HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	続発性骨粗鬆症の病態および治療に関する研究
Author(s)	清水, 智弘
Description	配架番号：2212
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12108号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12108
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/64801
Type	doctoral thesis
File Information	Tomohiro_Shimizu.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文

続発性骨粗鬆症の病態および治療に関する研究

(Studies on mechanisms and treatment of secondary osteoporosis)

2016 年 3 月

北 海 道 大 学

清水　智弘
Tomohiro Shimizu

学 位 論 文

続発性骨粗鬆症の病態および治療に関する研究

(Studies on mechanisms and treatment of secondary osteoporosis)

2016 年 3 月

北 海 道 大 学

清水　智弘
Tomohiro Shimizu

目　　次

発表論文目録および学会発表目録 …… 1 頁

緒言 …… 4 頁
略語表 …… 7 頁

第一章
緒言 …… 9 頁
実験方法 …… 11 頁
実験結果 …… 13 頁
考察 …… 17 頁

第二章
緒言 …… 19 頁
実験方法 …… 20 頁
実験結果 …… 23 頁
考察 …… 30 頁

第三章
緒言 …… 32 頁
実験方法 …… 34 頁
実験結果 …… 37 頁
考察 …… 42 頁

第四章
諸言 …… 44 頁
実験方法 …… 46 頁
実験結果 …… 47 頁
考察 …… 53 頁

第五章
諸言 …… 55 頁
実験方法 …… 56 頁
実験結果 …… 59 頁

考察 …… 67 頁

総括および結論 …… 69 頁
謝辞 …… 71 頁
引用文献 …… 72 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した.

1.Tomohiro Shimizu, Masahiko Takahata, Yusuke Kameda, Hiroki Hamano, Teppei Ito, Hiromi Suda-Kimura, Masahiro Todoh, Shigeru Tadano, Norimasa Iwasaki

Vitamin K-dependent carboxylation of osteocalcin affects the efficacy of teriparatide (PTH(1-34)) for skeletal repair.

Bone. 64:95-101, 2014

2.Tomohiro Shimizu, Masahiko Takahata, Yusuke Kameda, Tsutomu Endo, Hiroki Hamano, Shigeto Hiratsuka, Masahiro Ota, Norimasa Iwasaki

Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 15 (Siglec-15) mediates periarticular bone loss but not joint destruction in murine antigen-induced arthritis.

Bone. 79:65-70, 2015.

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. 清水　智弘, 高畑　雅彦, 亀田　裕亮, 東藤　正浩, 但野　茂, 岩崎　倫政
テリパラチドによる骨治癒促進効果にはビタミンK依存性Gla化蛋白オステオカルシンの充足が必要である
第28回日本整形外科学会基礎学術集会
平成25年10月17日-18日
幕張メッセ（千葉）

2. Tomohiro Shimizu, Masahiko Takahata, Yusuke Kameda, Hiroki Hamano, Teppei Ito, Hiromi Suda-Kimura, Masahiro Todoh, Shigeru Tadano, Norimasa Iwasaki
Vitamin K Maximizes the Efficacy of Teriparatide on Skeletal Repair
Orthopaedic Research Society 2014 Annual Meeting

March 15-18, 2014
Hyatt Regency New Orleans (New Orleans)

3. 清水　智弘, 高畑　雅彦,　亀田　裕亮,　濱野　博基, 伊藤　哲平,　木村―須田　廣美,　東藤　正浩,　但野　茂,　岩崎　倫政
ビタミンK依存性Gla化蛋白オステオカルシンはテリパラチドの骨治癒促進効果に影響する
第34回日本骨形態計測学会
平成26年6月12日-14日
さっぽろ芸文館（札幌）

4. 清水　智弘, 高畑　雅彦,　亀田　裕亮,　濱野　博基, 伊藤　哲平,　木村―須田　廣美,　東藤　正浩,　但野　茂,　岩崎　倫政
副甲状腺ホルモン製剤による骨治癒促進効果にはビタミンK依存性Gla化蛋白オステオカルシンの充足が必要である
第32回日本骨代謝学会
平成26年7月24日-26日
大阪国際会議場（大阪）

5. 清水　智弘, 高畑　雅彦,　亀田　裕亮,　遠藤　努, 濱野　博基, 平塚　重人,　太田　昌博, 岩崎　倫政
破骨細胞分化制御因子 Siglec-15 は関節炎に伴う関節破壊には関与しないが傍関節性骨粗鬆症を制御する
第32回日本骨代謝学会
平成26年7月24日-26日
大阪国際会議場（大阪）

6. 清水　智弘, 高畑　雅彦,　亀田　裕亮,　遠藤　努, 濱野　博基, 平塚　重人,　太田　昌博, 岩崎　倫政
破骨細胞分化制御因子 Siglec-15 は関節炎に伴う関節破壊には関与しないが傍関節性骨粗鬆症を制御する
第29回日本整形外科学会基礎学術集会
平成26年10月9日-10日
城山観光ホテル（鹿児島）

7. 清水　智弘,　高畑　雅彦,　亀田　裕亮, 濱野　博基,　平塚　重人,　太田　昌博,

奥村　潤一郎, 楫野　知通, 岩崎　倫政
関節リウマチ患者における骨微細構造の変化
第 27 回北海道骨粗鬆症研究会
平成 27 年 2 月 7 日
北海道大学学術交流会館（札幌）

8. Tomohiro Shimizu, Masahiko Takahata, Yusuke Kameda, Tsutomu Endo, Hiroki Hamano, Shigeto Hiratsuka, Masahiro Ota, Norimasa Iwasaki
Siglec-15 mediates periarticular bone loss but not joint destruction in murine antigen-induced arthritis
Orthopaedic Research Society 2015 Annual Meeting
March 28-31, 2015
MGM Grand Hotel (Las Vegas)

9. 清水　智弘, 高畑　雅彦, 亀田　裕亮, 遠藤　香織, 濱野　博基, 平塚　重人, 太田　昌博, 東藤　正浩, 但野　茂, 岩崎　倫政
関節リウマチでは早期から関節近傍皮質骨の骨質異常と骨脆弱性が生じる
第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会
平成 27 年 10 月 22 日-23 日
富山国際会議場（富山）

緒 言

骨粗鬆症は全身の骨強度が低下して骨折しやすくなった状態のことであり，世界保健機関 WHO により「低骨量と骨組織の微細構造の異常を特徴とし，骨の脆弱性が増大し，骨折の危険性が増大する疾患である」と定義されている．本邦における骨粗鬆症患者は約 1260 万人にのぼると推定されており，高齢人口の増加とともに罹患患者は増加の一途をたどっている.遺伝的素因や閉経および加齢によって骨代謝障害が生じる原発性骨粗鬆症がもっとも多いが，これらの要素以外に骨粗鬆症を惹起する特定の原因があるものは続発性骨粗鬆症と定義される.

続発性骨粗鬆症の原因は多彩であり，副甲状腺機能亢進症をはじめとする内分泌性疾患や，薬剤性，栄養性，不動性，先天性などの他，２型糖尿病，慢性腎臓病（chronic kidney disease：CKD）といった生活習慣病も含まれる．このうちもっとも頻度の高い原因疾患のひとつが関節リウマチ(RA)であり，慢性炎症や身体活動性の低下，ステロイド剤の使用といった複数の原因により重篤な骨脆弱性が発生する.

RA 患者の骨脆弱性を考える上で重要な要素のひとつは骨質劣化という概念である. 2000 年の米国立衛生研究所（NIH）におけるコンセンサス会議において，骨強度は骨密度と骨質の 2 つの要素によって規定されることが明言された. 原発性骨粗鬆症では，骨密度は骨強度の 70%を説明するとされており，それ以外の骨強度に寄与する要因はは骨質という概念でまとめられている．続発性骨粗鬆症では，病態によって骨強度に対する骨質の寄与率はさまざまであるが，とりわけステロイド性骨粗鬆症のように骨密度の割に骨折リスクが高い疾患では骨強度に対する骨質の寄与度が高いと判断される．しかし，骨質には，微細構造，骨代謝回転，微細骨折の集積，骨組織の石灰化の程度などさまざまな要因が含まれることから，続発性骨粗鬆症による骨質異常の詳細は未解明な部分が多い.

続発性骨粗鬆症における骨質異常が明らかになっていない理由は，非侵襲的な骨質検査法が確立されておらず，生検サンプルによる十分なデータも蓄積していないためである．さらに生検骨の評価法についてもすべての骨質パラメータを評価する方法は確立されていない．また，RA の場合には，病状や使用薬剤など骨代謝に影響する要因が複数あるため，どの要因がどの骨質パラメータにどの程度関与するかを特定しづらいといった問題もある．そこで本研究ではまず再現性の高い RA モデルマウスを用いて RA による骨質異常と力学的特性の変化を調査した．さらにマウス実験で確立した種々の骨質評価法を応用して，手術時に RA または非 RA 患者から採取したヒト

腸骨生検試料の解析を行った．このヒト検体を用いた研究は，倫理委員会承認のもとで行い，実臨床における RA 患者の骨質劣化の詳細と骨の強度特性の変化や実際の骨折頻度との関連を調査した.

さらに続発性骨粗鬆症の治療に関しては，当研究室がかねてより研究を続けている糖鎖受容体 Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins (Siglec)-15 をターゲットとした治療法の有効性を検証した．Siglec-15 は，破骨細胞分化を制御する免疫グロブリン様受容体(immunoglobulin-like receptor)の一種であり，免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) 依存性共刺激シグナルを賦活化する．Siglec-15 遺伝子欠損（*Siglec-15*$^{-/-}$）が軽度の大理石病様表現型を示すことや，卵巣摘出後の骨量減少に抵抗性を示すことから, Siglec-15 が閉経後骨粗鬆症の治療ターゲットとなり得る事を明らかにしている．そこで本研究では，RA とステロイド剤によって生じる続発性骨粗鬆症においても Siglec-15 が治療ターゲットとなりうるかどうかを調査した．RA による骨関節破壊に免疫受容体やITAM シグナルが関与することが多数報告されていることも[1-5], Siglec-15 を RA による続発性骨粗鬆症の治療ターゲットと考える根拠となっている.

ステロイド性骨粗鬆症については，とくに治療法が確立されていない小児への治療応用に着目した．小児においても炎症性疾患[6 7]やネフローゼ症候群[8]，血液疾患などに対してステロイド剤が使用されることがあり,薬剤性骨粗鬆症が重要な合併症の一つとなっている．ステロイド剤そのものに成長障害のリスクがあるが[9]，成人ステロイド性骨粗鬆症の第 1 選択薬であるビスフォフォネートは成長障害や低骨代謝回転の持続，尿管結石発生の懸念があり小児には推奨されていない．ステロイド性骨粗鬆症の管理と治療ガイドライン : 2014 年改訂版においても小児はエビデンスの蓄積に乏しく対象外となっており，安全性の高い小児ステロイド性骨粗鬆症の治療法は確立されていない.

われわれが Siglec-15 を小児ステロイド性骨粗鬆症に対する革新的な治療薬となると仮説を立てたのには理由がある．これまでの研究結果から，破骨細胞分化を制御する Siglec-15 を欠損するマウスでは破骨細胞機能不全により全身性に軽度の大理石病様の表現型を示すが，成長軟骨付近ではⅡ型コラーゲン-OSCAR-FcRγシグナルによる代償機構により正常な破骨細胞が誘導され成長障害をきたさないことが明らかになっている[10]．すなわち，Siglec-15 を治療ターゲットとした場合，全身性の骨粗鬆症に対しては治療効果を示すが，成長障害はきたさないと予想される．そこで本研究では成長期の WT 及び *Siglec-15*$^{-/-}$にステロイドを投与して Siglec-15 が小児ステロイド性骨粗鬆症の治療ターゲットとなり得るかを検証した.

続発性骨粗鬆症の原因となる薬剤のひとつに血栓予防を目的に頻用されるワーファリンがある．ワーファリンはビタミン K を阻害するため，骨の石灰化に重要なオステオカルシンのグラ化が抑制される．その結果，ワーファリン使用患者では骨折頻度が高く，また骨折治癒が遅延しやすい．近年，骨折治癒の補助療法として，ヒト副甲状腺ホルモン製剤テリパラチド (PTH_{1-34})の間欠的投与が注目されている．多くの動物実験で強力な骨修復促進効果をもつことが証明されており [11-15] [16]，実臨床においても多くの症例報告やいくつかのクリニカルトライアルで有用性が確認されている．しかし，ワーファリンによる続発性骨粗鬆症および石灰化障害が存在する状態で，テリパラチドが十分な骨治癒促進効果を発揮できるかは明らかではない．そこで本研究ではラット大腿骨骨折モデルを用いてワーファリン使用下のテリパラチドによる骨折修復促進効果について調査した．

これら一連の研究は，続発性骨粗鬆症の病態解明や新規治療法開発の研究基盤を形成するための統合的な研究である．

略 語 表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

AIA	antigen induced arthritis
α-MEM	alpha minimum essential medium
BMI	body mass index
CKD	chronic kidney disease
CT	computed tomography
CTX	C-terminal telopeptide
DAP12	DNAX-activating protein 12
DARs	DAP12-associated receptors
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FBS	fetal bovine serum
FcRγ	Fc receptor common γ chain
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IκBα	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha
IL-1	interleukin-1
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
MAPK	mitogen-activated protein kinase
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
MDL-1	myeloid DAP12-associating lectin-1
MRI	magnetic resonance imaging
NFATc1	nuclear factor of activated T cells c1
NF-κB	nuclear factor-kappa B
NIH	National Institutes of Health
OSCAR	osteoclast-associated receptor
Ovx	ovariectomy
PBS	phosphate-buffered saline
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PIR-A	paired Ig like receptor A
preOC	preosteoclast
PTH	parathyroidhormone

qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RA	rheumatoid arthritis
RANK	receptor activator of NF-κB
RANKL	receptor activator of NF-κB ligand
SHP-1	src homology region 2 domain-containing phosphatase-1
Siglec	sialic acid binding Ig-like lectin
shRNA	short hairpin RNA
SIRPb1	signal-regulatory protein-beta 1
TGF-β	transforming growth factor β
TNFα	tumor necrosis factor alpha
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAP	tartrate-resistant acid phosphatase
TREM-2	triggering receptor expressed in myeloid cells 2
UBMC	unfractionated bone marrow cells

第 一 章
関節リウマチにおける骨脆弱性発症のメカニズム
ー動物モデルを用いた検討ー

緒 言

関節リウマチ（RA）は全身性慢性炎症疾患であり，世界の人口の約 1%が罹患している[17]．関節周囲で産生される炎症性サイトカインによる直接あるいは関節的な影響により破骨細胞が活性化される結果，傍関節性骨粗鬆症や関節局所の骨破壊が発生する．さらに身体活動性の低下やステロイドなどの薬剤によって全身性の骨粗鬆症が引き起こされる．これまでの大規模疫学研究によって RA 患者は骨密度から予測される以上に骨折率が高いことが明らかになっており[18-21]，骨密度以外の骨強度を規定する要因，すなわち骨質異常が RA 患者の骨脆弱性発生に深く関与しているとされている[22].

2000 年の米国立衛生研究所（NIH）におけるコンセンサス会議において，骨強度は骨密度と骨質の 2 つの要素によって構成されると規定された.[23,24]．しかし，骨質は，骨密度を除く骨強度に関与するすべての要素を含む概念的な指標であり，実際には構造的特性や材質的特性など様々な要素を含んでいる[25,26]．このうち骨ジオメトリーや骨のサイズ，微細構造などの構造的特性に関しては，高分解能を有した computed tomography (CT)により評価され，疾患による骨微細構造の変化や強度に対する影響が徐々に明らかとなりつつある[27-29]．一方，コラーゲンや石灰化度，アパタイト結晶配向性などの材質的特性は，フーリエ変換型赤外分光法(fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) imaging)[30]，Raman 分光法[31]，X 線回折法[32]や光第 2 次高調波発生イメージング法[33]といった物理化学的な分析手法によって計測できることが明らかとなりつつある．骨形成不全症などの遺伝性骨疾患や骨粗鬆症患者の病態解明にこれらの骨材質分析法を応用する試みがいくつかの研究グループによりはじめられている[30-34]が，分析に特別な装置が必要であること，サンプルの前処理が煩雑で月単位の時間がかかること，結果について生理的な意義が必ずしも明らかになっていないことからまだ広く普及するにはいたっていない．そのため，RA による骨質異常についてもまだ十分な解析は行われていない.

本章では，RA による骨質異常と骨の力学的特性の変化の関連を明らかにするために，RA 類似の慢性関節炎をほぼ 100%発症する SKG マウス関節炎モデルを用いて骨微細構造や骨の材質特性の変化および骨の力学的特性の変化を調査した．骨質評価では，異常が現れやすい海綿骨に注目する研究が多いが[35] [36] [37]，長管骨の骨強度により重要な役割をもつ皮質骨の変化についても詳細な検討を行った．また，RA に特徴的な傍関節骨粗鬆症についてとくに焦点を当て，もっとも一般的な骨粗鬆症である閉経後骨粗鬆症との違いを検討した．

実 験 方 法

使用動物及び病態モデルの作製

本研究のために実施した動物実験はすべて北海道大学動物実験に関する規程に従った施行した．12 週齢，雌 Balb/CA マウス (日本クレア) に対して両側の卵巣を摘出する群（OVX 群）と腹膜切開のみを行う群（Sham 群）を行った．関節炎モデルは坂口らが報告した全身性関節炎発症モデルである SKG マウス (日本クレア) に対して同週齢に mannan (Sigma-Aldrich, USA)　20mg を 0.2 ml の溶媒(PBS)に溶解し腹腔内投与し関節炎モデルを作成した(SKG 群) [38]．四肢の関節腫脹は，2 週毎に観察してスコア化した.，手術あるいは関節炎誘導後 8 週時点で安楽死させ，右大腿骨をマイクロ CT と FTIR で評価した．右脛骨は力学的強度と X 線回折の評価に供した．第 5 腰椎をマイクロ CT で評価した. 下大静脈より静脈血を採取し, 骨代謝マーカーの測定に用いた.

血清骨代謝マーカー

安楽死時に採取した静脈血は遠心分離機で 4℃，3000rp で 30 分遠心し，血清のみを抽出した．骨吸収マーカーである I 型コラーゲン C 末端テロペプチド(CTX) を Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) キットを用いて測定した (Scottsdale, AZ, USA).

マイクロ CT

それぞれの右大腿骨，および第 5 腰椎をマイクロ CT (CT, R_mCT2; Rigaku, Tokyo, Japan)を用いて 1 ピクセルあたり 10 μm の解像度で撮影した．骨微細構造の解析は TRI/3D-BON (Ratoc System Engineering 社, Tokyo, Japan)を用いて行った [39]．測定関心領域を大腿骨に関しては遠位部の成長軟骨から 500μm 近位の 1500μm の範囲を，第 5 腰椎は上端と下端の成長板までの間の海綿骨領域と設定し測定した.

フーリエ変換型赤外分光(FTIR)イメージング

マイクロ CT 撮像後，右大腿骨を 70 %エタノールで 3 日間固定後，未染色でメタクリル酸メチル (Wako Chemicals, Kanagawa, Japan) に包埋し 30-40 ℃で約 10 日間重合させた．出来上がったブロックを成型し，ミクロトームを用いて厚さ 3μm の冠状断の未脱灰薄切切片を作製した．この切片をフッ化バリウム基板 (ピアオプティックス) にマウントし, 赤外イメージング装置 (Spotlight 400 Imaging System, Perkin Elmer, Inc., Waltham, MA, USA) により赤外イメージングを得た．骨質解析では，各赤外イメージングから抽出した赤外スペクトルの $PO4^{3-}$（1,200～900 cm^{-1}），$CO3^{2-}$（890～850 cm^{-1}），Amide I （1,720～1,585 cm^{-1}）バンドの高さや面積を用いて石灰化度 (PO_3^{4-}/Amide

I)，結晶化度，炭酸塩含有率 (CO_3^{2-}/PO_3^{4-})を骨幹部と骨幹端部(傍関節領域)において評価した [30].

また，偏光させた赤外光を骨に照射し，赤外二色性を利用した赤外二色性イメージングによりコラーゲンの配向性の評価を行った．これは得られた画から，骨軸方向に配向している AmideI バンドの面積率を比較検討した.

力学的強度試験

関節近傍の皮質骨の力学的強度試験を行うために，右脛骨遠位部を用いて万能力学試験機 (Model 3365, Instron Corp., Norwood, MA, USA) により 3 点曲げ試験を行った．初期荷重を 1N に設定し，脛骨遠位端より 7mm 近位の場所で支点間距離を 4mm に設定し, 0.5mm/分の速度で，破断するまで負荷した．破断強度と靭性を荷重-変位曲線より算出し, 剛性と弾性率を荷重-変位曲線の 5N から 10N の部位で線形類似することより算出した．弾性率と曲げ応力を算出は応力ひずみ曲線を用いた.

X 線回折

力学試験後に破壊片を用いて X 線回折を行った．試験片を X 線回折計 (Ultim IV, Rigaku, Japan)を用いて，試験片に側面から特性 X 線 Mo-Kα を照射し，透過した回折 X 線を X 線２次元検出器イメージングプレート(Fujifilm 製)を用いて検出した．ハイドロキシアパタイト結晶(002)面の回折 X 線パターン(デバリング)よりハイドロキシアパタイト結晶 c 軸の骨軸方向への配向度を表す $\cos^2\beta$ 値を算出した [32].

統計分析

得られたデータは，3 群間の検定には One way analysis of variance と Newman-Kuels tests を用いて有意差検定を行い，判定は P 値$<$0.05 で有意差ありとした．データは mean$\pm$SD で表した.

