

論文要旨等報告書

氏名	松原 正和
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 8 4 4 号
学位授与の日付	平成 2 1 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医歯薬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	1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid(DHNA)投与による骨吸収抑制機序の検討

論文審査委員 教授 北山 滋雄 教授 山本 敏男 教授 皆木 省吾

学位論文内容の要旨

(本研究の目的)

現在骨粗鬆症患者は本邦においても約1,000万人以上いると推測されており、高齢化社会の抱える大きな社会問題となっている。骨粗鬆症の治療にはビスフォスフォネート (BP) 製剤に代表されるように一般的には薬物療法が行われ、患者自身は長期に薬物内服の生活を強いられることも多い。このような薬剤内服患者において、副作用の問題も重要な課題である。特に近年口腔領域ではBP製剤内服患者の歯科治療後に顎骨壊死等の報告が急増している。そのため今後安全かつ効果的な骨粗鬆症の治療法の開発が望まれている。そのためわれわれは骨代謝に関与する微生物因子である1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid(DHNA)に注目し、骨代謝に関する効果について検討を行った。DHNAとは乳製品生成の際使用するプロピオン酸菌の代謝発酵産物であり、生体に対し様々な効果があるとされている。本来このDHNAはBifidogenic Growth Stimulator (ビフィズス菌増殖因子) として認識され、整腸作用を有することが注目されていた。しかし近年の研究にてDHNAは骨粗鬆症治療に有効なメナキノン (ビタミンK2) と類似した骨格 (ナフトキノン骨格) を有していることが判明した。このDHNAを骨粗鬆症モデルに投与し得られる骨粗鬆症の改善効果について、①全身における病態変化②局所における形態的变化③培養実験について検討を行った。

(実験方法)

実験動物作成法: 骨粗鬆症モデルには免疫抑制剤 (FK506) を使用した。近年移植学分野において臓器移植後、長期の免疫抑制療法において骨粗鬆症が発症するとの報告が多い。我々もFK506を連日投与することでマウスに骨粗鬆症様の病態が発症することを確認している。ICR雄性マウスにFK506を1mg/kg、5週間連日投与し、骨粗鬆症モデルマウスを製作した。また本実験では3群を用意した。その内容はFK506単独投与群 (以下FK群) FK-DHNA併用投与群 (以下FK-DHNA群) FK506-DHNA非投与群 (以下対照群) であり、それぞれ10個体ずつ準備した。

①全身における病態変化: 各群マウスは5週間連日投与を行い、投与終了後解剖し大腸、両側の頸骨、大腿骨を採取し眼下静脈より採血した。採取した大腸は組織学的に解析し、血液より生化学的データ[血中尿素窒素(BUN)、血清クレアチニン(Cr)、血清カルシウム(Ca)]および骨吸収性サイトカインを測定した。

②局所における骨の形態的变化: 採取した右側頸骨、大腿骨はHE染色にて組織学的に解析し、また破骨細胞観察のために酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色 (TRAP染色) を行った。また左側頸骨、大腿骨はX線学的検討を行った。

③培養実験法：摘出した頸骨・大腿骨内の骨髓細胞を回収しreceptor activator of nuclear factor-kappaB ligand(RANKL), macrophage-colony stimulating factor(M-CSF)添加下での培養を行った。10日間の培養後にTRAP染色を行い、各群の破骨細胞数を計測した。

(結果)

①全身における病態変化：大腸組織はFK群において全個体で大腸組織の炎症が認められた。一方FK-DHNA群においては、大腸組織の損傷は軽度であった。また血液中のBUN, Cr, Ca濃度を計測した結果FK群で有意に上昇し、FK-DHNA群では低下していた。また骨吸収性サイトカインであるIL-1 β , IL-6, TNF- α の値を計測した結果、FK群ではすべての値が上昇しておりFK-DHNA群に有意差が確認された。

②局所における骨の形態的变化：摘出大腿骨の組織標本を作成しHE染色にて観察を行った。FK群の大腿骨遠位骨端部付近では骨量の減少が認められた。FK-DHNA群においては骨の損傷は軽度であった。またTRAP染色を行った結果、FK群では破骨細胞様の多核巨細胞が顕著に確認された。一方FK-DHNA群において細胞数は減少していた。軟X線撮影装置にて摘出大腿骨の撮影を行った結果、FK群では大腿骨近、遠位骨端部付近の海綿骨に透過性が亢進していた。一方FK-DHNA群では骨吸収は改善していた。

