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_review.pdf, 審査の要旨 |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

# 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（歯学）　氏　名　坪井　香奈子

審査担当者　主査　教授　北川　善政
副査　教授　網塚　憲生
副査　教授　土門　卓文

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)

ビスフォスフォネート(BP)製剤であるアレンドロネート(ALN)は、その特徴として他の BP 製剤よりも、リン酸カルシウムへ高い結合力を有するため、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。しかし、骨吸収を行わない前破骨細胞を抑制するわけではないので、ALN 投与を急に中止すると骨吸収のリバウンドが起こる可能性が考えられる。また、一方で、骨リモデリングは、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おり、ALN で破骨細胞を抑制すると、骨芽細胞の骨形成も低下することが知られている。さらに、このことは、骨芽細胞と骨細胞は細胞突起を介して連結しているため、骨芽細胞の機能低下が骨細胞にも及ぶ可能性を示唆している。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。

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、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP)およびアルカリフォスファターゼ(ALP)の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 硫酸およびローダミン・ファロイジンによるアクチン線維の組織化学を行い、共焦点レーザー顕微鏡または Structured Illumination Microscopy (SIM)にて観察した。

ALN 投与中止後に 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、直ぐに減少することはなかった。透過型電子顕微鏡で投与終了直後の破骨細胞を観察すると、波状縁や明帯を持たず骨基質に接しない多数の破骨細胞を観察したことから、これら破骨細胞は骨吸収を行っていないことが強く示唆された。一方、休薬3日後では、核クロマチンの凝縮を伴う多数の TRAP 陽性破骨細胞のアポトーシス像が認められ

た。このことは、ALN 投与中止で破骨細胞数と機能が低下することを示唆していると考えられた。そこで、骨芽細胞のマーカー酵素である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ていた。ALP 陽性領域を統計学的に解析すると、ALP 活性は投与中止後すぐに回復することはなく、実験期間中は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長期間大きな影響が及ぶと考えられた。

次に、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。さらに、外頸静脈より ALN を 1 回投与し、36 時間後の骨基質を観察すると、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や骨細胞が骨小腔の壁から一部引きちぎれた像を認めた。そこで、骨細胞の細管中のアクチン線維を SIM で観察したところ、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、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、骨細管内における陽性反応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ことが示唆された。

以上より、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。

引き続き論文内容及び関連事項について、以下の項目を中心に質疑応答がなされた。

(1)非窒素含有 BP と窒素含有 BP の作用機序の違いについて
(2)破骨細胞と骨芽細胞とのカップリングについて
(3)破骨細胞のアポトーシス数の統計方法について
(4)画像イメージングの方法について
(5)アレンドロネートが骨細胞に作用するメカニズムについて
(6)アレンドロネートの骨細胞への直接作用を証明するための追加実験について

この結果は、全身性疾患における歯科医学・歯科治療を鑑みたときに、重要な基礎科学的情報を提供しており、学術的にも高く評価されると考えられた。加えて、上記の質疑応答から、申請者は本研究の内容を中心とした専門分野はもとより、関連分野について十分な理解と学識を有していることが確認された。

審査担当者全員は、学位申請者が博士(歯学)の学位を授与するに値するものと認めた。