実 験 結 果

関節炎による全身性骨粗鬆症

12 週齢の SKG マウスに対して 2mg の mannan を投与した．投与後 1 週より小関節と大関節ともに炎症が発症し，投与後 6 週の時点で既報告と同様，関節腫脹がピークに達して，炎症は維持した [35]．関節炎スコアは既報告と同様に SKG 群で Sham 群や OVX 群と比較して有意に上昇した [40] (Fig. 1A)．関節炎や OVX の骨吸収への影響を評価するために血清骨吸収マーカーである CTX-1 を測定したところ，SKG 群で他 2 群と比較して有意な骨吸収の上昇があった (Fig.1B).

次いで，全身性骨粗鬆症を評価するために関節炎の直接の影響を受けない第 5 腰椎のマイクロ CT 解析を行った．OVX 群と SKG 群では海綿骨量が減少した．定量的形態計測の結果では，骨密度，組織量あたりの海綿骨量，骨梁幅，骨梁数，板棒状指標は，Sham 群，OVX 群と比較して SKG 群で有意に減少した (Fig.1C).

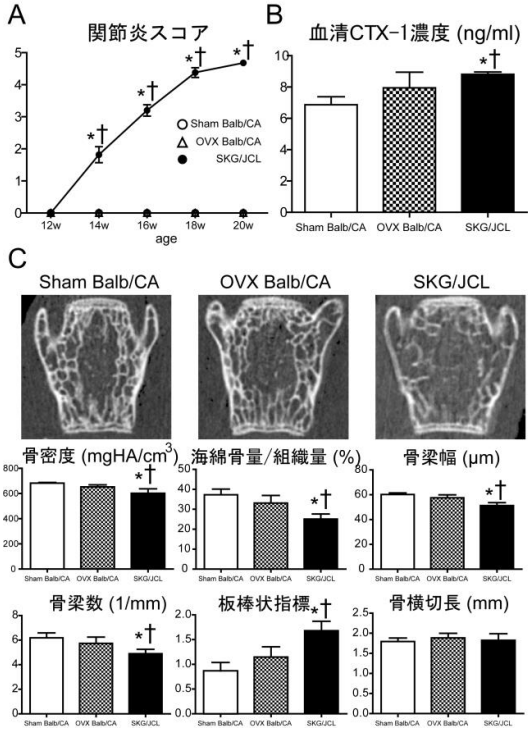

Fig..1. 関節炎に伴う骨吸収亢進により，全身性骨粗鬆症が惹起される．A. 術後および関節炎誘導後の関節炎スコアの推移．Sham Balb/CA(○), OVX Balb/CA(△) , SKG/JCL (●) mice で示す． B. 骨吸収マーカーCTX-1 の血清濃度．Sham 群，OVX 群と比較して SKG 群で有意に高値を呈した． C. 第 5 腰椎のマイクロ CT イメージと骨微細構造の解析結果．Sham 群，OVX 群と比較して SKG 群で有意な骨量減少と骨微細構造の劣化があった．Data represent means ± SD (* $p<0.05$ vs sham, † $p<0.05$ vs OVX).

関節炎による傍関節骨粗鬆症ー急速な骨量減少および構造劣化ー

次いで我々は大腿骨遠位部骨幹端部の海綿骨と皮質骨の評価を行った. マイクロ CT 画像では SKG 群，OVX 群ともに Sham 群と比較し明らかな骨量減少が観察された (Fig.2A). 骨微細構造の形態計測を行ったところ，両群ともに Sham 群と比較して構造的パラメータは有意に劣化した．とくに SKG 群では前述の腰椎と比較してもより重篤な海綿骨微細構造の劣化がみられ，さらに OVX 群では認めない皮質骨幅や断面二次モーメントの低下を認めた．このことから関節炎に伴う傍関節骨粗鬆症では早期から皮質骨にも影響が及ぶことがわかった (Fig.2B).

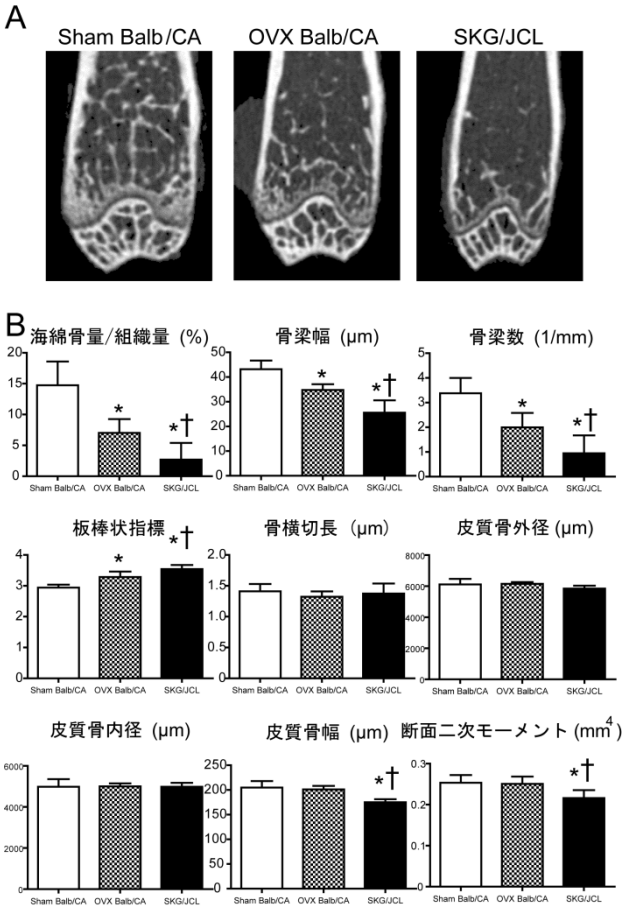

Fig..2. 関節炎により海綿骨だけでなく皮質骨の骨量低下や骨微細構造の劣化が惹起された A) 術後および関節炎誘導後 8 週時点の大腿骨遠位部のマイクロ CT イメージ　B) 海綿骨と皮質骨における骨微細構造の解析結果を示す. SKG 群で有意な骨量減少と骨微細構造の劣化があった. Data represent means ± SD (* $p<0.05$ vs sham, † $p<0.05$ vs OVX).

関節炎による傍関節骨粗鬆症ー皮質骨の材質劣化ー

石灰化度やコラーゲン配向性を評価するために, FTIR を用いて皮質骨の材料特性を調査した．石灰化度を表す FTIR イメージング像において SKG 群は Sham 群や OVX 群と比較して，骨幹端領域の皮質骨の石灰化度の低下を認めた (Fig.3A)．定量的評価においても SKG 群において骨幹端領域の石灰化度の低下を認めたが，同部位での結晶度や炭酸/リン酸比は群間で有意差はなかった．また骨幹部においても同様の評価を行ったが，こちらは各パラメータとも群間で有意差はなかった (Fig.3B).

次に赤外二色法を用いて，骨幹端および骨幹部のコラーゲンの配向を評価した．SKG 群では骨幹端部でコラーゲンの配向性の低下を認めた (Fig.3C)．我々は全領域に対する骨軸と同方向に配向している 1.5～3.0 以上の領域の占める割合を骨幹端部と骨幹部において定量的評価を行った. 骨幹部においては各群間での有意差はないものの, 骨幹端部においては SKG 群で多群と比較して有意な低下を認めた (Fig.3D).

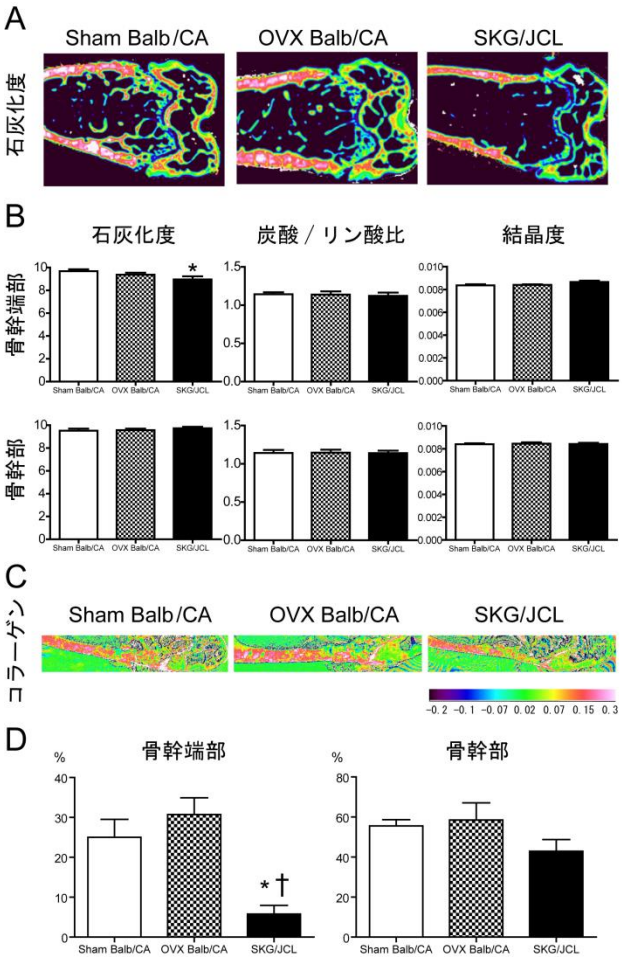

Fig.3. 関節炎により関節近傍の皮質骨の骨質劣化が惹起された．A. 術後および関節炎誘導後 8 週時点の大腿骨遠位部の石灰化度を表す FTIR イメージ像.　B. 骨幹端部と骨幹部における定量的の解析結果を示す．SKG 群の骨幹端部で有意な石灰化度の低下があった．C. 赤外二色法によるコラーゲンの配向度を表す FTIR イメージ像.　D) 骨幹端部と骨幹部における骨軸方向とお同じ配向度 (0.15-0.30) を示す定量的の解析結果を示す．Data represent means ± SD (* $p<0.05$ vs sham, † $p<0.05$ vs OVX).

関節炎による傍関節領域の力学的特性の低下

関節炎における皮質骨の力学的特性の影響を調査するために，脛骨骨幹端部の 3 点曲げ試験を行った. SKG 群では破断強度と靭性が有意に低下していた. Sham 群と OVX 群間に有意な差はなかった．さらに，弾性率や曲げ応力などの材料特性による力学強度においても過去の報告と同様に SKG 群で有意な低下を認めた [36] (Fig.4A).

力学試験後にX線回折装置を用いてハイドロキシアパタイトの配向性を調査したが, 各群間での有意差はなかった (Fig.4B).

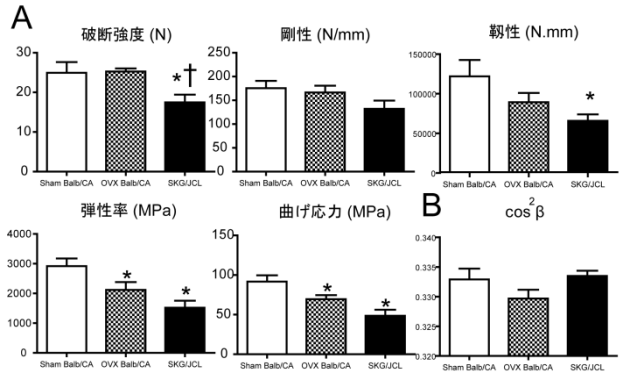

Fig..4. 関節炎により脛骨遠位部の関節近傍の皮質骨の力学的強度の劣化が惹起された. A. 脛骨遠位部の力学強度と B. ハイドロキシアパタイトの配向性の比較を示す．ハイドロキシアパタイトの配向性は各群間での有意差は認めなかったが, SKG 群では有意な力学強度の劣化を認めた. Data represent means ± SD (* $p<0.05$ vs sham, † $p<0.05$ vs OVX).

考 察

本章では，慢性関節炎における骨質異常と力学的特性の変化が，閉経後骨粗鬆症とどのように異なるかを調査した．OVX 群と SKG 群両群において骨吸収が亢進し，海綿骨の骨粗鬆症化と骨微細構造の劣化が惹起された．しかし，皮質骨に着目すると，SKG 群のみ石灰化度の低下とコラーゲンの配向性の低下が生じ，それにより著明な骨脆弱性が惹起されることがわかった．これらの結果は RA が閉経後骨粗鬆症と比べて骨密度から予想される以上に骨折リスクが高いという臨床研究の結果を説明するものと考えられる[18-21].

さらに，我々は SKG 群において全身性の骨粗鬆症に比較して傍関節領域の骨量減少や骨質劣化がより重篤であることを明らかにした．これは RA 患者において傍関節領域の骨粗鬆症化が全身性のものより，早期ににおこるという臨床研究を支持する結果である[41] [29]．過去の報告によると，慢性炎症は直接骨量低下や骨質劣化を惹起し，力学的強度を低下させることが明らかとなっている[35]．皮質骨は海綿骨よりも骨のリモデリングが遅いために，皮質骨の骨量低下は海綿骨に比べて遅れて出現するものの[42]，炎症性サイトカインの影響を直接受ける傍関節領域の皮質骨の構造的あるいは材質劣化は RA の早期から出現することが明らかとなった.

炎症による重篤な骨脆弱性の発症のメカニズムは骨量低下に加えて，骨質劣化によるものが要因である．本章の結果は慢性炎症によってコラーゲンネットワークの破綻を引き起こすという過去の報告と一致する[36]. われわれの結果では SKG マウスの骨幹端部の皮質骨のコラーゲンの配向性が有意に低下したが，これは関節炎が傍関節領域の皮質骨の材質特性に影響を及ぼすことを示唆している．しかし，予想に反して，傍関節領域の皮質骨におけるハイドロキシアパタイトの配向性は変化がなかった．正常に成熟した骨ではコラーゲンの配向とアパタイト結晶の配向は一致するが，一方で病的な環境下では必ずしも一致しないという報告がある[43] [44] [45]．それゆえ，関節炎によるハイドロキシアパタイトの配向性の変化はコラーゲンの配向性の変化が出現するより遅い時期に出現する可能性がある.

本章における研究にはリミテーションが数点存在する．一つ目は関節炎による影響と疼痛や関節破壊による不動の影響を分けて考えることができない点である．そのため，骨質異常発症のメカニズムに関する解釈には注意を要する．二つ目は，骨質の変化が観察された傍関節領域の力学試験が技術的に難しい点である. FTIR やマイクロ C

Tによる微細構造評価を行った大腿骨遠位骨幹端部は海綿骨が多いことや形状から皮質骨の力学試験を行うことは難しい．そのため，関節炎を生じる足関節に近い脛骨遠位骨幹端部を加工して力学試験を行ったが, FTIR や微細構造の変化は大腿骨で観察したものであり，直接相関を検討することはできない.

本章の研究によって，RA のような慢性関節炎は，骨量の減少だけでなく傍関節領域皮質骨に石灰化度の低下やコラーゲン配向性の低下などの骨質異常をもたらし，重篤な骨脆弱性を引き起こすことを明らかにした.

第 二 章
関節リウマチにおける骨脆弱性発症のメカニズム
ーヒト実臨床検体を用いた検討ー

緒 言

RA 患者の全身性骨粗鬆症は，炎症性サイトカインの影響に加え，ステロイドやメトトレキサートなどの抗リウマチ薬の副次的作用や，身体活動性の低下，性ホルモンの分泌低下，日光曝露機会の減少などにより生じるとされる[46-50].脆弱性骨折危険因子に関するメタアナリシスにおいても，年齢，性別，低 BMI （body mass index），大腿骨頸部骨密度，大腿骨頸部　骨折の家族歴，ステロイド使用，脆弱性骨折の既往，喫煙，2 単位以上のアルコール摂取，RA は独立した危険因子と報告されており[51]，RA 患者ではこれらの脆弱性骨折のリスク因子を複数持っていることが多い.

これまでの動物実験において，RA そのものにより骨微細構造の劣化や骨代謝回転亢進やコラーゲンの代謝亢進などの骨質異常が起こることが報告されている[35,36,40]. 前章にてわわれわれも関節炎発症後比較的早期から傍関節領域において皮質骨幅の減少や石灰化度の低下，コラーゲン配向性の低下といった材料特性の変化が生じることを示した. また RA モデル動物にステロイドを投与し骨脆弱性のメカニズムについて検討を行った研究では炎症は主に骨微細構造を，ステロイドは主に骨の化学組成を変化させる傾向があり，異なる機序で骨に作用することにより骨強度を相加的に減少させることが報告されている[37]．さらに RA によくみられる脆弱性不完全骨折リスク増加には，石灰化障害やコラーゲン成熟障害による骨基質の物性の変化が関わっていることも報告されている[52].

これらのマウスやラットなどの動物モデルで得られた研究成果は病態を考える上で重要な知見であるが，ヒトと齧歯類では解剖学的構造や骨代謝，薬物や炎症に対する反応性に違いがあることから，実臨床へ応用あるいは還元するためには実際の疾患患者においても同様の所見がみられるのかを検証する必要がある．そこで本章では，ステロイド剤を長期慢性使用している RA 患者および年齢，性別等をマッチングさせた非 RA 患者から採取した骨生検サンプルを用いて，RA およびステロイド剤長期慢性使用による骨質への影響や骨の力学的特性の変化を調査した..

実 験 方 法

倫理規定

本研究は北海道大学病院自主臨床研究審査委員会承認(012-0023)のもと実施した.

対象患者および適格性の基準

(1) 対象患者のうち，(2) 選択基準をすべて満たし，かつ (3) 除外基準のいずれにも該当しない場合を適格とする.

(1) 対象患者

北海道大学病院整形外科および研究協力施設において，骨，関節等の手術治療を受ける患者のうち，自家腸骨移植を必要とする患者を対象とする．対象群は関節リウマチおよびその類縁疾患による続発性骨粗鬆症患者とする．対照群は，関節リウマチのない原発性骨粗鬆症患者または骨量減少症患者とする.

(2) 選択基準

①同意取得時において年齢が 20 歳以上の患者

②骨，関節等の手術治療を受ける患者のうち，自家腸骨移植手術を必要とする患者

③本研究の参加にあたり十分な説明を受けた後，十分な理解の上，患者本人の自由意思による文書同意が得られた患者

(3) 除外基準

①同意取得時において年齢が 20 歳未満の患者

②その他，研究責任者が被験者として不適当と判断した患者

(4) 代諾者による同意が必要な被験者とその理由

本研究では未成年者や有効なインフォームド・コンセントを与えることが困難であると考えられる被験者を対象に加えない.

被験者の診療情報

以下の項目について，被験者の診療録から情報を入手した.

①患者基本情報：年齢，性別

②疾患情報：疾患名，手術名，治療内容，合併症

③血液検査結果：骨代謝マーカー

④画像検査所見：単純 X 線写真による既存椎体骨折の有無，骨密度測定値 (Discovery A, Hologic Japan,Inc, Tokyo, Japan)

⑤骨折リスクを予測する Kanis らが報告した FRAX®スコア [51] を算出

検体の採取法

骨移植手術において自家腸骨を採取する際に，直径 6mm，深さ 1cm 程度の骨組織片を追加して採取した.

マイクロ CT

骨検体をマイクロ CT (CT, R_mCT2; Rigaku, Tokyo, Japan)を用いて 1 ピクセルあたり 20 μm の解像度で撮影した．骨微細構造の解析は TRI/3D-BON (Ratoc System Engineering 社, Tokyo, Japan)を用いて行った[39]．骨構造解析を行う関心領域は皮質骨から 300 μm 離し, 500 μm 四方を関心領域として計測を行った.

組織解析

採取した腸骨を 4%パラホルムアルデヒドで浸漬固定，EDTA 中性脱灰の後、通法にてパラフィン包埋した. パラフィン切片を 5mm の厚さに薄切後, 切片をキシレンに浸してパラフィンを除去し，100 %，95 %，90%，80 %, 70%エタノールに順次浸して加水処理を行った．染色はヘマトキシリン・エオジン染色, 骨芽細胞に発現するアルカリフォファターゼ(ALP)免疫染色, 酒石酸抵抗性産生フォスファターゼ(TRAP)染色, 骨細胞に特異的に発現するスクレロスチン抗体免疫染色を行った.

ALP 染色は, 0.3%過酸化水素水入りのメタノールで 30 分浸し, 洗浄後 1%牛血清アルブミン(BSA; Serologicals Proteins Inc. Kankakee, IL)入りの PBS を温室で 20 分ブロッキングを行なう. その後, 1%BSA 入りの PBS で 150 倍に希釈したウサギ抗 ALP 抗体[53]を室温で約 2 時間静置し, PBS で洗浄後, 2 次交代として 1%BSA-PBS で 100 倍に希釈したウサギ HRP 抗体 (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., West Grove, PA) を室温で約 1 時間静置することによって行った[54,55].

TRAP 染色は, PBS で洗浄し, 2.5mg の 2.5 mg of naphthol AS-BI phosphate (Sigma, St. Louis, MO), 18 mg の red violet LB salt (Sigma St. Louis, MO), 100 mM L (+)の酒石酸を 0.76 g を 0.1M (pH 5.0)の酢酸バッファーに 37℃で 15 分静置することによって行った[56].

スクレロスチンは 1%BSA を 30 分室温で静置した後に，25 倍に希釈した抗スクレロスチン抗体(Abnova, Taipei, Taiwan)を静置し，2 次抗体として 100 倍に希釈したウサギ HRP 抗体(DakoCytomation, Glostrup, Denmark)を 1 時間静置することによって行った. 対比染色としてメチルグリーンで行い，光学顕微鏡(Eclipse E800, Nikon Instruments Inc. Tokyo, Japan)で観察した.

Von Kossa 染色は，ハーフカルノフスキーで浸漬固定し、四酸化オスミウムにて後固定を行った後, エポキシ樹脂に包埋した。切片は、500nm の厚さに薄切し，0.5%硝酸銀水溶液により染色を行い，光学顕微鏡で観察を行った.

マイクロインデンテーション試験による力学的強度の解析

実験系は自作のインデンテーション試験装置（負荷機構 Instron 4411, 自動ステージ, 光学顕微鏡, 制御プログラム）を用いた. インデンタ先端形状は球状圧子で幅φ500μm のものを用いた.

