



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	びまん性特発性骨増殖症における応力遮断性骨粗鬆症に対する骨粗鬆症治療薬の効果に関する研究 [全文の要約]
Author(s)	濱野, 博基
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2308 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12567号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66084
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroki_Hamano_summary.pdf



学 位 論 文 （ 要 約 ）

びまん性特発性骨増殖症における応力遮断性骨粗鬆症に対する
骨粗鬆症治療薬の効果に関する研究

(Studies on the effects of antiosteoporosis agents on immobilization-associated osteoporosis in
diffuse idiopathic skeletal hyperostosis)

2017 年 3 月

北 海 道 大 学

濱野 博基

Hiroki Hamano

学 位 論 文 （ 要 約 ）

びまん性特発性骨増殖症における応力遮断性骨粗鬆症に対する
骨粗鬆症治療薬の効果に関する研究

(Studies on the effects of antiosteoporosis agents on immobilization-associated osteoporosis in
diffuse idiopathic skeletal hyperostosis)

2017 年 3 月

北 海 道 大 学

濱野 博基

Hiroki Hamano

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		8 頁
実験方法		10 頁
実験結果		14 頁
考察		19 頁
第二章		
緒言		21 頁
実験方法		23 頁
実験結果		25 頁
考察		27 頁
統括及び結論		30 頁
謝辞		32 頁
引用文献		33 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. Hamano H, Takahata M, Ota M, Hiratsuka S, Shimizu T, Kameda Y, Iwasaki N.

Teriparatide Improves Trabecular Osteoporosis but Simultaneously Promotes Ankylosis of the Spine in the Twy Mouse Model for Diffuse Idiopathic Skeletal Hyperostosis.

Calcif Tissue Int. 2016 Feb; 98(2):140-8

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. 濱野博基, 高畑雅彦, 太田昌博, 平塚重人, 清水智弘, 亀田裕亮, 岩崎倫政
脊椎骨増殖性病変に対するテリパラチドの影響
ー靱帯骨化自然発症モデルマウスを用いた検討ー
第 32 回日本骨代謝学会学術集会
平成 26 年 7 月 24 日-26 日
大阪国際会議場 (大阪)
2. 濱野博基, 高畑雅彦, 太田昌博, 平塚重人, 清水智弘, 亀田裕亮, 岩崎倫政
脊椎骨増殖性病変に対するテリパラチドの影響
ー靱帯骨化自然発症モデルマウスを用いた検討ー
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)
3. Hamano H, Takahata M, Ota M, Hiratsuka S, Shimizu T, Kameda Y, Iwasaki N.
Teriparatide improves trabecular osteoporosis but simultaneously promotes spinal ankylosing in the twy mice model for diffuse idiopathic skeletal hyperostosis
Orthopaedic Research Society 2015 Annual Meeting
March 28-31, 2015 MGM Grand Hotel, Las Vegas

4. 濱野博基，高畑雅彦，太田昌博，平塚重人，清水智弘，亀田裕亮，岩崎倫政
脊椎骨増殖性病変と骨粗鬆症を併存する疾患に対してテリパラチドはどのように作用するか
ーびまん性特発性骨増殖症モデルマウス（TWY/TWTY）を用いた検討ー
第44回日本脊椎脊髄病学会
平成27年4月16日-18日
福岡国際会議場（福岡）
5. 濱野博基，高畑雅彦，太田昌博，平塚重人，清水智弘，亀田裕亮，岩崎倫政
脊椎骨増殖性病変と骨粗鬆症を併存する疾患に対してテリパラチドはどのように作用するか
ーびまん性特発性骨増殖症モデルマウス（TWY/TWTY）を用いた検討ー
第35回日本骨形態計測学会
平成27年6月4日-6日
倉敷市芸文館（岡山）
6. 濱野博基，平塚重人，高畑雅彦，太田昌博，清水智弘，亀田裕亮，岩崎倫政
脊椎骨増殖性病変と骨粗鬆症を併存する病態に対するテリパラチドとゾレドロネーとの比較
ーびまん性特発性骨増殖症モデルマウス（TWY/TWTY）を用いた検討ー
第33回日本骨代謝学会
平成27年7月23日-25日
京王プラザホテル（東京）
7. 濱野博基，平塚重人，高畑雅彦，太田昌博，清水智弘，亀田裕亮，岩崎倫政
脊椎骨増殖性病変と骨粗鬆症を併存する病態に対するテリパラチドとゾレドロネーとの比較
ーびまん性特発性骨増殖症モデルマウス（TWY/TWTY）を用いた検討ー
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）

8. Hamano H, Takahata M, Ota M, Hiratsuka S, Shimizu T, Kameda Y, Iwasaki N.
Differential effects of teriparatide and zoledronate on trabecular osteoporosis of the spine
in the twy mouse model for diffuse idiopathic skeletal hyperostosis
Orthopaedic Research Society 2016 Annual Meeting
March 1-5, 2016
Disney's Coronado Springs Resort., Orlando

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 1280 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．骨粗鬆症患者の多くは閉経後の女性であるが，男性骨粗鬆症の原因の一つにびまん性特発性骨増殖症（DISH）による応力遮蔽性骨粗鬆症がある．

DISH は，主に脊椎や四肢の靱帯に異所性骨化を生じる骨増殖性疾患であり¹⁴，骨化進展により脊椎強直が進行すると，椎体内部には応力遮蔽性海綿骨骨粗鬆症が併発する⁵（図 1）．本邦における大規模横断研究によると，DISH の有病率は全体の 10%と高く，とくに 80 歳以上の男性では 40%もの患者が罹患する⁶．そして DISH 患者の骨折リスクは，非 DISH 患者と比較して高いことが知られている^{4,7,8}（図 2）．

応力遮蔽性骨粗鬆症に代表される不動性骨粗鬆症は，受傷後の固定や長期臥床，宇宙飛行などにより，骨形成と骨吸収の uncoupling（連動不全）を起こし，海綿骨骨吸収の増加と骨膜性骨形成の低下，

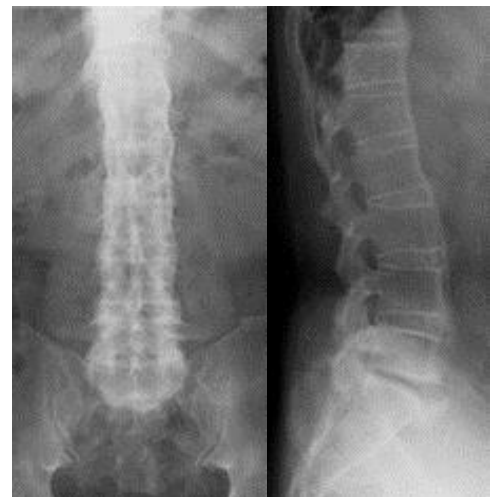


図 1. DISH 患者のレントゲン写真
靱帯の骨化による脊椎の強直があり，その内部は応力遮蔽性の骨粗鬆症を呈す

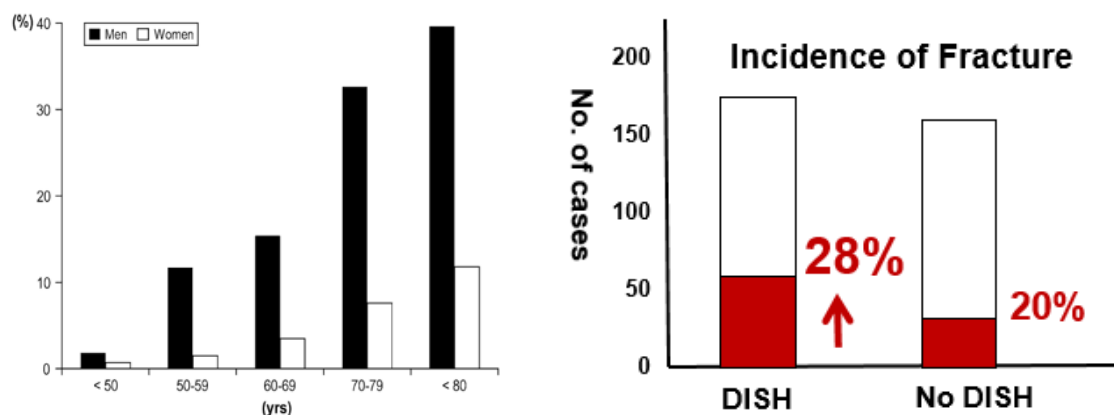


図 2. 本邦における DISH 発症頻度⁶と骨折リスク⁵

内皮質骨の骨吸収が増加して発症することはよく知られている^{9,10}。しかし、その発症メカニズムは、*wnt/β-catenin* 経路の抑制による骨形成低下¹¹⁻¹⁵、骨髓内圧の低下による血流不全¹⁶、*leptin* や *adiponectin* などによる交感神経系の活性化¹⁷⁻¹⁹、石灰化骨の微少損傷による骨細胞のアポトーシス²⁰ など諸説あるが、未だ不明な点が多い。

以上より DISH 患者の応力遮蔽性骨粗鬆症に対しては薬物治療の介入が妥当であるが、高齢男性における DISH 有病率とともに、それによる骨粗鬆症が認知されたのが比較的最近であることから、DISH 患者に対する骨代謝改善薬の治療効果や安全性に関する知見はほとんど蓄積されていない。とくに安全性に関しては、骨代謝改善薬が DISH の骨増殖性病変に対してどのような影響を及ぼすのかは重要な関心事である。そこで本研究では DISH モデルマウスを用いて、骨粗鬆症治療薬の安全性と有効性を検証した。

靱帯骨化石灰化自然発症モデルマウスとして *twy* (Tiptoe Walking Yoshimura)マウスがある。このマウスは、ICR 系マウスから近親交配を行っている過程で発見された常染色体劣性遺伝の自然発症遺伝子変異マウスである²¹。そのため、疾患モデル作成に投薬や外科的な処置が不要といった利点がある。*twy* マウスにおける異所性石灰化の原因は、*NPPS* (Nucleotide Pyrophosphatase)遺伝子の機能不全による生理的石灰化抑制分子ピロリン酸濃度の低下と考えられている²²。関節周辺の異所性靱帯骨化／石灰化によって四肢が硬直し、つま先立ち歩行を呈するのが特徴的である上に、週齢を重ねるにつれ脊椎靱帯が骨化し、脊柱強直とそれに伴う不動性・応力遮蔽性の骨粗鬆症が生じる(図3)。そのため、DISH や脊椎靱帯骨化症のモデルマウスとして、これまで様々な研究に用いられている²³⁻³⁰。



図3. *twy* マウスの頸椎および膝関節の micro-CT 矢状断像 (左図)

右図は健常な ICR マウスの写真 (いずれも自験例データ)

第一章では、*twy* マウスに強力な骨形成促進作用をもつ骨粗鬆症治療薬テリパラチドを投与し、DISHに伴う応力遮蔽性骨粗鬆症に対して治療効果を示すかどうかを調査した。同時に、有害作用として異所性骨化およびそれによる脊椎強直を助長させないかどうかを調査した。第二章では、代表的な骨吸収抑制剤であるビスフォスフォネートのうち、骨吸収抑制作用と石灰化抑制作用の強いゾレドロネートを投与し、DISHに伴う応力遮蔽性骨粗鬆症に対して治療効果を示すかどうかを調査した。また、第一章と同様に異所性骨化および脊椎強直に対する影響も調査した。最後にこれらのモデル動物を用いた研究結果を踏まえて、DISHによる応力遮蔽性骨粗鬆症に対し、2種類の主要な骨粗鬆症治療薬であるテリパラチドとビスフォスフォネートのどちらが適した治療薬なのかを考察した。

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.

