

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12045

研究課題名（和文）ポリリン酸エステルが骨密度・骨強度に与える影響：骨粗鬆症の新規治療法確立に向けて

研究課題名（英文）The effect of Poly (ethylene sodium phosphate) on bone strength and bone mineral density of femur in ovariectomized mice.

研究代表者

横田 淳司 (Yokota, Atsushi)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：10449564

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者らは、*in vitro*で破骨細胞の機能を特異的に阻害するポリリン酸エステル PEP・Naが、*in vivo*でも骨組織に長期間沈着することを先行研究で証明した。本研究では、PEP・Naを卵巣摘出マウスに投与し、PEP・Naの安全性およびPEP・Na投与がマウスの骨密度・骨強度に与える影響を、採血・バイオイメージング・ $\mu$ CTによる評価ならびに摘出標本の力学的評価により検討した。その結果、PEP・Naは卵巣摘出マウスの大腿骨遠位部海綿骨密度の減少を有意に抑制していた一方、血清生化学検査では重篤な有害事象を認めなかった。これよりPEP・Naが新規骨粗鬆症治療薬になり得る可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦では骨粗鬆症の約8割が未治療とされており、治療普及率の低さが問題となっている。薬物治療の第一選択として広く使われているBP製剤や、モノクローナル抗体製剤であるロモソズマブには様々な副作用も報告されており、低い治療普及率の一因になっていると思われる。そこで本研究では、新規ポリリン酸エステルPEP・Naが骨密度・骨強度に与える影響を検討し、その骨密度上昇効果と安全性を動物モデルにて証明した。今後、詳細な薬理作用や安全性について更なる検討が必要であるが、PEP・Naが骨粗鬆症患者にとってより安全、安価かつ有効性、利便性が高い新規治療薬になり得る可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：To clarify the effect of newly-synthesized Poly (ethylene sodium phosphate), PEP・Na on bone strength and bone mineral density of femur, twelve-week-old ovariectomized (OVX) mice were administered multiple doses of PEP・Na (MPN group) every 4 weeks (total 3 doses). MPN mice were compared with OVX control mice (CTL group) by high-resolution peripheral quantitative computed tomography analyses at different time points to evaluate the BMD of the femur. In addition, biochemical examinations of the blood specimens were analyzed to assess the safety of PEP・Na administration. The increasing rate in BMD of MPN mice was significantly higher than that in the CTL group. Moreover, no adverse effects by PEP・Na administration were observed. These results indicate PEP・Na holds therapeutic potential for future application as treatment for osteoporosis.

研究分野：整形外科学

キーワード：ポリリン酸エステル 骨粗鬆症 骨密度 卵巣摘出マウス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本邦人口の急激な高齢化に伴い、骨粗鬆症患者は年々増加し、現在の患者数は1280万人と推定されている<sup>1)</sup>。骨粗鬆症は骨折リスクを高めることで要介護・寝たきりの原因となることから、食事、運動指導に加え、有効な薬物治療を行うことが骨折予防のみならず高齢者の健康寿命の延長につながることを期待される。しかし、現実には骨粗鬆症患者の約8割が未治療といわれ、治療普及率の低さが問題となっており、この原因として高い薬価や薬物治療に対するアドヒアランス不良が考えられている。実臨床の場においては、既存の治療では副作用により服薬を中止せざるを得ないケース、服薬を継続しても目立った骨密度の改善が得られず、患者が治療へのモチベーションを失い drop out するケースを経験する。

現在、骨粗鬆症の治療薬の第一選択はビスホスホネート (BP) 製剤であり、その骨折予防効果についてのエビデンスも蓄積され、広く用いられている。一方、BP 製剤の副作用として、これまでに消化器障害、急性期反応、顎骨壊死、非定型大腿骨骨折、心房細動、食道がんなどが指摘されている<sup>2)</sup>。注射 BP 製剤のゾレドロン酸では、急性期反応を中心に副作用が60%弱に認められ、低分子化合物の BP 製剤では不可避の副作用とも考えられる。骨粗鬆症患者の多くは様々な併存症を有する高齢者であり、有害事象が発生すると治療を中止せざるを得ないケースが少なくないため、より安全・安価かつ有効性の高い新規骨粗鬆症治療薬に対するニーズは依然として高い。

研究分担者の岩崎は、BP 製剤と同様の薬理作用を持ち、副作用が出にくいとされる高分子化合物の合成に関する基礎研究を行い、*in vitro* で破骨細胞を選択的に阻害するポリリン酸エステル PEP・Na を合成した<sup>3)</sup>。研究代表者は、マウスを用いたバイオイメージングによる評価を行い、PEP・Na が *in vivo* でも骨組織への親和性が高い事を先行研究で見出した<sup>4)</sup>。

