

卵巣摘出ラットにおける骨病変および骨芽細胞と破骨細胞の分化因子の動態

松岡正登¹⁾ 藤下昌巳¹⁾ 塚原隆司²⁾ 中澤純子²⁾
永山元彦³⁾ 竹内宏³⁾

The Lesion of Bone and Movement of Osteoblast and Osteoclast Differentiating Factors on Ovariectomized Rat

MATSUOKA MASATO¹⁾, FUJISHITA MASAMI¹⁾, TSUKAHARA TAKASHI²⁾, NAKAZAWA JUNKO²⁾,
NAGAYAMA MOTOHIKO³⁾ and TAKEUCHI HIROSHI³⁾

高齢化社会を迎えて増加の一途を辿っている閉経後性骨粗鬆症は、口腔にも顎骨の吸収や歯周炎をひき起こす。本症はエストロゲン欠乏によって生じる高回転型の骨代謝性疾患であるが、その成因についてはまだほとんど知られていない。そこで今回、卵巣を摘出した骨粗鬆症モデルラット(OVX)を用いて、骨代謝の主役の骨芽細胞と破骨細胞の分化や活性化に関連している各種の発現因子の動態あるいは消長を、脛骨と下顎骨で免疫組織化学的に検索した。OVXは摘出後3カ月で両骨の海綿骨の消失、ハバース管およびフォルクマン管様の管の内壁の拡大、下顎骨ではこれらに加えて、骨髓腔・下歯槽神経管・歯根膜腔の開大を認めた。発現因子は無処置対照ラットと比べて発現低下したもの(bFGF, FGFR, BMP 2/4, Runx2, Osterix, Wnt, LRP5, OPG)、変化のなかったもの(RANKL, RANK)および増強したもの(βcatenin)の3種類に大別できた。この結果からは、骨芽細胞誘導因子とその転写因子の発現低下による骨芽細胞の分化・増殖抑制が生じること、その骨芽細胞によるRANKLの発現と破骨細胞前駆細胞によるRANKの発現には影響はないが、Wntの発現抑制に始まるβcateninの増加とリン酸化亢進によるOPGの発現停止が起因する破骨細胞分化亢進が起こることが示唆された。

キーワード：閉経後性骨粗鬆症、卵巣摘出ラット、骨芽細胞分化因子、破骨細胞分化因子、免疫組織化学

Postmenopausal osteoporosis involves oral lesions such as the resorption of cancellous and cortical bone, and periodontal disease; however, the crisis mechanisms of this type of osteoporosis are not well known. In order to elucidate the mechanisms, immunohistochemical analysis was performed of the expression features of factors concerning the differentiation of osteoblasts and osteoclasts, which play an important role in bone metabolism, using model rats that had undergone surgical removal of the ovaries. The expression pattern of factors was classified into three groups: 1) underexpression group (bFGF, FGFR, BMP 2/4, Runx2, Osterix, Wnt, LRP 5, OPG) 2) no change group (RANKL, RANK) 3) overexpression group (βcatenin) These findings strongly suggest that osteoblast differentiation is suppressed by under-expression of induction and transcription factors. It is also indicated that βcatenin overexpression following underexpression of Wnt and LRP 5 causes non-expression of OPG, and such an expression pattern readily connects RANKL to RANK, which facilitates osteoclast differentiation.

Key words: Postmenopausal osteoporosis, Ovary removed rat, Osteoblast differentiating factor,
Osteoclast differentiating factor, Immunohistochemistry

¹⁾朝日大学歯学部口腔病態医療学講座歯科放射線学分野

²⁾朝日大学歯学部総合医科学講座外科学分野

³⁾朝日大学歯学部口腔病態医療学講座口腔病理学分野
501 0296 岐阜県瑞穂市穂積1851

¹⁾Department of Oral and Maxillofacial Radiology, Division of Oral Pathogenesis and Disease Control

²⁾Department of Orthopaedic Surgery, Division of General Medicine

³⁾Department of Oral Pathology, Division of Oral Pathogenesis and Disease Control

Asahi University School of Dentistry
Hozumi 1851, Mizuho, Gifu 501 0296, Japan
(平成20年12月12日受理)

緒 言

骨の代謝性疾患には、クル病、骨軟化症、骨パジェット病、大理石骨病、副甲状腺機能亢進症、腎性骨異常症、骨粗鬆症の6種を数え、中でも骨粗鬆症の発現頻度は高い。Marcus & Bouxsein¹⁾は骨粗鬆症を、わずかな外傷、時には通常の生活で生じ得る以下の力で骨折を引き起こすような全身にわたる骨の脆弱性と定義付けている。この骨粗鬆症を今から約60年前に、Albright & Peifenstein²⁾は原発性骨粗鬆症を閉経後性骨粗鬆症と老人性骨粗鬆症の2型に分類した。さらにこの分類に基づいて、Riggs ら³⁾は Type I と Type II の2種類とし、前者を閉経後に生じる海綿骨の消失を、また後者を男女ともに増齡的に起こる海綿骨と皮質骨の消失を主変化とするとした。閉経後性骨粗鬆症はわが国では2,000万人以上に達していると推測されている⁴⁾。本症はエストロゲン欠乏を原因とする高回転型骨粗鬆症であり、骨芽細胞、破骨細胞ともに機能亢進を起こすものの経過中に破骨細胞による骨吸収の方が勝り、全身性の進行性骨吸収を招来する疾患で、低回転型の老人性骨粗鬆症とは対称をなしている。主症状は椎骨(円背)や大腿骨骨折、骨痛であるが、口腔にも、下顎骨の骨梁減少や下顎骨皮質骨の吸収^{5,6)}、(骨粗鬆症性)歯周炎^{7,8)}等が現れる。このように、骨粗鬆症の病変や症状についてはほぼ全容が明らかにされているが、その成因についてはまだ完全に解明し尽くされていない。

そこで今回、卵巣摘出によるラットの骨粗鬆症モデルを用いて、骨芽細胞分化に関連する basic fibroblast growth factor (bFGF) とそのレセプターの FGFR, bone morphogenic protein2/4 (BMP2/4), runt-related gene-2 (Runx2) および Osterix の発現、そして、破骨細胞分化に関連する Wnt 経路の Wnt1, low density lipoprotein receptor-related protein5 (LRP5), β catenin, osteoprotegerin (OPG) receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL), receptor activator of NF- κ B (RANK) の発現をエストロゲン欠乏による影響下で免疫組織化学的検索を中心に検討した。

材料と方法

Wistar 系ラットの卵巣を摘出し、摘出後3カ月ならびに6カ月後に大腿骨と脛骨、ならびに下顎骨の骨変化をX線の(軟X線およびマイクロCT)に観察することによって、閉経後性骨粗鬆症と同類の骨病変の生じうることを確認した後、これら罹患骨の組織学的観察を行うと同時に、骨芽細胞と破骨細胞の分化とくに Wnt 経路の面から、本症の成因を追求することを目的

として、1次抗体に、抗 bFGF, 抗 FGFR, 抗 BMP2/4, 抗 Runx2, 抗 osterix, 抗 Wnt1, 抗 low density lipoprotein5 (LRP5), 抗 β -catenin (β C), 抗 OPG, 抗 RANKL ならびに抗 RANK の11種を用いて免疫組織化学的観察を行った。なお、動物実験は朝日大学歯学部動物取り扱い規約に準拠した(承認番号朝動倫08 013)。

1. 卵巣摘出術群 (ovary ectomized; OVX) ならびに对照群 (Sham) ラットの作成

10週齢の Wistar 系ラット29尾に、ISOFULRANE (ISOFUL, Abotto Laboratory, IL, USA) 酸素混合ガスを吸入麻酔装置(実験動物麻酔システム IV-ANE, Olympus, 新宿, 東京)を用いて前麻酔し、次に、50 mg/kg のペントバルビタールナトリウム(ネプタール, Abott Laboratories, IL, USA)を生理食塩水で2倍希釈した後、腹腔内麻酔した。麻酔発現後、背部をバリカンと脱毛クリームを用いて剃毛した後、ヨードチンキで皮膚を消毒し、腎臓に相当する部分のやや下方を10mm程度に切開し、広背筋から胸腰筋の部分から腹腔内に達すると即座に内臓脂肪をピンセットで除き、これに附着した卵巣を卵巣子宮結合部で結紮後、卵巣部を摘出し、切端部をヨードチンキで消毒後、筋層と皮膚を縫合した。なお、Sham を9尾とし、OVX の手術開始時に資料採取し、また皮膚を切開した後、卵巣を摘出することなく縫合した後に3尾、OVX と同様に3および6カ月後にそれぞれ3尾ずつ屠殺した。なお、OVX・Sham とともに通常の餌を与えて通常の飼育を行った。

2. 標本作成と検索法

OVX・Sham とともに、術後3ヶ月と6ヶ月に4%パラホルムアルデヒド緩衝液を左心室より注入し還流固定を行った。そして、左右大腿骨と脛骨、ならびに下顎骨を採取し、同固定液にてさらに一夜4で再固定した。

1) 軟X線コンタクトマイクログラム (CMR) およびマイクロ CTX 線撮影

固定した Sham と OVX の頸骨ならびに下顎骨をそれぞれ軟X線撮影とマイクロ CTX 撮影を行った。

CMR 撮影には、撮影装置に CMB-2軟X線撮影装置(ソフテックス, 海老名)を、フィルムに FG orthochromatic (フジフィルム, 東京)を用い、コンタクトマイクロラジオグラム撮影(35KVp, 2.5mA, 180秒)を行った。

撮影後、脛骨は両骨幹部と骨幹部で、下顎骨は第1から第3臼歯を残すようにダイヤモンドカッターでトリミングし、下顎骨の場合は第1大臼歯の近心咬頭頂を指標に、マイクロフォーカスX線 L8121(浜松フォトニクス, 浜松)を用いて、管電圧60kV, 管電流0.13

mA, 焦点寸法 7 μm, 撮影枚数120枚にて μCT 撮影を行った。

2) 組織学的検索法

再固定を終えた骨を10%EDTA-2Na (pH7.2)にて4週で3週間にわたって中性脱灰し、通法によってパラフィン包埋後、4 μmの厚さの連続切片を作成した。

a. HE染色と酒石酸耐性酸性ホスファターゼ染色 (TRAP染色)