BFR	Bone formation rate
BMD	Bone mineral density
BP	Bisphosphonate
BS	Bone surface
BV/TV	Bone volume/Total volume
Ctl	Control
Ct. Th	Cortical thickness
CTX	C-terminal telopeptide
DISH	Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis
dLS	Double labeled surface
EHDP	Etidronate
MAR	Mineral apposition rate
NPPS	Nucleotide Pyrophosphatase
PTH	Parathyroid hormone
PBS	Phosphate buffered saline
sLS	Single labeled surface
Tb. N	Trabecular number
Tb. Sp	Trabecular separation
Tb. Th	Trabecular thickness
TPD	Teriparatide
ZA	Zoledronic Acid

脊椎骨増殖性病変と骨粗鬆症を併存するびまん性特発性骨増殖症に対する
テリパラチドの治療効果と安全性
— 靱帯骨化石灰化症自然発症モデルマウス(twy/twy)を用いた検討 —

骨粗鬆症性椎体骨折の予防効果が最も高い薬剤の一つに、副甲状腺ホルモン(PTH)製剤テリパラチド (TPD) がある。TPD は PTH の活性部位である N 端側 34 個のアミノ酸を遺伝子組換え大腸菌あるいは化学合成で作製したタンパク製剤である (図 4)。PTH は本来血中カルシウムの主要な調節因子であり、骨基質に貯蔵されているカルシウムを動員する作用をもつため、副甲状腺機能亢進症による持続的な PTH 高値では骨量は減少し、二次性骨粗鬆症をきたす。しかし、1980 年 Reeve らが、PTH を間歇的に(毎日 1 回)投与すると、骨吸収の亢進に比べ、骨形成が優位に上昇し、骨同化作用を示すことを報告した³¹⁾。以降、骨形成促進作用をもつ骨粗鬆症治療薬として開発が進み、本邦では 2010 年より臨床使用が承認されている。

1-34:biological action

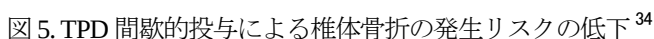
H₂N

1 34

Gly Ala Ser Cys Thr Glu Met Ile His Asn Glu Asp Lys Glu Lys Asp Lys Lys Glu Met Ser Asp Asn Glu Lys Lys Glu Lys Lys Glu Val His Asp Cys

COOH

TPD は N 末端側の 34 アミノ基から構成される



そこで我々は, TPD は DISH 患者の応力遮蔽性骨粗鬆症に対して有効であるものの, 同時に脊椎骨増殖性病変の進展を助長するという仮説を検証するために, DISH マウスモデルを用いて TPD による治療効果と安全性を調査した. その結果, TPD は応力遮蔽性の骨粗鬆症に対して骨同化作用を示すが, 脊椎強直や脊柱管内の靱帯骨化などの骨増殖性病変の進展を助長することが明らかになったので報告する.

実験方法

倫理規定

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。

研究デザイン (図6)

7週齢雄性 *twy* マウス 18匹と健常対照として同週齢の ICR マウス 18匹を用いた。6匹ずつ3群に分け、コントロール (Ctl) 群は PBS (Phosphate buffered saline) 200 μ l を1日3回, TPDx1 群は TPD (Forteo™, Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN, USA) 40 μ g/kg を1日1回と PBS 200 μ l を2回, TPDx3 群は TPD 40 μ g/kg を1日3回, それぞれ皮下投与した。

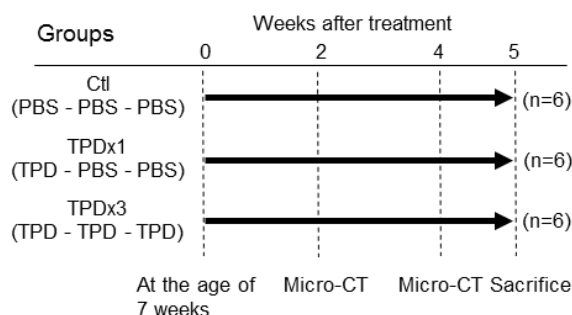


図6. 研究デザイン

投与群の設定は過去のマウスを用いた TPD 投与研究の用量, 用法を参考に決定した。多くの先行研究では TPD 1日1回マウスに投与されているが, 臨床使用されている1日1回の TPD 製剤の作用は, マウスでは1日2~3回に相当することから³⁵, 本研究では TPDx1 群に加えて TPDx3 群を設定した。

5週間投薬治療を行い, その間, 縦断的にマイクロ CT(micro-CT)を麻酔下に撮像した (0, 2, 4週および安楽死させた5週)。5週間後にマウスを安楽死させ, 頸椎, 腰椎および膝関節の検体を採取した。*twy* マウスは実験動物研究所より購入し自然交配を試みたが, 関節拘縮のため自然交配できず, 北海道大学大学院先端生命科学研究所へ人工授精を依頼し, 繁殖させた。

全身状態

投与開始時の7週齢から5週間 (12週齢) の体重と関節拘縮の推移を評価した。

micro-CT

頸椎, 右大腿骨, および第5腰椎を micro-CT (CT, R_mCT2; Rigaku, Tokyo, Japan)を用いて 1ピクセルあたり 10 μ m の解像度で撮像した。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。これは CT の横断面より関心領域をスライス毎に抽出, 合計し, 3次元的に評価するものである。測定関心

領域を、大腿骨に関しては遠位部成長軟骨の 300 μ m 近位から頭側方向へ 1000 μ m の範囲に設定した。脊椎に関しては、強直が最も顕著に進む頸椎の測定が理想的であるが、小さすぎて海綿骨と皮質骨を分離して微細構造を正確に解析することが困難であった。そのため、第 5 腰椎の頭尾側の成長軟骨の間の海綿骨領域を脊椎の海綿骨の計測領域に設定した。

アメリカ骨代謝学会のガイドラインに従った 3 次元的骨形態計測をラトック社の骨量解析ソフトを用いて行った³⁶。第 5 腰椎海綿骨の骨量 (BV/TV), 骨梁幅 (Tb.Th), 骨梁数 (Tb.N), 骨梁間隔 (Tb.Sp), および大腿骨遠位骨幹端の BV/TV, 骨密度 (BMD), 皮質骨幅 (Ct.Th)を計測した。

異所性石灰化巣の定量的変化に関しては、後環軸膜に存在する石灰化巣に照準をあわせ、同ソフトを用いて異所性石灰化巣の体積を測定し、経時的な評価を行った。頸椎強直の定性的評価は、Mata らの DISH スコアリングに準じて行った³⁷。これは各椎体間にある骨化巣を、0-4 点 (0=骨化なし, 1=架橋構造のない骨化巣, 2=不完全な架橋構造を有した骨化巣, 3=架橋構造を有した骨化巣, 4=重度の骨化巣) で加点していくものであり (図 7), 第 2-7 頸椎を対象に最大 20 点満点で評価した。

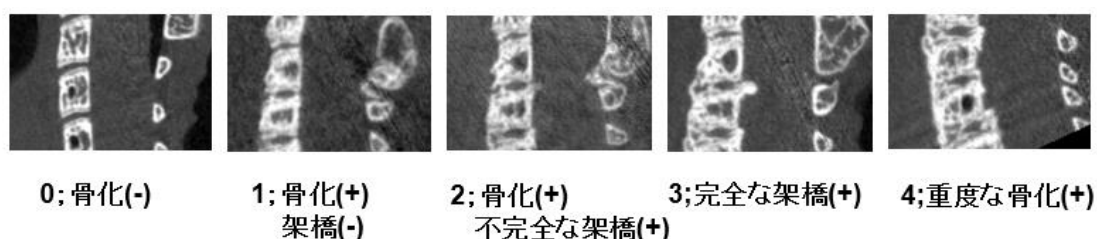


図 7. Mata による DISH のスコアリング。各椎体間の骨化巣の状態を 0-4 点で評価し、C2-7 の 5 椎間を合計する。図は自験例における twy マウス頸椎 CT 矢状断像。それぞれのスコアに該当する twy マウス頸椎 CT 矢状断像を例として提示した。

組織学的検討

安楽死後に頸椎および膝関節を採取し、可能な限り軟部組織を除去した。70%エタノールで固定し、冷暗所で保存した。70%エタノールは 24 時間毎に 3 日間新しいものに交換した。最後に 60%エタノールへと変更し、遮蔽して伊藤骨形態計測研究所 (新潟) へ送付し、非脱灰硬組織標本の作製を依頼した。Villaneuva 染色を行い、頸椎および膝関節の矢状断切片を光学顕微鏡および蛍光顕微鏡で観察した。骨形成を評価するために、屠殺する 3 日前にテトラサイクリンを、前日にカルセインを投与した。テトラサイクリンとカルセインはともに、骨の石灰化が起きている部位に沈着し、テトラサイクリンは黄色に、カルセインは緑に標識されることから、骨形成を定量的に測定

が可能となる。Image J を用いて骨形態計測を行い、計測指標として BV/TV, 骨面 (BS), 一重標識面 (sLS), 二重標識面 (dLS), 石灰化加速度 (MAR), 骨形成速度 (BFR) を計測した。どちらか一色のみで標識された部位が一重標識面, 二色で標識された部位が二重標識面である。骨石灰化速度は, テトラサイクリンとカルセインを皮下投与したインターバル(本実験では 2 日間)にどの程度骨石灰化が起きたかを算出したもので, 二重標識の幅をインターバル (2 日間) で除した値である。骨形成速度は 365 日間に起きる骨形成量を表す尺度で, $\text{骨形成速度} = (\text{二重標識面} + 1/2 \times \text{一重標識面}) \times \text{骨石灰化速度} \times 365$ によって算出される。これらの指標は, 骨面が多いと増加するため, 骨面で除して補正した値で比較する。