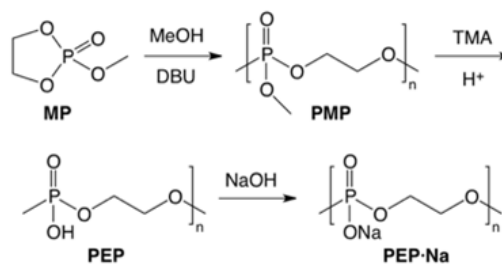


図1 PEP・Na の合成

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、PEP・Na を卵巣摘出マウスに投与し、PEP・Na の安全性および PEP・Na 投与がマウスの骨密度・骨強度に与える影響を、バイオイメージング・ $\mu$ CT・血清生化学検査による評価および摘出標本の力学的評価により検討し、PEP・Na が既存の骨粗鬆症治療薬より高い安全性と骨密度上昇効果を有するかを明らかにすることであった。

### 3. 研究の方法

- 動物モデル：7週齢の雌ICRマウスを用いた。バイオイメージングのみ無処置のマウスを10匹用いた。その他すべての解析には37匹のマウスを実験群 (N=26) と SHAM群 (N=11) に分け、実験群は腹側アプローチにより卵巣を摘出、SHAM群は皮膚切開のみ行った。実験群はさらに MPN (multiple doses of PEP・Na) 群、CTL (control) 群に分け、術後4週時より4週おきに

MPN 群 (N=12)：PEP・Na (10mg/ml) 0.1ml

CTL 群 (N=14)：生食 0.1ml

を尾静脈より計3回注射した。

- バイオイメージング：無処置ICRマウスを脱毛処置後、蛍光色素Cy-5で標識した PEP・Na (10mg/ml) 0.1ml および生食 0.1ml をマウス尾静脈より静注し、IVIS

Lumina XR (住商ファーマ、東京) を用いたバイオイメージングを行い、注入直後より8週間後までPEP・Naの体内動態を経時的に評価した(N=10)。

- $\mu$ CT による骨密度定量： $\mu$ CT (Latheta LCT-200, 日立アロカ,  $48\mu\text{m/slice}$ )を用いて、4週毎に計4回(8週齢・12週齢・16週齢・24週齢)、大腿骨遠位部で膝関節面より2mmを始点とし、近位30 sliceにおける海綿骨密度を評価した。OVX効果を評価するため8週齢を基準とし12週齢までは実験群とSHAM群に対して、また薬剤投与効果を評価するため12週齢を基準とし16週齢・24週齢まではP群とS群に対して、海綿骨密度の変化率を算出し比較した(MPN群N=12, CTL群N=14, sham群N=11)。
- 血清生化学検査：24週齢時、両実験群およびSHAM群に対して心臓穿刺による採血を施行し、腎機能 (BUN, クレアチニン)、肝機能 (AST, ALT)、電解質 (Na, K) および骨代謝マーカー (ALP, TRAP-5b) を測定した(各群N=5)。
- 力学的評価(N=5)：24週齢時、両実験群およびSHAM群より大腿骨を採取し、引っ張り試験機 (AGS-5kNX, 島津製作所, 京都) を用いて3点曲げ試験を行ない、maximum bending forceとstressを計測した (各群N=5)。

#### 4. 研究成果

- バイオイメージング：大腿骨遠位において、蛍光色素標識PEP・Na投与群のシグナルは、投与直後より投与後8週間のすべてのタイムポイントにおいて、生食投与群より有意に高く、安全性を重視し先行研究の1/10の濃度(10mg/ml)を投与してもPEP・Naが長期にわたり骨内に沈着することが示された(図2,  $p < 0.001$ )。

