

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11753

研究課題名(和文) 骨形成作用を有する抗DKK-1抗体の効果メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of mechanism for anti DKK-1 antibody possessing bone formation

研究代表者

井上 美穂 (INOUE, Miho)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教

研究者番号：20271059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：歯科補綴においては、骨欠損部位あるいは吸収した顎堤を補う治療が必要である。骨細胞や骨芽細胞から産生されるDickkopf1(DKK-1)は、骨芽細胞の分化抑制作用が報告されている。本研究では、抗DKK-1抗体の骨髄細胞への骨分化能に対する影響ならびに骨粗しょう症モデルマウスにおける骨形成能メカニズムを検討することを目的とした。細胞レベルでの影響はあまり認められなかったが、骨粗しょう症モデルマウスにおいては、明らかに骨量が増加し、破骨細胞の減少傾向が認められた。抗DKK1抗体投与により、骨吸収の抑制ではなく、骨形成の促進によって骨量が増加した可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

補綴歯科治療においては、骨欠損部位あるいは吸収した顎堤を補う処置が必要なことが多い。骨細胞や骨芽細胞から産生されるDKK-1は、骨代謝を阻害する因子で、DKK-1による骨芽細胞の分化抑制作用が報告されている。抗DKK-1抗体は全身投与での骨粗しょう症治療薬として期待されており、我々は局所投与においても骨形成促進作用を示すと期待している。

研究成果の概要(英文)：In the dental prosthesis, it is necessary the treatment to make up for a bone defect part or the residual ridge. The inhibition of osteoblasts differentiation is reported in Dickkopf1 (DKK-1) produced by a bone cell and osteoblasts. In this study, it was intended that I examined influence on bone differentiation ability to the bone marrow cell of the antiDKK-1 antibody and the osteoplasty ability mechanism in the osteoporosis model mouse. The influence at the cellular level was not accepted. However, in the osteoporosis model mouse the bone masses increased obviously, a tendency to decrease of the osteoclast was detected. By the antiDKK1 antibody dosage, the possibility that bone masses increased was suggested by bone morphogenetic promotion not inhibition of the bone resorption.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：抗DKK-1抗体 骨形成 骨代謝 骨粗しょう症 TNF-

1. 研究開始当初の背景

補綴歯科治療においては、骨欠損部位あるいは吸収した顎堤を補う処置が必要なが多い。骨細胞や骨芽細胞から産生される Dickkopf1 (DKK-1) は、骨代謝における Wnt/カテニンシグナル経路の阻害因子であり、DKK-1 による骨芽細胞の分化抑制作用が報告されている。抗 DKK-1 抗体は全身投与での骨粗しょう症治療薬として期待されており、我々は局所投与においても骨形成促進作用を示すと期待している (図1)。

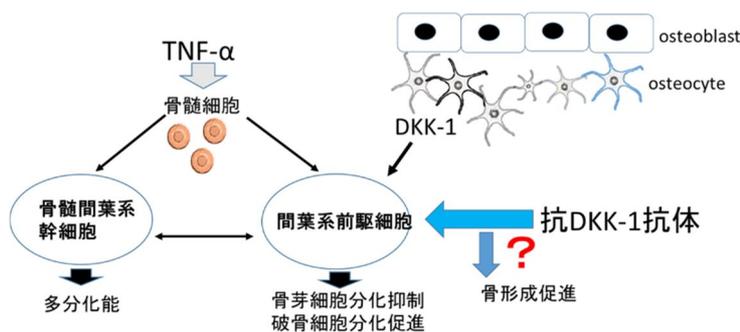


図1 抗DKK-1抗体とTNF-αの骨髄細胞の関連予想図

2. 研究の目的

本研究では、抗 DKK-1 抗体の骨髄細胞への骨分化能に対する影響ならびに骨粗しょう症モデルマウスにおける骨形成能メカニズムを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