通常の形態的観察のためには、HE染色を行った。

また、破骨細胞のマーカーとしてTRAP染色を施した。すなわち、脱パラした切片を10mMPBSに1時間浸漬し、次に0.1M酢酸緩衝液 (pH5.0)で10分間を3回洗浄した後にTRAP溶液を滴下し、1-2時間発色させた。そして、最後に0.01N NaOHを加えて5分間放置し、反応を停止させヘマトキシリンで対比染色を施した。なお、TRAP溶液調製に際しては、まず0.5mlのN,N-Dimethylformamide (NACALAITESQUE, INC)に20mgのNaphtol AS-MX Phosphate disodium salt (SIGMA)をピペティングによって溶解させ、これに40mlの0.1M酢酸緩衝液を加えた。次に、20mgのFast Red LB salt (SIGMA)を加え溶解させた後、355mgのTARTRIC ACID Disodium Salt Dihydrate (SIGMA)を加え、攪拌し、フィルター (ポアサイズ0.45 μm)で濾過した。

b. 免疫組織化学的検索法

脱パラした切片を3%過酸化水素水メタノールにて30分間反応させて内因性ペルオキシダーゼ阻止反応を行い、至適濃度希釈で1次抗体を反応させ、PBSで洗浄した後、ラット抗体用のhorseradish peroxidase (HRP)ポリマー標識2次抗体 (ヒストファイブ シンプルステインラットMAX-PO, ニチレイバイオサイエンス, 築地, 東京)で反応させ、過酸化水素水添加3,3'-ジアミノベンチジン (DAB)による基質染色を行い、ヘマトキシリンで対比染色を行った。この反応による顕微鏡的観察の際に、抗原賦活の必要性があると判断したものは、表1に示すようにトリプシン処理かオートクレーブ処理のいずれかを採用した。

実験結果

1. X線所見

1) 3ヶ月後の所見

CMRでは、脛骨骨幹部は、皮質骨の厚さにはOVXとShamとで著しい差異はなかったが骨幹内腔はOVXの方がわずかに拡大していた。またこの部の梁状骨はShamではわずかにその存在を認めたがOVXではほとんど消退していた。μCTでは、上下の骨端

表1 1次抗体の種類と性状

1次抗体	抗原動物	濃度	抗原賦活処理	製造メーカー
bFGF	rabbit	2 μg/ml	autoclave	①Santa Cruz
FGFR	rabbit	1 μg/ml	trypsin	①Santa Cruz
BMP2/4	goat	8 μg/ml	N/A	①Santa Cruz
Runx2	mouse	3 μg/ml	N/A	②Abcam
Osterix	rabbit	4 μg/ml	N/A	②Abcam
Wnt1	rabbit	2 μg/ml	autoclave	②Abcam
LRP5	rabbit	5 μg/ml	autoclave	②Abcam
β-catenin	rabbit	20 μg/ml	trypsin	TAKARA
OPG	rabbit	10 μg/ml	trypsin	②Abcam
RANKL	rabbit	5 μg/ml	autoclave	②Abcam
RANK	mouse	1 μg/ml	autoclave	②Abcam

①Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, US

②TAKARA BIO INC, Otsu, Shiga, JAPAN

③Abcam INC, Cambridge, MA, US

N/A, not applicable

部において皮質骨の厚みに変化はなかったが、海綿骨はOVXに著しい消失が認められたと同時に、残存した骨梁の肥大化が認められた (図1A)。

下顎骨では、CMRで下顎枝、下顎角部および筋突起における海綿骨がOVXでは明らかに減少し、骨髄腔、切歯管腔にわずかながら開大を認めた。またμCTではOVXのCMRと同様の所見に加えて歯根膜腔の若干の拡大が認められた (図1B)。

2) 6カ月後の所見

両X線所見で、脛骨、下顎骨ともにさらに進んだ海綿骨梁の減少を認めた (図2A)。

下顎骨では、OVXの歯根膜腔の拡大、骨髄腔の開大がかなり顕著になった (図2B)。

2 組織学的所見

1) 3ヶ月後の所見

OVXの脛骨は、X線像でも見られたように、海綿骨が消失し、それに代わって骨髄の占める量が増し、且つ、脂肪細胞 (adipose cell; AC) 数が増加した。また、X線所見と同様に、皮質骨面の吸収はShamと比べて著しい変化はなかったが、HE染色所見では、その皮質骨内のハバース管およびフォルクマン管様の管の管腔の開大が認められた。なお、骨梁の減少に伴って、残存した骨梁の幅が太くなる傾向を示し、ここにはOBが多数配列した。しかし、破骨細胞らしき形状の細胞は少なかった (図3A)。

歯槽骨面の吸収は、いわゆる篩状板内壁の吸収がShamに比べて顕著で、これが歯槽骨の大小種々の吸収窩として捉えられ、骨表面における破骨細胞の分化によるHawshipの吸収窩として認められたものは少なかった。また、ハバース管およびフォルクマン管様の管の内壁からの吸収は歯槽骨だけでなく、下顎骨全体の小孔として認められた。さらに、骨髄腔壁、下歯槽神経管、下顎切歯管の内壁の吸収も生じ、Shamよりも明らかな内腔の開大を認めた (図3Ba, Bb)。

これを TRAP 染色によって観察すると、OVX の脛骨の海綿骨での TRAP 陽性細胞は Sham よりも著しく増加するものと逆に減少するものの両方があった。これは OVX において海綿骨の多くが吸収されてしまったことに関係しているようであった。しかし皮質骨面では、TRAP 陽性細胞の出現には大きな差異はなかった。

下顎骨では、Sham が歯槽骨表面、骨髓腔内壁、下歯槽神経腔内壁、下顎切歯を通す管の内壁のすべての、しかもそれらの全層にわたって極めて多数の TRAP 陽性細胞が配列していた(図 3 Ca)のに対して、OVX の下顎骨では、多くの吸収窩や各種の腔の開大が認められたにもかかわらず、TRAP 陽性細胞数が逆に著しく減少するものが多かった(3 Cb)。

2) 6 カ月後の所見

OVX では HE 染色による観察では、X 線所見と同じく関節頭内と骨端部の海綿骨の多くの消失が見られた。

また、X 線所見では反映されなかった骨幹部の内壁の吸収窩の増加と、外壁付近のフォルクマン管様の管の内部吸収の進行を認めた(図 4 A)。

下顎骨部では、歯根膜腔はさらに空隙が広まり、歯槽壁面の至る所で大小の吸収の跡が認められたが、HE 染色で見る限り、ほとんどの吸収部位に破骨細胞の存在は明らかでなく、唯一、歯頸部付近の歯肉あるいは歯根膜部においてわずかにマクロファージ系細胞と見られる細胞浸潤と、同部の歯槽骨の破骨細胞性骨吸収が明らかであった(図 4 Ba)。下顎切歯の歯根膜腔や下歯槽神経管、下顎骨体全体にわたってハバース管およびフォルクマン管様の管の内腔が 3 カ月後よりもさらに開大したが、これらにも破骨細胞の存在が明確ではなかった。なお、骨髓腔内には Sham 以上に多数の骨髓細胞が存在する傾向があった(図 4 Bb)。

TRAP 染色で観察すると、この時期の Sham は陽性細胞が著しく減少して歯槽骨面に散在性に認められるように変化した。しかし、OVX では、HE 染色では捉え難かった顎骨の至るところに扁平な形状の TRAP 陽性細胞が認められ、3 ヶ月後のそれよりはるかに多くなった。とくに、歯槽骨や下顎骨体のハバース管およびフォルクマン管様の管の内壁にその数が最も多くなった(図 4 C)。

3. 免疫組織化学所見

1) bFGF と FGFR

Sham では bFGF と FGFR は類似した発現性を示し、骨壁を裏装する resting osteoblast (RO) や海綿骨面の

osteoblast (OB)、骨髓細胞の adipose cell (AC)、polykaryocyte (PK)、約半数の多角形や類円形の単核細胞 polygonal cell (PC) に陽性であった(図 5 A)。なお、RO は FGFR よりも bFGF の発現細胞数が勝っていた。

下顎骨でもほぼ同様の細胞に発現があったとともに、歯根膜細胞 periodontal ligament cell (PLC) や下顎切歯を通す下顎切歯管の偽歯根膜 pseudoperiodontal ligament cell (PPLC) にも発現が認められた。

OVX では RO、OB の発現は Sham と同じであったが、AC の増加に伴ってこの細胞に発現が著しくなり、他の骨髓細胞はその減少に伴って発現細胞数は減少した(図 5 B)。また PLC と PPLC の発現細胞も約半数程度に減少した。

2) BMP2/4 の発現

Sham では、RO、OB、骨髓細胞の AC、PC、一部の GC に発現した。骨髓細胞の発現は数箇所に分かれて集簇性、あるいは散在性に発現を認めた(図 6 A)。下顎骨でも似た発現性を示し、また、PLC にも多くの発現細胞を認めた(図 6 B)。

OVX は 3 ヶ月後と 6 ヶ月後とも、海綿骨の OB、RC の発現は Sham と変わりなく、骨髓細胞の AC の一部にも発現を認めたが、他は陰性であった(図 6 C)。下顎骨の OVX は Sham と同じ所見であったが、歯根膜においてのみ、発現細胞が Sham より少なくなった(図 6 D)。

3) Runx2 の発現

Sham では、本因子は RO と海綿骨の梁状骨面の OB のみに(図 7 A)、また下顎骨では PLC と PPLC にも発現された。

OVX では、骨梁数は少なくなったが、残存し肥厚した骨梁面の OB に発現を認めたが、RO では発現低下が明らかであった。しかし、下顎骨では 6 カ月後になると PLC、PPLC に発現細胞数がむしろ増加した(図 7 B)。

4) Osterix の発現

Sham では、RO と海綿骨面の OB、骨髓の PC の一部と AC の多くに発現した。下顎骨では、RO と一部の PC、および PLC の多くが発現した(図 8 A)。しかし、PPLC は全く発現しなかった。

