



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Histochemical assessment of interradicular and interalveolar septa following a single anti-RANKL antibody injection in mice [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	吉田, 理志
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第16443号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94912
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takashi_Yoshida_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学）氏名 吉 田 理 志

学位論文題名

Histochemical assessment of interradicular and interalveolar septa following a single anti-RANKL antibody injection in mice

（抗 RANKL 中和抗体単回投与後のマウス根間中隔及び槽間中隔における組織化学的検索）

キーワード（5つ）抗 RANKL 中和抗体, 破骨細胞, 歯槽骨, 骨芽細胞, 組織化学

骨粗鬆症治療薬である抗 RANKL 中和抗体製剤は、破骨細胞分化に重要な RANK/RANKL シグナルを抑制することで、破骨細胞分化・形成と、それに続く骨吸収を抑制し骨量を増加させる。また、骨では、破骨細胞と骨芽細胞のカップリングに基づく骨リモデリングと破骨細胞と骨芽細胞が互いに依存しないモデリングが誘導される。しかし、抗 RANKL 中和抗体によって破骨細胞を抑制した場合、骨リモデリングやモデリングにおける骨芽細胞がどのような影響を受けるか不明である。歯槽骨において、根間中隔内部の骨髄に面する領域は骨リモデリング部位であり、一方、歯根膜に隣接する根間中隔・槽間中隔の近心面や遠心面は、歯の生理的移動に伴って骨吸収や骨形成が誘導されるモデリング部位である。特に、マウスなどの齧歯類では歯が生理的遠心移動するため、槽間中隔の近心面で骨吸収を、また、遠心面で骨形成が生じる。よって、抗 RANKL 中和抗体は、歯槽骨の骨髄に面する根間中隔内部、および、槽間中隔の近遠心面における骨形成・骨吸収に対して異なる効果を及ぼす可能性が示唆される。以上より、本研究では、抗 RANKL 中和抗体を単回投与したマウスの下顎臼歯部の根間中隔および槽間中隔における破骨細胞と骨芽細胞の分布・局在を明らかにすることを目的とした。

生後 6 週齢雌性 C57BL/6J マウスに 5 mg/kg の抗マウス RANKL 中和抗体を単回腹腔内投与した。抗体投与 0 週（抗 RANKL 中和抗体投与直後：ベースライン）、2 週、4 週、5 週、6 週、8 週後に、マウスを麻酔下でパラホルムアルデヒド溶液を用いて灌流固定し、下顎骨を摘出した。下顎第一臼歯および第二臼歯の領域をマイクロ CT 撮影した後、EDTA 溶液で脱灰しパラフィンに包埋した。その後、パラフィン切片を作成し、H-E 染色、ならびに、組織非特異型アルカリホスファターゼ (tissue nonspecific alkaline phosphatase: ALP) と PHOSPHO1 免疫組織化学、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP) 染色を行った。組織標本における根間中隔の観察部位は、下顎第一臼歯の近心根と遠心根の先端を結ぶ仮想平面と一致させた 600 μ m $\times$ 600 μ m の正方形の領域とし、また、槽間中隔の観察部位は、第一臼歯と第二臼歯間の槽間中隔の近遠心面における歯槽頂

から根尖方向に 1000 μm の領域とした。各領域において ALP 陽性骨芽細胞系領域（骨芽細胞系細胞）、PHOSPHO1 陽性骨芽細胞（成熟骨芽細胞）、TRAP 陽性破骨細胞数の計測を行い、一元配置分散分析後に Tukey-Kramer 多重比較検定を用いた統計解析を行った。

その結果、マイクロ CT 解析と H-E 染色の低倍率観察では、抗 RANKL 中和抗体投与後 0 週から 8 週の全期間において、第一臼歯根間中隔および第一・第二臼歯槽間中隔ともに、明らかな組織学的な変化を認めなかった。

根間中隔内部の破骨細胞分布を観察すると、抗体投与後 0 週では、多数の TRAP 陽性破骨細胞が骨髓に面する骨表面に局在していたが、投与 2 週後にその数が有意に減少し、投与 5 週後では TRAP 陽性破骨細胞をほとんど認めなかった。その後、投与 6 週と 8 週において TRAP 陽性破骨細胞数が徐々に増加したが、ベースラインである投与 0 週の破骨細胞数まで回復していなかった。一方、ALP および PHOSPHO1 免疫染色にて骨芽細胞の検索を行うと、抗 RANKL 中和抗体投与直後（0 週）の根間中隔遠心面で、PHOSPHO1 陽性成熟型骨芽細胞の長い列が観察された。PHOSPHO1 陽性骨芽細胞の細胞列は、投与 2 週以降で著しく減少したが、投与 6 週以降で徐々に増加に転じ始め、投与 8 週で投与 0 週と同様に連続した長い列が形成されていた。また、ALP 陽性骨芽細胞系領域は、PHOSPHO1 陽性成熟骨芽細胞と同様の経時的変化を示したが、投与 8 週の時点でベースラインまで回復していなかった。このことから、リモデリング部位である根間中隔内部における破骨細胞数と骨芽細胞領域は連動しており、抗 RANKL 中和抗体による破骨細胞の抑制は、そのまま骨芽細胞の局在・分布に反映されると推察された。

槽間中隔における破骨細胞の分布については、抗 RANKL 抗体の投与直後（0 週）では、鋸歯状の骨表面を呈する中隔近心面の骨表面に TRAP 陽性破骨細胞が均一に分布していた。TRAP 陽性破骨細胞数を計測したところ、投与後 2 週でその数が有意に減少したが、投与後 4 週で増加に転じ、抗体投与後 6 週目にはベースラインである投与 0 週と同程度の数に回復していた。一方、槽間中隔の遠心面は滑らかな骨表面を呈しており、PHOSPHO1 陽性成熟骨芽細胞領域は、抗体投与後 2 週にはやや減少したが、6 週以降で 0 週と同程度まで回復していた。また、ALP 陽性骨芽細胞系領域は、抗体投与直後から 8 週までベースラインと有意差が認められなかった。よって、モデリング部位である槽間中隔において、破骨細胞や骨芽細胞が抗 RANKL 中和抗体の影響を受けるものの、その影響の程度は骨リモデリング部位である根間中隔に比較すると軽微な減少しか示さないことが示唆された。

以上、マウスに抗 RANKL 中和抗体を単回投与すると、骨リモデリング部位である根間中隔内部の破骨細胞数は著しく減少し、また、それに伴って骨芽細胞領域も低下するが、モデリング部位である槽間中隔の近遠心面の破骨細胞数と骨芽細胞領域は、抗 RANKL 中和抗体で若干の減少を示すものの、比較的早期にベースラインに回復することが示唆された。