



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Effects of drug discontinuation after short-term daily alendronate administration on osteoblasts and osteocytes [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	坪井, 香奈子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11730号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59250
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Kanako_Tsuboi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏名 坪井 香奈子

学位論文題名

Effects of drug discontinuation after short-term daily alendronate administration on osteoblasts and osteocytes

(アレンドロネート連日投与中止が骨芽細胞・骨細胞に与える組織化学的影響)

【緒言】

アレンドロネート(ALN)は、骨粗鬆症患者に最も使用されている窒素含有ビスフォスフォネート(BP)製剤である。一般的に窒素含有 BP は、メバロン酸経路のファルネシルピロリン酸(FPP)合成酵素を抑制し FPP の合成を阻害することで、その下流のゲラニルゲラニルピロリン酸合成を阻害し、その結果、小胞輸送や細胞生存に重要な役割をする低分子 GTP 結合タンパク質の合成を障害する。低分子 GTP 結合タンパク質は破骨細胞にも存在し、これが障害されることで最終的に破骨細胞の機能不全を誘導し、骨吸収能を抑制することとなる。また、ALN は、他の BP 製剤よりリン酸カルシウムへ高い結合力を持ち、主に骨吸収面に集積し骨吸収を行っている破骨細胞を抑制することが知られている。このようにアレンドロネートは、破骨細胞をターゲットとした薬剤である。

ところで、通常のリモデリングは、骨吸収と骨形成はバランスをとりながら連動しており、それは破骨細胞と骨芽細胞との細胞学的なカップリングに依存している。したがって、ALN によって破骨細胞の骨吸収が抑制されてしまうと、その影響は骨芽細胞にも及ぶ可能性がある。また、骨芽細胞と骨細胞、さらに骨細胞同士は細胞突起を介して連結しているため、ALN の影響は骨芽細胞だけでなく、骨細胞にも及ぶと考えられる。

歯科領域において、近年のポジションペーパーでは、抜歯等の観血的処置時には、BP 製剤関連顎骨壊死の発症を抑制するために、処置前に BP 製剤を休薬することを推奨しているが、BP 製剤の投与を急に中止すると、破骨細胞の骨吸収が亢進することを懸念する意見も散見される。そこで、本研究では、ALN 連日投与後に休薬を行ったマウスのモデルを使用し、ALN 投与中および投与中止後における骨の細胞群の変化について組織化学的に解析した。

【材料と方法】

生後 6 週齢雌性 ICR マウスを用いて、1mg/kg の ALN を 10 日間連続皮下投与した。投与開始後 5 日目、および投与中止直後、12 時間、1、2、3、4 日後に灌流固定を行った。その後、大腿骨および脛骨を摘出して、通法にて、パラフィン、エポキシ樹脂ならびにクリオスタット切片を作製した。これらの切片を用いて、H-E 染色、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP)、アルカリホスファターゼ (ALP) の免疫組織化学ならびに透過型電子顕微鏡観察を行った。さらに ICR マウスに対し 1mg/kg の ALN を外頸静脈に 1 回投与後 3、9、24、36、48 時間後に灌流固定し、上記と同様に組織切片を作製し、コンドロイチン 4 硫酸、ローダミン・ファロイジンによるアクチン線維の免疫組織化学を行い、共焦点レーザー顕微鏡または Structured Illumination Microscopy (SIM)にて観察した。

【結果と考察】

10日間にわたる ALN 投与を中止し、4日間経時的に観察したが、大腿骨の骨幹端骨梁の数は維持されたままであり、一度、増加した骨梁数・量が投与中止後に直ぐに減少することはなかった。また、TRAP 陽性破骨細胞数は、ALN 投与中から投与中止後にかけて統計学的に有意差を示さなかった。この結果から、ALN 投与中止後に破骨細胞が急激に増加し、骨吸収がリバウンドすることではなく、ALN による骨量の維持効果は比較的長期間持続すると考えられた。