OVX 3 カ月後には、OB に変化なく、RO や AC の発現細胞が減少し、下顎骨ではこれらに加えて PLC も減少した(図 8 B)。6 カ月後にはさらに発現細胞が減少したが、AC のみ 3 カ月後より増加した。

表2 各発現因子の消長

	bFGF			FGFR			BMP2/4			Runx2			Osterix			Wnt1			LRP5			β-catenin			OPG			RANKL			RANK		
	S	3	6	S	3	6	S	3	6	S	3	6	S	3	6	S	3	6	S	3	6	S	3	6	S	3	6	S	3	6	S	3	6
Osteoblasts																																	
Resting osteoblast	○	±	±	○	±	±	○	±	±	○	-	-	○	-	-	○	-	-	○	-	-				○	±	±				○	±	±
Mature osteoblast	○	±	±	○	±	±	○	±	±	○	±	±	○	±	±							○	±	±									
Bone marrow cells																																	
Monocyte(polygonal)	○	-	-	○	-	-	○	●	●				○	-	-	○	-	-	○	-	-	○	+	+	○	-	●	○	-	○	○	±	±
Adipose cell	○	+	+	○	+	+	○	-	-				○	-	+				○	-	-	○	+	+				○	-	○			
Polykaryocyte	○	-	-	○	-	-	○	●	●							○	-	-	○	-	-							○	±	±			
Osteoclasts																																	
Ligament cells																																	
Periodontal ligament cell	○	-	-	○	-	-	○	-	-	○	±	±	○	-	-	○	±	-	○	-	-	○	+	+									
Pseudoperiodontal ligament cell	○	-	-	○	-	-	○	-	-	○	±	±				○	-	-	○	-	-												

註： S； Sham 3； 3か月後のOVX 6； 6か月後のOVX ○； 局在 ●； 消失 ±； 変化なし -； 減少

5) Wnt1の発現

Wnt1発現細胞は多く見られ、Shamでは脛骨・下顎骨ともにRO、骨髄細胞のPCやGCがその主な発現細胞であるとともに、下顎骨ではさらにPLCも発現した(図9A)。OVXでもこれら細胞に発現されたが、その数は3か月後・6か月後ともにShamに比べて著しく減少した(図9B)。

6) LRP5の発現

Shamでは、ROと骨髄細胞のPC、AC、GC、とくにPCに多くの発現を認めた。下顎骨では、これらに加えて多くのPLCとわずかなPPLCが発現した。

OVXの3か月後ではその発現細胞数がやや減少し、6か月後になると発現細胞はさらに減少し、なかには骨髄細胞のPCにのみに限局性の発現性を示す例もあった。下顎骨でも同様であったが、PLCでも顕著な減少を示した。

7) βcateninの発現

Shamでは多数のACとPCの一部、海綿骨面の多くのOBが発現した。下顎骨でも同様であり、これらに加えてPLCも発現した(図10A)。

OVXの3か月後になると、海綿骨部のOBに変化なく、脛骨・顎骨ともに著しく増加し、6か月後では、海綿骨部のOBを除いて脛骨・下顎骨ともにさらに著しい増加を示した。また、PLCでも発現細胞が増加した(図10B)。

8) OPGの発現

ShamではPCが発現したが、これら発現細胞は幾つかの小集塊をなして認められた(図11A)。下顎骨でも同様の発現性を示したが、その細胞数は脛骨のそれよりはるかに多いという傾向を示した。

OVX3か月後では顎骨・下顎骨ともにこのような発現細胞はほとんど消退し、6か月後になると発現細胞はまったく認められなくなった(図11B)。

9) RANKLの発現

Shamでは骨髄壁のRO、多くのPCやACに発現があり、OVX3か月後には発現は主にPCに変わり、6か月では再びRO、PC、ACに戻った(図12)。下顎骨では、歯根膜部の単球が発現するとともに破骨細胞が陽性染色性を示した。

10) RANKの発現

ShamはROとPC、GCの一部が発現したが、発現細胞数はRANKLに比べるとかなり少なかった(図13)。

下顎骨ではこれらに加えて歯根膜部の破骨細胞や大型の単球が発現した。

OVX3か月後および6か月後でもほとんど変化なかったが、6か月ではPCに若干の増加を認めた。

表2は、今回検索した各発現物質の発現細胞と発現数をShamを基本として、比較した結果をまとめたものである。

考 察

Type I骨粗鬆症である閉経後性骨粗鬆症はエストロゲンの分泌不足が原因であることは明らかであるが、この原因によって如何なる機序が骨代謝に作用して発症に至るのかという点、すなわち、成因についてはまだ不明の点が多く残されている。今回、この点を解明するための一助とすべく、卵巣摘出術を施したラット(OVX)の脛骨と下顎骨における骨変化を検討した。

その結果、長管骨の肉眼的およびX線の検索にお

いて、卵巣摘出3カ月後にすでにヒトの閉経後性骨粗鬆症と類似の骨変化が生じることが明らかになった。このOVXのマイクロCTによる観察では、脛骨は骨幹部の若干の菲薄化と関節頭や骨幹部端部の海綿骨の消失、下顎骨は骨髓腔・下歯槽神経管・下顎切歯管の管腔の開大、固有歯槽骨の吸収に伴う歯根膜腔の開大が明確であった。また、組織学的観察では、OVXの骨変化は大きく2種類に大別できた。その一つは著しい吸収に伴う海綿骨の消失であり、他の一つは骨表面からの破骨細胞性吸収よりもむしろハバース管およびフォルクマン管様の管といった骨を貫通する微小管腔の内壁からの吸収が顕著に生じる皮質骨の変化である。しかしTRAP染色では、とくに3ヶ月後のOVXの骨吸収部にTRAP陽性細胞が常に数多く存在するという所見はあまりなく、むしろShamの方にTRAP陽性細胞が多い傾向を示した。

しかし、6カ月になると、Shamの陽性細胞は著しく減少し、OVXでは3ヶ月後よりはるかに多くのTRAP陽性細胞を認めるようになった。このようなOVXやShamにおけるTRAP陽性細胞の複雑な消長には種々の要因が考えられ、実験に供したラットの骨成長とリモデリングのサイクルが複雑に関連し、とりわけ骨吸収後の破骨細胞のアポトーシスが一斉に生じる時期と一致したこと、破骨細胞の分化が連続的に生じ維持されるのではなく非連続性であること等が示唆された。

これらに加えて、下顎骨部における歯槽骨の吸収は、骨面に分化した破骨細胞によるものだけでなく、フォルクマン管様の管の内壁からの吸収も大きく関わっていることも明らかになった。このようなフォルクマン管様の管の吸収に伴う歯槽骨の吸収性が通常の歯周炎における骨吸収と異なる点であり、もし、骨粗鬆症歯周炎があるとすれば、その骨吸収のメカニズムは口腔細菌を原因とする炎症性の歯周炎の骨吸収とはかなり異なるものであると云い得た。

このような骨変化を示すShamと、OVXの3カ月ならびに6カ月後における骨芽細胞や破骨細胞の分化に関する発現物質の推移を免疫組織化学的に追跡した。

今回、対象とした発現因子は、いずれも骨の発生に参与している発現因子であって、成体においてもそのまま残され、とくに、FGFs、BMPスーパーファミリー、Wntタンパクは代謝回転後の骨新生、骨構造の維持、骨修復の誘導に際して発現される⁹⁾。なお、この免疫組織化学的検索において、下顎骨部の歯根膜に存在する歯根膜細胞(periodontal ligament cell; PLC)がbFGF、FGFR、BMP2/4、Runx2、Osterix、Wnt1、LRP5、 β -cat-

eninといった骨芽細胞の分化や破骨細胞の分化調節因子の一部を発現することが明らかになった。この所見は歯根膜が歯槽骨のリモデリングに大きな役割を演じている可能性の高いことを示している。

OVXにおけるこれら発現因子を経時的に追跡調査した結果、その消長はほとんど変動のない因子と、OVXによく発現される因子、逆に発現が抑制される因子の3種類に分けることができた。にはRunx2とRANKL、RANKが、には唯一 β cateninが、にはbFGFとFGFR、BMP2/4、Osterix、Wnt1、LRP5およびOPGがそれぞれ属した。

このような消長を示した各因子について、骨芽細胞の分化、次に破骨細胞の分化の過程に基づいて展望すると、に属するbFGFは、元々、枝芽のパターン形成に関与しており¹⁰⁾、単なる線維芽細胞増殖因子だけではなく、形態形成において重要で、骨芽細胞系統の細胞の分化と増殖を促進させるだけでなく¹¹⁾、成熟した細胞に対してはアポトーシスをも誘導する¹²⁾。また、Wnt遺伝子の発現に対して促進的に作用する¹³⁾。OVXにおけるこのような機能を有するFGFとFGFRの発現が低下は、エストロゲンの分泌停止によって骨芽細胞の分化と増殖が低下するというを示唆している。

BMP2/4も同じく発現低下を示した。

BMP2は哺乳類において30種類以上が同定されているTGF β のスーパーファミリーの一つであり、20種類が知られている。その多くはSmad1を活性化し、そのSmadはRunx2/Cbfa1とリガンド依存性にするることによって、骨芽細胞への分化を効率よくする¹⁴⁾。また、FGFが軟骨細胞の増殖やIhhの発現を抑制するのに対して、BMPシグナルには軟骨細胞の増殖や前肥大軟骨細胞によるIhhの発現を促進する¹⁵⁾。このようにFGFとは若干の機能の違いがあるが、骨芽細胞分化の誘導因子である点において一致している。したがってBMP2/4の発現低下も骨芽細胞の分化に抑制的に作用していると見ることができる。

これらの誘導因子の影響を受けて発現されるRunx2は、Shamでは海綿骨部の骨芽細胞と下顎骨部の歯根膜細胞にのみ発現され、OVXでも海綿骨は幾ばくかが残されあるいは再生されてそこに骨芽細胞を認め、また歯根膜細胞はOVXの影響をほとんど受けなかったことに基づいて、これらはあまり影響を受けなかったと考えられた。ただ、脛骨骨幹部のOVXの静止骨芽細胞の発現が著しく減少した。すなわち、bFGFやBMPsの発現低下の影響は骨幹部の静止骨芽細胞に強く及ぶことが示唆された。