マウス骨髄細胞は 8 週齢 C3H マウス的大腿骨・脛骨から骨髄を採取し、10%FBS 含有 -MEM 培地にて細胞培養・継代を行った。3 代継代し、1 日後に抗 DKK-1 抗体(1mg/mL) 阻害物質としての rTNF- (10ng/mL) を添加し、細胞評価として細胞増殖能 (MTS Assay、細胞分化能 (定量的 RT-PCR、ALP 活性、アリザリンレッド染色) にて確認した。骨粗しょう症モデルマウスは、8 週齢 C3H マウスの卵巣を摘出し、4 週後に抗 DKK-1 抗体 (10mg/mL) を腹腔内投与した。1 週後に上顎第 1 大臼歯を抜歯した。その後、μCT 解析、パラフィン包埋にて組織学的に検討を行った (図 2))

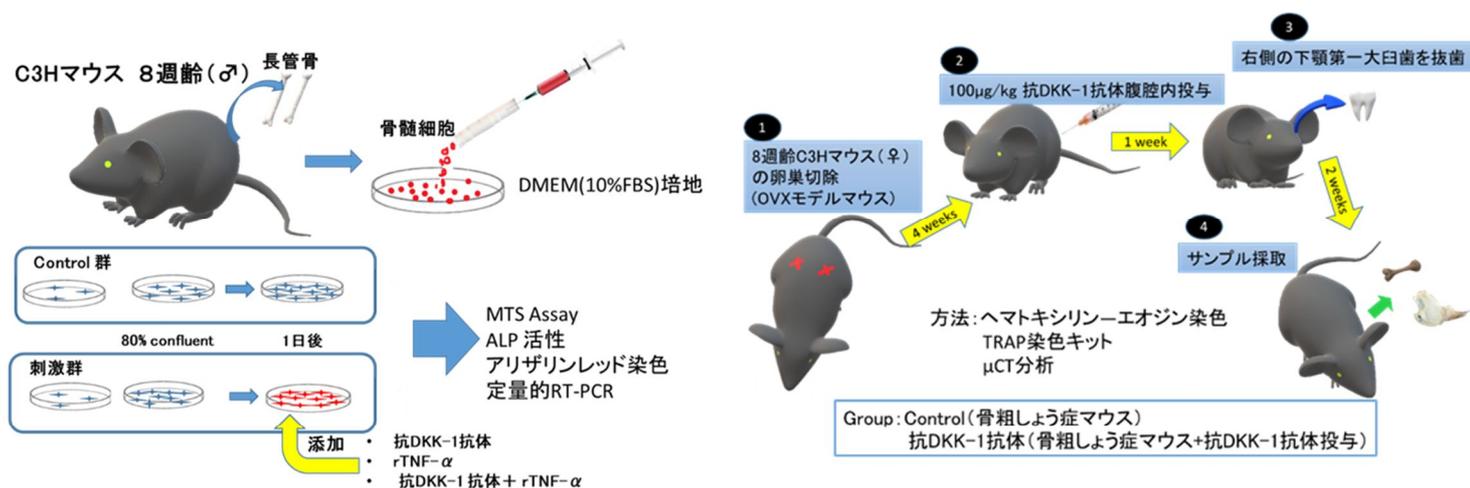


図2 実験方法：細胞培養実験および骨粗しょう症モデルマウスを用いた動物実験方法

4. 研究成果

細胞培養実験において、抗 DKK-1 抗体は、細胞増殖（図 3） ALP 活性（図 4）ではコントロールと比較して差がなかった。定量的 RT-PCR においてはオステオカルシンの高い発現（図 5）と、アリザリンレッド染色では 7 日後では若干強い染色が認められた（図 6）。一方、TNF- α 処理単独、及び TNF- α +抗 DKK-1 抗体処理では、ALP 活性（図 4）アリザリンレッド染色(図 6)は抑制されたが、オステオカルシンの発現（図 5）は TNF- α + 抗 DKK-1 抗体処理で高い値を示した。