血清骨代謝マーカー

安楽死時に採取した静脈血を室温で 15 分静置した後, 遠心分離機で 4℃, 3000rp で 30 分遠心し, 血清のみを抽出した。骨形成マーカーであるオステオカルシン (Biomedical Technologies 社 Stoughton, MA, USA), 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) (Immunodiagnostic System Inc. 社 Scottsdale, AZ, USA) を Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) キットを用いて測定した。

<オステオカルシン測定プロトコール>

- ①マウス血清を sample buffer (キット内) で 10 倍に希釈
- ②microtiter plate を取り出す
- ③標準液を sample buffer で希釈し, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50ng/ml になるように調整
- ④プレートの各 well に sample buffer (Blank), 標準液, マウス血清を 25μl 注入し, osteocalcin antiserum をそれぞれ 100μl 添加し, 4℃, 24 時間でインキュベート
- ⑤well 内を吸引し, Wash buffer で 300μl/well ずつ, 5 回洗浄
- ⑥Streptavidin-Horseradish Peroxidase を 100μl/well 添加し, 室温, 30 分振盪
- ⑦TMB solution と Hydrogen Peroxide を 1:1 で混合し, 用意する。⑤のように再度 well 内を洗浄した後に, 速やかに混合液を 100μl/well 添加し, 室温, 暗室で 15 分インキュベート
- ⑧Stop solution を 100μl/well 添加し, 振盪。吸光度 450nm で測定。

<CTX 測定プロトコール>

- ①Biotinylated RatLaps Antigen を 100μl/well 加えて、シールを貼り, 室温, 30 分インキュベート
- ②Wash solution で 300μl/well, 5 回洗浄

- ③Primary antibody を 100 μ l/well 加え, 標準液 (0-6)とコントロール液, マウス血清を 20 μ l/well 添加し, 4 $^{\circ}$ C, オーバーナイトでインキュベート
- ④②と同様に Wash solution で 5 回洗浄
- ⑤Peroxidase conjugated Goat anti-Rabbit IgG Antibody を 100 μ l/well 添加し, 室温, 60 分インキュベート
- ⑥②と同様に Wash solution で洗浄
- ⑦Substrate solution を 100 μ l/well 添加し, 暗室, 室温, 15 分インキュベート
- ⑧Stop solution を 100 μ l/well 添加
- ⑨2 時間以内に吸光度 450nm で測定

統計分析

得られたデータは平均値 $\pm$ 標準偏差で示し, 3 群間の検定には One way analysis of variance と Turkey's multiple comparison 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.

実験結果

1. TPD の投与は twy マウスの関節拘縮を進行させ、体重減少を招く

twy マウスは6週齢より徐々に頸椎の強直と関節の拘縮が起こり、つま先立ち歩行が出現、活動量が低下した。twy マウスの Ctl 群では経時的に体重が増加したが、ICR（健常）マウスと比較すると体重増加はゆるやかであった。TPD を投与すると、twy マウスでは投与頻度依存性に体重が減少したのに対し、ICR マウスでは TPD を投与しても体重は増加した（図 8）。

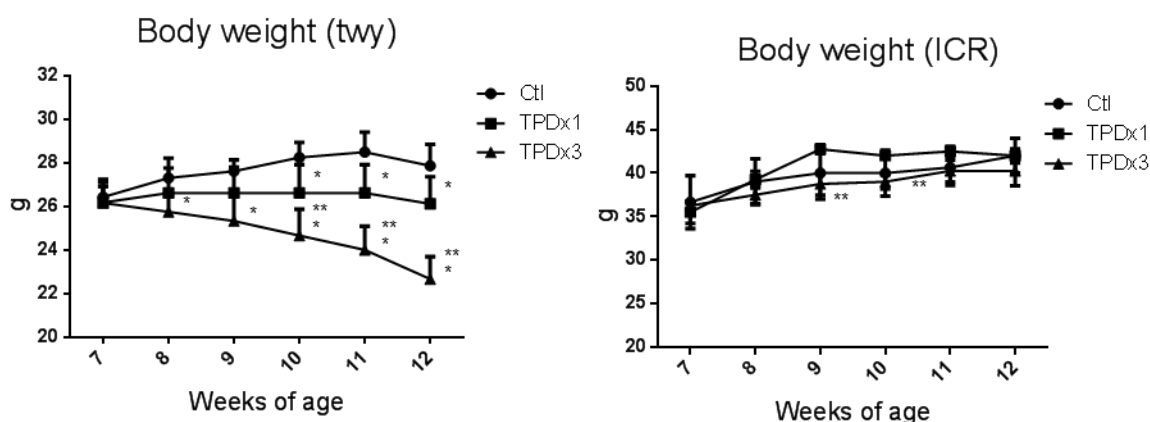


図 8. twy マウスと ICR マウスの経時的な体重の推移

2. TPD の投与は twy マウスの応力遮蔽性骨粗鬆症に対して治療効果を示す

同一個体における縦断的 micro-CT 解析の結果、twy マウスでは経時的に脊椎椎体内および大腿骨遠位骨幹端部の海綿骨骨粗鬆症化が進んだ。TPDx1 群では骨量増加は乏しいものの、TPDx3 群では著しく骨量が増加した（図 9 a, 図 10 a）。第 5 腰椎の海綿骨形態計測指標の結果、twy マウス Ctl 群では ICR マウスでみられるような BV/TV, Tb.Th, Tb.N の上昇や Tb.Sp の低下はみられず、成長に伴う骨形成が乏しかった。TPDx3 群は BV/TV, Tb.Th が著しく上昇したが、Tb.N や Tb.Sp は低下した（図 9 d-g）。TPDx3 群における Tb.N 低下は、骨梁幅と連結性が著明に上昇したためと考えられた。一方、TPDx1 群の計測値は穏やかに BV/TV が上昇した。大腿骨遠位骨幹端部でも同様に、TPDx3 群では著明に BV/TV, BMD や Ct.Th が増加したのに対し、TPDx1 群の計測値は Ctl 群と比較し、穏やかな増加傾向を示した（図 10 b-d）。血清の骨代謝マーカーも、有意差はないものの TPD の投与頻度依存性に骨形成マーカーのオステオカルシンが増加し、骨吸収マーカーの CTX が減少する傾向があった（図 11）。

第 6 頸椎椎体を用いた組織学的評価では、TPD の投与頻度依存性に椎体内の骨梁数

が増加していた(図 12 i-p). その骨梁変化の特徴として, TPDx1 群では幅が太く滑らかな, そして TPDx3 群では幅の細い骨梁が増加していた. 蛍光顕微鏡写真では, テトラサイクリンとカルセインの標識像が TPD の投与に応じて多数確認されたことから, TPD 投与による活発な骨形成が示唆された(図 12 q-t). 骨形態計測を行った結果, 投与頻度依存性に BV/TV, MAR, BS, sLS/BS, dLS/BS, BFR/BS が上昇していた(図 12 u-z).

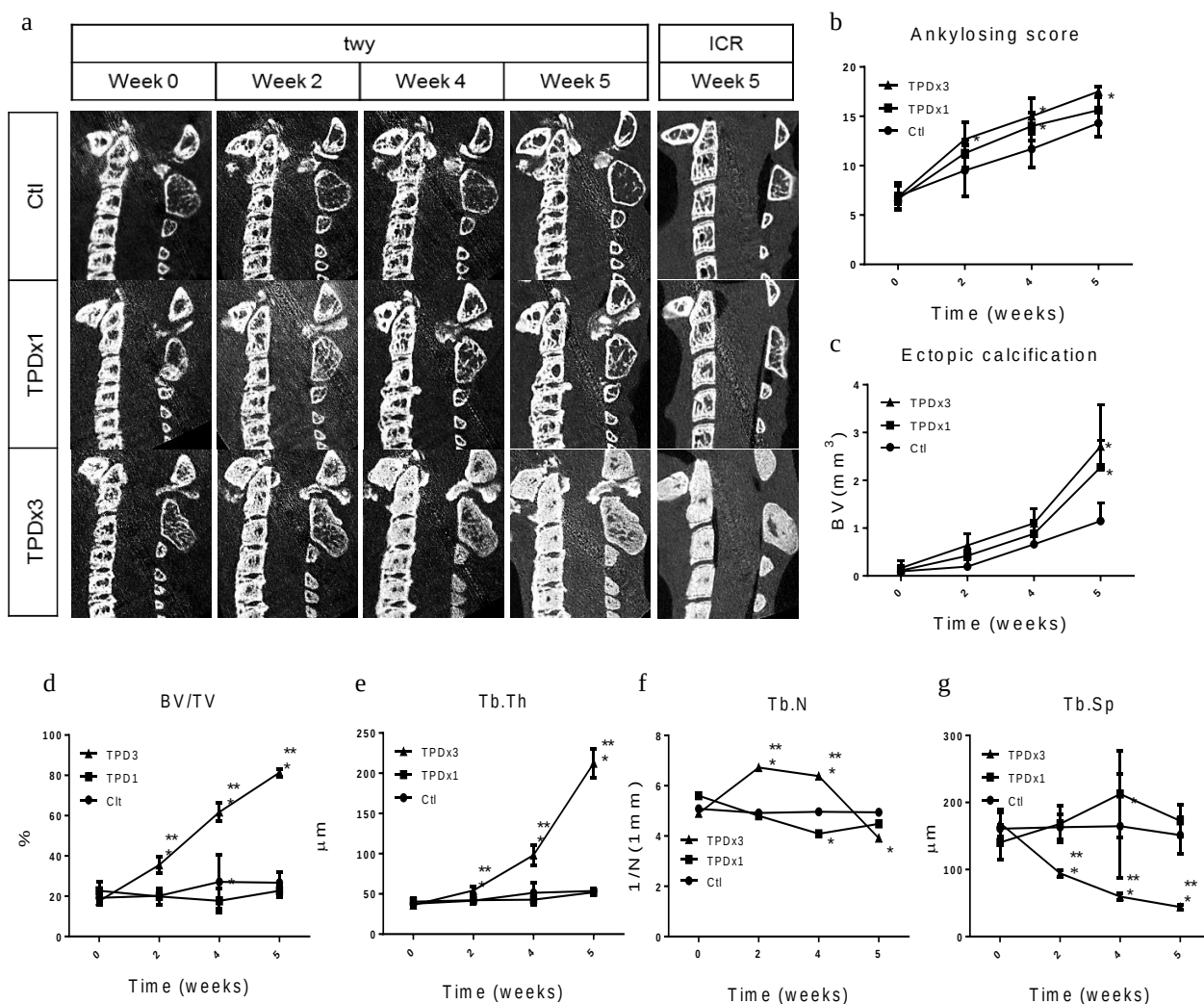


図 9. 縦断的頸椎 micro-CT 像を用いた TPD 投与による骨粗鬆症と骨増殖性病変の評価

平均値±標準偏差(* $p < 0.05$ vs Ctl, ** $p < 0.05$ vs TPDx1 by one-way ANOVA)

a. 同一個体における縦断的 micro-CT の頸椎矢状断像

b,c. Mata らに準じた頸椎強直スコア(b)と後環軸膜に存在する異所性石灰化巣の体積(c)は TPD の投与頻度依存性に増加している。

d-g. 第 5 腰椎椎体内の骨量(BV/TV), 骨梁幅(Tb.Th), 骨梁数(Tb.N), 骨梁間隔(Tb.Sp)を測定すると TPDx3 群は活発な骨形成促進反応を示すが, TPDx1 群の骨形成促進反応は穏やか。