元来、Runx2は骨格形成において極めて多様な機能

を發揮している¹⁶⁾。とくに、多能性未分化間葉系細胞より骨芽細胞系列への分化の決定因子になっている¹⁷⁾。因みに、骨芽細胞特異的 I 型コラーゲンプロモーターを用いた Runx2トランスジェニックマウスでは、皮質骨が減少して菲薄となって多くの陥凹が生じるが、トランスジェニックマウスでは骨芽細胞が2倍以上に増加しながら破骨細胞の分化はなく、また、その増加にもかかわらずオステオカルシンやアルカリホスファターゼなどの発現は低下し、骨細胞が著しい減少を示す¹⁸⁾。これはトランスジェニックマウスでは幼弱な骨芽細胞によって未熟な骨が形成され、今回の OVX における脛骨の骨幹部皮質骨の破骨細胞の出現をほとんど伴うことのない菲薄化がこのトランスジェニックマウスのそれと類似している。骨芽細胞の分化段階において、骨芽細胞の前駆細胞は I 型コラーゲン、アルカリホスファターゼ、オステオネクチンを産生し、幼弱骨芽細胞はオステオポンチンを産生する。さらに分化した成熟骨芽細胞は骨シアロタンパクやオステオカルシンを産生するようになる¹⁹⁾。このような細胞外基質分子は他の組織においても産生されるものが多い。

しかし、骨において骨基質として産生される表現型、すなわち骨芽細胞の表現型を決定するのは Runx2/Cbfa1 であり、この Runx2/Cbfa1 を表現する間葉系細胞に作用して骨芽細胞特異的表現型を決定するのが Osterix である。今回の Sham では、Osterix は海綿骨部の骨芽細胞、骨幹部の静止骨芽細胞、歯根膜細胞が主な発現細胞で、OVX ではこれらいずれの細胞においても Osterix の発現が低下あるいは減少した。

Osterix の機能を以上の知見に照らし合わせると、骨芽細胞系列の細胞はエストロゲンの分泌停止によって、成熟骨芽細胞への分化を抑制することが考えられる。

すなわち、OVX における骨芽細胞あるいはその近縁の細胞は完全に成熟した細胞ではないことを示唆している。これが脛骨骨幹部において成熟した骨芽細胞の分化がほとんどなかった理由と考えられる。また、このタイプの骨粗鬆症は高代謝回転型といわれているが、このような骨芽細胞の成熟抑制から推し量って、骨吸収後の骨添加能は低いのではないかという可能性も否定できない。

Wnt は350-380個のアミノ酸から成る分泌性糖タンパクで、19種類を数え、分泌に際しては、パルミチル転移酵素に類似した構造を持つ小胞体膜タンパクの porcupine が Wnt の N-グルコシル化を促進する²⁰⁾。レセプターは7回膜貫通型の Frizzled²¹⁾であるが、このレセプターに結合するもう一つの膜タンパクの LRP5/6が Wnt のシグナル認識に必要である²²⁾。その Wnt

経路は発生²³⁾、癌²⁴⁾、骨形成^{25, 26)}等、多方面に關与している。Wnt 経路には幾つかがあるが良く解析されているのは Wnt/ β catenin 経路である。Wnt がレセプターに結合すると、Dsh が活性化され、これが GSK-3 β をリン酸化して非活性にする。また Wnt は LRP の細胞内ドメインのリン酸化と、Axin を介した細胞内ドメインに対して Axin/APC/GSK-3 β 分解複合体を誘導する。 β catenin はこの複合体から分離し、細胞質内に蓄積する。そして、核に移動して転写因子の一つの Tcf/LEF1 と複合体を形成する。Wnt が存在しない場合には、 β catenin は GSK-3 β によってリン酸化され、標的遺伝子の発現を誘導する²⁷⁾。この Wnt は Sham では脂肪細胞と破骨細胞以外のすべての細胞に発現されたが、OVX ではそのすべての細胞の発現が著しく低下した。この減少は、OVX では Wnt 不在の状態下になって β catenin のリン酸化が起こり、ひいては標的遺伝子の発現が誘導されることを示している。

LRP5の機能異常は、これをコードする遺伝子の変異による機能障害、すなわち、骨の低形成、易骨折性等をひき起こす²⁸⁾。Gong ら²⁹⁾は、LRP5は骨芽細胞分化と増殖を調節するとし、Kato ら³⁰⁾は、LRP5^{-/-}マウスにおいては Cbfa1 発現が正常であっても骨芽細胞の増殖異常を起こすことを見出している。本検索では、Sham は本因子を破骨細胞を除くすべての細胞が発現し、OVX ではそのすべての細胞が発現低下を起こした。これは Wnt 経路が OVX では機能しなく、ひいては β catenin の量やリン酸化に強く影響することを示している。

その β catenin は、静止骨芽細胞以外のほとんどの細胞に見られたが、他の多くの発現因子とはまったく異なって OVX で発現細胞が増加する傾向が強く認められた。これは Wnt の発現低下と相関した現象と見ることが出来る。このように増量し且つリン酸化した β catenin は OPG の産生を促進させる。

OPG は元々、骨芽細胞培養液から分離され破骨細胞の形成を阻害するヘパリン結合性タンパクとして見出され、osteogenesis inhibitory factor と名付けられた³¹⁾。また、同じタンパクが一方では、膜貫通性ドメインを欠く分泌性の TNFR ファミリーが骨吸収を阻害し、動物実験において大理石病を引き起こすタンパクとして見出され、osteoprotegerin (OPG) と名付けられた³²⁾。

このレセプターのリガンドは RANKL であり、デコイレセプターとして機能し、それ故に骨のターンオーバーを調節していることが明らかになった³³⁾。そして、遺伝子障害による OPG 欠損マウスでは、生下時において骨粗鬆症が生じ、破骨細胞の分化と機能が促進さ

れる上に、長期にわたって生存することが見出された^{34, 35)}。今回の検索では、OPGは骨髄細胞の多角形を呈する単球にのみに発現され、OVXではまったく発現細胞が見られなくなった。これまでの先人達の知見から類推するに、この所見はOVXにおいては阻レセプターとしての機能がほとんど消失すること、ひいては破骨細胞の分化と機能を促進させる結果をもたらすと予測し得るものである。

RANKLは、macrophage-colony-stimulating factor (M-CSF)の存在下で破骨細胞形成を誘導する能力を持っている。例えば、骨芽細胞/間葉系細胞の非存在下で脾臓由来の破骨細胞前駆細胞から破骨細胞の形成を行い得る。そして、これはOPGの添加によって無効になる³⁶⁾。また、M-CSFの存在下で、ヒトや齧歯類の骨髄培養やヒト末梢血単球の培養において破骨細胞形成を刺激する^{37, 38)}。動物実験では、リコンビナントRANKLの非経口投与によって、1時間以内にイオン化されたカルシウムが血中に増加し³⁹⁾、1日2回、3日間の注射投与では破骨細胞数は非投与と変化がないにも拘わらず、持続性の高カルシウム血症になる⁴⁰⁾。

これらのデータは、RANKLが破骨細胞の分化を刺激するだけでなく、成熟破骨細胞を活性化させることを示している。また、遺伝子組み換えマウスにおける可溶性RANKLのoverexpressionは、破骨細胞性骨吸収の増大、骨皮質の多孔性、骨格の脆弱性等、ヒトの閉経後性骨粗鬆症と類似した表現型を示す⁴¹⁾。そのレセプターのRANK (TNFRSF11A)は、TNFRスーパーファミリーの中では細胞内にもっとも長いC末端を有するタイプI膜貫通型タンパクで、他のファミリーと同じく4つの細胞外システインリッチドメインを持つ。

このRANKメッセンジャーRNAは骨格筋、胸腺、脾臓、骨髄由来の破骨細胞前駆細胞に発現され^{42, 43)}、RANKL以外のリガンド、例えば、TNF α 、Fasリガンド、CD27、CD30、CD40リガンド等の他のTNFリガンドファミリーとは全く結合しない。また、RANK欠損マウスにおいて、IL-1、TNF α 、MIP-1 α のような前破骨細胞形成因子で刺激しても、破骨細胞分化は起こらない⁴⁴⁾。これは破骨細胞前駆細胞から成熟破骨細胞への分化はRANKシグナリングによってのみ起こることを示している^{45, 46)}。今回のRANKLとRANKの検索では、両因子とも、Shamの静止骨芽細胞、骨髄細胞の多角形の単球、脂肪細胞、至る部位の破骨細胞に発現あるいは染色性を認め、OVXでもほとんど変化しないかあるいは一旦発現が低下しつつも、その後反動的に増加する細胞も見受けられた。とくに、骨髄細胞にその傾向があった。このようなRANKLと

RANKの所見は、これらTNFスーパーファミリーはエストロゲンの影響から開放されると、発現亢進を起こす可能性のあることを示唆している。

骨はその成長と成熟、維持等の調節に極めて多くのホルモンを必要とする点において特殊な器官であり、とくに性ステロイドのエストロゲンやテストステロンは重要な位置を占めているが、これまでのエストロゲンと骨代謝の関係に関する知見を渉猟してみると、Weitzmann and Pacifici⁴⁷⁾はエストロゲン欠乏が末梢血単球(PBM)によるIL-1 β やTNF α の産生を増加に導き、また、エストロゲンの再供給によって可逆性であることを見出している。また、PBMによるこれらのサイトカインの産生は骨において類似のプロセスが生じていることが、ヒトの骨粗鬆症のエストロゲン療法の停止で見られる状況から肯定されている⁴⁸⁾。これらを含めて数多くの検索を総合すると、エストロゲン分泌低下によって破骨細胞性骨吸収において最も強く影響を受けるのは、TNF α 、IL-1 β およびRANKLであり、また、エストロゲンは破骨細胞の分化や活性化を低下させるシグナリング経路に直接的に関わっているとみなされている⁴⁹⁾。この影響を直接的に受けるのはTリンパ球であるとする説がある。すなわち、エストロゲン欠乏によって、Tリンパ球が産生するTNFレベルが上昇し、さらに、INF γ を産生してTRAF6の分解を促進し、このためにRANKシグナルを抑制するとされている^{50, 51)}。しかし、今回の検索を総合すると、エストロゲン分泌低下あるいは停止によって、骨代謝あるいは骨形成に関わる細胞の多くに、発現因子の発現低下や、その逆の発現亢進が生じ、これが骨代謝平衡を阻害することによって、骨粗鬆症が発症、増悪することが強く示唆された。とくに、BMP2/4、Osterix、Wnt1、LRP5、OPGの発現低下とこれに伴う一連の反応、例えば、骨転写因子発現の誘導能の低下とこれに伴うOsterix発現低下に起因する骨芽細胞の成熟抑制が起因する骨形成能の低下、そして、OPGの産生不全による破骨細胞の分化と骨吸収能の活性化が骨粗鬆症を発症に導くものと結論付けることができた。因みに、この一連の反応においてRANKLとRANKの発現には変化が生じないようであった。なお、Wnt1の発現低下がもたらす β cateninの増量とそのリン酸化に影響される筈のOPGの産生との関係については、これまでの知見とは矛盾する結果が出た。この点についてはPCP制御経路やCa²⁺シグナル経路のような他の要因が入り込んでいる可能性も考えられるが、今後の検討課題にしたい。