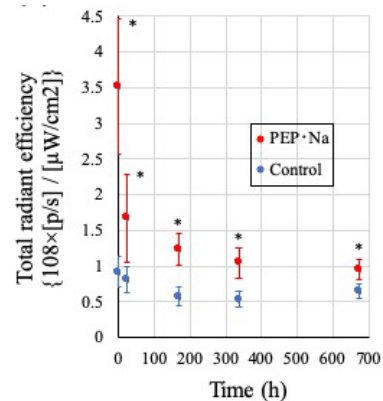


図2 バイオイメージング結果

- $\mu$ CT による骨密度定量：8週齢から12週齢において実験群はsham群より海綿骨密度は有意に低下し

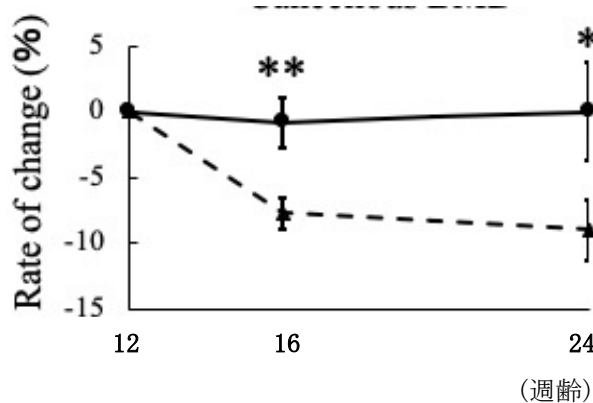


図3  $\mu$ CTによる海綿骨密度の経時的変化

(実線：MPN群、点線：CTL群)

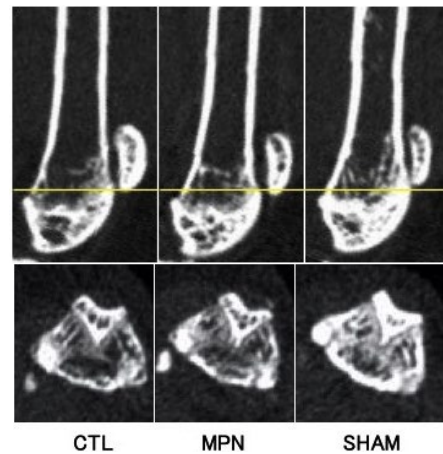


図4 24週齢時のCT画像

(上段：矢状断再構成、下段：横断)

ていた(OVX群:-18.2%, C群:-3.1%,  $p < 0.0001$ )。12週齢から16週齢においてP群はS群より海綿骨密度の低下が有意に小さく(図3, P群:-0.9%, S群:-7.7%,  $p = 0.0075$ )、最終24週齢においても同様の効果が持続していた(図3, 4, P群:+0.5%, S群:-9.0%,  $p = 0.0206$ )。

- 血清生化学検査：明らかな腎機能、肝機能障害は認めなかったが(図5a-d)、血中K値はMPN群でCTL群、SHAM群より有意に上昇していた(図5f)。血清ALP値はMPN群がCTL群、SHAM群より高値を示したがその差は有意ではなかった(図5g)。TRACP-5b値はMPN群およびCTL群はSHAM群の値より有意に低値を示したが、両実験群間には差はなかった(図5h)。