試験片作製条件は-80℃で保存したサンプルを室温 20℃で解凍 2 時間行い, 湿度 30-35%で自然乾燥した (樹脂包埋のため表面の水気を取った）. その後エポキシ系樹脂包埋を行い, 5mm 程度にスライス後, 試験片断面を研磨, 鏡面仕上げ（emery paper #1000-2000, バフ研磨機）後に超音波洗浄を行った.

計測条件は皮質骨部を計測し以下の条件で行った.

・押し込み速度：10 μm/min
・最大押込深さ：5 μm
・サンプリング：100 ms
・荷重-変位関係を記録
・負荷時の傾きより, 接触剛性を計算した.

統計分析

得られたデータは, 2 群間の検定には Student’s T-test を用いて有意差検定を行い, 判定は P 値＜0.05 で有意差ありとした. データは mean±SD で表した.

相関関数は, ピアソン相関係数を用いて行い, 判定は P 値＜0.05 で有意差ありとした.

実 験 結 果

研究対象者の特性

対象患者と対照者の患者背景および疾患情報を示す(Table.1). RA 群と非 RA 群の平均年齢はそれぞれ 67.7 歳(61-73 歳), 67.6 歳(56-83 歳)であり，年齢に有意差はなかった. RA 群は全例, ステロイドおよび抗リウマチ薬(DMARDs), 生物製剤使用していた.

骨質異常に関係する因子のうち，糖尿病(DM)の合併を RA 群の 2 例，非 RA 群の 4 例に認めた．慢性腎臓病(CKD)は大半の患者が罹患しており，ステージ 3 以上の患者は RA 群，非 RA 群ともに 2 例であった．骨粗鬆症治療薬は RA 群の 7 例が使用していたが，非 RA 群では使用例はなかった.

RA の罹患年数は全例 10 年以上で, Steinbrocker 分類 stage3 および Larsen グレード 3 以上の関節破壊が進行し，日常生活に障害を有する症例であった．すなわち，身体活動性の低下した患者であった.

既存脆弱性骨折の数や程度は，半定量的評価法 semi-quantitative（SQ）法による椎体骨折の重傷度（グレード 0~3）と長管骨の脆弱性骨折数を合わせたもの算出し，脆弱性骨折指数とした． この脆弱性骨折指数は，非 RA 群と比較して RA 群で有意に高値であった (Table1).

症例	年齢	ボディマス指数	糖尿病	慢性腎臓病 Stage	ステロイド使用	抗リウマチ薬	骨粗鬆症治療薬	RA罹患年数	Steinbrocker 分類		Larsen グレード	脆弱性骨折指数
Non-RA												
1	83	25.1	−	3	−	−	−					0
2	60	27.4	+	2	−	−	−					0
3	56	33.2	+	2	−	−	−					1
4	71	19.5	−	2	−	−	−					0
5	73	27.3	−	3	−	−	−					2
6	73	19.0	−	0	−	−	−					0
7	58	22.2	+	2	−	−	−					0
8	63	17.3	−	2	−	−	−					0
9	64	23.6	+	2	−	−	−					1
10	75	25.2	−	2	−	−	−					0
RA												
1	61	21.2	−	0	+	+	+	18	3	2	3	2
2	65	31.2	−	2	+	+	−	10	4	3	4	4
3	65	19.4	−	2	+	+	−	32	3	3	3	2
4	59	23.4	−	0	+	+	+	24	4	2	4	0
5	69	28.0	+	3	+	+	−	16	3	2	3	0
6	73	28.1	+	0	+	+	+	21	3	4	4	8
7	68	32.8	−	2	+	+	+	12	3	2	3	2
8	71	21.2	−	2	+	+	+	28	3	2	4	9
9	73	21.3	−	3	+	+	+	28	4	3	4	0
10	73	27.2	−	2	+	+	+	15	4	3	3	2

Table 1: 患者情報

臨床的骨折リスク評価

DEXA 法にて腰椎および大腿骨頚部の骨密度を測定したが，腰椎・大腿骨頚部ともに 2 群間で統計学的有意差はなかった (Fig.5A).

世界保健機構 WHO の骨折リスク評価ツール FRAX®スコアで骨折リスクを評価した．FRAX®は大規模な前向きコホートの結果に基づいて決定した臨床的危険因子によって今後 10 年間に骨粗鬆症骨折が生じる確率を算出するものである．骨密度に有意差がない群同士の比較においても，RA 群で主要骨粗鬆症性骨折および大腿骨頚部骨折の骨折リスクは有意に高く，前述の脆弱性骨折指数とも相関した (Fig.5B).

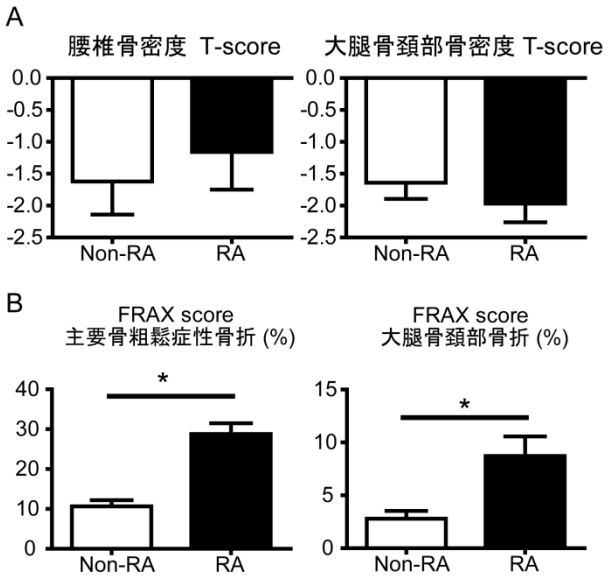

Fig.5. 骨密度は変わらないものの，RA 群で有意に骨折リスクは上昇する．(A) 腰椎および大腿骨頚部の DEXA の比較．(B) 主要骨粗鬆症性骨折と大腿骨頚部骨折の FRAX スコアの比較．Data represent means ± SD * $p<0.05$

RA 患者では骨代謝状態は抑制される

骨代謝状態を調査するために，骨形成マーカーとして骨型アルカリフォスファターゼ(BAP)を，骨吸収マーカーとして酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ 5b (TRACP-5b)をそれぞれ測定した．RA 群は Non-RA 群と比較して BAP では差がないものの TRAP-5b の有意な抑制を認めており，低骨代謝回転の傾向を示した (Fig.6A)．腸骨生検サンプルで免疫組織学的検討を行うと，ALP 陽性の成熟骨芽細胞の分布に関しては明らかな変化はみられなかったが，TRAP 陽性細胞の数は RA 群で少ない傾向があった．これは RA 群において骨吸収抑制剤使用例が多いことを反映していると考えられた(Fig.6B).

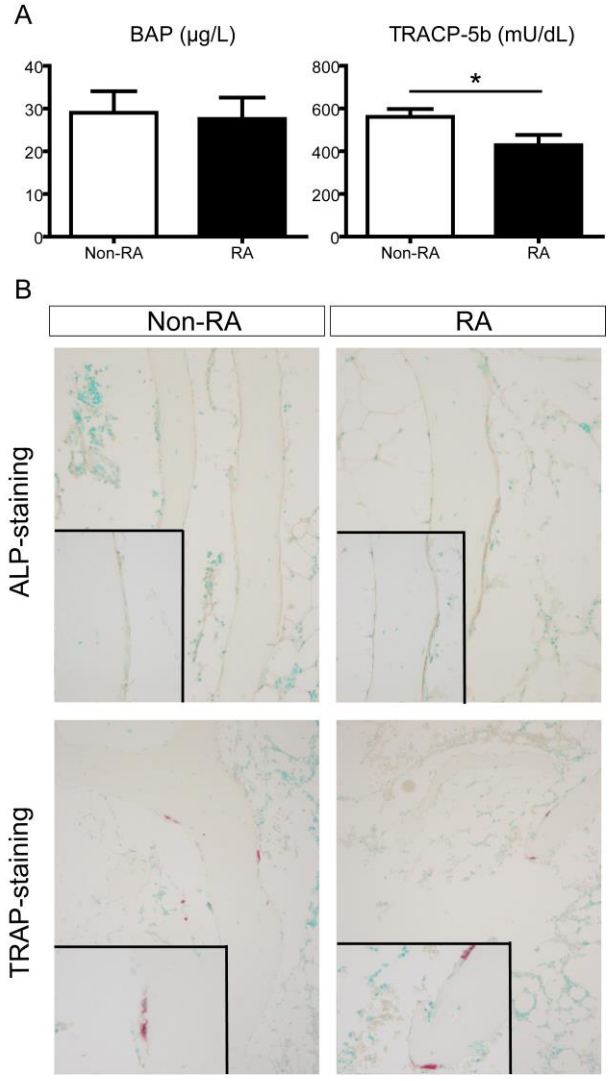

Fig.6. 骨吸収抑制剤を使用している RA 患者では骨吸収の抑制が起こる．(A) 骨形成マーカー (BAP)および骨吸収マーカー (TRACP-5b) (B) ALP 染色（上段），TRAP 染色（下段）の比較を示す．パネル左下に強拡大像を示す．Data represent means ± SD * $p<0.05$

RA 患者では骨微細構造が劣化

骨微細構造を比較検討するために，腸骨生検サンプルをマイクロ CT で撮像した．RA 群では非 RA 群と比較して明らかな骨梁幅の減少や骨梁間隙の拡大が観察された (Fig.7A)．三次元的形態計測による海綿骨構造の定量的評価を行ったところ，組織量に対する海綿骨量，骨梁幅，骨梁数，骨梁間幅の減少，板棒状指標，骨梁連結性などの骨微細構造のパラメータは RA 群で有意に劣化していることがわかった (Fig.7B)

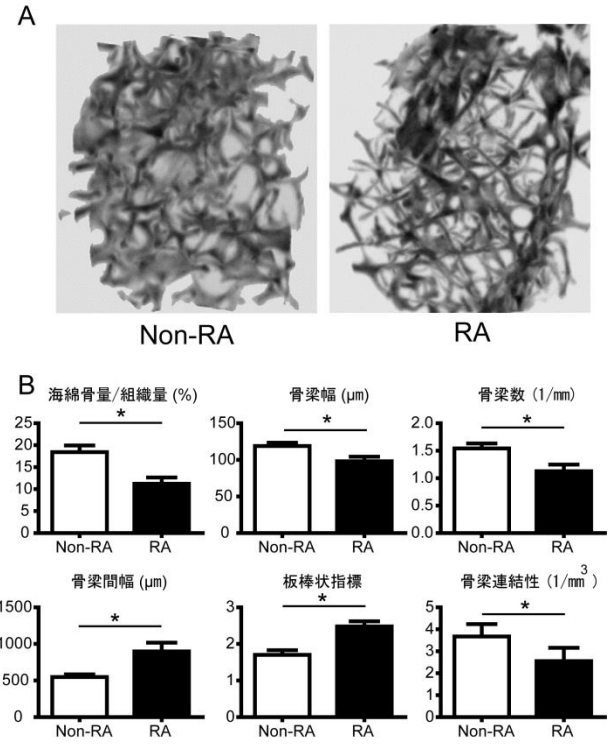

Fig.7. ステロイド投与中の RA の患者の骨微細構造は劣化 A) 非 RA 患者および RA 患者腸骨サンプルのマイクロ CT イメージ　B) 海綿骨における骨微細構造の解析結果を示す．RA 群で有意な骨微細構造の劣化があった．Data represent means ± SD ， * $p<0.05$

RA 患者では力学的強度は有意に低下

力学的強度を評価するために，腸骨サンプルに対して，マイクロインデンテーション試験を行った．RA 群では非 RA 群と比較して，接触剛性の有意な低下を認めた．このことから，骨粗鬆症治療を行っていても，局所の力学的強度はステロイド投与を受けた RA 患者では有意に低下した (Fig.8AB).

次に，これまで調査した骨密度，FRAX スコア，骨代謝マーカー，骨微細構造のパラメータが脆弱性骨折指数や接触剛性と相関があるかどうかを調査した．接触剛性と脆弱性骨折指数は有意に相関があった．DEXA 法を用いた骨密度の値は脆弱性骨折指数や接触剛性とは相関がなかった．FRAX スコアでは主要骨粗鬆症骨折のリスクと脆弱性骨折指数と接触剛性に相関があった．マイクロ CT で算出された微細構造のパラメータは RA 群と Non-RA 群では有意差はあったものの，脆弱性骨折指数とは必ずしも相関しなかったが，接触剛性とは骨連結性を除いて相関関係があった (Table 2).

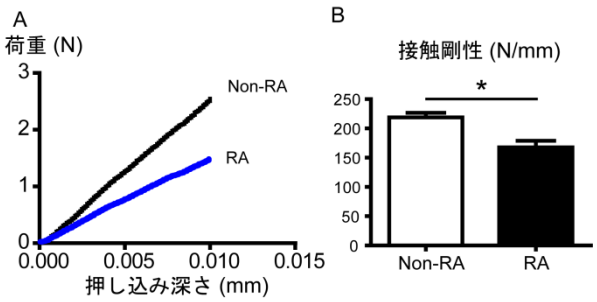

Fig.8. (A) RA 群と非 RA 群の荷重変位曲線の比較　(B) 2 群間での接触剛性の比較. RA 群で有意に低値であった．Data represent means ± SD ， * $p<0.05$

	脆弱性骨折指数	接触剛性
脆弱性骨折指数		-0.5546 p=0.011*
骨密度 腰椎	0.1134 p=0.644	0.0494 p=0.841
骨密度 大腿骨頸部	-0.1471 p=0.549	0.1780 p=0.466
FRAXスコア 主要骨粗鬆性骨折	0.5818 p=0.007*	-0.7605 p<0.001*
FRAX 大腿骨頸部骨折	0.4062 p=0.075	-0.6866 p<0.001*
BAP	-0.0595 p=0.803	0.1267 p=0.595
TRAP-5b	-0.3063 p=0.189	0.3627 p=0.116
海綿骨量/組織量	-0.3621 p=0.1167	0.5971 p=0.006*
骨梁幅	0.0649 p=0.786	0.5398 p=0.014*
骨梁数	-0.4807 p=0.032*	0.4694 p=0.037*
骨梁間幅	0.4101 p=0.072	-0.4482 p=0.048*
板棒状指標	0.5185 p=0.019*	-0.6327 p=0.003*
骨梁連結性	-0.2488 p=0.2901	0.1714 p=0.470

Table 2: 上段 pearson r, 下段 p 値

*: p< 0.05

RA 患者では骨細胞のアポトーシスと石灰化度の低下を生じる

力学的強度の低下のメカニズムを解明するために，組織的検討を行った．HE 染色では RA 群において空の骨小腔が多く，準超薄切片で骨細胞の形態を調査すると，RA 群では骨細胞が萎縮していた (Fig.9A)．骨細胞死が起こった後に残る空の骨小腔の割合を調査すると RA 群で有意に多かった．次に骨芽細胞分化を抑制するスクレロスチンの発現を調査すると，スクレロスチンの発現は RA 群で減少していたが，これは骨細胞のアポトーシスが多いことを反映していると考えらえた (Fig.9B)．石灰化度の評価は Von Kossa 染色で行った．RA 群では骨梁の表面に石灰化度の低い領域があり，一見骨のように見える領域においても石灰化度が低下していた (Fig.9C).

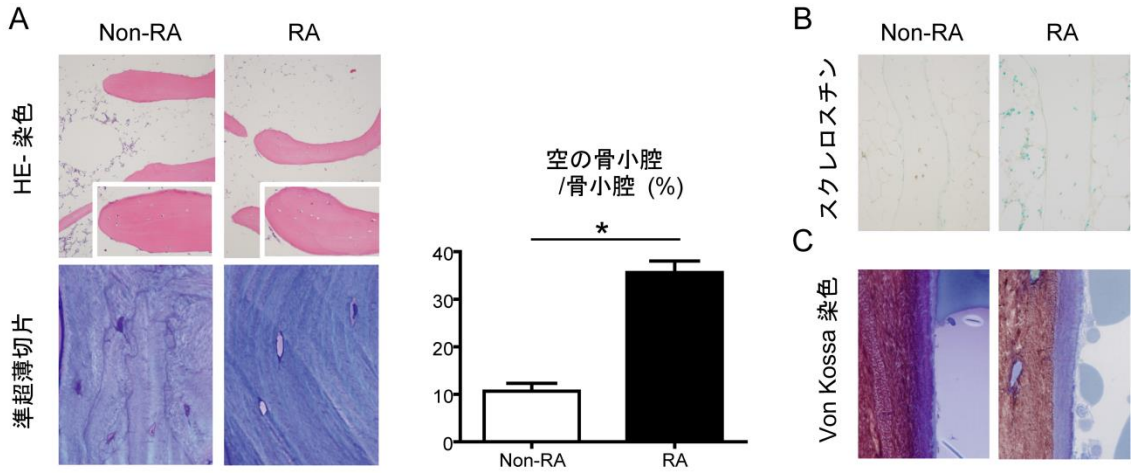

Fig.9. ステロイド慢性使用している RA 患者では骨細胞のアポトーシスと石灰化度の低下を生じる．(A) 上段 HE 染色，下段 準超薄切片を示す．HE 染色右下パネルに強拡大像を示す．空の骨小腔の割合をグラフで示す．(B) スクレロスチンの発現の比較．(C) Von Kossa 染色における石灰化度の評価．RA 群では骨表面の石灰化度が低下している．Data represent means ± SD ， * $p<0.05$

考 察

本章では, RA 患者の骨脆弱性と骨質異常の関連を調査した. 慢性的にステロイド剤を投与されている RA 長期罹患患者では閉経後骨粗鬆症患者と比較して有意に力学的強度が低下しており，脆弱性骨折の既往も多かった. DEXA 法で計測した腰椎，大腿骨近位部の骨密度は二群間で有意差はなかったことから，対象症例における骨脆弱性の違いは, 骨微細構造の劣化や石灰化障害による骨質異常が原因であると結論できる.

ただし，本研究における RA 患者は，女性，高齢，ステロイド投与，不動化などの複数の脆弱性骨折危険因子を含む症例であり [46 57]，原因が単一でない点に注意して解釈する必要がある．また，RA 患者のうちステロイド剤使用患者や身体活動性の低い患者では一般に骨量も減少していることが多いが, 本研究における対象患者(RA 患者）の骨密度は閉経後骨粗鬆症患者の骨密度と同程度であった．この理由はほとんどの RA 患者が骨吸収抑制薬の投与を受けていたのに対し，閉経後骨粗鬆症患者では投与を受けていなかったことによると考えられる．したがって，本研究において論じる骨質異常は，上記の複数の脆弱性骨折危険因子に加えて，骨吸収抑制薬の影響も加味して考える必要がある. ただし, ステロイド性骨粗鬆症の管理と治療ガイドライン : 2014 年改訂版では，ステロイド剤を３ヵ月以上使用する患者では骨吸収抑制剤ビスフォスフォネート製剤を併用投与することが推奨されており，本研究において対象とした”骨吸収抑制薬”によって治療中の”ステロイドを長期使用している”” 高齢”” 女性”” RA”患者は実臨床においてもっとも一般的な研究対象とすべき患者である. すなわち, 個別の因子による骨質異常発生のメカニズムは第１章のような動物実験によってしか明らかにできないが，本章で得られたデータは実際の RA 患者に発生する骨質異常を反映する重要な知見である.

骨代謝状態も骨質指標のひとつとされ，高骨代謝回転は骨強度を低下させる因子のひとつと考えられているが，本研究の対象患者では低代謝回転となっていた．一般的に RA では TNFα，IL-1，IL-6 などの炎症性サイトカインによる直接的な破骨細胞の活性化 [58,59] や Wnt シグナルを介した骨芽細胞の分化促進により高骨代謝回転になると報告されている [60]．一方，ステロイド性骨粗鬆症の病態の中心は，慢性的な骨形成の低下であり，幹細胞から骨芽細胞への分化や前骨芽細胞の増殖の抑制，骨芽細胞や骨細胞のアポトーシスの促進，骨芽細胞による基質産生能の低下により低骨代謝回転となる [61,62]．ステロイド剤の骨吸収に対する影響については完全なコンセンサスは得られていないが投与後早期に一過性に亢進するという報告が多い．また，不動化による力学的ストレス遮断は，骨吸収を亢進させ，骨形成を低下させる．本研究の対象患者では, 骨代謝マーカーや組織学的観察から低骨代謝回転となっていることがわかったが,

影響する因子がさまざまありメカニズムは特定できない．ほとんどの患者が骨吸収抑制薬を使用しており，その影響が強く反映されている可能性もある．

興味深い発見のひとつは，骨の力学的強度や既存骨折の数や程度ともっとも強く相関したパラメータが，骨密度や骨代謝マーカー，骨微細構造指標ではなく FRAX スコアであった点である．FRAX スコアは大規模な前向きコホートの結果に基づいて決定された臨床的危険因子によって今後 10 年間に骨粗鬆症骨折が生じる確率をアルゴリズムを用いて計算するものである．アメリカリウマチ学会では FRAX スコアを用いてステロイド性骨粗鬆症の予防と評価を行うことを勧告しており，汎用性が増している[63]．一方で，FRAX の危険因子に含まれていない重要な骨折危険因子が存在すること[64]や，算出されるリスクは脆弱性骨折を含む全骨粗鬆症性骨折を相当下回る[65]という問題点も指摘されている．我が国のステロイド性骨粗鬆症の管理と治療ガイドライン：2014 年改訂版では疾患活動性や重症度が反映されないなどの理由から，骨折のリスク評価方法として採用しない方針となっているが，本研究結果はステロイド剤を使用している RA 患者の骨折リスクの評価に FRAX スコアが有用であることを示唆している．

本章では，ステロイド剤を長期使用している RA 患者では，骨吸収抑制剤の使用にも関わらず，骨微細構造の劣化や低骨代謝回転，石灰化度の低下などの骨質異常が存在し，骨の強度が低下していることを明らかにした．

第三章
RA 続発性骨粗鬆症に対する新規治療ターゲットの検討

緒 言

RA の骨病変は, 関節の骨軟骨破壊, 傍関節骨粗鬆症および全身性骨粗鬆症の大きく三つに分けられる [66-68]. 関節内に発生する骨びらんや全身性骨粗鬆症は receptor activator of NF-κB ligand (RANKL)により制御されることから, 破骨細胞はRA の骨破壊および骨粗鬆症において重要な役割を担っていることが明らかとなっている [69,7071].