図3 MTS assay

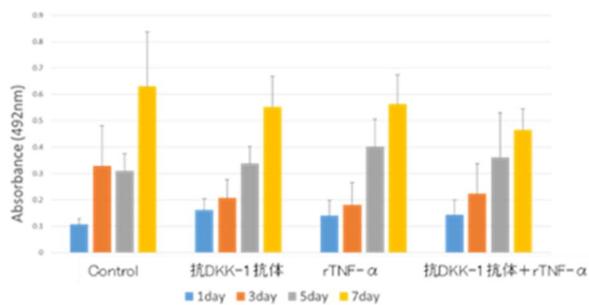


図5 定量的RT-PCR (Osteocalcin, 7day)

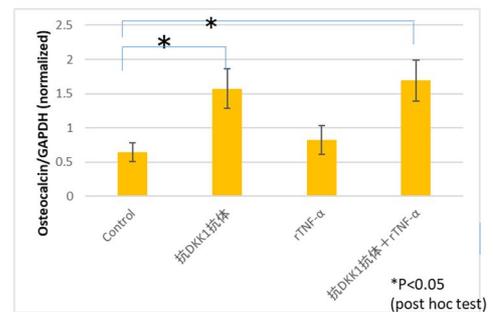


図4 ALP活性

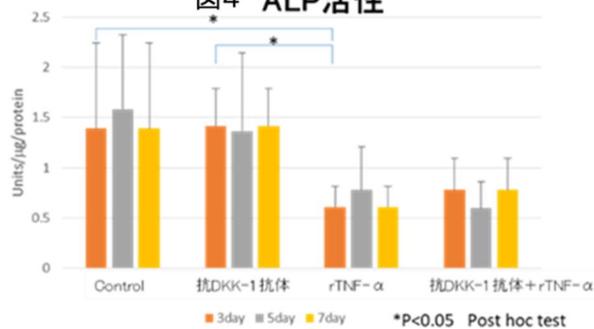
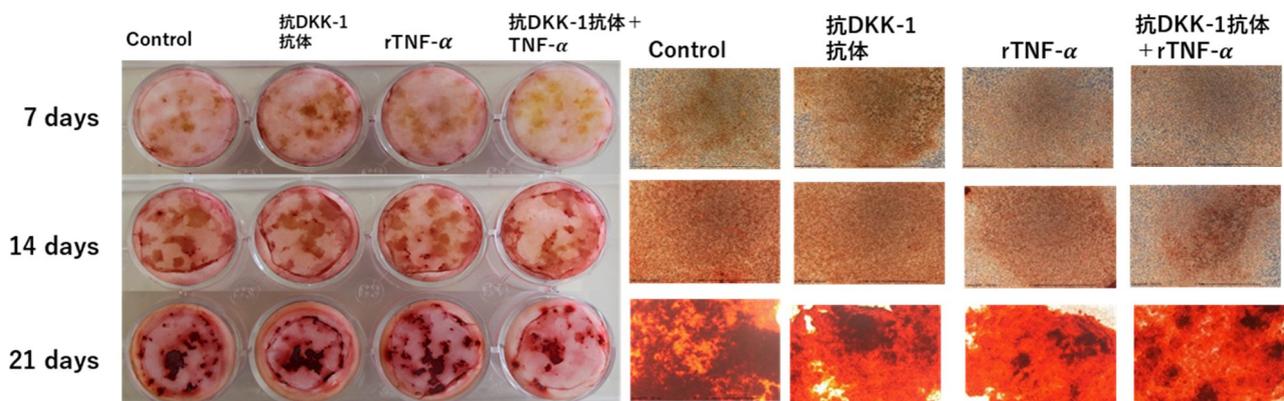


図6 アリザリンレッド染色



骨粗しょう症モデルマウスを用いた動物実験では、 μ CT 解析において抗 DKK-1 抗体投与群で骨量の増加が認められ（図 7）組織学的に骨量増加と破骨細胞の減少傾向が認められた（図 8）。抗 DKK-1 抗体投与によって、長管骨成長板付近での骨量の差が認められた（図 8）。しかし、TRAP 陽性細胞である破骨細胞の差は認められなかった（図 8）。顎骨においては、組織学的に、抗 DKK-1 抗体投与群において、炎症細胞浸潤、破