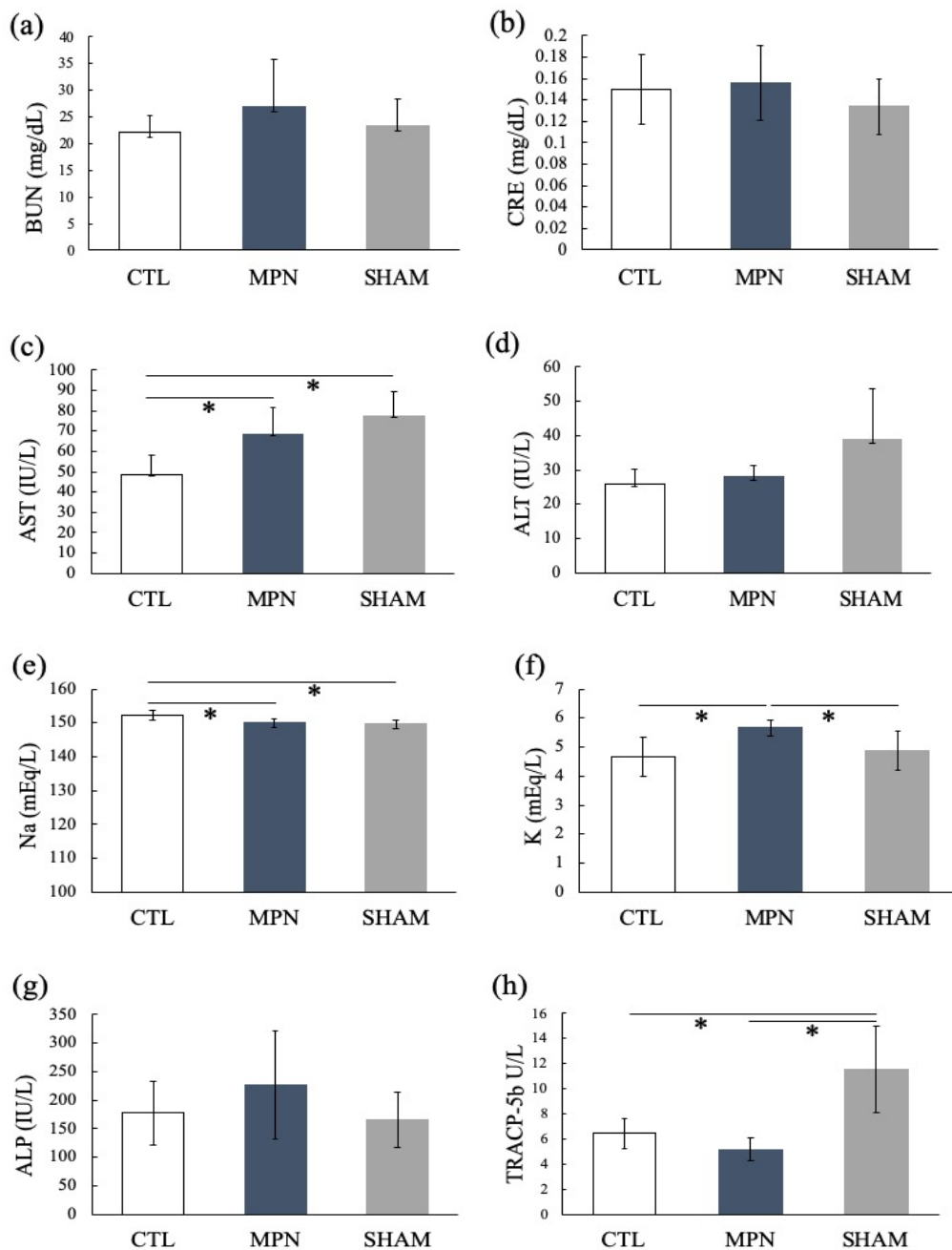


図5 血清生化学検査結果 (a)BUN(b)クレアチニン(c)AST(d)ALT(e)Na(f)K(g)ALP(h)TRACP-5b

- 力学的評価：maximum bending forceはMPN群、CTL群でSHAM群の値より有意に低かった。stressはMPN群がCTL群、SHAM群より高値を示したがその差は有意ではなかった(図6b)。

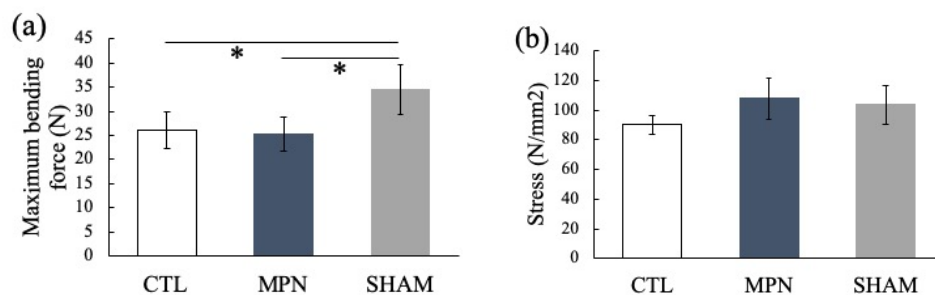


図6 力学的評価(a) maximum bending force (b) stress

参考文献

1. 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2015年版 pp4-5

2. 宗圓聡 最新医学 69卷10号 : 20-5, 2014年.
3. Yoon HY, et al. J Bone MinerMetab. 30: 509-16, 2012.
4. Iwasaki Y, Yokota A, et al. Biomater Sci. 6(1):91-95, 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木野圭一朗、横田淳司、岩崎泰彦、大高晋之、水谷正洋、根尾昌志
2. 発表標題 ポリリン酸エステルが卵巣摘出マウスの大腿骨密度に与える影響：経時的CTによる評価
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水谷正洋、横田淳司、岩崎泰彦、大高晋之、木野圭一朗、根尾昌志
2. 発表標題 ポリリン酸エステルが卵巣摘出マウスの腰椎密度に与える影響：マイクロCTを用いた経時的評価
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 リン酸ジエステル-リン酸トリエステル共重合体および合成方法ならびに骨標的薬物輸送担体	発明者 岩崎 泰彦、大高 晋之、横田 淳司、根尾 昌志	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、第6679067号	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岩崎 泰彦  (Iwasaki Yasuhiko)  (90280990)	関西大学・化学生命工学部・教授    (34416)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------