破骨細胞は，造血幹細胞由来の単球・マクロファージ系細胞であり，macrophage colony stimulating factor (M-CSF)と RANKL の存在下で破骨細胞に分化する [72]．さらに近年, M-CSF, RANKL に続く第 3 の破骨細胞分化必須刺激として immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)を介したシグナルの重要性が明らかとなった [73,74]. ITAM モチーフを含有する DNAX-activating protein 12 (DAP12)と Fc receptor common γ chain (FcRγ)のダブルノックアウトマウスは破骨細胞を形成できず重度の大理石骨病を呈することから，これらの分子が破骨細胞分化に重要な役割を担っていることが証明されている [75,76]. DAP12 と FcRγ は細胞外領域が小さいため, 外部からのシグナルを認識できない．そのため，DAP12 もしくは FcRγ と細胞膜上で会合する免疫受容体群が外部シグナルを認識し，ITAM シグナルを賦活化する. 糖鎖受容体 Sialic acid-binding Ig-like lectin (Siglec)-15 は， DAP12 と会合する免疫受容体の一種であり，酸性単糖であるシアル酸を認識する [77,78]. われわれはこれまでに遺伝子欠損マウスを作成するなどして，Siglec-15 が DAP12 を介して RANKL シグナルを正に調整することや Siglec-15 が生理的環境下の二次海綿骨の骨吸収に関与することを明らかにしている [10]. また, 閉経後骨粗鬆症における二次海綿骨の骨吸収亢進にも重要な役割を担っており, 治療ターゲットとなることを報告している.

近年の研究で, DAP12, FcRγ やそれらと会合するいくつかの免疫受容体は活動性の高い RA で高発現することが明らかとなっており，ITAM シグナルが RA の骨破壊あるいは骨粗鬆症の発症に関与している可能性が示唆されている [1,2]. 実際にいくつかの RA モデルマウスを用いた前臨床研究により paired immunoglobulin-like receptor A (PIR-A), myeloid DAP12-associating lectin-1(MDL-1)などの免疫受容体を制御することにより関節の炎症や軟骨・骨破壊が抑制されることが報告されている [3-5]. それゆえ,

Siglec-15 が RA の病態や骨破壊に重要な役割を担っているかどうかは大きな関心事であり，治療ターゲットとなりうるかについて検証する必要がある．本章では Siglec-15 が関節炎における骨破壊および続発性骨粗鬆症に関与するかどうかをマウス antigen-induced-arthritis (AIA)モデルを用いて検証した.

実 験 方 法

使用動物及び AIA 関節炎モデルの作製

本研究のために実施した動物実験はすべて北海道大学動物実験に関する規程に従って実施した．実験には 8 週齢の雌性の野生型(WT)及び *Siglec-15*$^{-/-}$マウスを用いた．AIA モデル作成は 100 μg のメチル化された牛血清アルブミン(mBSA; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO)と結核死菌(H37RA (Difco))を含む complete Freund's adjuvant(CFA) (Sigma–Aldrich)のエマルジョンを 9 週齢の時点で皮内投与し免疫を行った. 11 週齢の時点で右膝に 100 μg の mBSA を 50 μl の PBS に溶解したものを関節内投与し，左膝はコントロールとして 50 μl の PBS を関節内投与した[79]．関節内投与 0 日から 28 日まで，両膝の横幅を計測し，右膝と左膝の差を関節腫脹幅として測定した．関節炎誘導後 28 日目で安楽死させ，マイクロ CT と組織学的検討を行った．

マイクロ CT

WT 及び*Siglec-15*$^{-/-}$それぞれの両膝をマイクロ CT (CT, R_mCT2; Rigaku, Tokyo, Japan)を用いて 1 ピクセルあたり 10 μm の解像度で撮影した．骨微細構造の解析は脛骨近位部について行い，TRI/3D-BON (Ratoc System Engineering 社, Tokyo, Japan)を用いて行った[39]．

組織学的検討

安楽死後，採取した膝関節を 4 %パラホルムアルデヒドで固定，EDTA 脱灰しパラフィン包埋した．作製したパラフィン切片をサフラニン O 染色およびファストグリーン染色で関節破壊を，TRAP（酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ）およびメチルグリーンで染色，破骨細胞を観察した．

第 2 章で記した方法と異なるために，以下に概略を述べる．

・Basic stock incubation medium (下記を混合し，pH5.0 に調整した．)

蒸留水	1000 ml
無水酢酸ナトリウム	9.2 g
L-(+)-酒石酸	11.4 g
氷酢酸	2.8 ml

・Naphtol ether solution

Naphtol AS-BI phosphate	0.1 g
エチレングリコールモノエチルエーテル	5 ml

・亜硝酸ナトリウム溶液

亜硝酸ナトリウム　　1 g
蒸留水　　25 ml

・ベーシックフクシン溶液

ベーシックフクシン 1 g
2N 塩酸　　20 ml

切片をキシレンに浸してパラフィンを除去し，100 %，95 %，70 %，50 %エタノールに順次浸して加水処理を行った．Basic stock incubation medium150 ml に 1.5 ml の naphtol-ether solution を加え，37 ℃で 1 時間インキュベートした．新たな Basic stock incubation medium150 ml に亜硝酸ナトリウム溶液 1 ml とベーシックフクシン溶液 1 ml を混合したものを加え, 切片を溶液内で破骨細胞が赤く染色されるまで 37 ℃で 20-40 分間インキュベートした.

形態計測は，関節表面と 2 次海綿骨領域における，単核・多核の TRAP 陽性破骨細胞数と骨吸収面を測定した[80].

破骨細胞培養

マウス全骨髄細胞（unfractionated bone marrow cells; UBMC）を関節炎発症後 1 週の時点でマウス大腿骨，脛骨髄腔をフラッシュし，α-MEM で洗浄後，0.727 % NH4Cl-0.017 % Tris-Cl (pH7.2)-PBS 溶液で赤血球を除去して採取した．UBMC は骨髄マクロファージと異なり，骨髄内の血球系，間葉系細胞全てを含む細胞群である.

UBMC を 10 %FBS, 50 μg/ml アスコルビン酸及び 20 nM 1,25-dihydroxyvitamin D3 含有α-MEM で培養し破骨細胞へと分化誘導した[81]..

TRAP（酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ）染色

破骨細胞は TRAP 染色によって確認した．培地を除去後，PBS で洗浄，4 %ホルムアルデヒド, アセトン, クエン酸緩衝液で固定した. TRAP 染色キット（Sigma-Aldrich）を使用し，2-5 分間，37 ℃でインキュベートした．TRAP 陽性でかつ 3 つ以上の核を含有する細胞を多核破骨細胞としてカウントした.

quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

関節内および傍関節領域の関節炎の遺伝子発現の変化を調査するために, 関節炎発症 3 日, 7 日後にそれぞれの場所より Total RNA を Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA)を用いて採取し，1 μg の Total RNA から ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, Fitchburg, WI)を用いて逆転写にて cDNA を合成した．PCR DNA Engine Opticon 2 System (MJ Research, Hercules, CA)を使用し，DyNAmo™ HS SYBR Green qPCR Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて DNA 合成の検出に用

いた．使用したマウス glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), RANKL, interleukin-17 (IL-17)のプライマーのシークエンスは以下のとおりである．

GAPDH: 5’-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG -3’ (forward)
5’-GGGGTCGTTGATGGCAACA-3’ (reverse)

RANKL: 5’- AGCCGAGACTACGGCAAGTA-3’ (forward)
5’-AAAGTACAGGAACAGAGCGATG-3’ (reverse)

IL-17: 5’-GGTCAACCTCAAAGTCTTTAACTT-3’ (forward),
5’-TTAAAAATGCAAGTAAGTTTG-3’ (reverse).

mRNA の発現量は全て GAPDH の発現量により標準化した．

統計分析

得られたデータは，2 群間の検定には Student’s T-test を，3 群間の以上検定には One way analysis of variance と Newman-Kuels tests を用いて有意差検定を行い，判定は P 値＜0.05 で有意差ありとした．データは mean±SD で表した．

実 験 結 果

Siglec-15$^{-/-}$マウスの関節炎および関節破壊は WT と同程度に発症する

関節炎へに対する Siglec-15 の関与を調査するために, WT 及び *Siglec-15*$^{-/-}$マウスそれぞれ AIA 関節炎を発症させた. mBSA 投与後によって全てのマウスに関節炎が発症した. 関節腫脹の程度や経時的変化に関しても，WT と *Siglec-15*$^{-/-}$マウスの間に有意な違いは認められなかった(Fig.10A). 関節内における RANKL と IL-17 の遺伝子発現は関節炎に伴い上昇したが，, WT と *Siglec-15*$^{-/-}$マウス間に有意差はなかった(Fig.10B).

炎症性関節破壊における Siglec-15 の関与を評価するために, 関節炎誘導 28 日後に関節破壊の程度をマイクロ CT および組織学的に評価をした. 3D-CT 像では関節びらんなどの関節炎に伴う関節破壊像は両群にみられた(Fig.10C). 組織学的にも炎症細胞誘導,や滑膜増殖, パンヌス形成, 骨びらんの形成は*Siglec-15*$^{-/-}$マウスでも WT と同様に起こっており, 定量的評価でも WT と *Siglec-15*$^{-/-}$マウスに有意差はなかった (Fig.10D).関節表面に誘導された破骨細胞についても WT と *Siglec-15*$^{-/-}$マウスで大きな違いはみられず，パンヌスに接した骨表面や軟骨下骨には両群ともに巨大な多核破骨細胞を認めた. 定量的評価でも 2 群間に有意な差は認めなかった (Fig.10E). これらの結果から Siglec-15 は関節炎発症や関節破壊に関与しないことが明らかとなった.

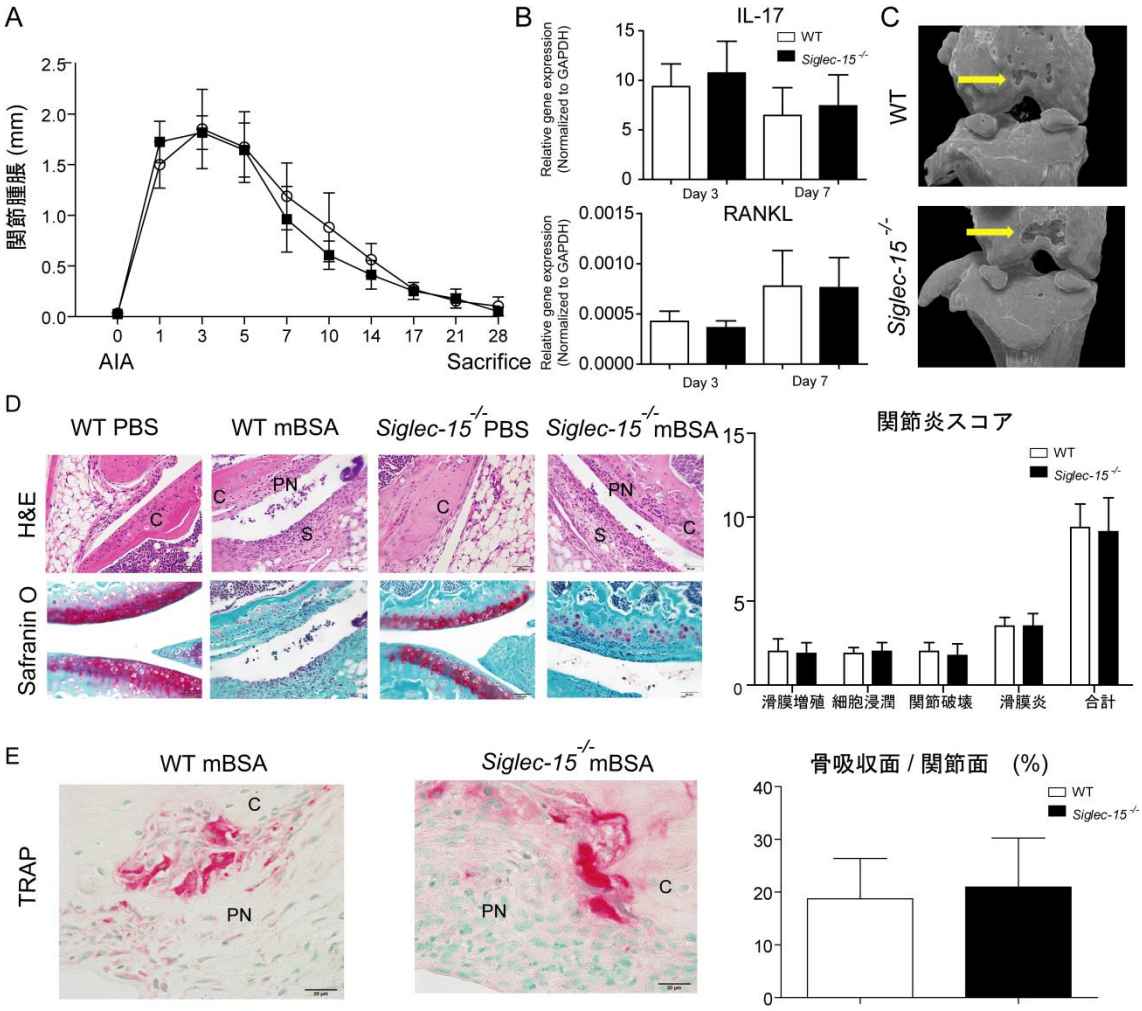

Fig.10. Siglec-15 は AIA 誘導関節炎と関節破壊に関与しない. A) mBSA 関節内投与後の関節腫脹推移を示す. Data are means ± SD from n=8 WT (○) and *Siglec-15*$^{-/-}$ (■) mice. B) RT-PCR における関節内の IL17 および RANKL の遺伝子発現量の比較. C) WT および *Siglec-15*$^{-/-}$マウス関節炎誘導 28 日後の関節の 3D-CT 像を示す. 両群とも同様な関節破壊を示した. D) 膝関節内の組織像を示す. 図表中の C は軟骨,S は滑膜,PN はパンヌスを指す. 両群とも関節炎スコアは各スコアとも傾向は同じであった. E) TRAP 染色での強拡大像を示す. 赤い多核の破骨細胞がパンヌス内や軟骨化骨内に誘導されている. 関節面における骨吸収面には統計学的有意差はない. Values shown are means ± SD . *p<0.05.

Siglec-15$^{-/-}$マウスは AIA による傍関節骨粗鬆症に抵抗性を示す

次に我々は, 関節炎誘導28日後に脛骨近位骨幹端部の傍関節領域骨粗鬆症を評価した. WT では関節炎進行に伴って脛骨近位骨幹端部の骨量は減少したが, _Siglec-15_$^{-/-}$マウスではこの減少しなかった (Fig.11A).定量的評価では, 海綿骨量, 骨梁幅, 皮質小幅は WT では関節炎によって有意に低下するが, _Siglec-15_$^{-/-}$マウスでは低下しなかった (Fig.11B). 相対的骨量減少は WT では 31.0%であったのに対し, _Siglec-15_$^{-/-}$マウスでは 2.7%のみであった.

さらに詳細に傍関節領域の変化を検証するためにパラフィン切片を用いて組織学的検討を行った (Fig.11C). この検討で明らかとなった興味深い事実は, 二次海綿骨に存在する _Siglec-15_$^{-/-}$マウスの破骨細胞は, 関節炎の有無に関わらず小型で海綿骨の表面に十分に広がっていなかったことである. それゆえ関節炎によって傍関節領域に誘導される破骨細胞数は両群ともに増加するが, 多核破骨細胞数や骨吸収面は WT では有意に増加したが, _Siglec-15_$^{-/-}$マウスでは増加しなかった (Fig.11D).傍関節領域における RANKL 発現の程度は両群間に有意差はなかったことから(Fig.11E), Siglec-15 を阻害すると関節炎による傍関節領域の破骨細胞誘導は抑制されることが明らかとなった.

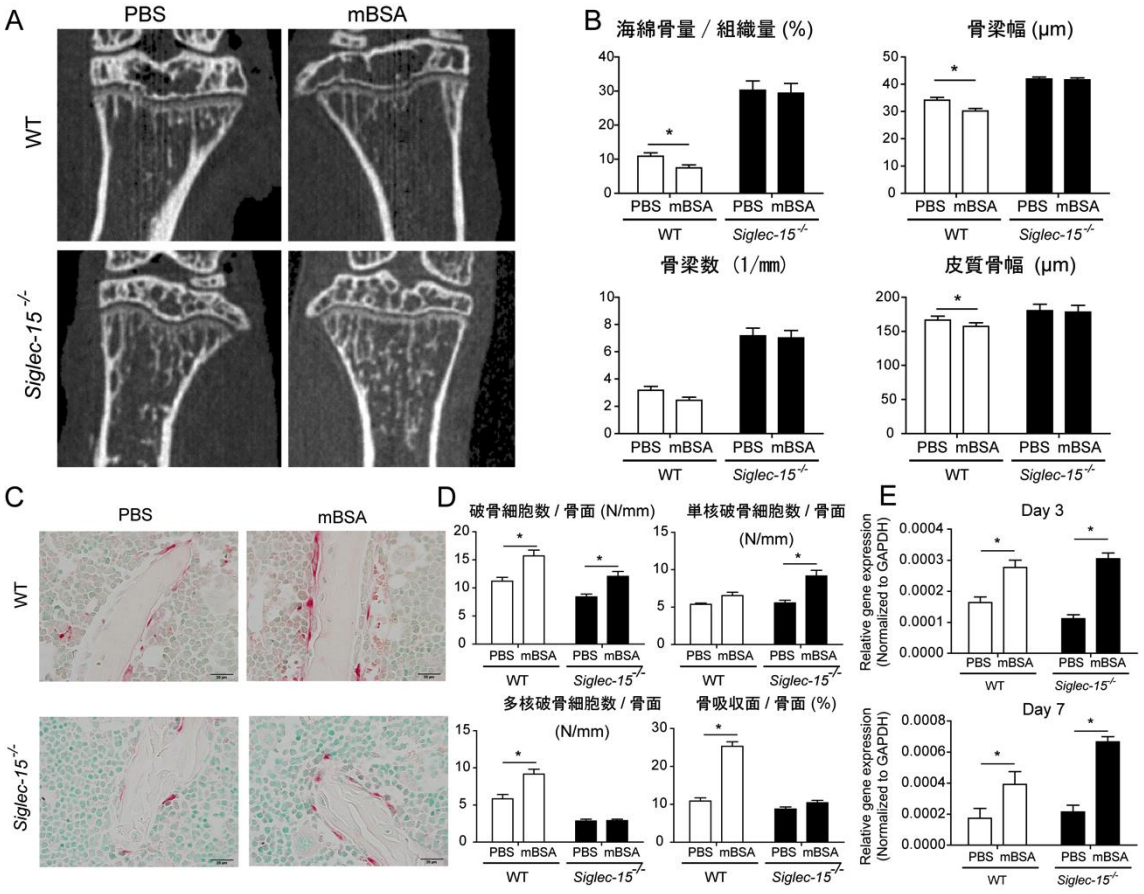

Fig.11. 脛骨近位部傍関節領域における AIA 関節炎による骨リモデリングの変化 A) mBSA 関節内投与 28 日後の両群の脛骨近位部マイクロ CT 像を示す. B) 海綿骨量, 海綿骨の微細構造, 皮質骨幅の骨形態計測の比較. C) 二次海綿骨領域の TRAP 染色像を示す. WT, *Siglec-15*$^{-/-}$マウスはともに, 関節炎により TRAP 陽性細胞は増加するが, *Siglec-15*$^{-/-}$マウスで誘導される破骨細胞は, 骨面に広がることができず小型である. このことは細胞融合あるいは細胞骨格形成が不完全であることを意味する. D) 二次海綿骨領域における骨吸収の骨形態計測を示す. 炎症によって WT では多核破骨細胞数や骨吸収面の割合は有意に増加するが, *Siglec-15*$^{-/-}$マウスにおいては有意に増加しない. E) RT-PCR による傍関節領域における RANKL の発現の比較. Values shown are means ± SD . *p<0.05.

Siglec-15 は炎症環境下において破骨細胞形成に重要な役割を示す

関節炎環境下における破骨細胞の分化能を比較するために,関節炎誘導後1週で大腿骨および脛骨骨髄から UMBC を抽出した. UMBC を 1,25-dihydroxyvitamin D3 存在下で培養し，破骨細胞に分化させた. 予想通り，WT の関節炎発症下肢骨から抽出された UMBC は対側の PBS のみを投与した関節炎の起こってない下肢から抽出された UMBC と比べ, 77.2%多く TRAP 陽性の多核細胞が誘導された. 一方, *Siglec-15*$^{-/-}$マウス由来の UMBC からも TRAP 陽性細胞は誘導されるが, これらの多くは小型で単核のもであった(Fig.12A). それゆえ *Siglec-15*$^{-/-}$マウスの関節炎を誘導した下肢より抽出された TRAP 陽性多核巨細胞の数は WT よりも有意に少なかった(Fig.12B). *Siglec-15*$^{-/-}$マウスでは mBSA を投与した関節炎側から抽出した UMBC と PBS を投与した非関節炎側の下肢骨から抽出した UMBC の間に, TRAP 陽性多核巨細胞の形成能に違いはなかった. この結果は *Siglec-15*$^{-/-}$マウスが AIA モデルにおける傍関節領域の骨粗鬆症化を抑制したという結果と一致する.