なお、歯根膜細胞がOPG、RANKL、RANKを除くすべての因子を発現し、OVXにおける消長は静止骨

芽細胞に類似していたが、この細胞の機能、および骨粗鬆症の発症や経過にどのように関連しているのかは今回の検索では不明であった。

結 論

骨粗鬆症の成因を探ることを目的としたラット卵巣摘出実験によって、以下の結論を得た。

1. 卵巣摘出3カ月後に、脛骨と下顎骨に著しい骨吸収の生じることが、軟X線、マイクロCTおよび組織学的観察で明らかになった。

2. その骨吸収は、脛骨の海綿骨にもっとも顕著であったが、皮質骨の菲薄化、骨髓壁、ハバース管およびフォルクマン管様の管の内壁、下顎骨では、これらに加えて、下歯槽神経管や切歯管内壁からの内部吸収も認められた。

3. このような吸収と破骨細胞の分化と程度とは必ずしも相関しなかった。これは、破骨細胞の骨吸収後のアポトーシスの時期等が関係していると考えられた。

4. 骨芽細胞と破骨細胞の分化・増殖に関連する発現因子の免疫組織化学的検索では、OVXで発現低下あるいは発現細胞数の減少をきたした因子、変化のない因子、逆に亢進あるいは増加した因子に分類でき、減少をきたした因子は骨芽細胞誘導因子 (bFGF, FGFR, BMP2/4), 骨芽細胞転写因子 (Runx2, Osterix), Wntシグナル関連因子 (Wnt, LRP5, OPG) で、ほとんど変化のなかったのは破骨細胞分化因子 (RANKL, RANK) であり、逆に増加あるいは亢進したのは唯一 β catenin だけであった。

5. この所見はOVXにおいては、とくにWntの発現低下に伴う β catenin の過剰発現を認めた。しかし、これに伴うリン酸化亢進によるOPGの発現の様相については矛盾があった。

6. しかし、OPGは著しく産生低下を起こし、これが破骨細胞の分化促進に繋がるもので、RANKLとRANKの発現性はあまり関係がないことが示唆された。

7. この破骨細胞の分化はTRAP染色所見から、OVXにおける破骨細胞の分化は常時持続しているのではなく、分化と消退 (アポトーシス) を反復しつつ骨吸収を進行させることが示唆された。

8. 下顎骨でも、脛骨とほとんど同じような骨吸収が生じることと、これらに加えて、下歯槽神経管や切歯管内壁からの吸収が加わることが明らかになった。

9. 歯槽骨の吸収も骨面に分化した破骨細胞による吸収もさることながら、フォルクマン管様の管の内壁からの吸収の方が著しいという所見を得た。

文 献

- 1) Marcus R and Bouxsein M; Marcus R, Feldman D, Nelson DA and Rosen CJ, ed. The Nature of Osteoporosis in Osteoporosis. 3rd ed. TOKYO: ELSEVIER; 2008: 27-86.
- 2) Albright F and Reifenstein EC Jr. ed. The Parathyroid Glands and Metabolic Bone Disease: Selected Studies. Baltimore: Williams and Wilkins; 1948.
- 3) Riggs BL, Wahner HW, Seeman E, Offord KP, Dunn WL, Mazess RB, Johnson KA and Melton LJ 3rd. Changes in bone mineral density of the proximal femur and spine with aging. Differences between the postmenopausal and senile osteoporosis syndromes. *J Clin Invest.* 1982; 70: 716-723.
- 4) 米田俊之. 骨と人間のつきあい. 骨のサイエンス総集編. *Bone sense*. (別冊) 2007: 3 5.
- 5) 黒須康成, 稲垣幸司, 吉成伸夫, 佐藤連造, 夫馬大介, 坂野雅洋, 杉石 泰, 岩田武久, 深田淳一郎, 高木善寛, 野口俊英, 内藤宗孝, 有地榮一郎, 田口 明. 定量的コンピューター断層撮影法 (QCT法) を用いた下顎骨骨密度と腰椎骨密度との関係. *日歯周誌*. 2004; 46: 202 208.
- 6) Taguchi A, Suei Y, Sanada M, Ohtsuka M, Nakamoto T, Sumida H, Ohama K and Tanimoto K. Validation of dental panoramic radiography measures for identifying postmenopausal women with spinal osteoporosis. *AJR Am J Roentgenol.* 2004; 183: 1755-1760.
- 7) Inagaki K, Kurosu Y, Kamiya T, Kondo F, Yoshinari N, Noguchi T, Krall Ea and Garcia RI. Low metacarpal bone density, tooth loss, and periodontal disease in Japanese women. *J Dent Res.* 2001; 80: 1818-1822.
- 8) 佐藤連造, 稲垣幸司, 黒須康成, 夫馬大介, 吉成伸夫, 古川美喜子, 山根 隆, 野口俊英, 森田一三, 中垣晴男, 徳田隆一, 長谷川良広, 村田寛泰, 安藤正憲, 野田和裕, 墨 宏. 閉経後女性の歯周病所見と骨密度. *Osteoporosis Japan*. 2003; 11: 333 338.
- 9) Lian JB and Stein GS; Marcus R, Feldman D, Nelson DA, Rosen CJ, ed. Osteoblast Biology in Osteoporosis. 3rd ed. TOKYO: ELSEVIER; 2008: 93-150.
- 10) Ohuchi H, Hori Y, Yamasaki M, Harada H, Sekine K, Kato S and Itoh N. FGF 10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 277: 643-649.
- 11) Kim HJ, Rice DP, Kettunen PJ and Thesleff I. FGF-, BMP- and Shh-mediated signalling pathways in the regulation of cranial suture morphogenesis and calvarial bone development. *Development.* 1998; 125: 1241- 1251.
- 12) Mansukhani A, Bellosta P, Sahni M and Basilico C. Signaling by fibroblast growth factor (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR 2) -activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. *J Cell Biol.* 2000; 149: 1297-1308.

- 13) Hartmann C and Tabin CJ. Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb. *Development*. 2000; 127: 3141-3159.
- 14) Zhang YW, Yasui N, Ito K, Huang G, Fujii M, Hanai J, Nogami H, Ochi T, Miyazono K and Ito Y. A RUNX 2/PEBP 2 alpha A/CBFA 1 mutation displaying impaired transactivation and Smad interaction in cleidocranial dysplasia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 10549-105554.
- 15) Yoon BS and Lyons KM. Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. *J Cell Biochem*. 2004; 93: 93-103.
- 16) Komori T. Runx 2, a multifunctional transcription factor in skeletal development. *J Cell Biochem*. 2002; 87: 1-8.
- 17) Kobayashi H, Gao Y, Ueta C, Yamaguchi A and Komori T. Multilineage differentiation of Cbfa 1-deficient calvarial cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 273: 630-636.
- 18) Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Himeno M, Narai S, Yamaguchi A and Komori T. Overexpression of Cbfa 1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J Cell Biol*. 2001; 15: 157-166.
- 19) Gordon JA, Tye CE, Sampaio AV, Underhill TM, Hunter GK and Goldberg HA. Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone*. 2007; 41: 462-473.
- 20) Tanaka K, Kitagawa Y and Kadowaki T. Drosophila segment polarity gene product porcupine stimulates the post-translational N-glycosylation of wingless in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2002; 277: 12816-12823.
- 21) Franzoso G, Carlson L, Xing L, Poljak L, Shores EW, Brown KD, Leonardi A, Tran T, Boyce BF and Siebenlist U. Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev*. 1997; 11: 3482-3496.
- 22) Arch RH, Gedrich RW and Thompson CB. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)-a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev*. 1998; 12: 2821-2830.
- 23) Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R and Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997; 89: 309-319.
- 24) Horwood NJ, Elliott J, Martin TJ and Gillespie MT. Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. *Endocrinology*. 1998; 139: 4743-4746.
- 25) Ammann P, Rizzoli R, Bonjour JP, Bourrin S, Meyer JM, Vassalli P and Garcia I. Transgenic mice expressing soluble tumor necrosis factor-receptor are protected against bone loss caused by estrogen deficiency. *J Clin Invest*. 1997; 99: 1699-1703.
- 26) Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H and Manolagas SC. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science*. 1992; 257: 88-91.
- 27) Johnson MJ and Recker RR; Marcus R, Feldman D, Nelson DA, Rose CJ, ed. Wnt Signaling in Bone. In *Osteoporosis*. TOKYO:ELSEVIER; 2008: 467-490.
- 28) Yun TJ, Chaudhary PM, Shu GL, Frazer JK, Ewings MK, Schwartz SM, Pascual V, Hood LE and Clark EA. OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD 40. *J Immunol*. 1998; 161: 6113-6121.
- 29) Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, Dupuis J, Osborne M, Folz C, Manning SP, Swain PM, Zhao SC, Eustace B, Lappe MM, Spitzer L, Zweier S, Braunschweiger K, Benckekroun Y, Hu X, Adair R, Chee L, FitzGerald MG, Tulig C, Caruso A, Tzellas N, Bawa A, Franklin B, McGuire S, Nogues X, Gong G, Allen KM, Anisowicz A, Morales AJ, Lomedico PT, Recker SM, Van Eerdewegh P, Recker RR and Johnson ML. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet*. 2002; 70: 11-19.
- 30) Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH, Glass DA 2nd, Hartmann C, Li L, Hwang TH, Brayton CF, Lang RA, Karsenty G and Chan L. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp 5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol*. 2002; 157: 303-314.
- 31) Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T and Higashio K. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 234: 137-142.
- 32) Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R and Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997; 89: 309-319.
- 33) Wada T, Nakashima T, Hiroshi N and Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*. 2006; 12:17-25.
- 34) Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K and Ozawa H. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *J Clin Invest*. 2000; 105: 1573-1581.