3. TPD の投与は、twy マウスの脊椎骨増殖性病変（頸椎強直や異所性石灰化巣）の進行を助長する

twy マウスでは投与開始時（7 週齢）より後環軸膜および歯突起周辺に石灰化巣が存在し、経時的に増大した。また靱帯骨化による頸椎強直も進行した。これら脊椎骨増殖性病変は、TPD の投与によりさらに増悪した（図 9 a）。twy マウス頸椎強直の定性的評価を、Mata らのスコアリングに準じて行くと、TPD の投与頻度依存性に頸椎の強直が進行していた（図 9 b）。twy マウス前縦靱帯付着部の組織像は、不規則な骨化と軟骨様小細胞の浸潤があるが、炎症細胞の浸潤は確認されなかった。腹側の椎間板線維輪と前縦靱帯は異所性に骨化していた。TPD の投与により、異所性骨化による椎間の架橋が亢進しており、それは TPDx1 群と比較し TPDx3 群の方が顕著であった（図 12 e-h）。蛍光顕微鏡写真では、靱帯付着部の標識像は TPD の投与頻度依存性に増加していた（図 12 a-d）。

続いて、後環軸膜に発生する異所性石灰化巣の定量的評価を行った。twy マウスでは Ctl 群においても経時的に異所性石灰化巣は増大したが、TPD 群では投与頻度に応じて増大傾向が助長していた（図 9 c）。組織学的には異所性石灰化巣内に細胞は存在せず、蛍光顕微鏡写真でも標識像は確認されなかった。異所性石灰化巣の外周には線維芽細胞様または骨芽細胞様の小細胞が存在していた。

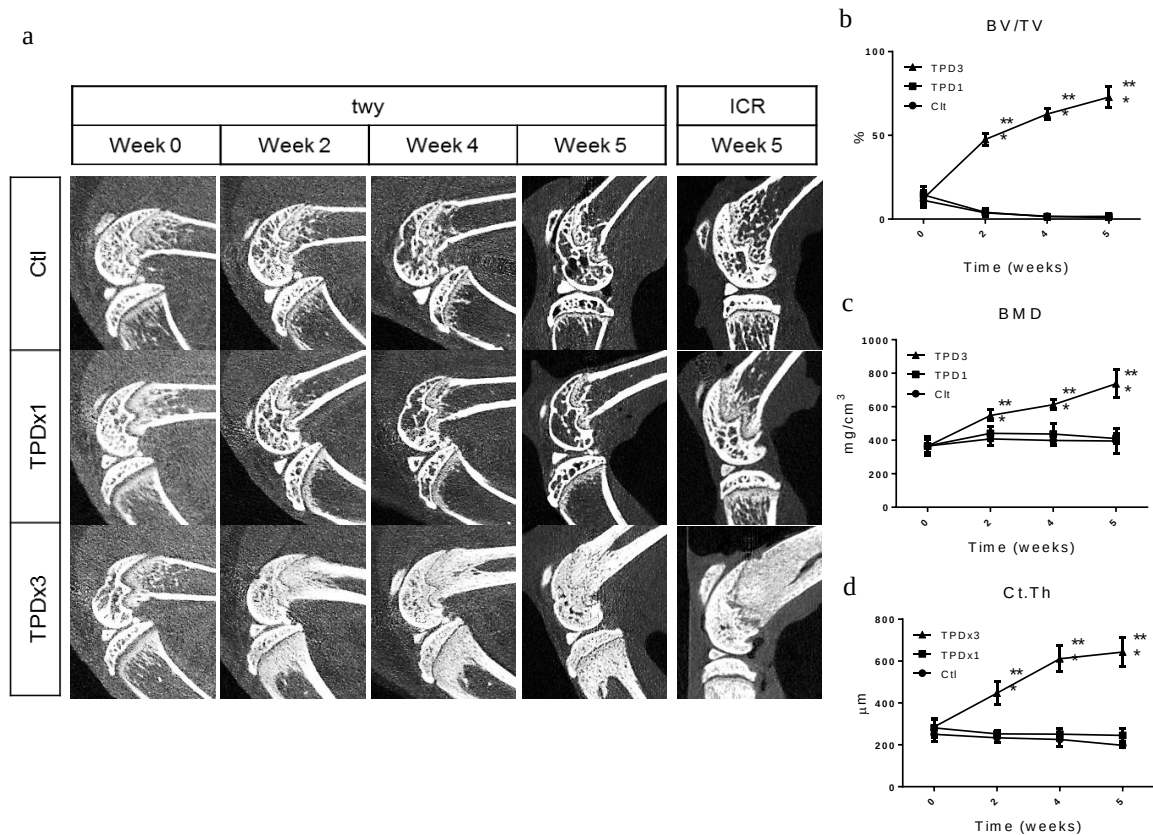


図 10. 縦断的膝関節 micro-CT 像を用いた TPD 投与による骨形成の評価

平均値±標準偏差 (* $p<0.05$ vs Ctl, ** $p<0.05$ vs TPDx1 by one-way ANOVA)

a. 同一個体における縦断的 micro-CT の膝関節矢状断像

b-d. 大腿骨遠位骨幹端の骨量(BV/TV), 骨密度(BMD), 皮質骨幅(Ct.Th)を計測すると, 腰椎の指標と同様に TPDx3 群で活発な骨形成促進反応を示すが, TPDx1 群では穏やか。

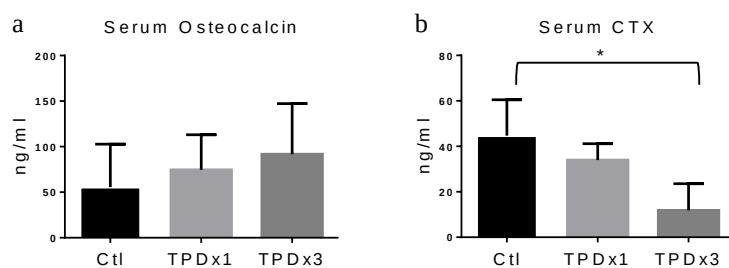


図 11. 投薬 5 週間後の血清骨代謝マーカー値. TPD の投与頻度依存性に骨形成マーカーであるオステオカルシン (a)は上昇し, 骨吸収マーカーである CTX (b)は減少した. (* $p<0.05$ vs Ctl by one-way ANOVA)

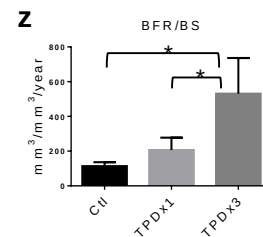
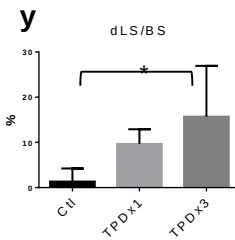
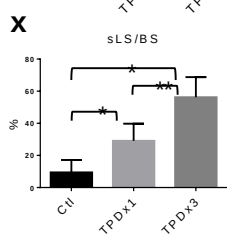
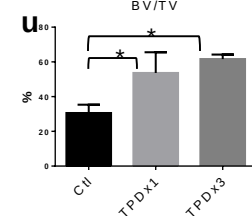
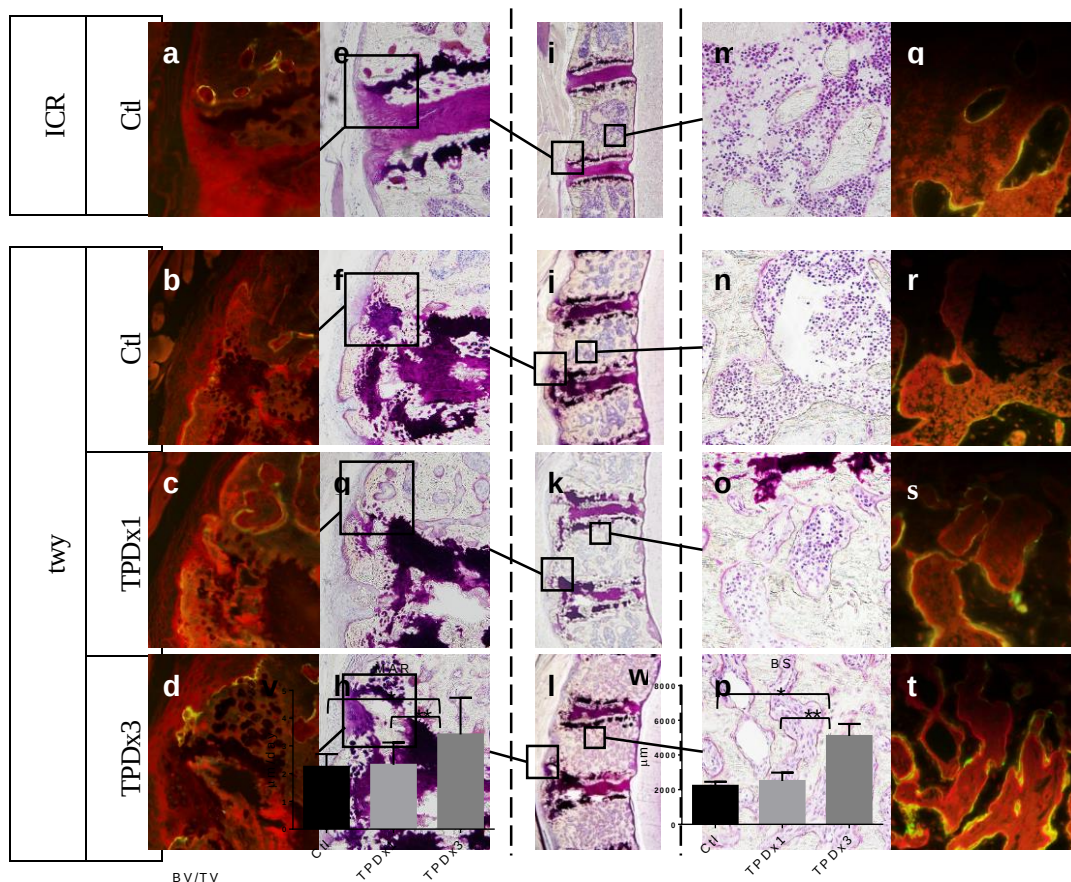