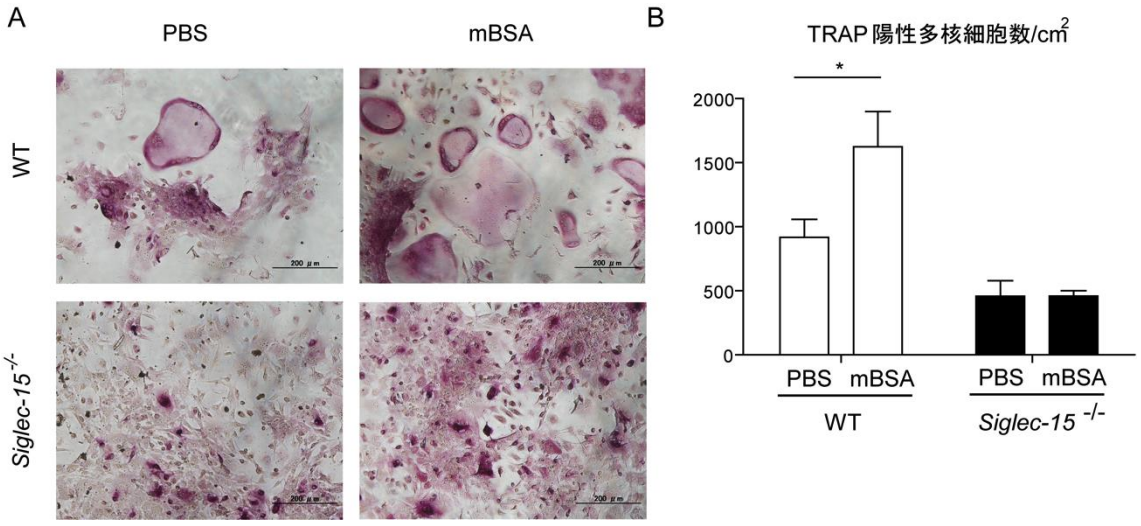

Fig.12. *Siglec-15*$^{-/-}$マウス長管骨骨髄から抽出した細胞からは未熟な破骨細胞が形成される A) 50 μg/mL のアスコルビンサンと 20 nM 1,25-dihydroxyvitamin D3 存在下で UMBC を培養した際に形成される TRAP 陽性細胞を示す. B) UMBC から TRAP 陽性多核細胞へ分化する数は *Siglec-15*$^{-/-}$細胞では有意に少ない. WT では炎症を起こした下肢から抽出した UMBC は非炎症側から抽出した UMBC と比較して TRAP 陽性細胞に高率に分化するが, *Siglec-15*$^{-/-}$細胞ではこれらの違いを認めない. Values shown are means ± SD . *p<0.05.

考 察

本章の結果から，Siglec-15 は関節炎に伴う関節破壊を制御しないことがわかった. Siglec-15 は二次海綿骨の生理的な骨吸収だけでなく，閉経後骨粗鬆症における病的な骨吸収亢進にも関与することが分かっているが [82]，本章の研究結果は Siglec-15 は関節破壊を引き起こす破骨細胞誘導には関与しないことを示唆している. Siglec-15/DAP12 経路は RANKL や TNFα による破骨細胞分化において重要な役割を果たしており，炎症による破骨細胞誘導にも関与しているとであるが，関節炎局所に誘導される破骨細胞は *Siglec-15*$^{-/-}$マウスにおいても形態的にも機能的にも正常であった．これは関節内に豊富に含まれるⅡ型コラーゲン特異的エピトープによって賦活化される OSCAR/FcRγ 経路が，Siglec-15/DAP12 経路を代償するためと考えられた.

興味深いことに, *Siglec-15*$^{-/-}$は関節炎による傍関節骨粗鬆症の発生には抵抗性を示すことがわかった. mBSA によって誘導した膝関節炎は, 関節内だけでなく傍関節領域にも破骨細胞を多数誘導するが, *Siglec-15*$^{-/-}$マウスでは傍関節領域に誘導される破骨細胞は形態的に異常であり,十分な骨吸収ができていなかった．この事実は，WT では炎症を起こした下肢から抽出した UMBC は非炎症側から抽出した UMBC と比較して TRAP 陽性細胞に高率に分化するが, *Siglec-15*$^{-/-}$細胞ではこれらの違いを認めなかったという in vitro の研究結果とも一致する．これらのデータは，RA 患者に発生する傍関節骨粗鬆症に対して，Siglec-15 は有力な治療ターゲットとなりうることを示唆している.

免疫受容体群による破骨細胞分化制御機構には未解明の部分が多いが， DAP12 や FcRγ に関与する複数の免疫受容体群は破骨細胞の分化の調節においてそれぞれ異なった役割を持っている可能性がある．近年の研究において,FcRγ や PIR-A のリガンドである β2 ミクログロブリンのノックアウトマウスにおける TNFα 誘導の関節炎において炎症は制御しないものの骨びらんや骨粗鬆症を抑制したという報告がある [3,4]. Joyce らは myeloid DAP12-associating lectin-1 (MDL-1) が関節炎の炎症期における滑膜増生や骨びらんを調整している鍵となる免疫受容体であることを報告している [5].本研究結果は，Siglec-15 が主に二次海綿骨の生理的あるいは病的な骨吸収の制御において重要な役割を果たしていることを示唆している.

この実験系には数点の限界がある. 一つには，AIA はヒトの RA とは病態が異なっていることがある．AIA は T 細胞依存性の関節炎であり，全身性骨粗鬆症を惹起しない [83]．しかしこのモデルは，滑膜増殖やパンヌス形成，関節軟骨破壊などの RA の病態

を示し，同一個体で健側との比較ができるという大きな利点がある[84]．またⅡ型コラーゲン誘発の関節炎モデルはAIAよりもヒトRAに病態が近いが，C57/Bl6マウスでは関節炎の発症率が低く，再現性のあるデータが得られにくい．疼痛の程度の違いを評価していないことも結果に影響する可能性がある．すなわち，身体活動性に違いがある場合，不動性骨粗鬆症の程度が異なるかもしれない．

本章の結論であるが，Siglec-15は関節炎に伴う傍関節骨粗鬆症進展に関与するが，関節破壊には関与しないことが明らかとなった．

第四章
小児ステロイド性骨粗鬆症における Siglec-15 の役割

緒 言

ステロイドで治療する疾患は多岐にわたるが，ステロイドによる副作用の中で最も頻度が高いのが骨粗鬆症とそれに伴う関連骨折であり，疫学的には長期使用者の約 50%に骨粗鬆症が発症する [85]．英国では成人の約 0.9%，高齢者の約 2.5%がステロイドを使用しており [86]，全骨粗鬆症患者のうちで約 20%をステロイド性骨粗鬆症が占める [87]．一方，小児期においても炎症性疾患 [6 7] やネフローゼ症候群 [8] や血液疾患などに対してステロイドを使用することがあり，小児においてもステロイド使用による骨粗鬆症が重要な合併症の一つとなっている．

骨組織におけるステロイドの作用として骨芽細胞の増殖や分化抑制からアポトーシスに陥ることによる骨形成阻害 [88] [89,90] と破骨細胞のアポトーシスの低下による骨吸収亢進が起こると考えられている [91,92]．ステロイド性骨粗鬆症の治療についてはこれまでの臨床的エビデンスの蓄積によりビスフォスフォネートが第一選択薬とされているが，小児に対するビスフォスフォネートの投与は成長障害や低骨代謝回転の持続，尿管結石発生の懸念があり推奨されていない．ステロイド性骨粗鬆症の管理と治療ガイドライン : 2014 年改訂版においても小児はエビデンスの蓄積に乏しく対象外となっており，安全に使用できる小児ステロイド性骨粗鬆症の治療法は確立されていない．

Siglec-15 はマクロファージや破骨細胞に発現するシアル酸受容体ファミリー蛋白のひとつであり，ITAM アダプター蛋白 DAP12 の共受容体として破骨細胞の最終分化を制御する [73] [74]．ITAM シグナルは破骨細胞分化に必須の経路であり，Siglec-15 以外の DAP12 共受容体やもうひとつの ITAM アダプター蛋白 FcRγ とその共受容体でも賦活化される．われわれのこれまでの研究結果から，Siglec-15 を阻害した場合，二次海綿骨における破骨細胞分化が抑制されるが，成長軟骨直下ではⅡ型コラーゲン-OSCAR-FcRγ シグナルによる代償機構があるため正常な破骨細胞分化が起こり成長障害はきたさないことが明らかになっている [10]．すなわち，Siglec-15 をターゲットとして成長期のステロイド性骨粗鬆症を治療した場合，成長障害を起こすことなく全身性骨粗鬆症を治療できる可能性がある．そこで，本章では，マウスモデルを用いてス

テロイド性骨粗鬆症に対する Siglec-15 阻害あるいはビスフォスフォネートによる治療効果と成長障害を調査した.

実 験 方 法

使用動物及びステロイド投与モデルの作製

本研究のために実施した動物実験はすべて北海道大学動物実験に関する規程に従って実施した．7 週齢，雄の WT，及び *Siglec-15*$^{-/-}$マウスを実験に用いた．マウスの皮下にプレドニゾロン(フジタ，東京，日本)に 5mg/kg/day を投与した [37]．さらに代表的なビスフォスフォネートであるアレンドロネート(LKT Laboratories Inc.，ミネソタ，USA) 0.1mg/kg/day を投与する群を作製した [93]．投与後 2, 8 週時点で大腿骨・脛骨を採取し，マイクロ CT を撮影して骨量の変化を観察した後，組織学的検査に供した．投与後 8 週時点で大腿骨の 3 点曲げ試験を行い力学的強度を評価した．

マイクロ CT

WT 及び *Siglec-15*$^{-/-}$それぞれの右大腿骨をマイクロ CT (CT, R_mCT2; Rigaku, Tokyo, Japan)を用いて 1 ピクセルあたり 10 μm の解像度で撮影した．骨微細構造の解析は TRI/3D-BON (Ratoc System Engineering 社, Tokyo, Japan)を用いて行った [39]．

組織学的検討

投与後 2，8 週で採取した脛骨を 4 %パラホルムアルデヒドで固定，EDTA 脱灰し，パラフィン包埋した．作製したパラフィン切片をサフラニン O 染色およびファストグリーン染色で成長軟骨を，TRAP（酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ）およびメチルグリーンで染色，破骨細胞を観察した．

形態計測は，成長軟骨幅と 1 次海綿骨，2 次海綿骨，骨幹部骨内膜面の骨表面における，TRAP 陽性破骨細胞数と骨吸収面を測定した [80]．

力学的強度試験

皮質骨の力学的強度を測定するため，右大腿骨骨幹部を用いて万能力学試験機 (Model 3365, Instron Corp., Norwood, MA, USA) により 3 点曲げ試験を行った．初期荷重を 1N に設定し，脛骨遠位端より 8mm 近位の場所を 0.5mm/分の速度で，破断するまで 3 点曲げを行った．破断強度を荷重変位曲線より算出し，剛性と弾性率を荷重-変位曲線の 5N から 10N の部位で線形類似することより算出した．弾性率と曲げ応力の算出は応力ひずみ曲線を用いた [14]．

統計分析

群間の検定には One way analysis of variance と Newman-Kuels tests を用いて有意差検定を行い，判定は P 値＜0.05 で有意差ありとした．データは mean±SD で表した．

実 験 結 果

Siglec-15 を阻害しても成長障害はきたさない

7 週齢の雄の WT および *Siglec-15*$^{-/-}$マウスに対してプレドニゾロンを 8 週間投与し，大腿骨長の長さの変化率を経時的に調査した．過去の報告と同様に Siglec-15 の成長は WT と差はなかった[10]．プレドニゾロン投与により，WT と *Siglec-15*$^{-/-}$マウスとも投与 4 週後から有意に成長率の低下があったが，その低下率に有意差はなかった．一方，アレンドロネートとプレドニゾロンを投与した WT マウスでは，プレドニゾロンを投与した WT マウスと比較しても投与 2 週後から有意に成長率が低下した(Fig.13A).

次に，プレドニゾロンとアレンドロネートおよび Siglec-15 阻害の成長や破骨細胞分化に対する影響を検証するために，薬剤投与後 2,8 週時点で脛骨のパラフィン切片を作製し，サフランイン O 染色と TRAP 染色を行った．プレドニゾロン投与により，成長軟骨幅は WT，*Siglec-15*$^{-/-}$マウスともに，投与 2 週後から有意に減少した．更にアレンドロネートを投与すると，肥大軟骨層が増加し増殖軟骨層幅はステロイド群よりも有意に低下した.

成長の鈍化に伴い，PBS 投与後 8 週時（15 週令）では，投与後 2 週時（9 週令）と比較して成長軟骨幅は減少するが，プレドニゾロンを投与するとさらに減少した(Fig.13B)．プレドニゾロン投与 2 週後では，TRAP 陽性破骨細胞の数と骨吸収面は有意に増加したが，投与 8 週後では逆に減少した(Fig.13C)．アレンドロネート投与 2 週時には TRAP 陽性破骨細胞数と骨吸収面は有意に減少した (Fig.13C).

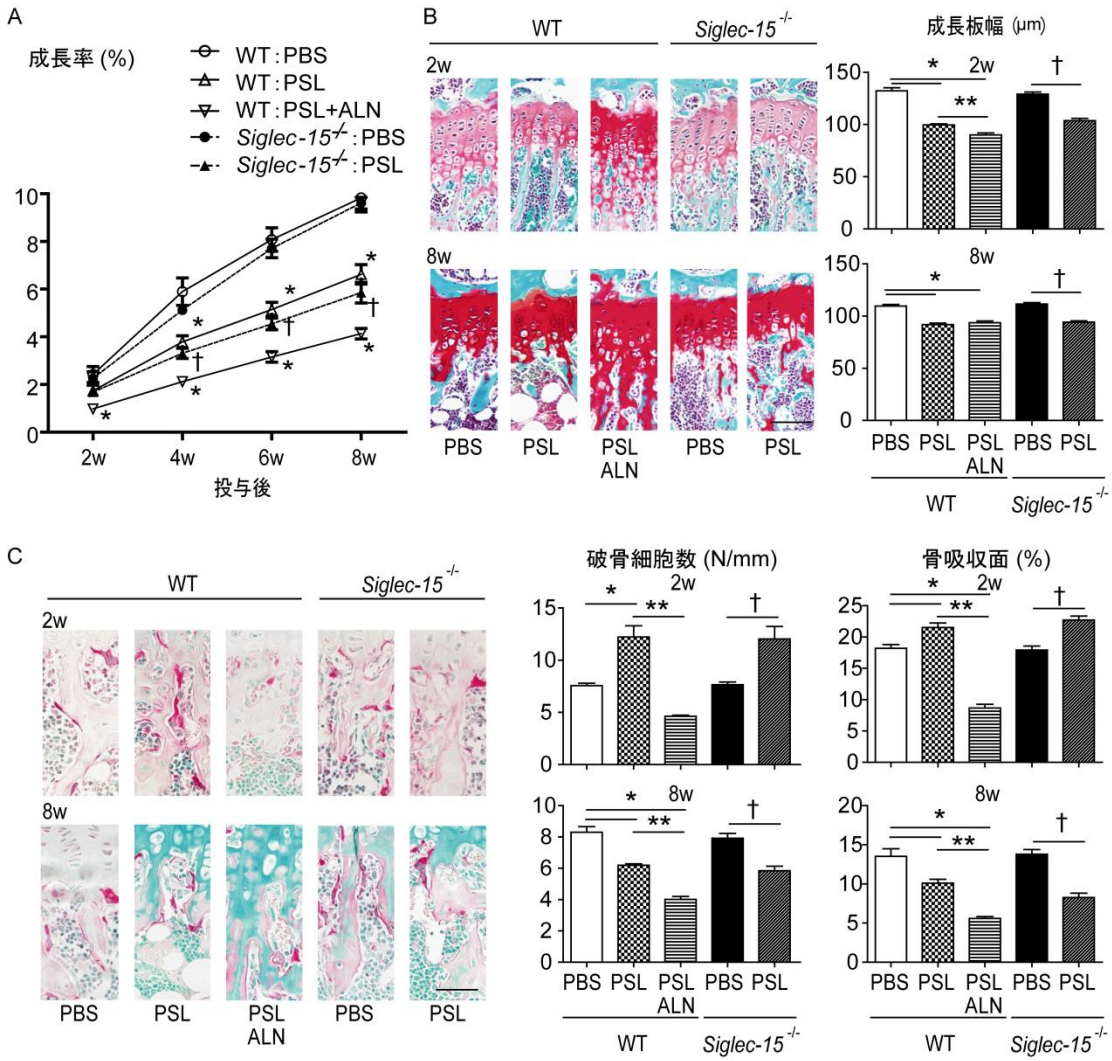

Fig.13. *Siglec-15*$^{-/-}$マウスではステロイドによる成長障害を増長しない．A) 大腿骨の長軸方向の成長率を示す．B) 薬剤投与後 2，8 週時点における脛骨近位成長軟骨部のサフラニン O 染色像と成長軟骨幅の計測結果を示す．C) 同部位の TRAP 染色像を示す．投与後 2 週ではプレドニゾロンにより TRAP 陽性細胞数と骨吸収面が増加したが，投与後 8 週では減少した．アレンドロネートを投与すると TRAP 陽性細胞は減少した．Data represent means ± SD (* $p<0.05$ vs WT+PBS, ** $p<0.05$ vs WT+PSL, † $p<0.05$ vs *Siglec-15*$^{-/-}$+PBS).

***Siglec-15* はステロイドによる二次海綿骨領域における多核破骨細胞の形成を障害**

プレドニゾロンを投与しても，二次海綿骨領域の骨密度，海面骨梁，骨梁幅，骨梁数は WT と *Siglec-15*$^{-/-}$ともに有意に減少しなかった [37]．投与後 8 週の時点でアレンドロネートを投与した群のみ有意な骨量の上昇を認めた(Fig.14AB).

二次海綿骨領域における破骨細胞への影響を検証するために TRAP 染色を行った．投与後 2 週の時点では，プレドニゾロン投与により，TRAP 陽性破骨細胞数は有意に増加した．WT では破骨細胞数の増加とともに骨吸収面も有意に増加したが，*Siglec-15*$^{-/-}$では，TRAP 陽性破骨細胞数の大多数が小型な破骨細胞であり骨吸収面はプレドニゾロン投与によっても有意に増加しなかった．投与後 8 週の時点では，WT，*Siglec-15*$^{-/-}$ともにプレドニゾロン投与により TRAP 陽性破骨細胞数と骨吸収面は減少傾向を示した．このことからプレドニゾロン投与後早期（2 週後）には骨吸収の亢進が起こるが，慢性期（8 週後）になると骨吸収は低下すると考えられた．尚，アレンドロネート投与では投与 2 週後から骨吸収が抑制され，結果的に 2 次海綿骨量の増加した (Fig.14CD).

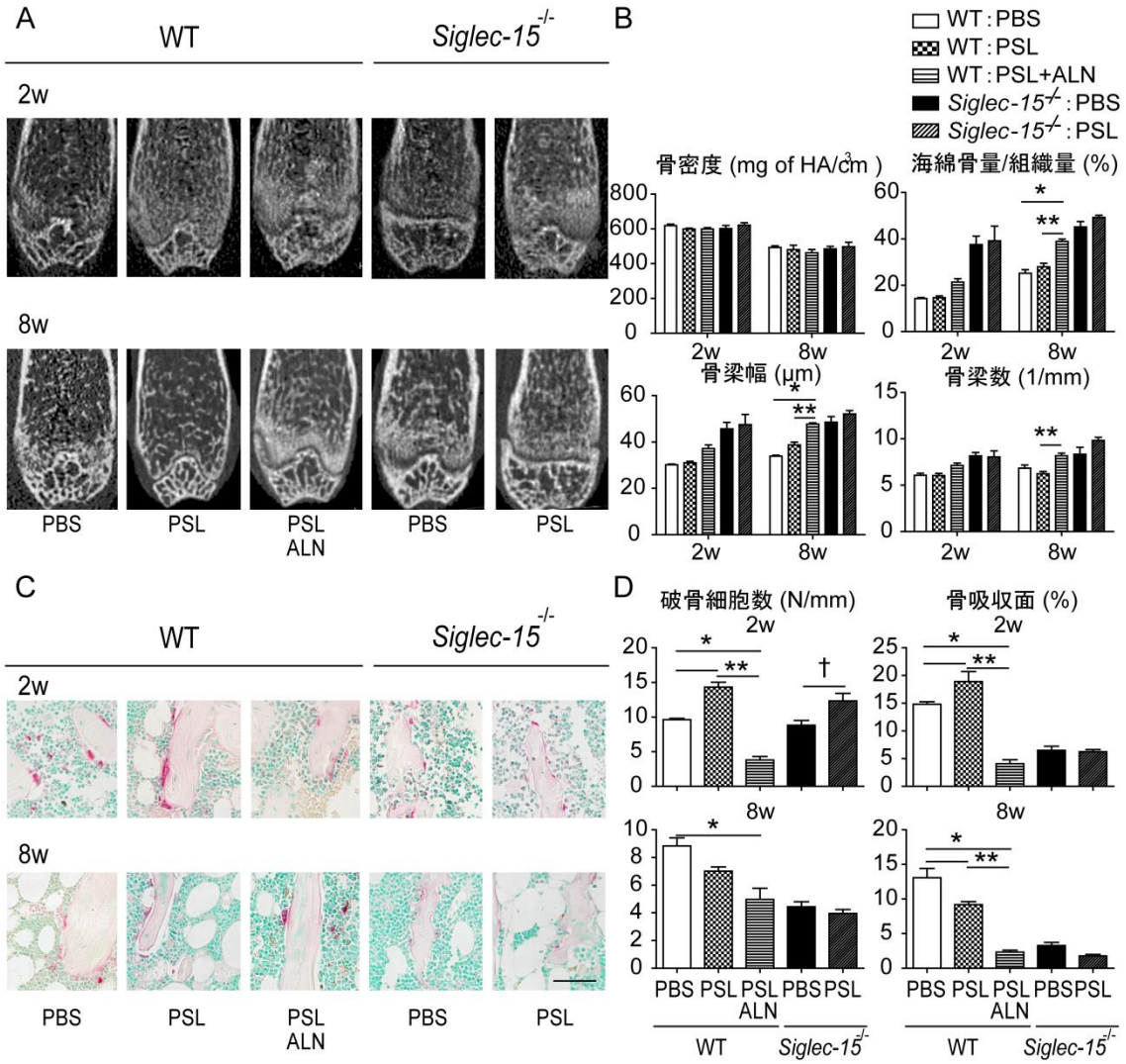

Fig.14. *Siglec-15*$^{-/-}$マウスでは，ステロイド投与後早期の機能的多核破骨細胞の誘導が抑制される．A) 投与後 2,8 週で摘出した大腿骨遠位部のマイクロ CT 像を示す．B) マイクロ CT データに基づく骨形態計測の結果を示す．C) 脛骨の二次海綿骨領域の高倍率画像を示す．WT，*Siglec-15*$^{-/-}$マウスいずれもプレドニゾロン投与後 2 週の時点では TRAP 陽性細胞が増加したが，*Siglec-15*$^{-/-}$マウスでは TRAP 陽性細胞は小さく，骨表面で広がる事ができていない．D) 組織学的データに基づく骨形態計測の結果を示す．破骨細胞数はプレドニゾロン投与後 2 週の時点には増加し，8 週後には減少した．この現象は WT と *Siglec-15*$^{-/-}$マウスともに同じ傾向を呈したが，*Siglec-15*$^{-/-}$マウスでは機能的な破骨細胞は形成されておらず骨吸収面は増加していない．アレンドロネート投与により破骨細胞数と骨吸収面が低下した．Data represent means ± SD (* $p<0.05$ vs WT+PBS, ** $p<0.05$ vs WT+PSL, † $p<0.05$ vs *Siglec-15*$^{-/-}$+PBS).

