾が生じることから、免疫抑制剤投与による骨粗鬆症はT細胞以外の他の因子の関与により、RANKL発現による破骨細胞が増加し骨破壊がひき起こされるのではないかと考えた。そこで本研究では、T細胞活性阻害剤のうち免疫抑制作用と副作用の面において、より有効な薬剤である免疫抑制剤FK506を選択してT細胞が抑制された状態での骨粗鬆症を、細胞膜上にRANKLを発現するB細胞に注目し検討した。

### [材料と方法]

#### 1. 実験動物の作製

実験動物には6週齢のICR雄性マウス40匹を用い、実験群にはFK506 (1mg/kg/day)を、対照群には生理食塩水を1、4週間の連日腹腔内投与し、投与終了後、血液を採取し、大腿骨、脛骨を摘出した。

#### 2. 軟X線撮影、マイクロCT撮影による観察

摘出した右側大腿骨は、軟X線撮影装置(SOFRON TYPE SRO-M50)を用いてX線学的観察を行った。摘出した左側大腿骨は、3DマイクロCT装置(CBSTAR MCT-100CB)を用いて撮影し、大腿骨の海綿骨のみ三次元構築し、画像解析ソフト(MCT system software package)を用いた統計学的な検討を行った。

#### 3. 組織学的観察

摘出した脛骨は、4%パラホルムアルデヒド-0.05Mリン酸緩衝液で固定し、10%エチレンジアミン四酢酸で脱灰し、アルコール系列にて脱水し、パラフィン切片を作製した。組織学的観察のためにヘマトキシリン・エオジン(H-E)染色、破骨細胞の観察のためにACID PHOSPHATASE 387A (Sigma-Diagnostics)を用いた酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ(TRAP)染色、およびB細胞の観察のために抗CD45R/B220モノクローナル抗体(BD Pharmingen)を用いた免疫組織化学染色を行った。

#### 4. 血液生化学的検討

血清中の RANKL 量、TRAP 量は、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法を用いて定量した。

#### 5. 共存培養系における B 細胞添加による破骨細胞形成の影響についての検討

破骨細胞の形成は、初代骨芽細胞様細胞と骨髄細胞に活性型ビタミン D を添加する共存培養系を用いた。24 ウェル細胞培養用プレートを用いて、共存培養系に Cell Culture Insert (BD Labware) を介し、MACS 磁気細胞分離システム (MiniMACS) により回収した CD45R 陽性細胞をフィルター上面に播種した群を非接触群、フィルターを介さずに直接播種した群を接触群とした。

7~10 日間培養後、破骨細胞様細胞の同定は、TRAP 染色にて評価し、吸収窩形成能は、Pit formation assay 法にて評価した。

#### [結果]

投与 4 週間後において、実験群は対照群と比較して、X 線学的に大腿骨の海綿骨の透過性が亢進し、マイクロ CT による統計学的な骨量の解析で、大腿骨海綿骨において有意な骨密度の減少を認めた。H-E 染色では、対照群で連続性のある骨梁が認められるのに対し、実験群では、骨の吸収を受け骨梁の連続性が失われ、それに伴い、骨髄腔の拡大を認めた。TRAP 染色では、実験群は対照群と比較して、TRAP 陽性で多核の破骨細胞が多く観察された。ELISA 法による血液生化学的検討では、TRAP 量、RANKL 量は、ともに有意に増加していた。また、免疫組織化学染色を用いた組織学的検討により、実験群において B 細胞は TRAP 陽性で多核の破骨細胞の近くに集積している様子が観察された。

培養実験により、接触群は、非接触群と比較して、TRAP 陽性で多核の破骨細胞様細胞の増加が、有意に認められた。

#### [考察]

組織学的検討により、B 細胞は破骨細胞の近くに集積している様子が観察され、さらに、純粋な状態で確認するために培養実験を行い、接触群において破骨細胞様細胞の有意な増加が認められた。以上より、破骨細胞前駆細胞と B 細胞とが接触することにより、破骨細胞の分化が促進されることが示唆された。

本研究において、免疫抑制剤 FK506 による骨粗鬆症では、免疫細胞、とくに B 細胞の破骨細胞前駆細胞への作用により破骨細胞を増加させ骨粗鬆症をひき起こすことが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

近年、骨免疫学では、活性化されたT細胞にreceptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL)が発現され、破骨細胞が増加し骨破壊をひき起こすとされている。一方、T細胞の活性化を抑制する免疫抑制剤を使用した場合においても、破骨細胞が増加し骨破壊が進行し、重篤な骨粗鬆症がひき起こされる。これらの現象から、免疫抑制剤投与による骨粗鬆症はT細胞以外の因子の関与によるRANKL発現に起因する破骨細胞の増加が骨破壊をひき起こすのではないかと考えた。

本研究は、T細胞活性阻害剤のうち免疫抑制剤FK506を選択してT細胞が抑制された状態での骨粗鬆症を、細胞膜上にRANKLを発現するB細胞に注目し検討したものである。

実験動物にはマウスを用い、実験群にFK506を4週間連日腹腔内投与した結果、局所的に骨粗鬆症様症状が発症していることが確認された。ELISA法による血液生化学的検討では、TRAP、RANKLは、ともに有意に増加していた。また、免疫組織化学染色を用いた組織学的検討により、実験群は対照群と比較して、B細胞は破骨細胞の近くに集積していることが観察された。さらに、骨髄の培養細胞系を用いた実験を行い、B細胞接触群において破骨細胞様細胞の有意な増加が認められた。以上より、破骨細胞前駆細胞とB細胞とが接触することにより、破骨細胞の分化が促進されることが示唆された。

これらのことから、FK506による骨粗鬆症では、B細胞の関与により破骨細胞が増加することを示唆する新たな知見を得ることができた。

以上のことから、本研究は、FK506の及ぼす局所的な骨の変化、培養実験の結果から、FK506による骨吸収機序にはB細胞が関与することを示したものである。この結果は、免疫抑制剤FK506投与時における骨粗鬆症発症機序の解明につながる有用な結果であり、本申請論文は博士（歯学）の学位論文に値するものと認められた。