図 12. 第 6 頸椎の光学顕微鏡・蛍光顕微鏡写真と骨形態計測結果.

a-h. 靱帯付着部の強拡大写真. TPD の投与により, 椎体間架橋構造の形成促進. 靱帯付着部の軟骨様細胞の増加(e-h)や靱帯付着部の標識像の増加(a-d)がみられる.

i-i. 第 5-7 頸椎の弱拡大写真. TPD の投与依存性に骨梁数の増加がみられる.

m-t. 第 6 頸椎椎体の強拡大写真. TPDx1 は太く滑らかな骨梁, TPDx3 は多数の細い骨梁がみられ(m-p), 投与依存性に標識像の増加もみられている(r-t).

u-z. 骨量(BV/TV), 石灰化速度(MAR), 骨面(BS), 一重標識面(sLS/BS), 二重標識面(dLS/BS), 骨形成速度(BFR/BS)を計測すると, TPDx3 群の活発な骨形成促進反応が示される(平均値±標準偏差*p<0.05 vs Ctl, **p<0.05 vs TPDx1 by one-way ANOVA).

考 察

本研究は, DISH に併発する応力遮断性骨粗鬆症に対しても TPD が強力な骨形成促進作用を発揮することを示した. これは不動や応力遮断による全身性の骨形成低下を TPD が改善させた, 病態にマッチしたきわめて合目的な治療法といえる. 応力遮断性骨粗鬆症に対して TPD が有効に働くことは, 多数の他の動物モデルにおいても証明されている. Halloran らはラット後肢挙上モデルに対して TPD 80 μ g/kg を投与し, 海綿骨量が増加することを報告している³⁸. 酒井らは後肢の坐骨神経を切除した不動化マウスに対して TPD を 40 μ g/kg 投与し, 対照群と同等まで骨形成速度が増加したと報告している³⁹. Ma らは, ラットの後肢を弾性包帯で固定したモデルに対して PTH(1-38)を 30 μ g/kg および 80 μ g/kg 投与し, 不動状態の PTH の骨形成促進反応と荷重時での相乗効果を報告している⁴⁰. また田中らは尾部懸垂マウスモデルに対して TPD 40 μ g/kg を投与し, 骨同化作用が発現したことを報告している⁴¹.

しかしながら, 本研究結果によって得られたもっとも重要な知見は, 強力な骨形成促進作用をもつ TPD が twy マウスの異所性靱帯骨化を促進し, 脊椎強直の進行を助長させたという事実であり, DISH 患者においても同様の副次的作用が発現しうることを示唆している. DISH 患者に対する TPD 投与の影響については, 渉猟しうる範囲では症例報告が 2 編あるのみである. これらの報告では, DISH を有する椎体骨折患者に対し TPD を投与したところ, 疼痛の軽減と骨癒合の促進, また早期社会復帰が可能であったことから, TPD 投与は骨折の治療に有効であると結論されている^{42,43}. しかしながら, これらの報告は骨折治癒に焦点がしぼられたものであり, 全身的な骨化傾向や強直への影響を評価したものではない. もし, 脊椎の強直や脊柱管内の骨化巢

がさらに増悪した場合、一部の患者では脊椎可動域制限や嚥下障害、気道障害、脊髄障害などのリスクが増す可能性がある。すなわち、TPD がすべての DISH 患者に推奨される治療かどうか、不利益なく骨粗鬆症治療効果のみを発揮するかどうかについては、まだ十分な知見が蓄積されていない。したがって、現時点では DISH 患者に対する TPD の投与は慎重にすべきと考えられる。これは DISH 患者のみならず、一般的な原発性骨粗鬆症患者においても、異所性骨化巣などの骨増殖性病変を有していた場合、TPD 投与によってそれらをさらに増大させてしまうことが示唆されるが、OVX 動物モデルの実験を含めてその報告はない。

twy マウスの骨増殖性病変に全身性骨代謝改善薬が作用することは、TPD 以外の薬剤では報告がある。Okawa らは twy マウスに calcitonin を投与すると、週齢に関わらず骨膜性骨形成が抑制されたことから、後縦靱帯骨化症に対する治療法の一つとなりうると報告している²⁷。第一世代のビスフォスフォネート製剤であるエチドロネート (EHDP) を twy マウスに投与し、異所性石灰化巣が抑制されたとする報告もあるが^{30,44}、Hirakawa らは EHDP により椎間板の変性と後縦靱帯が肥厚したため、石灰化が完成される前段階では EHDP の投与は軟骨過形成を招くと報告している²⁴。

本研究の問題点は、まずマウスに用いた TPD の投与量が、必ずしも実臨床でヒトに用いられている投与量に一致していないことが挙げられる。げっ歯類に対しては、TPD 40-200 μ g/kg/day の用量が主に使われているが、これはヒトの投与量の 100-500 倍に相当する。Bellido らは TPD をマウスに 3-300 μ g/kg と幅をもたせて 1 か月間投与し、脊椎や四肢の BMD 上昇に少なくとも 30 μ g/kg の投与量が必要であり、in vitro の実験では、TPD の 4 回/日投与により破骨細胞が 50% アポトーシスへと導かれることを報告している⁴⁵。これは、ヒトとげっ歯類では体格や寿命、薬剤動態が異なるためと考えられている。現在、臨床において 1 日 1 回 20 μ g もしくは 1 週間に 1 回 56.5 μ g の TPD の投与がヒトに対し用いられているが、最近の研究では、骨代謝や薬物動態を考えると、ヒトに対する 1 日 1 回の TPD 投与は、ラットでは 1 日 3 回に相当することが報告されている^{35,46}。以上の理由から、我々は上述の TPD の用量、用法を設定した。DISH 患者に対する TPD 投与の効果については、ヒトと薬物動態のより近い大動物を用いた研究が理想的であるが、DISH モデル動物は大動物ではなく行うことができない。

その他の問題点として、DISH という疾患が主に 50 歳以上で発症する疾患であるのに対し、今回用いたマウスが 7 週齢と若齢であることが挙げられる。我々が若齢マウスを用いた理由は、twy マウスは 12 週齢以降、脊髄麻痺によって徐々に衰弱し死

亡する例があったためである．なおこの脊髄麻痺は，脊椎靱帯骨化や後環軸膜に発生する異所性石灰化巣による圧迫性脊髄症が原因であることがわかっている．

DISH モデルマウスとされる *twy* マウスに TPD を投与し，応力遮蔽性骨粗鬆症や骨増殖性病変に対する効果を調査した．TPD は *twy* マウスに生じる応力遮蔽性骨粗鬆症に対して治療効果を示すものの，脊椎強直や靱帯骨化など骨増殖性病変の進展を助長した．このことから，DISH 患者への TPD 投与は慎重にすべきと考えられた．

第 二 章

脊椎骨増殖性病変と骨粗鬆症を併存するびまん性特発性骨増殖症に対する ゾレンドロネートの治療効果と安全性 —靱帯骨化石灰化症自然発症モデルマウス(twy/twy)を用いた検討—

緒 言

骨吸収抑制剤であるビスフォスフォネート（BP）製剤は、骨粗鬆症治療の第一選択薬として広く用いられており、破骨細胞の機能を抑制することで効果を発揮する。BP 製剤の分子構造は、ピロリン酸の酸素原子の代わりに炭素原子と、2 つの C-P 結合を特徴としており、炭素原子に付加する 2 つの側鎖を変えたり、リン酸化をエステル化したりすることによって、種々の類似物質が得られている。その機序は、骨に取り込まれた BP が破骨細胞による骨吸収の際、酸性環境下で波状縁から特徴的に破骨細胞に取り込まれることによって、破骨細胞をアポトーシスへと誘導することが主である。第二・三世代の窒素含有 BP では、メバロン酸代謝経路におけるファルネシルピロリン酸（FPP）合成酵素を阻害、small G protein の活性化を阻害し、これらのタンパク質の細胞膜への結合が阻害されて破骨細胞機能が抑制される。

第三世代の BP 製剤であるゾレンドロネート（ZA）は、BP 製剤の中でも FPP 合成酵素阻害活性が最も高く⁴⁷、最も強力な破骨細胞の骨吸収抑制作用をもつ。骨粗鬆症に対する効果は、HORIZON-PET-study で確認されており、閉経後骨粗鬆症女性 7,736 例に対し、ZA5mg を 1 年毎に投与すると、3 年間で椎体骨折のリスクを 70%、大腿骨骨折のリスクを 41%低下せたと報告されている（図 13）⁴⁸。さらに同試験では、骨密度も腰椎で 6.71%、大腿骨で 6.02%の改善がみられている。

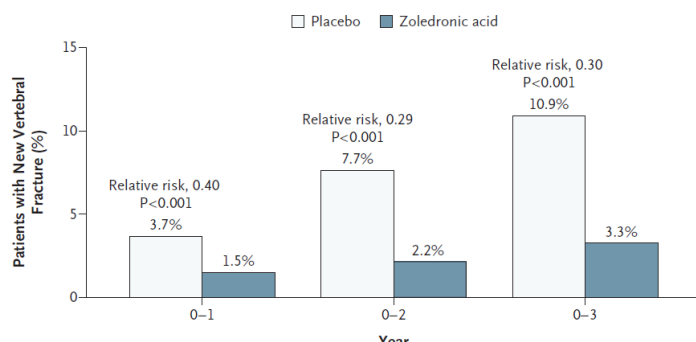


図 13. ZA 投与による椎体骨折リスクの低下

第一章では、骨形成促進剤であるテリパラチド (TPD)が、DISH 患者の応力遮蔽性骨粗鬆症に対して骨形成促進作用を示すが、同時に脊椎の強直や靱帯骨化などの骨増殖性病変の進展を助長することを明らかにした。脊椎の強直が進むと、脊柱可動域低下による転倒リスクの増加、脊椎の柔軟性低下による軽微な外傷での骨折リスク増加へとつながる可能性がある。さらに、脊椎靱帯付着部の骨化が進むと、嚥下障害や気道障害、脊髄麻痺を招きかねない。一方、ZA は骨吸収を強力に抑制し治療効果を発揮するため、異所性骨化を助長するリスクを回避しながら骨粗鬆症を治療できる可能性がある。さらに BP 製剤は硬水軟化剤として機能し、軟組織の石灰化阻害作用を有するため⁴⁹、異所性骨化を抑制できる可能性もある。