Siglec-15 を阻害するとステロイドによる皮質骨の菲薄化が抑制される

次に皮質骨に対する薬剤の影響を検討した．マイクロ CT の解析では投与後 2 週では皮質骨に構造上の変化はみられなかったが，投与後 8 週では WT プレドニゾロン投与群で皮質骨の菲薄化を認めた．一方，*Siglec-15*$^{-/-}$マウスではこのような変化は認めなかった(Fig.15A). 形態計測においても，皮質骨幅および断面二次モーメントは投与後 2 週では WT と *Siglec-15*$^{-/-}$ともに有意差はなかったが，投与後 8 週ではプレドニゾロン投与 WT 群では非投与 WT 群と比べて有意に皮質骨幅，断面二次モーメントが低下した．一方，*Siglec-15*$^{-/-}$マウスではこのような変化はみられなかった．

薬剤投与による皮質骨部の破骨細胞への影響を明らかにするために TRAP 染色を行った． WT ではプレドニゾロン投与により，皮質骨内骨膜面の TRAP 陽性破骨細胞数と骨吸収面は有意に増加したが， *Siglec-15*$^{-/-}$マウスでは，小型な破骨細胞しか形成されず骨吸収面もプレドニゾロン投与によっても有意に変化しなかった． 尚，アレンドロネート投与では海綿骨同様投与 2 週後から骨吸収が抑制された(Fig.15C, D).

次に 3 点曲げ試験で皮質骨の力学的強度を調査した．プレドニゾロン投与により，WT では破断強度や材料力学特性が有意に低下したが，*Siglec-15*$^{-/-}$ではアレンドロネート追加投与と同様にプレドニゾロンを投与しても有意な低下はみられなかった．このことから Siglec-15 を阻害するとステロイドによる皮質骨の菲薄化や力学的強度を低下を予防できる可能性が示唆された(Fig.15E).

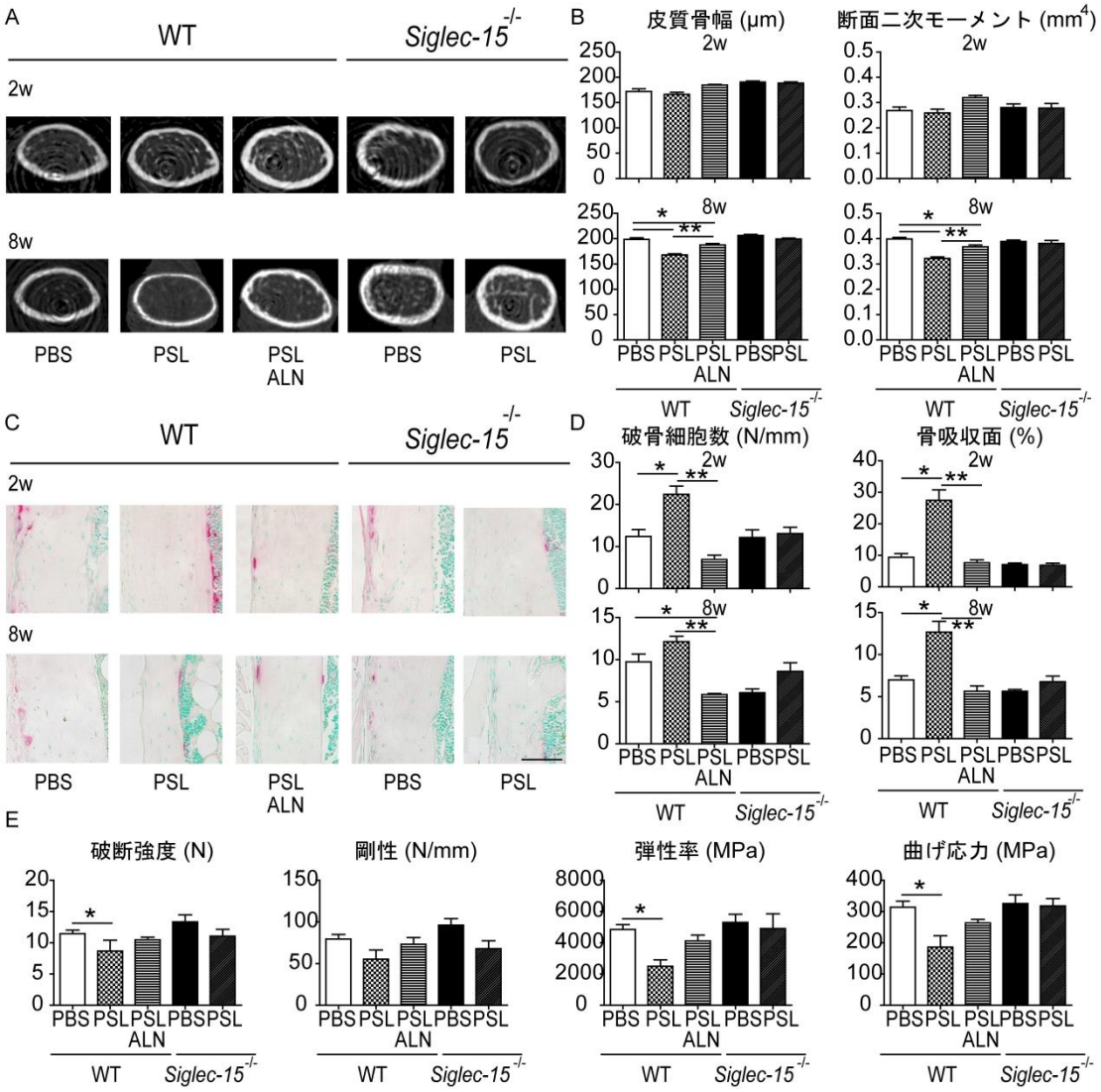

Fig.15. *Siglec-15*$^{-/-}$マウスでは，ステロイドによる皮質骨の菲薄化と力学的強度の低下が抑制される．A. プレドニゾロン投与後 2,8 週で摘出した大腿骨骨幹部のマイクロ CT 断面像. B. マイクロ CT データに基づく形態計測．C. 大腿骨骨幹部皮質骨の TRAP 染色光学顕微鏡画像．D. WT ではステロイド投与後 2, 8 週の時点で内骨膜面の破骨細胞数と骨吸収面が増加したが，*Siglec-15*$^{-/-}$マウスではステロイド投与によっても破骨細胞数，骨吸収面は増加しなかった. アレンドロネート投与群では投与 2 週後から破骨細胞数と骨吸収面が低下した．E) 大腿骨骨幹部の力学的特性． Data represent means ± SD (* $p<0.05$ vs WT+PBS, ** $p<0.05$ vs WT+PSL, † $p<0.05$ vs *Siglec-15*$^{-/-}$+PBS).

考 察

本章の結果から，Siglec-15 はステロイド性骨粗鬆症における皮質骨の菲薄化に関わっている事が明らかとなった．ステロイド投与により *Siglec-15*$^{-/-}$マウスにおいても投与 2 週後の海綿骨や皮質骨の内骨膜面の破骨細胞数は増加したが，機能的な多核破骨細胞への分化が障害されており，ステロイドによる骨量減少や皮質骨の菲薄化に抵抗性を示した. また, 成長軟骨直下では骨吸収抑制剤であるアレンドロネートでは, 成長軟骨下においても破骨細胞を抑制し, 肥大軟骨細胞層の吸収置換を阻害することにより成長障害を呈したが, *Siglec-15*$^{-/-}$マウスでは成長軟骨下には正常な多核破骨細胞が誘導され成長障害を示すことはなかった．この事は，Siglec-15 をターゲットとした骨吸収抑制療法は小児ステロイド骨粗鬆症の予防，治療に安全かつ有効である事を示唆している.

小児骨粗鬆症におけるビスフォスフォネートの使用に関しては，これまで骨形成不全や続発性骨粗鬆症に対する使用経験から骨粗鬆症患児の BMD を上昇させるといった報告が少数存在するが，同剤による骨折率の低下を支持するデータは十分に得られていない[94]．また,ビスフォスフォネートの成長障害に関しては惹起するという報告としないとの報告がありまだ一定の見解に至っていないが [95]，本研究においては成長障害を増長する結果となった．組織学的にも成長軟骨帯に明らかな異常が生じており，ビスフォスフォネートが成長に何らかの影響を及ぼすことは間違いない．またビスフォスフォネートによる過剰な骨吸収抑制を小児期に続けた場合，大理石骨病[96]や顎骨壊死などが発生する可能性も示唆されている．一方，Siglec-15 中和抗体は破骨細胞の機能をマイルドに抑制することに加えて, 骨芽細胞の発現を亢進させることが明らかとなっており [97]，骨代謝回転の点からも Siglec-15 は小児ステロイド骨粗鬆症に対するきわめて適当な治療ターゲットであるといえる.

本研究の限界のひとつは, 実験に用いられるほとんどのマウス系統はヒトと異なり, ステロイドを投与しても二次海綿骨に骨粗鬆症化を起こさない点である．本研究では C57/Bl6 をバックグラウンドにもつ *Siglec-15*$^{-/-}$マウスを実験に用いたため，ステロイドの投与により海綿骨骨粗鬆症はきたさなかった. 雄の Swiss Webster マウスではステロイド投与により骨粗鬆症を発症することが報告されており [98] [99] [100]，今後はこの系統に対する中和抗体投与による検討を行い直接的なエビデンスを得る必要がある．また, ステロイドおよびアレンドロネートの投与量や投与頻度も実際のヒト臨床用量とは異なる．本研究では過去の齧歯類での報告に準じて投与量を設定したが，よりヒトに近い用量で検討する必要もある.

本研究の結果から Siglec15 の阻害によって安全かつ有効に小児ステロイド性骨粗鬆症を予防できる可能性が示された.

第五章
ワーファリンによる続発性骨粗鬆症状態における骨折修復能とテリパラチドによる骨治癒促進効果

緒 言

続発性骨粗鬆症の原因となる薬剤ひとつに血栓予防を目的に頻用されるワーファリンがある．ワーファリンはビタミン K を阻害するため，オステオカルシンの Gla 化を抑制し，骨の石灰化障害の原因となる [101-103,104{Price, 1981 #13]．骨芽細胞で合成されるオステオカルシンは細胞内でビタミン K 依存性カルボキシラーゼにより Gla 化される。17 位、21 位、24 位のグルタミン酸が Gla 化されてカルシウムポケットを形成し，ヒドロキシアパタイトと結合する。そのため，ワーファリン使用患者では石灰化障害を特徴とする続発性骨粗鬆症を発症し，易骨折を呈する．また，石灰化障害により，骨折の治癒が遅延しやすいという問題がある．

副甲状腺ホルモン製剤テリパラチド(PTH_{1-34})は，本邦において唯一使用可能な骨形成促進剤であり，その強力かつ即効的な骨量増加効果から骨粗鬆症性脆弱性骨折の予防に用いられている [105].一方，PTH_{1-34} が整形外科領域においてとくに注目されている別の理由に骨治癒促進効果がある．PTH_{1-34} は骨治癒様式や病態にかかわらず，骨の治癒が促進されることが多くの動物実験で証明されている [11-15 16]．しかしながら，これらの研究の大多数は健常な成熟動物を用いた報告であり，骨代謝異常が存在する場合にもテリパラチドが骨治癒促進効果を十分に発揮できるかは明らかでない．

本研究においてワーファリンによる続発性骨粗鬆症に注目した理由は，石灰化障害が存在する場合はとくに PTH_{1-34} の骨治癒促進効果が減弱する可能性があるためである．すなわち，PTH_{1-34} によって非生理的なレベルまで骨形成を亢進させても，骨修復の最終過程である石灰化障害が背景に存在する場合には，急造した再生骨に十分な強度を与えることができないかもしれない [106]．逆に，ビタミン K の補充によって活性型 Gla 化オステオカルシンが増加し，ラットの骨治癒を促進するという報告もあり，PTH_{1-34} を投与する際にはビタミン K を併用したほうが有利である可能性もある [107]．

そこで本章では，ワーファリンまたはビタミン K を投与したラットに大腿骨骨切り行い，PTH_{1-34} による骨治癒促進効果を調査した．

実 験 方 法

使用動物及び大腿骨骨切りモデルの作製

本研究のために実施した動物実験はすべて北海道大学動物実験に関する規程に従って実施した．10 週齢の雌の SD ラット(日本クレア, 東京, 日本) 40 匹を用いて SPF 環境で実験を行った．飼育用の餌は，0.98% Ca, 0.80% Pi, and 15.4 mg/kg vitamin K3 含有の餌 (Labo MR Stock; Nosan Corporation Life-Tech Department, 横浜, 日本)を用いた．2 週間環境に順応させたあと，大腿骨を糸鋸 (MDS36-30 T-saw, MANI, Tochigi, Japan) を用いて経皮的に骨切りを行い，1.0mm のチタン製のワイヤー (Synthes, 東京, 日本) で固定した．このモデルの利点としては，骨膜温存や軟部組織損傷の回避ができ，再現性の高いモデルであることが挙げられる [108].

研究デザイン

骨切り後, すべてのラットを無作為に Vehicle control 群, $PTH_{1\text{-}34}$ 投与群， $PTH_{1\text{-}34}$ にワーファリンを併用投与した群, $PTH_{1\text{-}34}$ にビタミン K_2 を併用投与した群の 4 群に分けた. $PTH_{1\text{-}34}$ (Forteo®; Eli Lilly, Ltd., 神戸, 日本)は 30 μg/kg/day で毎日皮下投与した [106,109]．ワーファリンを 0.4 mg/ml/kg で週 3 回，口腔内投与 [110]，ビタミン K_2 (menatetrenone; Eisai Co., Ltd., 東京, Japan)は 1 回 30 mg/ml/kg を週 3 回ゾンデを用いて経口投与した [107,111,112].投与 2 週間毎に体重測定と尾静脈採血を行い，麻酔下で大腿骨のマイクロ CT 撮像を行った．投与 8 週間後に安楽死させ、大腿骨を摘出した．大腿骨をマイクロ CT で撮像し，力学試験と組織学的検討を行った.

血清 Gla 化，Glu オステオカルシン濃度測定

ELISA キット(Takara Bio Inc., Shiga, Japan)により血清 Gla 化，Glu オステオカルシン濃度を測定した.

力学試験

骨折部における 3 点曲げ破壊試験を万能力学試験器 (Model 3365, Instron Corp., Norwood, MA, USA)を用いて行った．大腿骨は 15mm の間隔で，大腿骨の前面を治具の上方向にして骨折部における力学試験を行えるように設置した．押し込みは 0.2mm/min の速度で破壊するまで行った．破断強度 (N) と剛性 (N/mm)を強度 - 変位曲線より算出した．また弾性率や曲げ応力などの材料そのものの力学強度も算出した [14].

マイクロ CT

右大腿骨のマイクロ CT (CT, R_mCT2; Rigaku, Tokyo, Japan)を用いて 1 ピクセルあたり 20 μm の解像度で撮影した．骨微細構造の解析は TRI/3D-BON (Ratoc System Engineering 社, Tokyo, Japan)を用いて行った[39]. 測定関心領域は骨切り部から 2.5mm の範囲で，全骨量(BV total)と元々あった骨量(BV original)を差し引いたものを仮骨量(BV callus)として計測し，骨塩量と骨密度 をそれぞれ測定した[113 114].

組織学的検討

大腿骨を 70 %エタノールで 3 日間浸漬固定した後，Villaneuva Bone 染色を行い，非脱灰硬組織標本を作製した．屠殺前 7，2 日前にカルセイン (20 mg/kg) をそれぞれ皮下投与し，骨形成を観察するための骨標識を行った．非脱灰硬組織標本の作製は新潟骨の科学研究所(新潟，日本)で行った.

Villaneuva Bone 染色は非脱灰骨組織標本の染色法として用いられ，類骨や石灰化骨の観察に適している．また，カルセインやテトラサイクリンで標識する事により，骨形成の動的な指標の測定が可能である．本研究においては，主に骨形成の評価のために本標本を作製したが，破骨細胞や骨芽細胞の数や面積についても測定を行った．以下に標本の作製方法の概略を述べる.

摘出した大腿骨を 70 %エタノールで固定後, Villaneuva Bone Stain に 4 日間浸透させる．Villaneuva Bone stain の調整は以下の通りである.

Azull II	1.5 g
酢酸 Na 三水和物	13.6 g
ベーシックフクシン	5 g
Fast Green FCF	1.5 g
Orange G	3.75 g
95 %エタノール	100 ml
酢酸	6 ml
蒸留水	900 ml

染色後，エタノールで脱水し，メチルメタクリレートモノマー樹脂に包埋し，30-40 ℃で約 10 日間重合させる．出来上がったブロックを成型し，ミクロトームを用いて厚さ 5μm の薄切切片を切り出し，封入する.

骨切り周囲の仮骨の組織量，骨量，類骨量，骨面，骨芽細胞数，骨芽細胞面，カルセインで標識された面，標識幅を測定した．得られたパラメーターから，破骨細胞数/骨面，骨吸収面/骨面，骨芽細胞面，骨石灰化速度，骨形成速度/骨面，骨石灰化面/骨面を算出した[80].

統計分析

群間の検定にはOne way analysis of variance と Newman-Kuels tests を用いて有意差検定を行い，判定はP 値＜0.05 で有意差ありとした．データは mean±SEM で表した．相関関数は, ピアソン相関係数を用いて行い, 判定はP 値＜0.05 で有意差ありとした.

実 験 結 果

骨治癒過程における血清中 Gla 化および Glu オステオカルシン量の経時的変化

血清 Gla および Glu オステオカルシン濃度の術後 2,4,6,8 週後における縦断的な変化率を示す (Fig.16A, B). Vehicle 群では 2 週の時点で Gla オステオカルシンがベースラインから 18%上昇し, 2 週から 8 週にかけて減少した. $PTH_{1\text{-}34}$ 投与群では術後 2 週から 6 週までベースラインから 100~140%上昇した. ビタミン K_2 を追加投与した群では $PTH_{1\text{-}34}$ 投与群と比較して明らかな差はなかったが, ワーファリンを追加投与した群では $PTH_{1\text{-}34}$ 投与による上昇効果が打ち消され, ベースラインよりも減少した.

Glu オステオカルシンは術後 4 週までは上昇し, その後ゆるやかに減少する. $PTH_{1\text{-}34}$ 投与群とビタミン K_2 追加投与群では Glu オステオカルシンの値や継時的変化に有意な変化はなかったが, ワーファリンを追加投与した群では著明な Glu オステオカルシンの上昇を認めた(Fig.16B).

