

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍) 手塚 充 樹 (東京都)
博士の専攻分野 博士(歯学)
学位記番号 甲 第 443 号
学位授与年月日 平成 27 年 3 月 13 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻 鶴見大学大学院歯学研究科
(博士課程) 歯学専攻
学位論文題目 Possible Involvement of Leptin in the Elevated Osteoblastic Activity Observed
in High Turnover Type Osteoporosis of Ovariectomized Mice
(卵巣摘出による高回転型骨粗鬆症マウスでの骨芽細胞活性へのレプチンの関与)
Journal of Autacoids and Hormones, 第 3 巻, 第 1 号 1000105.1 頁~ 1000105.6 頁掲載
平成 26 年 11 月 4 日発行
論文審査委員 主査 教授 斎 藤 一 郎
副査 教授 濱 田 良 樹 副査 教授 里 村 一 人

内容の要旨

【緒 言】

閉経後骨粗鬆症は閉経に伴うエストロゲン欠乏により発症する疾患であり、発症初期では骨吸収と骨形成が共に活性化されるものの、最終的には骨吸収が骨形成より優位となるため、骨粗鬆症症状を呈するに至る。エストロゲン欠乏による骨吸収活性の亢進に関するメカニズムについては詳細に検討され、多く報告があるものの、骨形成の活性化メカニズムについては依然として不明であり、本疾患の効果的予防と治療のためには、骨芽細胞活性化メカニズムの解明が重要である。

レプチンは、遺伝性肥満マウスである *ob/ob* マウスの原因分子として同定された 16 kDa のタンパク質で、主に白色脂肪組織から産生、分泌される。その生理作用としては、糖・脂質代謝促進、摂食抑制、エネルギー消費亢進などの体重増加抑制作用に加えて、骨代謝調節作用や血管新生作用が報告されている。また閉経後の女性では、閉経前と比較し血清レプチン濃度が上昇する傾向があることが知られている。本研究では、これらの事実に着目し、閉経後骨粗鬆症初期にみられる骨芽細胞活性化にレプチンが関与している可能性について検討した。

【材料および方法】

1. 骨粗鬆症モデルマウスの作製および評価

8 週齢、雌性の ICR マウスに卵巣摘出術 (ovariectomy) あるいは擬似手術を行い、それぞれ OVX 群、Sham 群とした。術後 4 週まで各群のマウスの体重の変動を測定した。また、OVX 群において骨粗鬆症が発症していることを確認するために術後 4 週にマウス脛骨近位端の骨梁変化を μ CT および組織学的観察により検討した。

2. 骨粗鬆症モデルマウス骨髄内でのレプチン発現

(1) 免疫組織化学的検討

卵巣摘出後 3 週のマウス大腿骨のパラフィン切片を作製し、通法に従い、抗マウスレプチン抗体を用いた免疫組織化学的手法にてレプチン発現細胞を同定した。

(2) レプチンタンパク質の定量

卵巣摘出後 1 週および 3 週のマウス大腿骨を Retch Mixer Mill Type MM400 を用いて粉碎、タンパク質を抽出し、Quantikine[®] ELISA Mouse/Rat Leptin Immunoassay kit によりレプチンタンパク質の定量を行った。

3. 卵巣摘除の骨髄間質細胞への影響

卵巣摘出後3週および4週のマウス脛骨骨髓腔内の細胞を100 mm ディッシュに播種した。培養10日目に4%パラホルムアルデヒドにて固定し、Alkaline phosphatase (ALPase) staining kit (Primary Cell Co., Ltd.) を用いて酵素化学染色を行った後、ALPase 陽性のコロニー数を計測した。

4. マウス骨髄間質細胞株 (MMSC3) におけるレプチンレセプターの発現

(1) Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法

MMSC3 細胞を100 mm ディッシュに播種し、コンフルエントに達した後に TRIzol[®] reagent を用いて total RNA を回収した。RT-PCR 法にてレプチンレセプターである Ob-Ra および Ob-Rb の mRNA の発現を検討した。

(2) Western blot 法

MMSC3 細胞を100 mm ディッシュに播種し、コンフルエントに達した後に RIPA バッファーを用いてタンパク質を抽出した。NuPAGE system (Novex, San Diego, USA) を用いて電気泳動を行った後、ニトロセルロースメンブレンに転写し、通常に従い Ob-Ra および Ob-Rb タンパク質の発現を検討した。

5. マウス骨髄間質細胞株 (MMSC3) に対するレプチンの影響

(1) Cell proliferation assay

MMSC3 細胞を 3×10^3 cells/cm² の細胞濃度で播種し、各種濃度 (0, 1, 5, 10 および 100 ng/ml) のレプチンを添加し培養を行った。播種後 0, 3, 7, 10 および 14 日目に細胞を固定し、クリスタルバイオレット法を用いて細胞増殖へのレプチンの影響について検討した。