本章では、DISH に併発する応力遮蔽性骨粗鬆症に対して、ZA は異所性骨化の進展を抑制しつつ、海綿骨骨量を増加させるという仮説を立てた。この仮説を検証するために、ZA による骨粗鬆症治療効果を確認するとともに、異所性靱帯骨化に対する作用に関し twy マウスモデルを用いて検討した。その結果、ZA は、異所性骨化抑制作用は示さなかったが、骨増殖病変の進展を助長させることなく、応力遮蔽性骨粗鬆症を改善することを明らかにしたので報告する。

実験方法

倫理規定

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。

研究デザイン

7 週齢雄性 twy マウス 10 匹を用いた。5 匹ずつ 2 群に分け、コントロール (Ctl) 群は PBS 200 μ l を 1 回、ZA 群は ZA (Zoledronate, Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland) 100 μ g/kg を 1 回それぞれ治療開始時 (7 週齢時) に一度だけ皮下投与し、以降、マイクロ CT (micro-CT) を 0, 2, 4 週に縦断的に撮像した。ZA 投与量は実臨床ではヒト骨粗鬆症に対し 5mg/year で投与されているが、それはヒト体重を 50-70 kg で換算すると 70-100 μ g/kg に相当する。Llyod らは 2 週間の尾部懸垂モデルマウスに対し、骨吸収抑制作用を示す ZA の最少量は 45 μ g/kg とし⁵⁰、Pozzi らは ZA の骨吸収抑制作用はマウスに対して 500 μ g/kg 以上で天井効果があることを示した⁵¹。また、ZA の骨吸収抑制効果は 100 μ g/kg/week とした概念実証研究もあり^{52,53}、我々は上述の投与量を選択した。投薬の 4 週間後にマウスを安楽死させ、頸椎、腰椎および膝関節の検体を採取した。twy マウスは実験動物研究所より購入し、北海道大学大学院先端生命科学研究所へ人工授精を依頼し、繁殖させた。

全身状態

投与開始時の 7 週齢から 4 週間 (11 週齢) の体重と関節拘縮の推移を評価した。

micro-CT

第一章と同様に、頸椎、右大腿骨、および第 5 腰椎を micro-CT を用いて撮影した。骨微細構造の解析は TRI/3D-BON を用いて行い、第 5 腰椎椎体内 (頭側の終板から尾側の終板まで) の骨量 (BV/TV), 骨梁幅 (Tb.Th), 骨梁数 (Tb.N), 骨梁間隔 (Tb.Sp), および大腿骨遠位骨幹端 (骨端線の 300 μ m 近位より 1000 μ m の領域) の BV/TV, 骨密度 (BMD), 皮質骨幅 (Ct.Th) を計測した。

後環軸膜に存在する石灰化巣に照準をあわせ異所性石灰化巣の定量的変化を測定し、Mata らの DISH スコアリングに準じて第 2-7 頸椎を対象に頸椎強直の定性的評価を行った³⁷。

組織学的検討

第一章と同様に、安楽死後に頸椎および膝関節を採取し、固定した後、Villaneuva染色を行い、硬組織標本の矢状断切片を光学顕微鏡および蛍光顕微鏡で観察した。骨形成を評価するために、安楽死させる3日前にテトラサイクリンを、前日にカルセインを投与して骨石灰化前線を標識した。Image Jを用いて骨形態計測を行い、計測指標としてBV/TV、骨面 (BS)、一重標識面 (sLS)、二重標識面 (dLS)、石灰化加速度 (MAR)、骨形成速度 (BFR)を計測した。

統計分析

得られたデータは平均値±標準偏差で示し、2群間の検定には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。

実験結果

1. ZA の投与は twy マウスの全身状態に影響を与えない

第一章では TPD の投与頻度依存性に脊椎の強直や関節拘縮が亢進し、それらと相関して体重減少と活動量の低下がみられた。一方、ZA 群では体重減少や活動量の低下はみられなかった (図 14)。

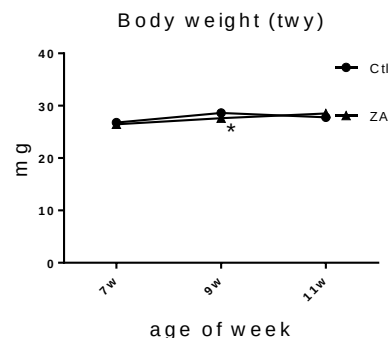


図 14. 体重の推移

2. ZA の投与は、twy マウスの応力遮蔽性骨粗鬆症に対して治療効果を示す

同一個体における縦断的 micro-CT 再構築画像による観察では、Ctl 群の頸椎椎体内および大腿骨遠位骨幹端の骨粗鬆症化が進んだが、ZA 群では頸椎椎体内および大腿骨遠位骨幹端の骨量増加がみられた。

第 5 腰椎の micro-CT データを用いた 3 次元的海綿骨形態計測の結果では、twy マウスの Ctl 群では BV/TV の増加がなく、相対的な骨粗鬆症を認め、一方で ZA 群は海綿骨骨粗鬆症に対し治療効果を示していた。

大腿骨遠位骨幹端の micro-CT データでも同様に Ctl 群では BV/TV が経時的に低下し、骨粗鬆症が進行性に起こるのに対し、ZA 群では腰椎のみならず大腿骨遠位骨幹端の不動性骨粗鬆症においても治療効果を示すことがわかった。しかし、皮質骨に対しては ZA の 4 週間の投与では有意な影響を与えなかった。

第 6 頸椎椎体を用いた組織学的観察では、ZA 群は Ctl 群と比較して椎体内に幅の太い骨梁が増加しており、骨形態計測でも BV/TV が増加していた。一方で、蛍光顕微鏡所見では ZA 群の標識像は Ctl 群と比較し少なかった。

3. ZA の投与は、脊椎骨増殖性病変を増悪させることはない

同一個体における縦断的 micro-CT 再構築画像による観察では、後環軸膜および歯突起周辺の石灰化巣や靱帯骨化による脊椎強直に関して、ZA 群と Ctl 群の間に明らかな差はなかった。頸椎強直および後環軸膜に存在する異所性石灰化巣の定量的評価では、ZA の投与は骨増殖性病変の進行を抑制することもなかったが、促進もしないことが確認された。

考察

第二章では、ZA が DISH による応力遮蔽性骨粗鬆症に対し、異所性骨化の進展を抑制しつつ、海綿骨骨量を増加させることを期待したが、*twy* マウスの異所性石灰化や脊椎強直の進展を抑制するには至らなかった。一方、TPD 投与でみられたような体重減少や麻痺の進行といった副次的作用を助長することなく、応力遮蔽性骨粗鬆症に対して治療効果を示したことから、ZA は DISH 患者の骨粗鬆症治療に適した性能をもつ薬剤と考えられた。

不動性骨粗鬆症は早期の段階から骨吸収の亢進と破骨細胞面の上昇が起こり、これに引き続いて骨形成低下が起こることにより、短期間で著明な骨量低下を生じる。ZA は骨代謝回転を制御し、破骨細胞を骨表面から離し、アポトーシスへと導くことで骨吸収抑制作用を発揮するため⁵⁴、このような骨代謝の *uncoupling* が起こっている不動性骨粗鬆症に対する使用は理に適っている。本研究においても、ZA は海綿骨量や骨梁数を増加させたが、これはストレス遮断による骨吸収優位な骨代謝状態を骨形成優位な状態に変化させることに加えて、通常の状態であれば破骨細胞によってハウシッ窩で占拠されてしまう骨表面を、ミネラル化を進める骨表面へと変化させたり、あるいは骨芽細胞や骨細胞のアポトーシスを直接抑制させたりしている可能性が考えられる^{55,56}。一方、ZA は靱帯骨化や異所性骨化を助長したり、脊椎強直の進行を促進させたりすることはなかった。その理由として考えられるのは、靱帯付着部のミネラル化はモデリング過程であり、不動による海綿骨の骨量低下は、破骨細胞によって引き起こされるリモデリング過程が中心であるといった違いがある。異所性骨化病変では、破骨細胞の数が少なく、活動性が低いため、大きな作用を及ぼさないのかもしれない⁵⁷。

応力遮蔽に代表される不動性骨粗鬆症に対し、BP 製剤が有効とする報告はこれまでも動物モデルにおいて散見される。尾部懸垂モデルは広く用いられている不動性骨粗鬆モデルである^{50,58-61}。Lloyd らは、2 週間の尾部懸垂を行ったマウスモデルに対して ZA を投与すると、骨梁微細構造や大腿骨の力学的特性が温存され、骨膜の骨吸収が抑制されることを報告している⁵⁰。Kodama らはラット尾部懸垂モデルにパミドロネートを投与すると、海綿骨の BMD は大きく増加するが、皮質骨には有意な変化が生じなかったと報告しており⁵⁹、BP 製剤の皮質骨に対する効果はほとんどなかったという我々の研究結果と一致していた。Barou らはラット下肢非荷重モデルにおいて、高用量のチルドロネート投与が 80% の骨量低下を十分に改善させ⁵⁸、Bikle らは骨量だけではなく、骨梁数や骨梁幅も改善させたことを報告している⁶¹。その他、下

肢関節固定モデル⁶²や坐骨神経麻痺モデル⁶³⁻⁶⁵においても、BP 製剤は海綿骨の骨代謝回転を制御することで、海綿骨の骨量や骨強度を保つことが示されている。

動物モデルのみならず、ヒトにおいても脊髄損傷患者や入院患者を対象とした不動性骨粗鬆症に対し、BP 製剤を投与した臨床的検討が報告されている。Gilchrist らは急性脊髄損傷患者を対象とした二重プラセボ対象試験により、アレンドロネート