骨細胞浸潤が認められ、抜歯窩の治癒が促進された（図9）。

図7 長管骨における μ CT分析

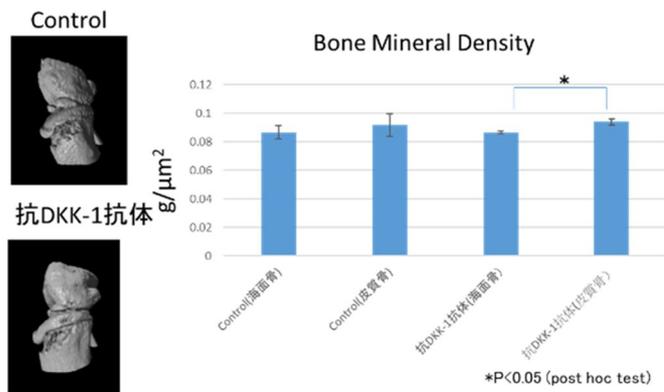


図8 長管骨における組織学的検討

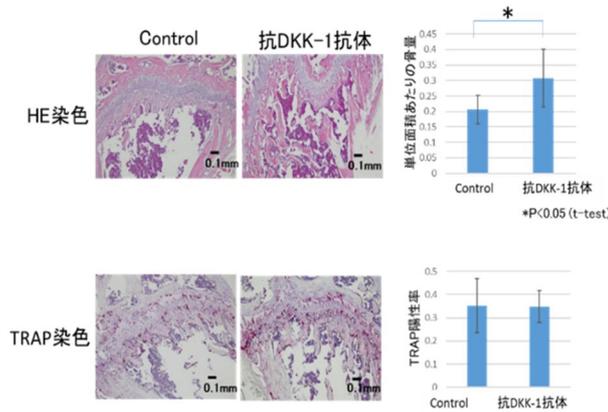
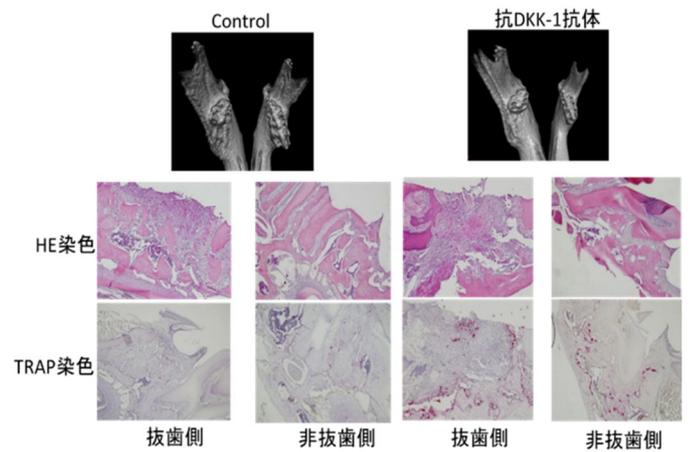


図9 顎骨における組織学的検討



以上より、抗 DKK-1 抗体投与により、細胞増殖能・分化能への影響は少ないものの、骨粗しょう症モデルでは明らかに骨量の回復、骨形成能の増加が認められ、骨吸収の抑制ではなく、骨形成の促進によって骨量が増加した可能性が示唆された。

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 井上美穂、Raju Resmi、岩浅匠真、秋山謙太郎、大島正充、窪木拓男、松香芳三
2. 発表標題 抗Dickkopf1(DKK-1)抗体による骨分化能への影響と骨粗しょう症に対する骨分化能メカニズムの解明
3. 学会等名 公益社団法人日本歯科補綴学会第128回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Raju R, 井上美穂, 宮城麻友, 秋山謙太郎, 大島正充, 井上正久, 松香芳三.
2. 発表標題 抗Dickkopf1(DKK-1)抗体による骨髄細胞の骨分化能への影響
3. 学会等名 硬組織再生生物学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	井上 正久 (INOUE Masahisa) (20223274)	徳島文理大学・薬学部・教授 (36102)	
研究分担者	宮城 麻友 (MIYAGI Mayu) (20625719)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教 (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	松香 芳三 (MATSUKA Yoshizo) (90243477)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・教授 (16101)	

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