(2) Quantitative RT-PCR 法

MMSC3 細胞がコンフルエントに達した後に、培養液に各種濃度 (0, 1, 5, 10 および 100 ng/ml) のレプチンを添加し培養を行った。レプチン添加後 0, 4, 7, 14 および 21 日目に total RNA を回収し、Real-time RT-PCR 法にて骨芽細胞分化マーカーである Type I collagen (Col I), Bone sialoprotein (BSP) および Osteocalcin (OC) の mRNA の発現量について検討した。

【結 果】

1. 骨粗鬆症モデルマウスの作製・評価

骨粗鬆症モデルマウスの体重は、Sham 群と比較してやや重い傾向がみられたものの、統計学的有意差は認められなかった。μ CT 所見では、Sham 群と比較し OVX 群では、脛骨近位端の骨梁が減少していた。また組織学的所見では、Sham 群と比較して OVX 群の脛骨骨髓腔内において骨梁の減少および脂肪細胞の増加が認められた。

2. 骨粗鬆症モデルマウス骨髄内におけるレプチンの発現

(1) 免疫組織化学的染色

OVX 群の脛骨近位端では、Sham 群と比較して一次海綿骨に近接する骨芽細胞、脂肪細胞および肥大軟骨細胞にレプチンのより高度の発現がみられた。

(2) レプチンタンパク質量

卵巣摘出後1週においては、OVX 群と Sham 群との間で大腿骨に含まれるレプチン量に有意な差はみられなかった。一方術後3週においては、OVX 群でのレプチン量は Sham 群の約2倍量となり、また術後1週の約2倍量にまで増加していた。

3. 卵巣摘除による骨髄間質細胞への影響

卵巣摘出後3週および4週において、OVX 群における ALPase 陽性コロニー数は Sham 群と比較して有意に増加していた。

4. マウス骨髄間質細胞株 (MMSC3) におけるレプチンレセプターの発現

MMSC3 細胞が2種類のレプチンレセプター (Ob-Ra および Ob-Rb) mRNA およびタンパク質を発現していることが確認された。

5. マウス骨髄間質細胞株 (MMSC3) の増殖および分化に対するレプチンの影響

レプチンは MMSC3 細胞の増殖に明らかな影響を示さなかった。一方、レプチンは濃度依存的に MMSC3 細胞の BSP および OC の mRNA 発現を上昇させたものの、Col I mRNA の発現には影響を示さなかった。

【考 察】

卵巣摘除によりマウス骨髄内のレプチン濃度の上昇が惹起されることが確認された。一方レプチンが骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化を促進することが確かめられたことから、閉経後高回転型骨粗鬆症初期にみられる骨芽細胞活性の亢進に、閉

閉経によるエストロゲン欠乏により惹起される骨髄内レプチン濃度の上昇が大きく関与している可能性が示唆された。本研究は、閉経後高回転型骨粗鬆症の病態のさらに正確な理解に寄与するものと考えられる。

審査の結果の要旨

閉経後骨粗鬆症は閉経に伴うエストロゲン欠乏により発症する疾患であり、発症初期では骨吸収と骨形成が共に活性化されるが、その骨形成の活性化メカニズムについては不明な点が多く、本症の効果的予防と治療を確立するためには、骨芽細胞活性化メカニズムの解明が重要である。

レプチンは、遺伝性肥満マウスである *ob/ob* マウスの原因分子として同定された 16 kDa のタンパク質で、主に白色脂肪組織から産生、分泌され骨代謝調節作用等が報告されている。また閉経後の女性では、閉経前と比較し血清レプチン濃度が上昇する傾向があることが知られている。本研究では、これらの背景から、閉経後骨粗鬆症初期にみられる骨芽細胞活性化におけるレプチンの関与について検討が行われた。

本研究の結果、以下のことが明らかとなった。

1. 骨粗鬆症モデルマウスの作製・評価

骨粗鬆症モデルマウスでは Sham 群と比較し骨梁が減少し脂肪細胞の増加が認められた。

2. 骨粗鬆症モデルマウス骨髄内におけるレプチンの発現

骨芽細胞、脂肪細胞および肥大軟骨細胞にレプチンの高度の発現がみられ、OVX 群でのレプチン量は Sham 群の約 2 倍量まで増加した。

3. 卵巣摘除による骨髄間質細胞への影響

OVX 群における ALPase 陽性コロニー数は Sham 群と比較して有意に増加していた。

4. マウス骨髄間質細胞株 (MMSC3) におけるレプチンレセプターの発現

MMSC3 細胞が 2 種類のレプチンレセプターを発現していることが確認された。

5. マウス骨髄間質細胞株 (MMSC3) の増殖および分化に対するレプチンの影響

レプチンは濃度依存的に MMSC3 細胞の BSP 等の発現を上昇させた。

これらの結果からレプチンは骨芽細胞の活性化に関与することが示唆され、閉経後の骨粗鬆症の病態の一端を明らかにしたことの意義は大きく、今後の臨床応用への道を拓くものと考えられる。

よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。