(70mg/週)の投与が骨吸収を抑制し、全身および大腿骨近位部の骨密度低下の予防に有効であったことを報告した⁶⁶。さらに Heaney らは、閉経後骨粗鬆症患者を対象とした Phase III 治験において、重篤有害事象が認められた入院患者と非入院対照患者を用いた後ろ向き試験を行い、プラセボ投与群において入院群が非入院群と比較し、有意な骨密度低下を認めたのに対し、リセドロネート (5mg/日) 投与群では、入院群と非入院群の骨密度に有意差が認められなかったことを報告している⁶⁷。このように BP 製剤は不動性骨粗鬆症に対して有効性が確立されている薬剤と考えられる。

第一世代の BP 製剤であるエチドロネート (EHDP) は、脊髄損傷後および股関節形成後の異所性骨化の予防あるいは治療薬として、骨粗鬆症治療薬としてよりも早期から臨床使用が承認されている薬剤である。DISH の骨増殖性病変に対し、EHDP の明確な有効性を示した報告は過去にないが、Fulton らは、DISH 患者に対する EHDP の投与が患者の腰痛を軽減させたと報告している⁶⁸。この報告より、EHDP が骨増殖性病変に対しても何らかの効果を示す可能性が示唆される。Tanno らは twy マウスに EHDP を投与し、EHDP は脊椎靱帯付着部や椎間板辺縁部に感受性が高く、石灰化を抑制したとし、中橋も同様の報告をしている^{44,30}。さらに、Yamamoto らは靱帯骨化を促進させる我々とは別の動物モデル (Zucker fatty rats) において、EHDP の投与が靱帯骨化の進行を抑制したことを報告している⁶⁹。これらに対し、Hirakawa らは twy マウスに対し EHDP を投与すると、椎間板の変性や後縦靱帯の肥厚を招き、コントロール群と比較すると COL- I 陽性の軟骨様細胞が増殖するため、石灰化が完成される前段階の EHDP 投与は、逆に靱帯付着部の軟骨性過形成を促進させるのではないかと報告している²⁴。本研究では ZA による明らかな骨増殖性病変の進行抑制効果は確認できなかったが、ZA は石灰化表面に沈着し石灰化・骨化を抑制する効果があるため、投与時期、投与量次第では骨増殖性病変の進行を抑制させる可能性があるかもしれない。

本研究の問題点のひとつに、DISH に罹患する患者の多くが高齢者であるにもかかわらず、実験に用いたマウス週齢が 7 週齢と若いことがある。設定を 7 週齢とした理由は、第一章において twy マウスは異所性石灰化巣あるいは靱帯骨化巣による脊髄損傷により、12 週齢あたりから死亡例が出始めたことがある。さらにマウスは 4 足歩行

であるため、荷重状態がヒトとは異なり、それと共に ZA の効果も異なってくる可能性がある。また、ZA の薬物動態も両者では異なり、ヒトの骨粗鬆症に対しては 1 年に 1 回の ZA 投与が適応であるが、本研究ではマウスに対して 1 か月 1 回の投与をしていることも幾分か薬物効果の違いを生み出している可能性がある。DISH 患者に対する薬物投与の効果については、ヒトと薬物動態のより近い大動物を用いた研究が理想的であるが、DISH モデル動物はマウスのみであり、大動物では行うことができない。

DISH モデルマウスである *twy* マウスに対し ZA を投与し、応力遮蔽性骨粗鬆症および骨増殖性病変に対する効果を調査した。ZA は応力遮蔽性骨粗鬆症に対して治療効果を示し、骨増殖性病変に対しては、TPD 投与が骨増殖性病変の進行を助長させたのに対し、ZA は骨増殖性病変の進行を抑制できなかったが、促進もさせなかった。以上により、DISH のように骨増殖性病変を伴う骨粗鬆症患者に対する骨粗鬆症薬は、TPD よりも ZA が適しているのではないかと我々は考えている。

総括および結論

- 脊椎骨増殖性病変と骨粗鬆症を併存する DISH に対する TPD 投与の治療効果と安全性に関して、twy マウスを用いて調査した.
- 脊椎強直による応力遮蔽性骨粗鬆症に対し、TPD は骨形成促進作用を示した.
- 一方、TPD は脊椎の強直や異所性石灰化巣の進展を助長した.
- DISH のような脊椎骨増殖性病変を併存する骨粗鬆症に対する TPD の投与は、慎重にすべきである.
- DISH の脊椎骨増殖性病変と骨粗鬆症に対する効果を、twy マウスに ZA を投与し、調査した.
- 脊椎強直による応力遮蔽性骨粗鬆症に対し、ZA は TPD ほどではないが骨量を増加させた.
- 脊椎骨増殖性病変に対しては、ZA は脊椎の強直や異所性石灰化巣の進展を抑制できなかったが、助長もさせなかった.
- 脊椎骨増殖性病変を併存する骨粗鬆症に対する骨粗鬆症治療薬の選択は、脊椎骨増殖性病変の進展を助長させないという観点から、ZA の方が好ましいと思われる.

DISH は脊椎骨増殖性病変と骨粗鬆症を併存し、その罹患率は 80 歳代で 40%と稀でなく、男性骨粗鬆症の原因として重要な位置を占める. しかし、現状として DISH の骨粗鬆症治療に関する知見はほとんどない. 本研究では DISH モデルマウスである twy マウスに対し、骨形成促進剤である TPD を投与すると、骨粗鬆症は改善されたが、脊椎骨増殖性病変の進展を助長した. DISH 患者の脊椎強直や脊柱管内の骨化巣がさらに進展すると、嚥下障害や気道障害、脊髄麻痺、転倒や骨折などのリスクが上昇する可能性が考えられる. 以上のように本研究にもたらされた結果は、DISH のような骨増殖性病変を有す患者に対し、TPD の投与は慎重にすべきとする新しい知見である.

一方で *twy* マウスに骨吸収抑制剤である ZA を投与すると、骨増殖性病変の進展を助長させることなく、骨粗鬆症を改善させた。骨粗鬆症に対する効果は TPD よりも劣る可能性があるが、脊椎骨増殖性病変の進展を助長させないという安全性を考えると、DISH 患者に対する骨粗鬆症治療薬は TPD よりも ZA の方が好ましいという、これも新しい知見である。

本研究をさらに発展させるために、ヒトの脊椎骨増殖性病変に対し、骨粗鬆症治療薬を投与した症例を集積し、解析を行い、実臨床へ適応していくことが望まれる。また、投与時期、投与法、用量によっては、TPD が骨増殖性病変の進展を助長させることなく骨粗鬆症に作用したり、ZA が骨増殖性病変を抑制させつつ骨粗鬆症を改善させたりする可能性も考えられるため、さらなる検討が必要である。

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、マウスの人工授精による繁殖を引き受けていただきました北海道大学大学院先端生命科学研究所幸田敏明教授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 Belanger, T. A. & Rowe, D. E. Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis: musculoskeletal manifestations. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* **9**, 258-267 (2001).
- 2 Mazieres, B. Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (Forestier-Rotes-Querol disease): what's new? *Joint Bone Spine* **80**, 466-470 (2013).
- 3 Forestier, J. & Rotes-Querol, J. Senile ankylosing hyperostosis of the spine. *Ann. Rheum. Dis.* **9**, 321-330 (1950).
- 4 Resnick, D., Shaul, S. R. & Robins, J. M. Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH): Forestier's disease with extraspinal manifestations. *Radiology* **115**, 513-524 (1975).
- 5 Diederichs, G. *et al.* Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH): relation to vertebral fractures and bone density. *Osteoporosis Int.* **22**, 1789-1797 (2011).
- 6 Kagotani, R. *et al.* Prevalence of diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH) of the whole spine and its association with lumbar spondylosis and knee osteoarthritis: the ROAD study. *J. Bone Miner. Metab.* **33**, 221-229 (2015).
- 7 Hannallah, D., White, A. P., Goldberg, G. & Albert, T. J. Diffuse Idiopathic Skeletal Hyperostosis. *Oper. Tech. Orthop.* **17**, 174-177 (2007).
- 8 Westerveld, L. A., Verlaan, J. J. & Oner, F. C. Spinal fractures in patients with ankylosing spinal disorders: a systematic review of the literature on treatment, neurological status and complications. *Eur. Spine. J.* **18**, 145-156 (2009).
- 9 Smith, S. M. *et al.* Bone markers, calcium metabolism, and calcium kinetics during extended-duration space flight on the mir space station. *J. Bone Miner. Res.* **20**, 208-218 (2005).
- 10 LeBlanc, A. D., Spector, E. R., Evans, H. J. & Sibonga, J. D. Skeletal responses to space flight and the bed rest analog: a review. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **7**, 33-47 (2007).
- 11 Spatz, J. M. *et al.* The Wnt Inhibitor Sclerostin Is Up-regulated by Mechanical Unloading in Osteocytes in Vitro. *J. Biol. Chem.* **290**, 16744-16758 (2015).
- 12 Gaudio, A. *et al.* Increased sclerostin serum levels associated with bone formation and resorption markers in patients with immobilization-induced bone loss. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95**, 2248-2253 (2010).
- 13 Frings-Meuthen, P. *et al.* Sclerostin and DKK1 levels during 14 and 21 days of bed rest in healthy young men. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **13**, 45-52 (2013).