- protegerin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 247: 610-615.
- 35) Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ and Simonet WS. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998; 12: 1260-1268.
- 36) Tsukii K, Shima N, Mochizuki S, Yamaguchi K, Kinoshita M, Yano K, Shibata O, Udagawa N, Yasuda H, Suda T and Higashio K. Osteoclast differentiation factor mediates an essential signal for bone resorption induced by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3, prostaglandin E2, or parathyroid hormone in the microenvironment of bone. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 246: 337-341.
- 37) Matsuzaki K, Udagawa N, Takahashi N, Yamaguchi K, Yasuda H, Shima N, Morinaga T, Toyama Y, Yabe Y, Higashio K and Suda T. Osteoclast differentiation factor (ODF)induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 246: 199-204.
- 38) Min JK, Kim YM, Kim YM, Kim EC, Gho YS, Kang II, Lee SY, Kong YY and Kwon YG. Vascular endothelial growth factor up-regulates expression of receptor activator of NF-kappa B(RANK)in endothelial cells. Concomitant increase of angiogenic responses to RANK ligand. *J Biol Chem.* 2003; 278: 39548-39557.
- 39) Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, Kelley M, Hsu H, Boyle WJ, Dunstan CR, Hu S and Lacey DL. The ligand for osteoprotegerin(OPGL)directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol.* 1999; 145: 527-538.
- 40) Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J and Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998; 93: 165-176.
- 41) Mizuno A, Kanno T, Hoshi M, Shibata O, Yano K, Fujise N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Tsuda E, Murakami A, Yasuda H and Higashio K. Transgenic mice overexpressing soluble osteoclast differentiation factor(sODF)exhibit severe osteoporosis. *J Bone Miner Metab.* 2002; 20: 337-344.
- 42) Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Douglall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D and Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature.* 1997; 390: 175-179.
- 43) Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB and Boyle WJ. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 3540-3545.
- 44) Oyajobi BO, Anderson DM, Traianedes K, Williams PJ, Yoneda T and Mundy GR. Therapeutic efficacy of a soluble receptor activator of nuclear factor kappaB-IgG Fc fusion protein in suppressing bone resorption and hypercalcemia in a model of humoral hypercalcemia of malignancy. *Cancer Res.* 2001; 61: 2572-2578.
- 45) Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, Morinaga T and Higashio K. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 253: 395-400.
- 46) Jimi E, Akiyama S, Tsurukai T, Okahashi N, Kobayashi K, Udagawa N, Nishihara T, Takahashi N and Suda T. Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J Immunol.* 1999; 163: 434-442.
- 47) Weitzmann MN and Pacifici R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J Clin Invest.* 2006; 116: 1186-1194.
- 48) Charatcharoenwithaya N, Khosla S, Atkinson EJ, McCready LK and Riggs BL. Effect of blockade of TNF-alpha and interleukin-1 action on bone resorption in early postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2007; 22: 724-729.
- 49) Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM and Pike JW. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97: 7829-7834.
- 50) Srivastava S, Toraldo G, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP and Pacifici R. Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation. *J Biol Chem.* 2001; 276: 8836-8840.
- 51) Gao Y, Qian WP, Dark K, Toraldo G, Lin AS, Guldborg RE, Flavell RA, Weitzmann MN and Pacifici R. Estrogen prevents bone loss through transforming growth factor beta signaling in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 16618-16623.

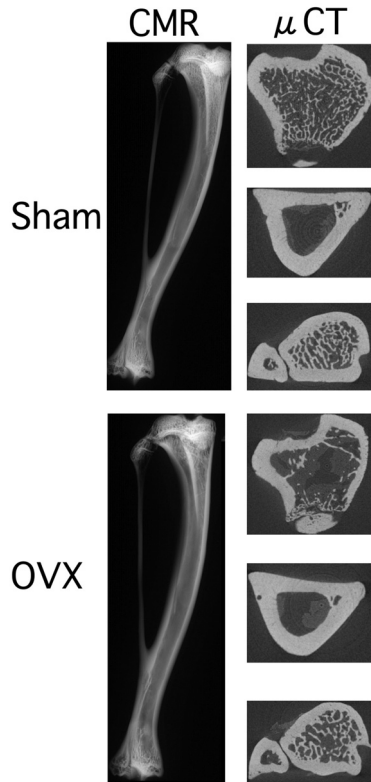


図 1 A

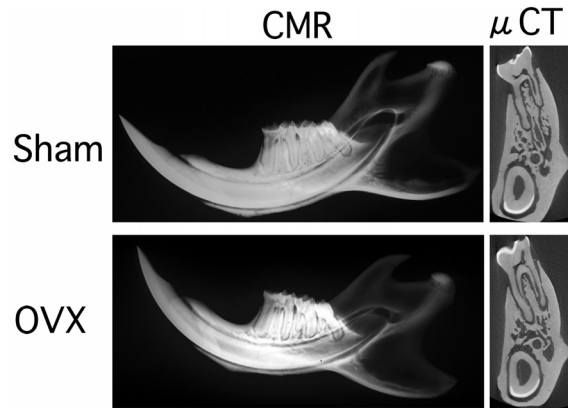


図 1 B

図 1 A . CMR による顎骨の皮質骨は Sham と OVX いずれにも差を認めないが骨端部の海綿骨では OVX で明らかな骨梁減少がみられる . マイクロ CT による OVX では骨端部で明らかな海綿骨減少がみられるが , 個々の骨梁は太い傾向を示す . (3 ヶ月 , 顎骨)

図 1 B . CMR による下顎骨の海綿骨梁は OVX で下顎枝 , 下顎角 , 筋突起で減少し , 骨髓腔や切歯歯胚腔などの開大もみられる . マイクロ CT では骨髓や歯根膜腔の開大が明瞭にみられる . (3 ヶ月 , 下顎骨)



図 2 A

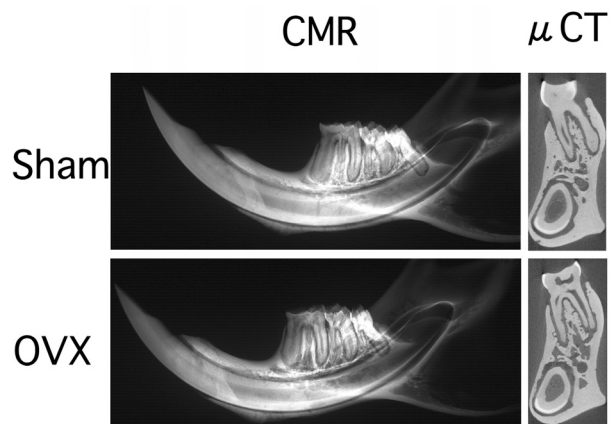


図 2 B

図 2 A . CMR による顎骨骨端部の海綿骨では OVX で明らかな骨梁減少がみられ , マイクロ CT による OVX でも骨端部で明らかな海綿骨減少と皮質骨内面の溝状骨欠損がみられる (矢印) . (6 ヶ月 , 顎骨)

図 2 B . CMR による下顎骨の海綿骨梁は OVX で下顎枝 , 下顎角 , 筋突起で減少し , マイクロ CT では明瞭な骨体部の海綿骨減少がみられる . (6 ヶ月 , 下顎骨)

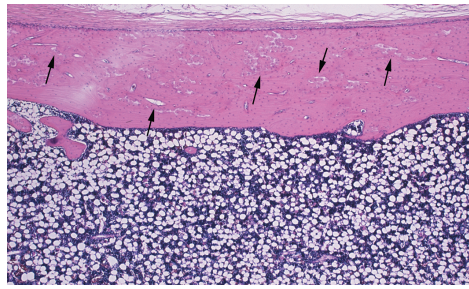


図 3 A

図 3 A . OVX 3 か月後の脛骨の HE 所見 , 皮質骨のハバース管 (arrow) およびフォルクマン管様の管の内腔の開大を認める (X × 40) .

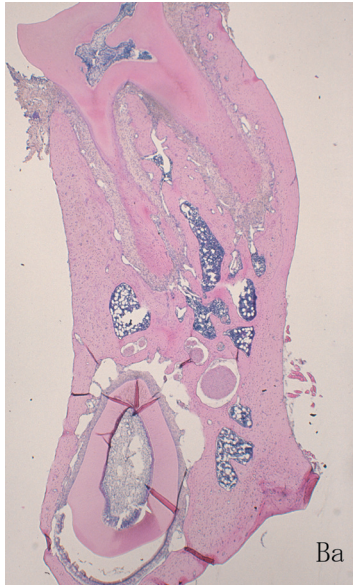


図 3 Ba

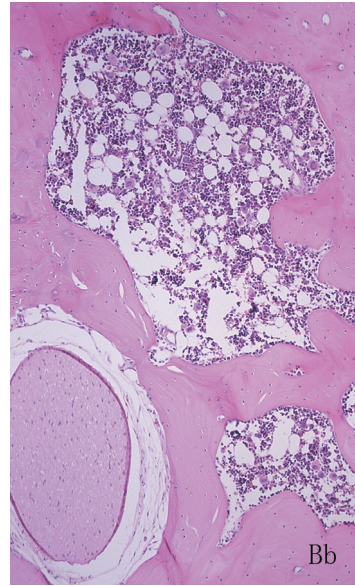


図 3 Bb

図 3 B . Sham (3 Ba) と OVX 3 か月 (3 Bb) の下顎骨の HE 所見 , Sham に比べて OVX の骨髓腔 , 切歯管等に吸収を認める (× 100) .