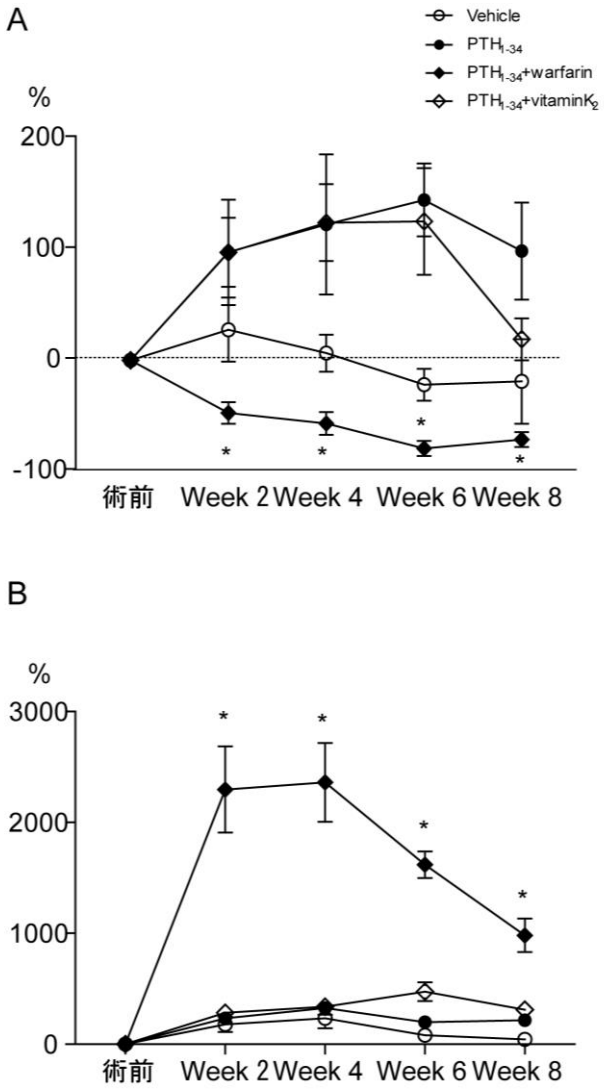

Fig.16. 骨切り術後の血清 Gla オステオカルシン(A) と Glu オステオカルシン (B)濃度の経時的変化をベースラインからの変化率で示した．A. 血清 Gla オステオカルシン．Vehicle 群では術後 2 週でベースラインから 18%上昇し，その後減少した. PTH_{1-34} 投与群では Vehicle 群の約 5 倍の上昇し, 6 週まで増加傾向を示した．ワーファリン追加投与により, PTH_{1-34} による上昇は消失し，ベースラインよりも低下した．ビタミン K_2 追加投与群では単独投与群と比較して有意な差はなかった．B) Glu オステオカルシン濃度はワーファリン追加投与群でのみ有意な変化がみられ，術後から約 100-200%の著明な上昇を認めた．Data represent means ± SEM (n=6). * $P < 0.05$ vs. PTH_{1-34} group

ビタミン K は PTH_{1-34} による骨治癒促進効果と相関する一力学的特性一

過去の報告と同様に PTH_{1-34} 投与により骨強度は上昇し，破断強度と剛性はそれぞれ Ctl 群と比較して 2.4 倍, 1.7 倍と増加した [109,115]．ワーファリンを併用投与すると PTH_{1-34} 投与の効果の減弱 (破断強度は 0.5 倍, 剛性は 0.6 倍)した．一方，ビタミン K_2 を併用した場合，統計学的有意差はないものの PTH_{1-34} の効果は増強傾向を示した(破断強度は 1.5 倍, 剛性は 1.3 倍)．材料特性を表す弾性率や曲げ応力も，破断強度や曲げ応力と同様の傾向を示した(Table.3).

PTH_{1-34} 投与群においては術後 2-6 週での間で Gla オステオカルシンと力学的特性が統計学的に相関することが分かった (Table 4).

	Vehicle	PTH_{1-34}	PTH_{1-34} warfarin	PTH_{1-34} vitamin K_2
破断強度(N)	74.6 ± 8.8	180.7 ± 37.9	97.4 ± 33.4	265.9 ± 42.9*
剛性(N/mm)	20.0 ± 5.2	34.9 ± 6.0	21.4 ± 8.4	46.3 ± 4.4*
弾性率 (MPa)	139.9 ± 36.5	390.9 ± 126.1	188.5 ± 62.9	517.2 ± 89.0*
曲げ応力(MPa)	10.0 ± 1.8	34.0 ± 10.0	15.3 ± 4.8	46.1 ± 5.6*

Values are mean ± SEM. n=5 for each group

*: p<0.05 vs. vehicle

Table.3 術後 8 週における,骨切り部の力学的特性の比較

	破断強度	剛性	弾性率	曲げ応力
Gla-OC *Week 2*	0.6348 p=0.015*	0.4125 p=0.142	0.5050 p=0.061	0.7695 p=0.0013*
Gla-OC *Week 4*	0.7367 p=0.003*	0.6467 p=0.012*	0.6454 p=0.013*	0.6918 p=0.0061*
Gla-OC *Week 6*	0.7339 p=0.003*	0.6333 p=0.015*	0.6365 p=0.014*	0.7764 p=0.0011*
Gla-OC *Week 8*	0.2689 p=0.352	0.2668 p=0.357	0.5052 p=0.062	0.4603 p=0.098

Table.4 術後 8 週における骨切り部の力学的特性と Gla オステオカルシンの相関

上段は Peason r　下段は p 値を示す.　p<0.05 で統計学的有意差ありとした.

ビタミン K 充足の程度は PTH_{1-34} による骨治癒促進効果と相関する―画像的評価―

骨治癒の経時的変化を評価するために，術後 2-8 週で縦断的にマイクロ CT を撮像した． PTH_{1-34} 投与群では過去の報告と同様に巨大な仮骨が形成された (Fig17A) [14,106,116]．一方で，骨切り部の間隙は PTH_{1-34} 投与群とビタミン K_2 追加投与群では術後 6 週で埋まっていたが，ワーファリン追加投与群では間隙の石灰化が遅延する傾向であった.

さらに，術後 8 週の時点で固定したワイヤーを抜去し，骨折仮骨に関する定量的評価を行った. 仮骨の骨量と骨密度は PTH_{1-34} を投与すると有意に増加した (Fig.17 BC). ワーファリン併用投与群では PTH_{1-34} 投与群間内ではこれらが低い傾向であったが，統計学的有意差はなかった.

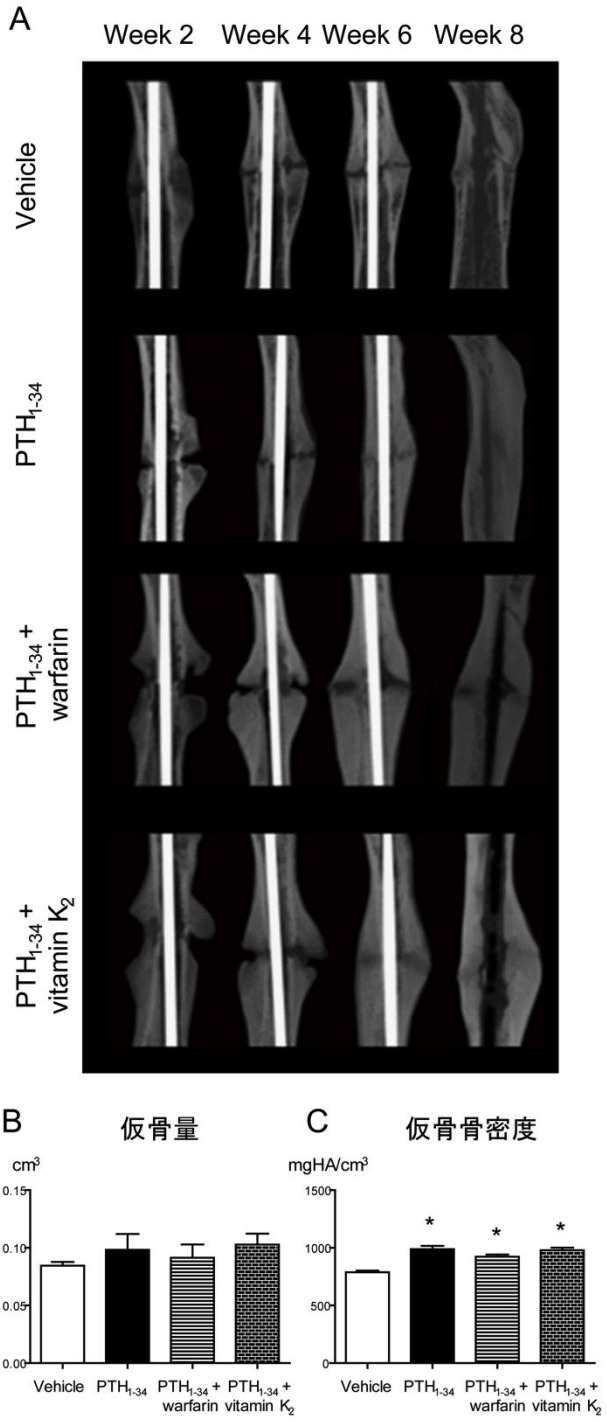

Fig.17. PTH_{1-34} による骨治癒促進効果に関する画像評価. A. 縦断的 2D マイクロ CT イメージを時系列に示す. 術後 8 週時点の石灰化した仮骨量(B)と仮骨骨密度(C)の比較. PTH_{1-34} 投与により大きく密な仮骨が形成されるが, ワーファリンを併用投与すると効果は減弱する傾向があった. Data represent means ± SEM (n=10). * $P < 0.05$ vs. vehicle group.

ビタミン K 充足による PTH_{1-34} の骨治癒効果の影響の組織学的評価

力学的強度への薬剤の影響のメカニズムをより明らかにするために, 我々は投与 8 週後に組織学的検討を行った. マイクロ CT と同様に PTH_{1-34} において旺盛な仮骨形成を認め (Fig.18A-D), 形態計測においても Vehicle 群と比較して有意な骨量の上昇を認めた (Fig.18M). 画像上赤紫色を呈する類骨はワーファリン追加投与群で多く見られ, 類骨量/骨量はビタミン K_2 追加投与群と比較して有意な上昇を認めた(Fig.18G, K and N). 骨表面に対する骨芽細胞数, 骨芽細胞面, 石灰化面は PTH_{1-34} 投与において Vehicle 群と比較して有意な上昇を認めたが, 群間には有意な差がなかった (Fig.18OP). 骨形成を検討すると PTH_{1-34} 投与により石灰化速度や骨形成速度は上昇し仮骨の石灰化の亢進が認められた (Fig. 18I-L and Q-S) [15]. 一方でビタミン K_2 追加投与により石灰化速度や骨形成速度は有意には上昇しないものの, ワーファリン追加投与により PTH_{1-34} の効果は減弱した.

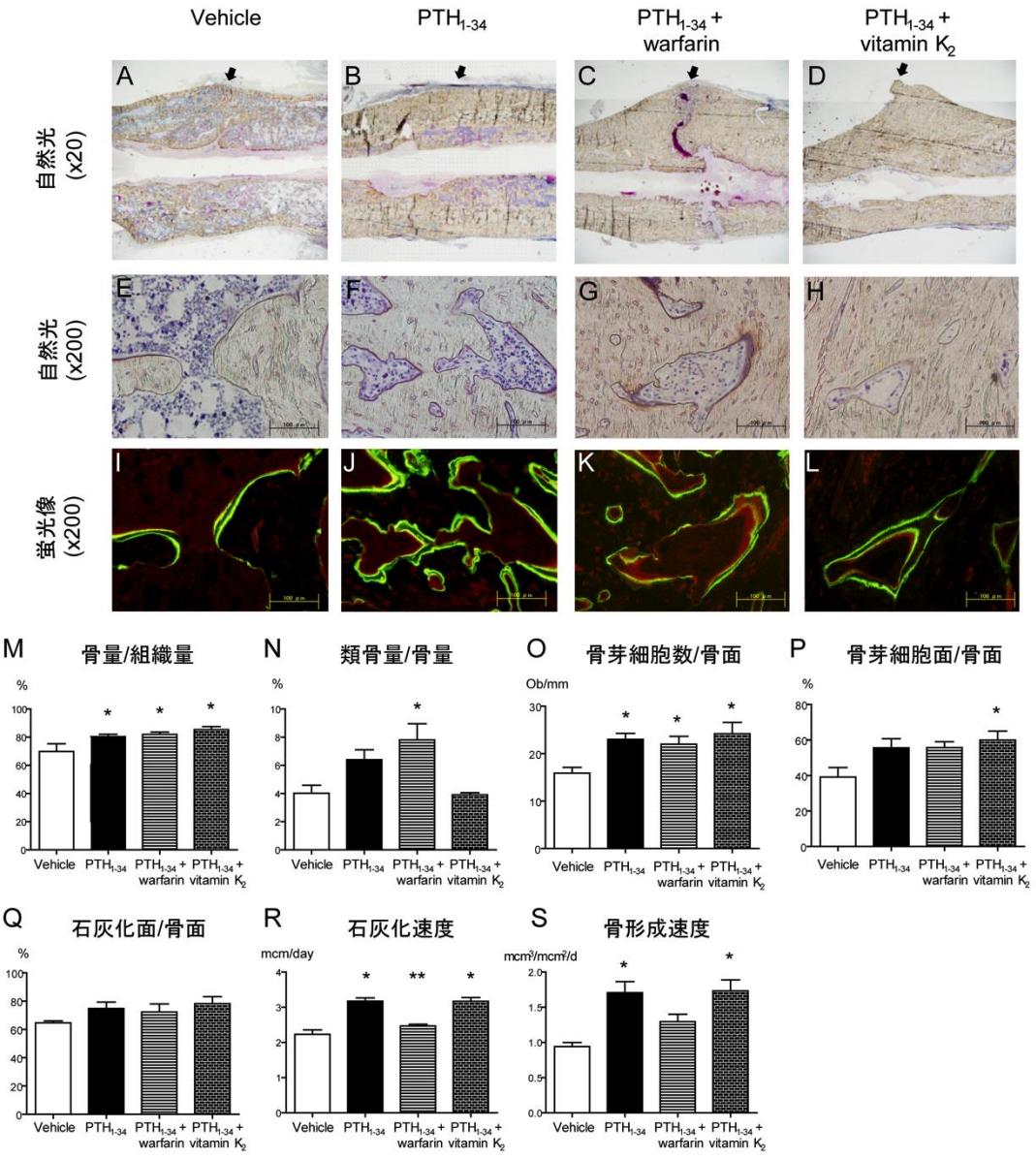

Fig.18. 仮骨の組織および形態計測結果．ビラヌーバ染色における矢状断の組織像．自然光(A-H)，蛍光像(I-L)を示す．(A-D) 弱拡像．(E-H) 強拡像．自然光において，赤紫は類骨であるが，PTH_{1-34} 投与群とビタミン K_2 追加投与群では類骨の減少を認めた．(M-S) 骨形態計測結果を示す．Data represent means ± SEM (n=5). * $P < 0.05$ vs. vehicle group. **: $P < 0.05$ vs. PTH_{1-34} group.

考 察

本章の研究では，ワーファリン投与によるオステオカルシンのグラ化の抑制が $PTH_{1\text{-}34}$ による骨治癒促進効果を減弱させること示した．骨治癒とオステオカルシンのグラ化に関しては相反する報告がある．Einhorn らはビタミン K を含まない食餌摂取によりビタミンK不足状態にさせたラットの骨折モデルでは骨折治癒は抑制されなかったと報告した[117]．一方，ビタミン K の阻害剤であるワーファリンは骨折治癒を抑制するという報告がある[118]．$PTH_{1\text{-}34}$ 投与では Gla オステオカルシン濃度を 5 倍上昇させることから考えると，$PTH_{1\text{-}34}$ により骨治癒促進を図る場合にはビタミン K 濃度による影響が生じやすい可能性がある．

本研究では，ビタミン K_2 の追加投与が $PTH_{1\text{-}34}$ の骨治癒効果を増強させるかどうかについても調査した．ビタミン K_2 の投与によりラットの長管骨の骨治癒が促進することから[107]，$PTH_{1\text{-}34}$ にビタミン K_2 を併用することにより相加的あるいは相乗的な骨治癒促進効果を期待したが，実際には $PTH_{1\text{-}34}$ 単独投与とほとんど違いがなかった．この事象の考えうる原因としては食餌にビタミン K_3 が含有されていることがあげられる．したがって，ビタミン K の摂取が十分である患者では，$PTH_{1\text{-}34}$ にビタミン K_2 を併用するメリットは少ないと考えられる．しかし，高齢者ではビタミン K 濃度は低下していることが多いため，実臨床においては骨治癒促進効果を期待して $PTH_{1\text{-}34}$ を投与する場合にはビタミン K_2 の併用投与が有効な可能性もある[119]．またビタミン K_2 は核内受容体である SXR (Steroid and Xenobiotic Receptor)を通して骨芽細胞の分化を亢進することが分かっており，グラ化以外の別の作用も関与して骨治癒を亢進させる可能性もある[120,121]．

興味深い発見のひとつは，ワーファリン投与によって著明に Gla オステオカルシン濃度が低下しているラットでも仮骨の骨塩量は有意には減少しなかったことである．ハイドロキシアパタイトと高い親和性をもつ Gla オステオカルシンは石灰化に重要と考えられているが[122,123]，アパタイトの析出や沈着自体には必須ではない可能性がある．近年の研究により，オステオカルシンはハイドロキシアパタイトの成熟に関与することがわかっている．またオステオカルシンを欠損させると骨量は増えるものの，組織学的な骨基質のミネラル成分は変化しないという報告もある[124]．フーリエ変換型赤外分光法を用いた検討では，オステオカルシン欠損マウスのハイドロキシアパタイト結晶は野生型と比較して小さく，未熟であることが明らかにされており，オステオカルシンがミネラルの成熟に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている．すなわち，Gla オステオカルシンは結晶配向性や結晶度などのハイドロキシアパタイトの結

晶化挙動を調節すること，すなわち骨質を改善させることによって骨折の力学的強度の回復に寄与する可能性がある．

この研究の限界点の一つは，ビタミン K 濃度を測定しなかったことがあげられる．動物はビタミン K_3 含有の食餌を摂取しているため，ビタミン K 濃度に個体差があった可能性がある．２つ目は，オステオカルシン以外のグラ化蛋白であるマトリックスグラ蛋白の検討を行っていないことがある．この蛋白も血管石灰化に関与することが報告されているため骨に対してなんらかの作用をもつ可能性があり，今後の研究課題である．

本章をまとめると，$PTH_{1\text{-}34}$ による骨治癒促進効果はワーファリンによるビタミン K 不全状態では減弱された．このことは低栄養やワーファリンなどの薬剤を服用している患者では $PTH_{1\text{-}34}$ による骨治癒促進効果が十分に得られないことを示唆している．逆にビタミン K が不足している高齢者などでは，ビタミン K_2 を $PTH_{1\text{-}34}$ に併用することにより，ハイドロキシアパタイトの成熟を促し，力学的強度の回復を促進させる可能性があることを示唆している．

総括および結論

- 我々は，関節リウマチモデルを用いた解析により，関節リウマチそのもの骨脆弱性のメカニズムを明らかにした.

- 骨代謝回転亢進による骨粗鬆症化や骨微細構造の劣化に加えて，関節炎によって誘発される骨質異常は皮質骨の石灰化度やコラーゲンの配向度の低下であり，それが RA の骨脆弱性の原因となっていることを明らかにした.

- 実臨床においてステロイド投与を受けている RA 患者には骨脆弱性があり，そのことは骨微細構造の劣化や骨代謝の変化による石灰化度の低下などの骨質劣化が原因となっていることを明らかにした.

- そのメカニズムの一つに骨細胞ネットワークの破綻によるスクレロスチンの産生低下があり，ステロイド薬慢性使用や身体活動性低下による骨形成の持続的な抑制が骨質異常の原因となっていることが示唆された.

- *Siglec-15*$^{-/-}$マウスは関節炎モデルにおいて傍関節領域の骨粗鬆症化は制御するが関節破壊そのものは制御しなかった.

- Siglec-15 の機能は type II collagen により活性化される FcRγシグナルと骨基質の両者の存在下では完全に代償されるため，関節炎に伴う関節内の骨病変には治療ターゲットとならないことが示唆された.

- 一方で，成長期のステロイド投与モデルを用いて，Siglec-15 が小児ステロイド骨粗鬆症の治療ターゲットとなり得る事を示した.

- *Siglec-15*$^{-/-}$マウスではステロイドによる成長障害を増強させず，皮質骨幅の減少と力学的特性の劣化を抑制した.

- 副甲状腺ホルモン製剤の間欠投与にはビタミン K の充足が必要であることが明らかとなった.

本研究結果は続発性骨粗鬆症の骨脆弱性のメカニズムを主に関節リウマチにターゲットを絞って検証し，新規治療の分子として Siglec-15 による関節炎と小児ステロイド性骨粗鬆における役割について検証し，また副甲状腺ホルモン製剤の骨治癒効果に必要である条件を明らかにしたものである．本研究をさらに発展させるためには，他の続発性骨粗鬆症においても同様の手法で減少しするとともに，Siglec-15 を様々な骨粗鬆症の新規治療のターゲットとしリガンドを明らかとし，本研究では解明しきれなかった Siglec-15 の機能を明らかとしていき臨床応用される事が望まれる．

謝辞

本論文は，筆者が北海道大学大学院医学研究科　医学専攻　機能再生医学講座　整形外科学分野博士課程在学中に行った研究をまとめたものです．本研究に関して終始ご指導ご鞭撻を頂きました整形外科学分野教授　岩崎倫政先生および同講師　高畑雅彦先生に心より感謝いたします．

本研究を行うにあたり，力学実験の実験機器の提供並びに実験に関するご助言を頂きました独立行政法人国立高等専門学校機構　函館工業高等専門学校　校長　但野茂先生，北海道大学大学院工学研究院　人間機械システムデザイン部門・バイオ・ロボティクス分野　東藤正浩准教授，山田悟史助教，組織作成および組織学的な病態の解釈にご助言・ご指導頂いた北海道大学大学院歯学研究科　硬組織発生生物学教室の網塚憲生教授，長谷川智香助教，山本知真也先生，骨質の材質特性の測定および解釈にご助言・ご指導頂いた千歳科学技術大学理工学部　応用化学生物学科　木村―須田廣美教授，伊藤哲平様に深い感謝の意を表します．

これまでの研究課程において数々のご指導を賜りました北海道大学医学部機能再生医学講座整形外科学分野の諸先生方および研究にご助力頂きました皆様に心よりの感謝を申し上げます．

引 用 文 献

1 Crotti, T. N. *et al.* The immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) -related factors are increased in synovial tissue and vasculature of rheumatoid arthritic joints. *Arthritis research & therapy* **14**, R245(2012).

2 Alias, E. *et al.* Polyethylene particles stimulate expression of ITAM-related molecules in peri-implant tissues and when stimulating osteoclastogenesis in vitro. *Acta biomaterialia* **8**, 3104-3112(2012).

3 van Lent, P. L. *et al.* Fcgamma receptors directly mediate cartilage, but not bone, destruction in murine antigen-induced arthritis: uncoupling of cartilage damage from bone erosion and joint inflammation. *Arthritis and rheumatism* **54**, 3868-3877 (2006).