- 14 Moustafa, A. *et al.* Mechanical loading-related changes in osteocyte sclerostin expression in mice are more closely associated with the subsequent osteogenic response than the peak strains engendered. *Osteoporosis Int.* **23**, 1225-1234 (2012).
- 15 Lin, C. *et al.* Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/beta-catenin signaling. *J. Bone Miner. Res.* **24**, 1651-1661 (2009).
- 16 Stevens, H. Y., Meays, D. R. & Frangos, J. A. Pressure gradients and transport in the murine femur upon hindlimb suspension. *Bone* **39**, 565-572 (2006).
- 17 Wang, Y. H. *et al.* Fasting serum levels of adiponectin, ghrelin, and leptin in men with spinal cord injury. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* **86**, 1964-1968 (2005).
- 18 Martin, A. *et al.* Opposite effects of leptin on bone metabolism: a dose-dependent balance related to energy intake and insulin-like growth factor-I pathway. *Endocrinology* **148**, 3419-3425 (2007).
- 19 Zayzafoon, M., Gathings, W. E. & McDonald, J. M. Modeled microgravity inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and increases adipogenesis. *Endocrinology* **145**, 2421-2432 (2004).
- 20 Aguirre, J. I. *et al.* Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J. Bone Miner. Res.* **21**, 605-615 (2006).
- 21 Hosoda, Y., Yoshimura, Y. & Higaki, S. A new breed of mouse showing multiple osteochondral lesions--twy mouse. *Ryumachi. [Rheumatism]* **21 Suppl**, 157-164 (1981).
- 22 Meyer, J. L. Can biological calcification occur in the presence of pyrophosphate? *Arch. Biochem. Biophys.* **231**, 1-8 (1984).
- 23 Furuya, S., Ohtsuki, T., Yabe, Y. & Hosoda, Y. Ultrastructural study on calcification of cartilage: comparing ICR and twy mice. *J. Bone Miner. Metab.* **18**, 140-147 (2000).
- 24 Hirakawa, H. *et al.* An immunohistochemical evaluation of extracellular matrix components in the spinal posterior longitudinal ligament and intervertebral disc of the tiptoe walking mouse. *J. Orthop. Sci.* **9**, 591-597 (2004).
- 25 Kobayashi, Y., Goto, S., Tanno, T., Yamazaki, M. & Moriya, H. Regional variations in the progression of bone loss in two different mouse osteopenia models. *Calcif. Tissue Int.* **62**, 426-436 (1998).
- 26 Koshizuka, Y., Ikegawa, S., Sano, M., Nakamura, K. & Nakamura, Y. Isolation of novel mouse genes associated with ectopic ossification by differential display method using ttw, a mouse model for ectopic ossification. *Cytogenet. Cell Genet.* **94**, 163-168 (2001).
- 27 Okawa, A., Goto, S. & Moriya, H. Calcitonin simultaneously regulates both periosteal hyperostosis and trabecular osteopenia in the spinal hyperostotic mouse (twy/twy) in

- vivo. *Calcif. Tissue Int.* **64**, 239-247 (1999).
- 28 Uchida, K. *et al.* Apoptosis of neurons and oligodendrocytes in the spinal cord of spinal hyperostotic mouse (twy/twy): possible pathomechanism of human cervical compressive myelopathy. *Eur. Spine J.* **21**, 490-497 (2012).
 - 29 Uchida, K. *et al.* Initiation and progression of ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine in the hereditary spinal hyperostotic mouse (twy/twy). *Eur. Spine J.* **21**, 149-155 (2012).
 - 30 中橋, 謙. TWY マウスの脊柱靱帯骨化に関する実験的研究. *金沢大学十全医学会雑誌* **103**, 959-971 (1994).
 - 31 Reeve, J. *et al.* Anabolic effect of low doses of a fragment of human parathyroid hormone on the skeleton in postmenopausal osteoporosis. *Lancet* **1**, 1035-1038 (1976).
 - 32 Jiang, Y. *et al.* Recombinant human parathyroid hormone (1-34) [teriparatide] improves both cortical and cancellous bone structure. *J. Bone Miner. Res.* **18**, 1932-1941 (2003).
 - 33 Marcus, R., Wang, O., Satterwhite, J. & Mitlak, B. The skeletal response to teriparatide is largely independent of age, initial bone mineral density, and prevalent vertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* **18**, 18-23 (2003).
 - 34 Neer, R. M. *et al.* Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1434-1441 (2001).
 - 35 Yamamoto, T. *et al.* Frequency of Teriparatide Administration Affects the Histological Pattern of Bone Formation in Young Adult Male Mice. *Endocrinology* **157**, 2604-2620 (2016).
 - 36 Bouxsein, M. L. *et al.* Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J. Bone Miner. Res.* **25**, 1468-1486 (2010).
 - 37 Mata, S., Chhem, R. K., Fortin, P. R., Joseph, L. & Esdaile, J. M. Comprehensive radiographic evaluation of diffuse idiopathic skeletal hyperostosis: development and interrater reliability of a scoring system. *Semin. Arthritis Rheum.* **28**, 88-96 (1998).
 - 38 Halloran, B. P. *et al.* Regional responsiveness of the tibia to intermittent administration of parathyroid hormone as affected by skeletal unloading. *J. Bone Miner. Res.* **12** (1997).
 - 39 Sakai, A. *et al.* Intermittent administration of human parathyroid Hormone(1-34) prevents immobilization-related bone loss by regulating bone marrow capacity for bone cells in ddY mice. *J. Bone Miner. Res.* **14**, 1691-1699 (1999).
 - 40 Ma, Y. *et al.* Parathyroid hormone and mechanical usage have a synergistic effect in rat

- tibial diaphyseal cortical bone. *J. Bone Miner. Res.* **14**, 439-448 (1999).
- 41 Tanaka, S. *et al.* Skeletal unloading alleviates the anabolic action of intermittent PTH(1-34) in mouse tibia in association with inhibition of PTH-induced increase in c-fos mRNA in bone marrow cells. *J. Bone Miner. Res.* **19**, 1813-1820 (2004).
- 42 Iida, Y. *et al.* Successful Treatment of Spine Fracture for Diffuse Idiopathic Skeletal Hyperostosis with Teriparatide—A Report of Two Cases. *Open J. Orthop.* **03**, 278-282 (2013).
- 43 Matsumoto, T., Ando, M. & Sasaki, S. Effective treatment of delayed union of a lumbar vertebral fracture with daily administration of teriparatide in a patient with diffuse idiopathic skeletal hyperostosis. *Eur. Spine J.* **24 Suppl 4**, S573-576 (2015).
- 44 Tanno, T. [Experimental study on the spinal lesions in hyperostotic mouse (twy/twy): special reference to the pathogenesis of the ossification of the spinal ligaments and to the action of ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP)]. *Nihon Seikeigeka Gakkai zasshi* **66**, 1073-1083 (1992).
- 45 Bellido, T. *et al.* Proteasomal degradation of Runx2 shortens parathyroid hormone-induced anti-apoptotic signaling in osteoblasts. A putative explanation for why intermittent administration is needed for bone anabolism. *J. Biol. Chem.* **278**, 50259-50272 (2003).
- 46 Dobnig, H. & Turner, R. T. The effects of programmed administration of human parathyroid hormone fragment (1-34) on bone histomorphometry and serum chemistry in rats. *Endocrinology* **138**, 4607-4612 (1997).
- 47 Dunford, J. E. *et al.* Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **296**, 235-242 (2001).
- 48 Black, D. M. *et al.* Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* **356**, 1809-1822 (2007).
- 49 Fleisch, H. A., Russell, R. G., Bisaz, S., Muhlbauer, R. C. & Williams, D. A. The inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo. *Eur. J. Clin. Invest.* **1**, 12-18 (1970).
- 50 Lloyd, S. A., Travis, N. D., Lu, T. & Bateman, T. A. Development of a low-dose anti-resorptive drug regimen reveals synergistic suppression of bone formation when coupled with disuse. *J. Appl. Physiol.* **104**, 729-738 (2008).
- 51 Pozzi, S. *et al.* High-dose zoledronic acid impacts bone remodeling with effects on osteoblastic lineage and bone mechanical properties. *Clin. Cancer Res.* **15**, 5829-5839 (2009).

- 52 Yamashita, J., Koi, K., Yang, D. Y. & McCauley, L. K. Effect of zoledronate on oral wound healing in rats. *Clin. Cancer Res.* **17**, 1405-1414 (2011).
- 53 Croucher, P. I. *et al.* Zoledronic acid treatment of 5T2MM-bearing mice inhibits the development of myeloma bone disease: evidence for decreased osteolysis, tumor burden and angiogenesis, and increased survival. *J. Bone Miner. Res.* **18**, 482-492 (2003).
- 54 Kuroshima, S., Go, V. A. & Yamashita, J. Increased numbers of nonattached osteoclasts after long-term zoledronic acid therapy in mice. *Endocrinology* **153**, 17-28 (2012).
- 55 Plotkin, L. I. *et al.* Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J. Clin. Invest.* **104**, 1363-1374 (1999).
- 56 Bellido, T. & Plotkin, L. I. Novel actions of bisphosphonates in bone: preservation of osteoblast and osteocyte viability. *Bone* **49**, 50-55 (2011).
- 57 Tatara, A. M. *et al.* The role of muscle loading on bone (Re)modeling at the developing enthesis. *Plos One* **9**, e97375 (2014).
- 58 Barou, O. *et al.* Bisphosphonate effects in rat unloaded hindlimb bone loss model: three-dimensional microcomputed tomographic, histomorphometric, and densitometric analyses. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **291**, 321-328 (1999).
- 59 Kodama, Y. *et al.* Inhibition of bone resorption by pamidronate cannot restore normal gain in cortical bone mass and strength in tail-suspended rapidly growing rats. *J. Bone Miner. Res.* **12**, 1058-1067 (1997).
- 60 Siu, W. S. *et al.* Effect of anti-osteoporotic agents on the prevention of bone loss in unloaded bone. *Mol. Med. Rep.* **8**, 1188-1194 (2013).
- 61 Bikle, D. D. *et al.* Alendronate increases skeletal mass of growing rats during unloading by inhibiting resorption of calcified cartilage. *J. Bone Miner. Res.* **9**, 1777-1787 (1994).
- 62 Mosekilde, L., Thomsen, J. S., Mackey, M. S. & Phipps, R. J. Treatment with risedronate or alendronate prevents hind-limb immobilization-induced loss of bone density and strength in adult female rats. *Bone* **27**, 639-645 (2000).
- 63 Iwamoto, J., Seki, A., Takeda, T., Sato, Y. & Yamada, H. Effects of risedronate on femoral bone mineral density and bone strength in sciatic neurectomized young rats. *J. Bone Miner. Res.* **23**, 456-462 (2005).
- 64 Tarvainen, R. *et al.* Clodronate prevents immobilization osteopenia in rats. *Acta Orthop. Scand.* **65**, 643-646 (1994).
- 65 Murakami, H. *et al.* Effects of tiludronate on bone mass, structure, and turnover at the epiphyseal, primary, and secondary spongiosa in the proximal tibia of growing rats after sciatic neurectomy. *J. Bone Miner. Res.* **9**, 1355-1364 (1994).

- 66 Gilchrist, N. L. *et al.* Alendronate prevents bone loss in patients with acute spinal cord injury: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 1385-1390 (2007).
- 67 Heaney, R. P., Valent, D. J. & Barton, I. P. Hospitalization-related bone loss and the protective effect of risedronate. *Osteoporosis Int.* **17**, 212-216 (2006).
- 68 Fulton, J. D. Analgesic use of etidronate in Forrestier's disease. *Lancet* **340**, 1287 (1992).
- 69 Yamamoto, K., Imakiire, A., Shishido, T. & Masaoka, T. Effects of ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate on ossification of the posterior longitudinal ligament in Zucker fatty rats. *J. Orthop. Surg.* **12**, 45-54 (2004).