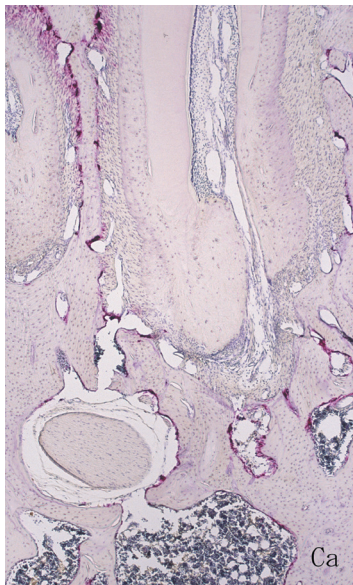


図 3 Ca

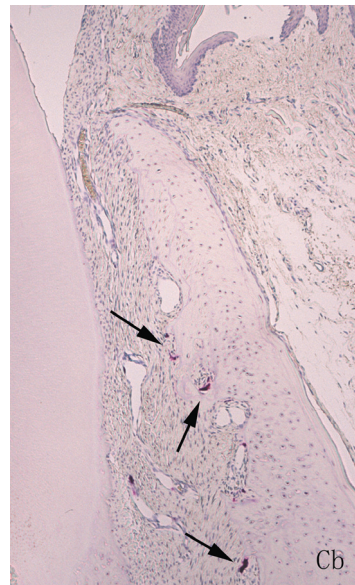


図 3 Cb

図 3 C . Sham (3 Ca , X20) と OVX 3 か月 (arrow) (3 Cb , × 40) の下顎骨の TRAP 染色所見 , TRAP 陽性細胞は , むしろ Sham の方に多く現れる傾向にあった .

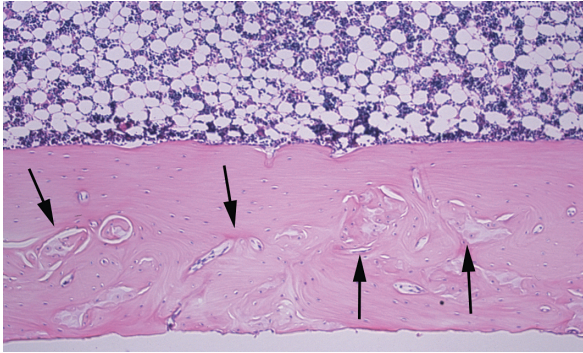


図 4 A

図 4 A . OVX 6 か月後の脛骨の HE 所見 , フォルクマン管様の管等 (arrow) の吸収の進行を認める (× 100) .

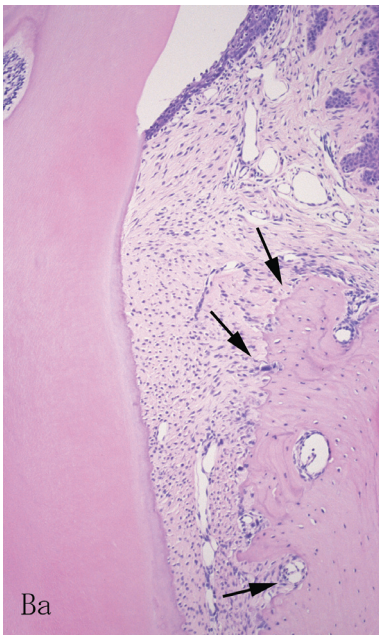


図 4 Ba

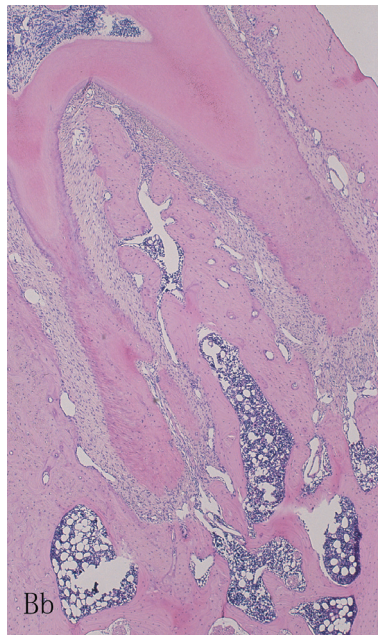


図 4 Bb

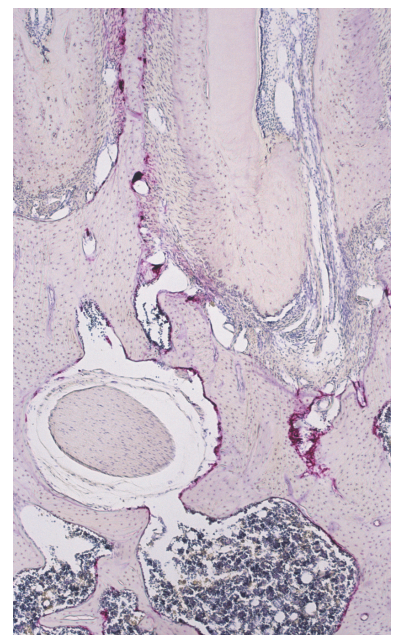


図 4 C

図 4 B . OVX 6 か月後の下顎骨の HE 所見 , 歯槽頂付近の歯槽骨面に僅かながら破骨細胞性骨吸収を認め (arrow) (4 Ba , × 100) , また , 骨髓腔を始めとする腔の内壁からの吸収の進行を認める (4 Bb , × 20) .

図 4 C . OVX 6 か月後の TRAP 染色所見 , 吸収されつつある骨面の多くに陽性細胞を認める (× 40) .

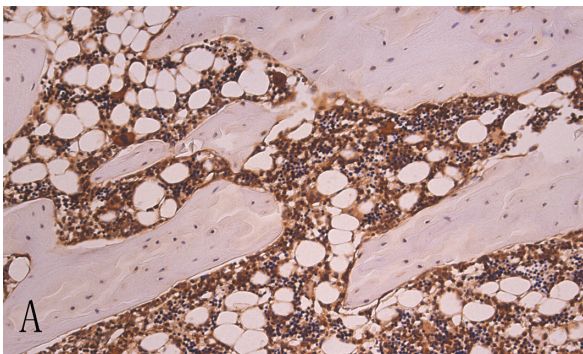


図 5 A

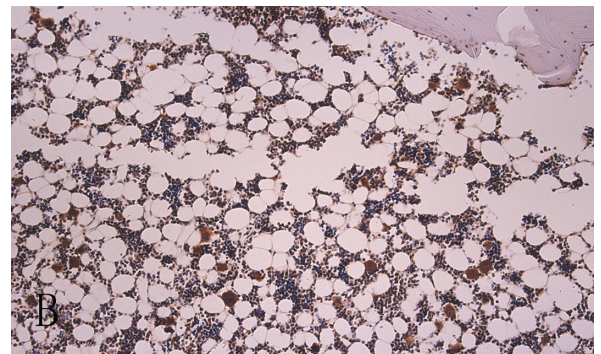


図 5 B

図 5 . bFGF の発現 , Sham では多種類の細胞に発現され (A , × 100) , OVX (B , × 100) では発現細胞数が低下した .

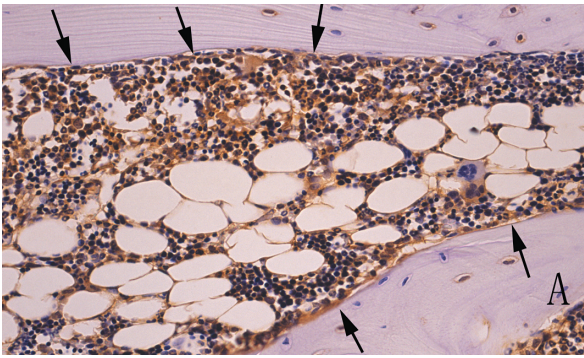


図 6 A

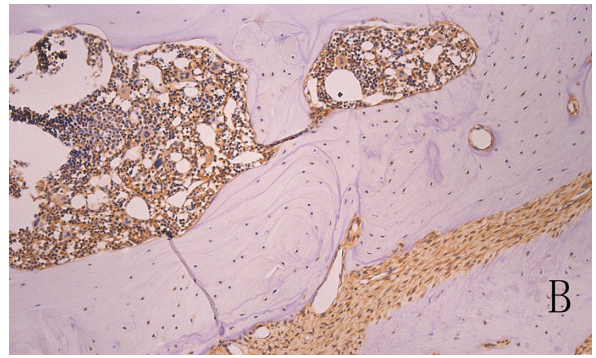


図 6 B

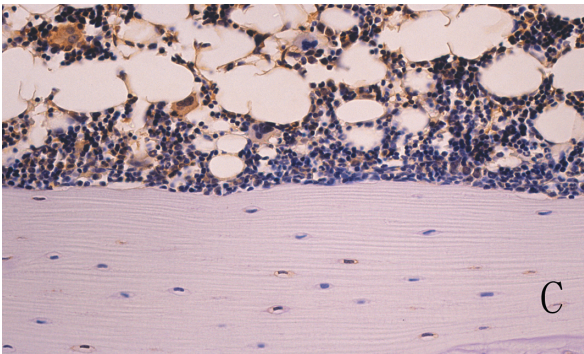


図 6 C

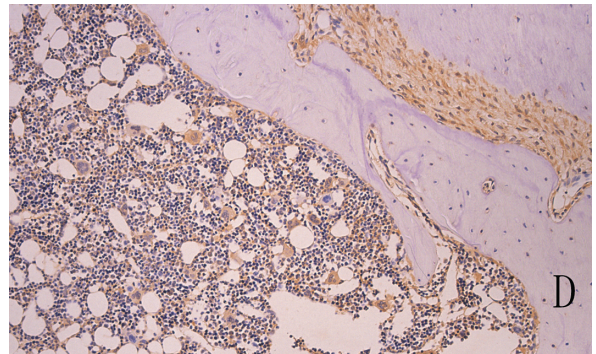


図 6 D

図 6 . BMP 2 / 4 の発現 , Sham の骨髓細胞や静止骨芽細胞等による発現 (arrow)(A , × 200) と , 下顎骨部の歯根膜細胞の発現 (B , × 100) , および OVX 3 か月後の脛骨 (C , × 100) と下顎骨 (D , × 100) における著しい発現低下 .