一方、破骨細胞のアポトーシス数は、ALN 投与中止後に増加した。特に投薬中止 2 日後からはコントロール群と比較し、アポトーシス数が有意に増加していた。そこで ALN 投与後の破骨細胞を透過型電子顕微鏡で観察すると、投与終了直後では、アポトーシスを起こす破骨細胞も認めたが、その一方で、豊富なミトコンドリアを有するが、波状縁や明帯を有さないため、骨基質に接しない多数の破骨細胞を観察した。このことから、ALN 投与中は、アポトーシスを起こす破骨細胞が存在する一方で、分化・多核化した状態でとどまり、骨吸収を行っていない破骨細胞も存在することが推察された。ところが休薬3日後では、核クロマチンの凝縮を伴う多数の破骨細胞のアポトーシス像が認められた。そのような破骨細胞の周囲には、活性型骨芽細胞や前骨芽細胞はほとんど存在しない傾向が認められた。

そこで、骨芽細胞を検索するため、骨芽細胞マーカーである ALP 免疫染色を行ったところ、ALN 投与中から ALP 活性は徐々に減少し、投薬中止後には有意に低下した。ALP 陽性領域を統計学的に解析すると、減弱した ALP 活性は投与中止後もすぐに回復することではなく、低い値を示していた。このことから、ALN により破骨細胞が抑制されるとカップリング機構が作用せず、骨芽細胞の数や活性に大きな影響が及ぶと考えられた。また、骨芽細胞の抑制は長期間持続する可能性が示唆された。

このように ALN の効果が破骨細胞だけでなく骨芽細胞にも及ぶと、骨細胞にも何らかの作用をきたす可能性が考えられる。そこで骨細胞を観察すると、ALN 投与中から投与中止後において、骨小腔には萎縮した骨細胞と広い間隙が認められた。萎縮した骨細胞の統計学的割合は、投薬中止後に有意に増加しており、少なくとも中止後 4 日まで持続していた。投薬中止後 3 日目の骨梁を電顕観察すると、骨梁表面には扁平化したごくわずかな骨芽細胞と萎縮した骨細胞が認められた。しかしながら、アポトーシスを示す骨細胞が有意に増加する傾向は認められなかった。

このような萎縮した骨細胞の出現は、ALN により骨芽細胞の活性が低下した間接作用なのか、あるいは、ALN の骨細胞への直接作用かを明らかにするため、我々は、ALN を外頸静脈から 1 回投与した後の骨細胞を観察した。すると、1 回投与 36 時間後では、骨基質には細胞体がふくよかな活性型骨芽細胞が局在しているにも関わらず、既に、歪な形態や萎縮した骨細胞が認められた。電顕観察では、萎縮した骨細胞と骨小腔壁の間には空隙が生じ、その中に網目状の不定形構造物が充満している像、あるいは、骨細胞が骨小腔の壁から一部引きちぎれた像を観察した。そこで、骨細胞の細管中のアクチン線維を SIM で観察すると、コントロール群では、骨細胞の細胞突起は長く伸びて互いに連結していたのに対して、ALN 投与群では、骨細胞の細胞突起のアクチン線維が一部断裂、または、不連続を示していた。さらに、骨小腔や骨細管に存在することが知られているコンドロイチン 4 硫酸の免疫組織化学を行うと、ALN 投与後には、骨細管内におけるコンドロイチン 4 硫酸が経時的に減少することが明らかにされた。従って、これらの所見から、ALN は骨細胞・骨細管系に対して直接作用を有するものと推測された。ALN の骨細胞への直接作用のメカニズムは不明であるが、可能性として、骨細胞は、骨細管を通過してきた少量の ALN を取り込み可能性があり、今後の検討課題と考えられる。

【結語】

ALN 投与中止後には、破骨細胞による骨吸収のリバウンドはないと考えられるが、骨芽細胞や骨細胞が持続的な機能低下が生じると推察された。