③培養実験法：培養骨髓細胞をTRAP染色し、TRAP陽性細胞の細胞数を測定した。FK群ではTRAP陽性で多核、単核の細胞が有意に確認された。FK-DHNA群では細胞数は減少していた。

(考察)

①全身における病態変化：大腸や腎臓はともに骨代謝に関連性のある臓器である。FK506長期投与によりこれらに二次障害が生じるとの報告がある。実際FK506群において大腸や腎機能障害は重篤であったが、FK-DHNA群においてこれらは改善が認められた。また骨吸収性サイトカインであるIL-1 β 等サイトカインもFK群で上昇し、FK-DHNA群では低下していた。FK506投与に伴う副作用がDHNAによって軽減されたことが示唆された。

②局所における骨の形態的变化：FK群において骨組織像、X線撮影像より骨減少が生じていると思われる。FK-DHNA群において骨減少は軽減されており、TRAP染色において確認された破骨細胞数も抑制されていた。これによりDHNA投与によって、骨量減少の改善効果があることが示唆された。

③培養実験法：破骨細胞の培養においてFK群では、TRAP陽性単核、多核細胞の出現が顕著に観察された。FK-DHNA群においてはこれら細胞数の抑制が確認された。このことよりDHNAが破骨細胞分化シグナルへ何らかの影響があることが示唆された。

これまでDHNAは整腸作用を主目的とされ、骨への影響についての報告はほとんどなくその効果は未解明であった。本実験においてDHNAは免疫抑制剤FK506による骨粗鬆症に対し改善効果を示した。本邦では現在このDHNAは食品添加物としての応用が検討されている。つまり日常的に簡単に摂取することが可能であり、現在のところDHNAによる明らかな毒性症状の報告はなく安全性についても立証済みである。この点は現在使用されている種々の骨粗鬆症治療薬とは大きく異なる。今回の実験においてDHNAは骨粗鬆症に対し有効な改善効果があることを示した。今後DHNAの作用機序を明らかに解明することで骨粗鬆症の治療に応用できる可能性があり、実現すれば骨粗鬆症の治療に大きく貢献するものと思われる。

論文審査結果の要旨

現在骨粗鬆症は高齢化社会の抱える大きな問題であり、本邦で約 1,000 万人以上の患者がいると推測され、その対策は今後の大きな課題である。骨粗鬆症の病因は主に加齢や慢性関節リウマチ等の自己免疫疾患などがあげられる。これらに対して臨床では薬物療法が主体であり、骨粗鬆症患者は長期にわたり薬剤の内服を強いられる。現在種々の薬物が開発され用いられているが、より簡便で安全性の確立された治療法の開発が望まれている。本研究では新規骨代謝改善物質として、プロピオン酸菌の発酵物質 (PC) より抽出した 1,4-dihydroxy-2-naphthoic-acid (DHNA) に注目した。この DHNA は整腸作用があり、他にも免疫力の向上をはじめ生体に有益な作用を持つことで注目されている。そこで今回は DHNA の骨への影響について免疫抑制剤 FK506 により惹起される骨粗鬆症モデルマウスを用いて以下のような結果を得た。

1. 大腸、腎機能、サイトカインなど全身的な病態変化

DHNA は FK506 による大腸組織の損傷を改善した。また FK506 により上昇する骨吸収性サイトカインである IL-1 β , IL-6, TNF- α などのサイトカイン産生を抑制した。

2. 局所における骨の形態的变化

骨粗鬆症モデル動物において DHNA 投与を行った結果、骨吸収の抑制効果を示した。組織学的には骨梁構造の維持や破骨細胞数の減少が確認された。X 線学的には FK506 による海綿骨の骨量減少は DHNA 投与により回復した。

3. 培養実験における破骨細胞の変化

破骨細胞培養実験において骨粗鬆症モデルマウスの大腿骨骨髄からの培養細胞中、FK 群では破骨細胞数の増加が観察されたのに対し、DHNA を投与した群では破骨細胞数の減少を示した。

以上の結果より DHNA が免疫抑制剤による骨吸収を改善させる効果があることが示唆された。これまで DHNA の骨への影響についての報告はなく、本研究は DHNA が骨粗鬆症に対して改善効果があることを初めて示唆したものである。これまで骨粗鬆症に対して薬物療法が中心であり、副作用の面からも患者への負担は大きかった。DHNA は明らかな毒性症状は伴わず安全に使用できる可能性を持ち今後骨粗鬆症治療への応用が期待できる。以上に示すように本研究は新規性が認められ、価値ある研究である。よって審査委員は本申請論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。