4 Ochi, S. *et al.* Pathological role of osteoclast costimulation in arthritis-induced bone loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 11394-11399 (2007).

5 Joyce-Shaikh, B. *et al.* Myeloid DAP12-associating lectin (MDL)-1 regulates synovial inflammation and bone erosion associated with autoimmune arthritis. *The Journal of experimental medicine* **207**, 579-589 (2010).

6 Burnham, J. M. *et al.* Whole body BMC in pediatric Crohn disease: independent effects of altered growth, maturation, and body composition. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **19**, 1961-1968 (2004).

7 Burnham, J. M. *et al*. The dysfunctional muscle-bone unit in juvenile idiopathic arthritis. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* **6**, 351-352 (2006).

8 Leonard, M. B. *et al.* Long-term, high-dose glucocorticoids and bone mineral content in childhood glucocorticoid-sensitive nephrotic syndrome. *The New England journal of medicine* **351**, 868-875 (2004).

9 Olney, R. C. Mechanisms of impaired growth: effect of steroids on bone and cartilage. *Hormone research* **72 Suppl 1**, 30-35 (2009).

10 Kameda, Y. *et al.* Siglec-15 regulates osteoclast differentiation by modulating RANKL-induced phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Erk pathways in association with signaling Adaptor DAP12. *Journal of bone and mineral research* **28**, 2463-2475 (2013).

11 Andreassen, T. T., Ejersted, C. & Oxlund, H. Intermittent parathyroid hormone (1-34) treatment increases callus formation and mechanical strength of healing rat fractures. *Journal of bone and mineral research* **14**, 960-968 (1999).

12 Nakajima, Y., Ishida, M. & Mikami, K. Microtubules mediate germ-nuclear behavior after meiosis in conjugation of Paramecium caudatum. *The Journal of eukaryotic microbiology* **49**, 74-81 (2002).

13 Andreassen, T. T., Willick, G. E., Morley, P. & Whitfield, J. F. Treatment with parathyroid hormone hPTH(1-34), hPTH(1-31), and monocyclic hPTH(1-31) enhances fracture strength and callus amount after withdrawal fracture strength and callus mechanical quality continue to increase. *Calcified tissue international* **74**, 351-356 (2004).

14 Komatsubara, S. *et al.* Human parathyroid hormone (1-34) accelerates the fracture healing process of woven to lamellar bone replacement and new cortical shell formation in rat femora. *Bone* **36**, 678-687 (2005).

15 Nakazawa, T. *et al.* Effects of low-dose, intermittent treatment with recombinant human parathyroid hormone (1-34) on chondrogenesis in a model of experimental fracture healing. *Bone* **37**, 711-719 (2005).

16 Takahata, M.*et al*. Endogenous tissue engineering: PTH therapy for skeletal repair. *Cell and tissue research* **347**, 545-552(2012).

17 Alamanos, Y. & Drosos, A. A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmunity reviews* **4**, 130-136 (2005).

18 Vis, M. *et al.* High incidence of vertebral and non-vertebral fractures in the OSTRA cohort study: a 5-year follow-up study in postmenopausal women with rheumatoid arthritis. *Osteoporosis international* **22**, 2413-2419 (2011).

19 van Staa, T. P. *et al*. Clinical assessment of the long-term risk of fracture in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **54**, 3104-3112 (2006).

20 Lodder, M. C. *et al.* Bone mineral density in patients with rheumatoid arthritis: relation between disease severity and low bone mineral density. *Annals of the rheumatic diseases* **63**, 1576-1580 (2004).

21 Haugeberg, G., Orstavik, R. E. & Kvien, T. K. Effects of rheumatoid arthritis on bone. *Current opinion in rheumatology* **15**, 469-475 (2003).

22 Angeli, A. *et al.* High prevalence of asymptomatic vertebral fractures in post-menopausal women receiving chronic glucocorticoid therapy: a

cross-sectional outpatient study. *Bone* **39**, 253-259 (2006).

23 Seeman, E. Pathogenesis of bone fragility in women and men. *Lancet* **359**, 1841-1850 (2002).

24 Raisz, L. G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *The Journal of clinical investigation* **115**, 3318-3325 (2005).

25 Seeman, E. & Delmas, P. D. Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *The New England journal of medicine* **354**, 2250-2261 (2006).

26 Torres-del-Pliego, E., Vilaplana, L., Guerri-Fernandez, R. & Diez-Perez, A. Measuring bone quality. *Current rheumatology reports* **15**, 373 (2013).

27 Bessho, M. *et al.* Prediction of strength and strain of the proximal femur by a CT-based finite element method. *Journal of biomechanics* **40**, 1745-1753 (2007).

28 Bevill, G. & Keaveny, T. M. Trabecular bone strength predictions using finite element analysis of micro-scale images at limited spatial resolution. *Bone* **44**, 579-584 (2009).

29 Zhu, T. Y. *et al.* Structure and strength of the distal radius in female patients with rheumatoid arthritis: a case-control study. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **28**, 794-806 (2013).

30 Boskey, A. & Pleshko Camacho, N. FT-IR imaging of native and tissue-engineered bone and cartilage. *Biomaterials* **28**, 2465-2478 (2007).

31 Chappard, D., Basle, M. F., Legrand, E. & Audran, M. New laboratory tools in the assessment of bone quality. *Osteoporosis international* **22**, 2225-2240 (2011).

32 Giri, B. & Tadano, S. Nanostructural alteration in bone quantified in terms of orientation distribution of mineral crystals: a possible tool for fracture risk assessment. *Journal of biomechanical engineering* **133**, 124503 (2011).

33 Cox, G. *et al.* 3-dimensional imaging of collagen using second harmonic generation. *Journal of structural biology* **141**, 53-62 (2003).

34 Forlino, A., Cabral, W. A., Barnes, A. M. & Marini, J. C. New perspectives on osteogenesis imperfecta. *Nature reviews. Endocrinology* **7**, 540-557 (2011).

35 Caetano-Lopes, J. *et al.* Chronic arthritis directly induces quantitative and qualitative bone disturbances leading to compromised biomechanical properties. *Clinical and experimental rheumatology* **27**, 475-482 (2009).

36 Caetano-Lopes, J. *et al.* Chronic arthritis leads to disturbances in the bone collagen network. *Arthritis research & therapy* **12**, R9 (2010).

37 Takahata, M. *et al.* Mechanisms of bone fragility in a mouse model of glucocorticoid-treated rheumatoid arthritis: implications for insufficiency fracture risk. *Arthritis and rheumatism* **64**, 3649-3659 (2012).

38 Hashimoto, M. *et al.* Complement drives Th17 cell differentiation and triggers autoimmune arthritis. *The Journal of experimental medicine* **207**, 1135-1143 (2010).

39 Bouxsein, M. L. *et al.* Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of bone and mineral research* **25**, 1468-1486 (2010).

40 Keller, K. K. *et al.* Bone formation and resorption are both increased in experimental autoimmune arthritis. *PloS one* **7**, e53034 (2012).

41 Peel, N. F., Spittlehouse, A. J., Bax, D. E. & Eastell, R. Bone mineral density of the hand in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **37**, 983-991 (1994).

42 Bala, Y., Zebaze, R. & Seeman, E. Role of cortical bone in bone fragility. *Current opinion in rheumatology* **27**, 406-413 (2015).

43 Skedros, J. G., Sorenson, S. M., Takano, Y. & Turner, C. H. Dissociation of mineral and collagen orientations may differentially adapt compact bone for regional loading environments: results from acoustic velocity measurements in deer calcanei. *Bone* **39** (2006).

44 Reisinger, A. G., Pahr, D. H. & Zysset, P. K. Principal stiffness orientation and degree of anisotropy of human osteons based on nanoindentation in three distinct planes. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* **4**, 2113-2127 (2011).

45 Yamada, S., Tadano, S., Fujisaki, K. & Kodaki, Y. Influence of osteon area fraction and degree of orientation of HAp crystals on mechanical properties in bovine femur. *Journal of biomechanics* **46**, 31-35 (2013).

46 Arai, K. *et al.* Risk factors for vertebral fracture in menopausal or postmenopausal Japanese women with rheumatoid arthritis: a cross-sectional and longitudinal study. *Journal of bone and mineral metabolism* **24**, 118-124 (2006).

47 Furuya, T. *et al.* Risk factors associated with incident clinical vertebral and nonvertebral fractures in Japanese women with rheumatoid arthritis: a

prospective 54-month observational study. *The Journal of rheumatology* **34**, 303-310 (2007).

48 Furuya, T. *et al.* Risk factors associated with the occurrence of hip fracture in Japanese patients with rheumatoid arthritis: a prospective observational cohort study. *Osteoporosis international* **24**, 1257-1265 (2013).

49 Ochi, K. *et al.* Sites, frequencies, and causes of self-reported fractures in 9,720 rheumatoid arthritis patients: a large prospective observational cohort study in Japan. *Archives of osteoporosis* **8**, 130 (2013).

50 Omata, Y. *et al.* Vertebral fractures affect functional status in postmenopausal rheumatoid arthritis patients. *Journal of bone and mineral metabolism* **32** (2014).

51 Kanis, J. A. *et al.* The use of clinical risk factors enhances the performance of BMD in the prediction of hip and osteoporotic fractures in men and women. *Osteoporosis international* **18**, 1033-1046 (2007).

52 Inzana, J. A. *et al.* Bone fragility beyond strength and mineral density: Raman spectroscopy predicts femoral fracture toughness in a murine model of rheumatoid arthritis. *Journal of biomechanics* **46**, 723-730 (2013).

53 Oda, K. *et al.* A general method for rapid purification of soluble versions of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins expressed in insect cells: an application for human tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *Journal of biochemistry* **126**, 694-699 (1999).

54 Amizuka, N. *et al*. Vitamin D3 differentially regulates parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor expression in bone and cartilage. *The Journal of clinical investigation* **103**, 373-381 (1999).

55 Sasaki, M. *et al.* Altered distribution of bone matrix proteins and defective bone mineralization in klotho-deficient mice. *Bone* **57**, 206-219 (2013).

56 Amizuka, N. *et al.* Vitamin K2, a gamma-carboxylating factor of gla-proteins, normalizes the bone crystal nucleation impaired by Mg-insufficiency. *Histology and histopathology* **23**, 1353-1366 (2008).

57 Nampei, A. *et al.* Characteristics of fracture and related factors in patients with rheumatoid arthritis. *Modern rheumatology* **18**, 170-176 (2008).

58 Walsh, N. C., Crotti, T. N., Goldring, S. R. & Gravallese, E. M. Rheumatic diseases: the effects of inflammation on bone. *Immunological reviews* **208**, 228-251 (2005).

59 Schett, G. Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the

bone. *European journal of clinical investigation* **41**, 1361-1366 (2011).

60 Buckland, J. Bone balance restored by blocking Dickkopf-1 in a mouse model of inflammatory arthritis. *Nature reviews. Rheumatology* **6**, 673 (2010).

61 Weinstein, R. S., Jilka, R. L., Parfitt, A. M. & Manolagas, S. C. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *The Journal of clinical investigation* **102**, 274-282 (1998).

62 Plotkin, L. I. *et al.* Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *The Journal of clinical investigation* **104**, 1363-1374 (1999).

63 Grossman, J. M. *et al.* American College of Rheumatology 2010 recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Arthritis care & research* **62**, 1515-1526 (2010).

64 Watts, N. B., Ettinger, B. & LeBoff, M. S. FRAX facts. *Journal of bone and mineral research* **24**, 975-979 (2009).

65 FitzGerald, G. *et al.* Differing risk profiles for individual fracture sites: evidence from the Global Longitudinal Study of Osteoporosis in Women (GLOW). *Journal of bone and mineral research* **27**, 1907-1915 (2012).

66 Gough, A. K. *et al.* Generalised bone loss in patients with early rheumatoid arthritis. *Lancet* **344**, 23-27 (1994).

67 Hansen, M. *et al.* Bone loss in rheumatoid arthritis. Influence of disease activity, duration of the disease, functional capacity, and corticosteroid treatment. *Scandinavian journal of rheumatology* **25**, 367-376 (1996).

68 Alenfeld, F. E. *et al.* Detailed analyses of periarticular osteoporosis in rheumatoid arthritis. *Osteoporosis international* **11**, 400-407 (2000).

69 Cohen, S. B. *et al.* Denosumab treatment effects on structural damage, bone mineral density, and bone turnover in rheumatoid arthritis: a twelve-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II clinical trial. *Arthritis and rheumatism* **58**, 1299-1309 (2008).

70 Deodhar, A. *et al.* Denosumab-mediated increase in hand bone mineral density associated with decreased progression of bone erosion in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis care & research* **62**, 569-574 (2010).

71 Miller, P. D. *et al.* Effect of Denosumab on Bone Mineral Density and Biochemical Markers of Bone Turnover: Six-Year Results of a Phase 2

Clinical Trial. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **96**, 394-402 (2010).

72 Boyle, W. J., Simonet, W. S. & Lacey, D. L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423**, 337-342 (2003).

73 Kaifu, T. *et al.* Osteopetrosis and thalamic hypomyelinosis with synaptic degeneration in DAP12-deficient mice. *The Journal of clinical investigation* **111**, 323-332 (2003).

74 Humphrey, M. B. *et al.* The signaling adapter protein DAP12 regulates multinucleation during osteoclast development. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **19**, 224-234 (2004).

75 Koga, T. *et al.* Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* **428**, 758-763 (2004).

76 Mocsai, A. *et al.* The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor gamma-chain (FcRgamma) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 6158-6163 (2004).

77 Angata, T. *et al*. Discovery of Siglec-14, a novel sialic acid receptor undergoing concerted evolution with Siglec-5 in primates. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20**, 1964-1973 (2006).

78 Angata, T., Tabuchi, Y., Nakamura, K. & Nakamura, M. Siglec-15: an immune system Siglec conserved throughout vertebrate evolution. *Glycobiology* **17**, 838-846 (2007).

79 Wong, P. K. *et al.* Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis. *Arthritis and rheumatism* **54**, 158-168 (2006).

80 Dempster, D. W. *et al.* Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **28**, 2-17 (2013).

81 Hiruma, Y., Hirai, T. & Tsuda, E. Siglec-15, a member of the sialic acid-binding lectin, is a novel regulator for osteoclast differentiation.

Biochemical and biophysical research communications **409**, 424-429 (2011).

82 Kameda, Y. *et al.* Siglec-15 is a potential therapeutic target for postmenopausal osteoporosis. *Bone* **71**, 217-226 (2015).

83 Ferraccioli, G. *et al.* Interleukin-1beta and interleukin-6 in arthritis animal models: roles in the early phase of transition from acute to chronic inflammation and relevance for human rheumatoid arthritis. *Mol Med* **16**, 552-557 (2010).

84 Ohshima, S. *et al.* Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 8222-8226 (1998).

85 Lane, N. E. & Lukert, B. The science and therapy of glucocorticoid-induced bone loss. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* **27**, 465-483 (1998).

86 Van Staa, T. P. *et al*. Use of oral corticosteroids and risk of fractures. *Journal of bone and mineral research* **15**, 993-1000 (2000).

87 Recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. American College of Rheumatology Task Force on Osteoporosis Guidelines. *Arthritis and rheumatism* **39**, 1791-1801 (1996).

88 Weinstein, R. S. Clinical practice. Glucocorticoid-induced bone disease. *The New England journal of medicine* **365**, 62-70 (2011).

89 Buehring, B., Viswanathan, R., Binkley, N. & Busse, W. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update on effects and management. *The Journal of allergy and clinical immunology* **132**, 1019-1030 (2013).

90 Henneicke, H. *et al*. Glucocorticoids and bone: local effects and systemic implications. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **25**, 197-211 (2014).

91 Kim, H. J. *et al.* Glucocorticoids and the osteoclast. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1116**, 335-339 (2007).

92 Manolagas, S. C. Steroids and osteoporosis: the quest for mechanisms. *The Journal of clinical investigation* **123**, 1919-1921 (2013).

93 Yang, J. *et al.* Inhibition of farnesyl pyrophosphate synthase attenuates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis in vivo. *The international journal of biochemistry & cell biology* **45**, 657-666 (2013).

94 Marini, J. C. Bone: Use of bisphosphonates in children-proceed with caution. *Nature reviews. Endocrinology* **5**, 241-243 (2009).

95 Zhu, E. D. *et al*. B. Effect of bisphosphonates on the rapidly growing male murine skeleton. *Endocrinology* **155**, 1188-1196 (2014).

96 Whyte, M. P., Wenkert, D., Clements, K. L., McAlister, W. H. & Mumm, S. Bisphosphonate-induced osteopetrosis. *The New England journal of medicine* **349**, 457-463 (2003).

97 Stuible, M. *et al.* Mechanism and function of monoclonal antibodies targeting siglec-15 for therapeutic inhibition of osteoclastic bone resorption. *The Journal of biological chemistry* **289**, 6498-6512 (2014).

98 Aguirre, J. I. *et al.* Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *Journal of bone and mineral research* **21**, 605-615 (2006).

99 Weinstein, R. S. *et al*. C. Intermittent parathyroid hormone administration counteracts the adverse effects of glucocorticoids on osteoblast and osteocyte viability, bone formation, and strength in mice. *Endocrinology* **151**, 2641-2649 (2010).

100 Dai, W. *et al.* Prevention of glucocorticoid induced bone changes with beta-ecdysone. *Bone* **74**, 48-5 (2015).

101 Nelsestuen, G. L., Zytkovicz, T. H. & Howard, J. B. The mode of action of vitamin K. Identification of gamma-carboxyglutamic acid as a component of prothrombin. *The Journal of biological chemistry* **249**, 6347-6350 (1974).

102 Stenflo, J., Fernlund, P., Egan, W. & Roepstorff, P. Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**, 2730-2733 (1974).

103 Hauschka, P. V., Lian, J. B. & Gallop, P. M. Direct identification of the calcium-binding amino acid, gamma-carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**, 3925-3929 (1975).

104 Abrahams, M. J., Price, J., Whitlock, F. A. & Williams, G. The Brisbane floods, January 1974: their impact on health. *The Medical journal of Australia* **2**, 936-939 (1976).

105 Neer, R. M. *et al.* Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *The New England journal of medicine* **344**, 1434-1441 (2001).

106 Aiko, S. *et al.* Effects of an immuno-enhanced diet containing antioxidants in

esophageal cancer surgery following neoadjuvant therapy. *Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus / I.S.D.E* **25**, 137-145 (2012).

107 Iwamoto, J. *et al.* Vitamin K2 promotes bone healing in a rat femoral osteotomy model with or without glucocorticoid treatment. *Calcified tissue international* **86**, 234-241 (2010).

108 Tobita, K. *et al.* Effect of low-intensity pulsed ultrasound stimulation on callus remodelling in a gap-healing model: evaluation by bone morphometry using three-dimensional quantitative micro-CT. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* **93**, 525-530 (2011).

109 Alkhiary, Y. M. *et al.* Enhancement of experimental fracture-healing by systemic administration of recombinant human parathyroid hormone (PTH 1-34). *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **87**, 731-741 (2005).

110 Patel, N. N., Shah, P. R., Wilson, E. & Haray, P. N. An unexpected supraclavicular swelling. *World journal of surgical oncology* **5**, 90, (2007).

111 Iwamoto, J., Yeh, J. K. & Takeda, T. Effect of vitamin K2 on cortical and cancellous bones in orchidectomized and/or sciatic neurectomized rats. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **18**, 776-783 (2003).

112 Iwamoto, J. *et al.* Raloxifene and vitamin K2 combine to improve the femoral neck strength of ovariectomized rats. *Calcified tissue international* **77** (2005).

113 Malizos, K. N., Papachristos, A. A., Protopappas, V. C. & Fotiadis, D. I. Transosseous application of low-intensity ultrasound for the enhancement and monitoring of fracture healing process in a sheep osteotomy model. *Bone* **38**, 530-539 (2006).

114 Nyman, J. S. *et al.* Quantitative measures of femoral fracture repair in rats derived by micro-computed tomography. *Journal of biomechanics* **42**, 891-897 (2009).

115 Li, Y. F. *et al.* The effects of combined human parathyroid hormone (1-34) and zoledronic acid treatment on fracture healing in osteoporotic rats. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* **23**, 1463-1474 (2012).

116 Manabe, T. *et al.* Human parathyroid hormone (1-34) accelerates natural

fracture healing process in the femoral osteotomy model of cynomolgus monkeys. *Bone* **40** (2007).

117 Einhorn, T. A., Gundberg, C. M., Devlin, V. J. & Warman, J. Fracture healing and osteocalcin metabolism in vitamin K deficiency. *Clinical orthopaedics and related research*, 219-225 (1988).

118 Lindner, T. *et al.* The effect of anticoagulant pharmacotherapy on fracture healing. *Expert opinion on pharmacotherapy* **9**, 1169-1187 (2008).

119 Tsugawa, N. *et al.* Vitamin K status of healthy Japanese women: age-related vitamin K requirement for gamma-carboxylation of osteocalcin. *The American journal of clinical nutrition* **83**, 380-386 (2006).

120 Sokoll, L. J. *et al.* Changes in serum osteocalcin, plasma phylloquinone, and urinary gamma-carboxyglutamic acid in response to altered intakes of dietary phylloquinone in human subjects. *The American journal of clinical nutrition* **65**, 779-784 (1997).

121 Tabb, M. M. *et al.* Vitamin K2 regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR. *The Journal of biological chemistry* **278**, 43919-43927 (2003).

122 Boskey, A. L. *et al.* Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone* **23**, 187-196 (1998).

123 Roy, M. E. *et al.* Correlations between osteocalcin content, degree of mineralization, and mechanical properties of C. carpio rib bone. *Journal of biomedical materials research* **54**, 547-553 (2001).

124 Ducy, P. *et al.* Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* **382**, 448-452 (1996).