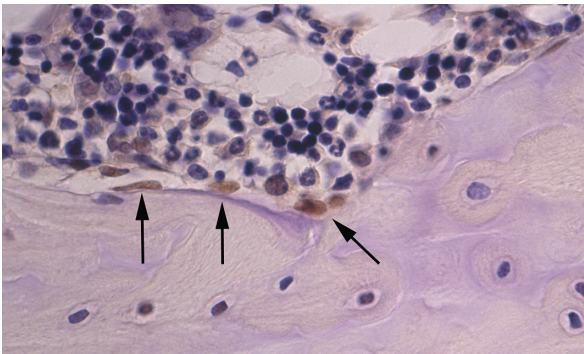


図 7 A

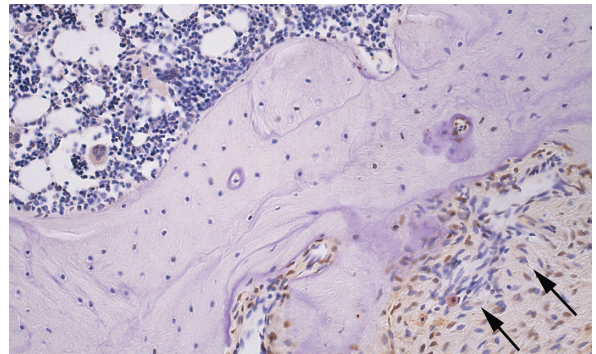


図 7 B

図 7 . Runx2 の発現 , Sham の海面骨部の発現 (arrow)(A , × 400) と , OVX 6 か月後の下顎骨部の発現低下 (arrow)(B , × 200)

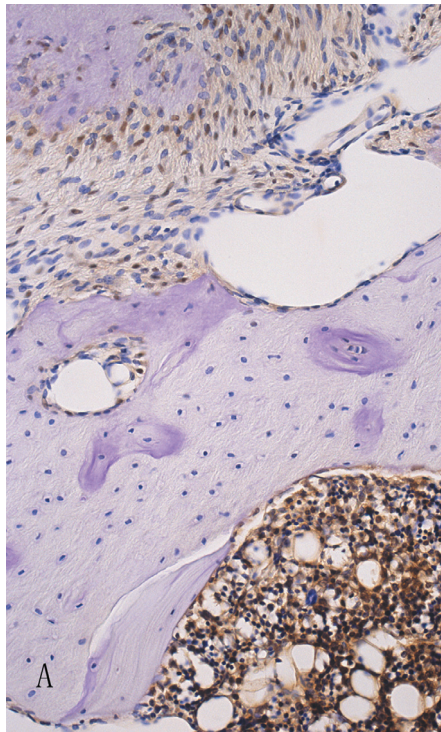


図 8 A

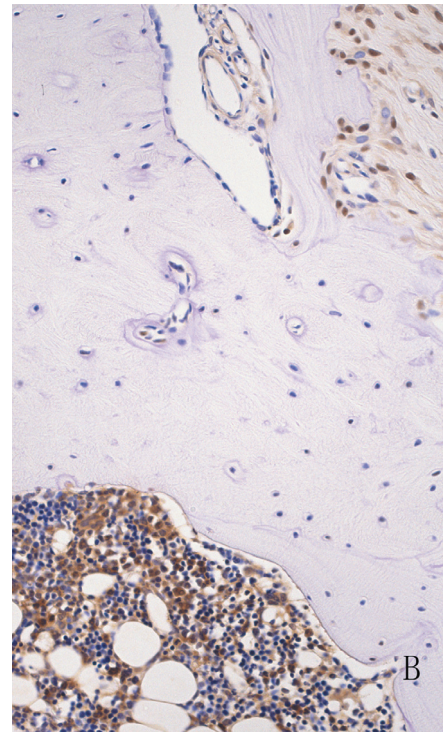


図 8 B

図 8 . Osterix の発現，Sham の下顎骨の発現（A，v200）と，OVX 6 か月後の発現低下（B，x200）.

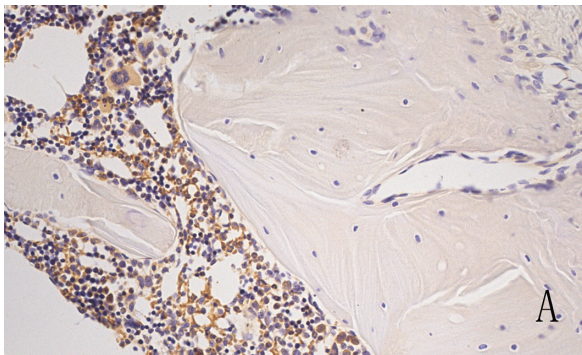


図 9 A

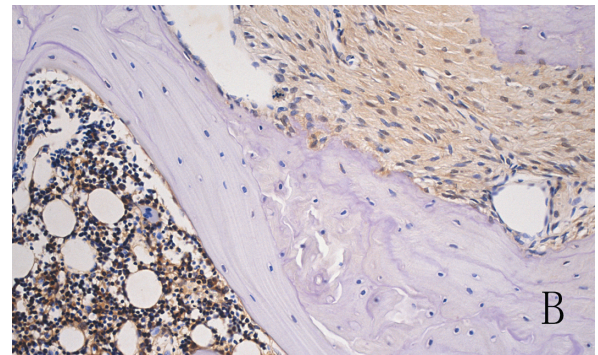


図 9 B

図 9 . Wnt の発現，Sham の下顎骨部の発現（A，x200）と，OVX 6 か月後の著しい発現低下（B，x200）.

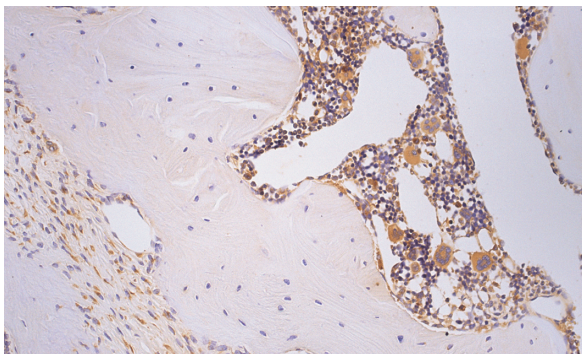


図10A

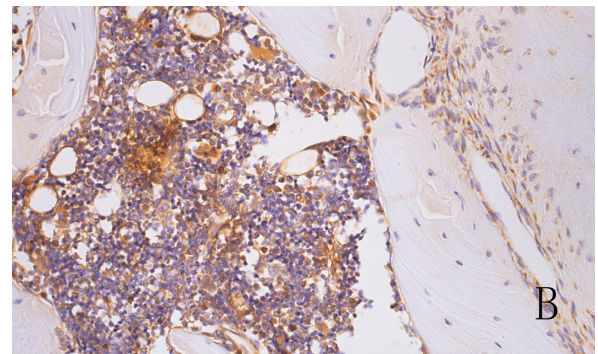


図10B

図10 . β catenin の発現，Sham の下顎骨部の発現（A，x200）と，OVX 6 か月後の著しい発現低下（B，X200）.

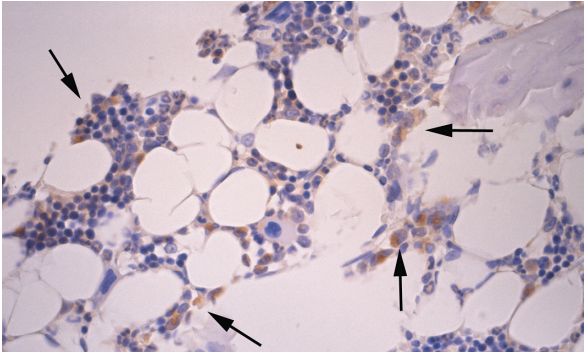


図11A

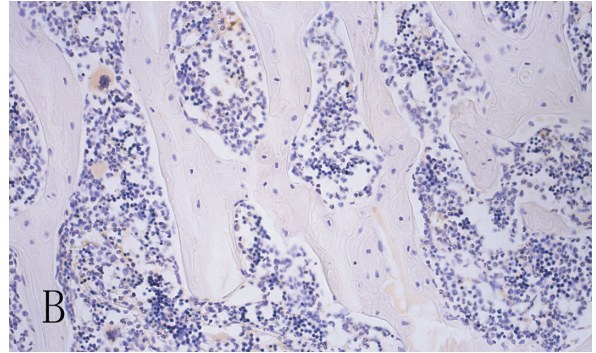


図11B

図11 . OPG の発現 , Sham の骨髓細胞の OPG の発現 (arrow)(A , × 400) と , 全く発現性を消失した OVX の海綿骨部 (B , × 400) .

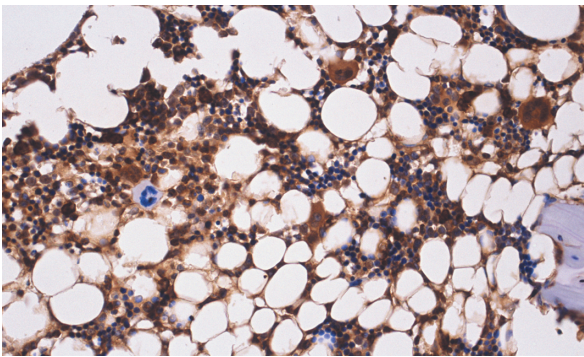


図12 . RANKL の骨髓細胞の発現 (× 200) .

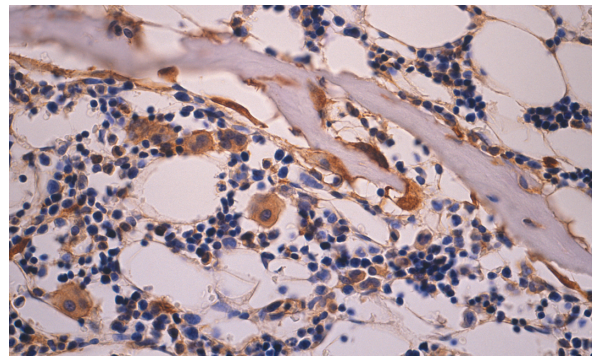


図13 . RANK の骨髓細胞の発現 (× 400) .