

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2020

課題番号：18H06332・19K21416

研究課題名(和文) 成長期における骨吸収抑制薬の作用機序の解明

研究課題名(英文) Biological Effects of Anti-RANKL Antibody and Zoledronic Acid on Growth in Growing Mice

研究代表者

井澤 基樹 (Isawa, Motoki)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：20827373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨吸収抑制薬は小児の骨関連疾患治療にも用いられているが、それが成長に及ぼす影響を及ぼすかは不明である。本研究では、2種類の骨吸収抑制薬、抗RANKL抗体製剤およびビスホスホネート製剤を用いて、若齢マウスの成長、骨および歯に及ぼす影響を解明することを目的とした。これらの薬を生後1週目に単回投与のみ、もしくは生後1週間から週1回ずつ計7回皮下投与し、体長・体重・骨形態計測・組織解析を行った。抗RANK抗体はマウスの成長発育に異常を示さなかったが、ゾレドロネートは成長および臼歯部の歯根伸長を抑制した。以上より、抗RANKL抗体はゾレドロネートよりも小児への安全性が高いと推察される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨吸収抑制薬は小児の骨関連疾患治療にも用いられているが、それが成長に及ぼす影響を及ぼすかは不明であった。本研究によって、抗RANKL抗体製剤およびビスホスホネート製剤を用いて、若齢マウスの成長、骨および歯に及ぼす影響を解明することを目的とした。抗RANKL抗体はゾレドロネートよりも、成長や歯には変化が認められなかったため、小児への安全性が高いと推察される。

研究成果の概要(英文)：The anti-bone resorptive drugs denosumab, an anti-human-RANKL antibody, and zoledronic acid (ZOL), a nitrogen-containing bisphosphonate, have recently been applied for treatment of pediatric patients with bone diseases, though details regarding their effects in growing children have yet to be fully elucidated. In the present study, we administered these anti-resorptive drugs to mice from the age of 1 week and continued once-weekly injections for a total of 7 times. Mice that received the antiRANKL antibody displayed normal growth and tooth eruption, though osteopetrotic bone volume gain in long and alveolar bones was noted, while there were nearly no osteoclasts and a normal of number osteoblasts observed. In contrast, ZOL significantly delayed body growth, tooth root formation, and tooth eruption, with increased osteoclast and decreased osteoblast numbers. These findings suggest regulation of tooth eruption via osteoblast differentiation by some types of anti-resorptive drugs.

研究分野：小児歯科

キーワード：骨吸収抑制薬 抗RANKL抗体 ビスホスホネート 破骨細胞 成長

## 1. 研究開始当初の背景

胎児期や青年期における骨のリモデリングは、脊椎動物の成長にとって不可欠である。正常な骨は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスによって発達する。破骨細胞の分化および機能は、RANKL(Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand)によって調節される。RANK が RANKL に結合すると、単球マクロファージ前駆細胞は単核破骨細胞に分化し、単核破骨細胞は融合して多核成熟破骨細胞になり、骨吸収を行う。遺伝子異常などの内因や投薬などの外因より、骨芽細胞や破骨細胞のバランスが崩れ破骨細胞による骨吸収が促進されると、骨形成不全症やステロイド性骨粗鬆症などの小児骨系統疾患が引き起こされる。

抗ヒト RANKL 抗体デノスマブ (Denosumab) やビスホスホネートなどの骨吸収抑制薬は、破骨細胞による過剰な骨吸収を抑制する目的で骨疾患の治療に使用される。2013 年に本邦にて承認された新規の骨吸収抑制薬であるデノスマブは、完全ヒト型モノクローナル抗体であり、RANKL に結合し、破骨細胞分化および骨再吸収機能を強く阻害する抗 RANKL 抗体である。一方、窒素含有ビスホスホネートはヒドロキシアパタイトに対する親和性を有する骨吸収の最も強力な阻害剤の 1 つであり、破骨細胞の骨吸収により骨表面から単離されると、窒素含有ビスホスホネートはメバロン酸代謝の阻害により破骨細胞アポトーシスおよび機能低下を誘発する。これらの骨吸収抑制薬は強い効果を示し、成人で高い治療成績を上げているが、小児期の骨組織や細胞の特異性により小児への使用は本邦では大半が認可されていない。しかし、近年では骨形成不全症やステロイド性骨粗鬆症の治療に骨吸収抑制薬の使用が報告され、国際的にビスホスホネートの小児に対する大規模なトライアルも開始しており、小児骨系統疾患治療への骨吸収抑制薬の応用に対するニーズが高まっている。小児期は発育発達を司る時期であり、成人とは異なる骨代謝回転を示すことから、安全性、毒性、有効性に関する情報が不可欠である。

## 2. 研究の目的

多くの骨吸収抑制薬の添付文書には小児などにおける投与に関しては安全性が確立していないと記載されており、現在は小児に適用可能な骨吸収抑制薬は極めて限られている。しかし実際の臨床ではこれらの骨吸収抑制薬の小児への応用が開始されており、治療の安全性を確実にするために、小児期および青年期の骨吸収抑制薬の効果を明らかにすることが急務である。本研究は、若齢マウスに抗マウス RANKL 抗体またはビスホスホネート製剤の 1 つであるゾレドロネートを継続的に投与し、成長、骨発達、および歯の萌出に対する効果を治療開始から成人後まで比較することを目的とする。申請者は抗 RANKL 抗体およびゾレドロネートの投与期間を調節することで小児期に治療を完了した短期治療モデルマウスおよび成人まで治療を継続した長期治療モデルマウスを開発した。これまでの小児の骨吸収抑制薬の作用を調べた研究は小児期の短期間のみ解析が先行してきた。小児期の破骨細胞活性を一過性もしくは継続して抑制する本モデルでは、発達形成期の時期特異的な破骨細胞の抑制が成長中および成熟後に及ぼす影響を解明でき、本研究モデルマウスを使用し解析することで小児期の治療が成長期だけでなく成人後の QOL に及ぼす影響を調べることができる。本研究は成人での適用が進んでいる骨吸収抑制薬を使用しており、小児治療の安全性に大きく貢献し小児治療の幅を広げるだけでなく、発達期の破骨細胞作用の特異性を解明し基礎的知見を充実させることで、成長後の患者 QOL 向上の一助になると期待できる。

## 3. 研究の方法

抗マウス RANKL 抗体およびゾレドロネートを用いた。これらの薬を生後 1 週目に単回投与のみ、もしくは生後 1 週目から週 1 回ずつ計 7 回皮下投与し、毎週体長・体重を計測した。8 週目に頭蓋骨・大腿骨・脛骨を採取し  $\mu$ CT で骨形態計測を行うとともに、組織標本を作製して骨芽細胞と破骨細胞の解析を行った。各薬物の投与量 (抗マウス RANKL 抗体: 2.5 mg/kg、ゾレドロネート: 0.1 mg/kg または 3.0 mg/kg) はヒト投与量および過去の文献を参考に設定し、対照群

には生理食塩水またはラット IgG を用いた。

#### 4 . 研究成果

抗 RANKL 抗体投与群では対照群と比較し、単回および7回投与群で体長や体重、大腿骨長に有意な差は認められなかったが骨量は有意に増加した。一方、ゾレドロネート投与群(3.0mg/kg)では単回・7回投与のいずれも著しい体長と体重、大腿骨長の抑制と骨量増加を認めた。この時、抗 RANKL 抗体投与群では脛骨の破骨細胞数が減少したのに対し、ゾレドロネート投与群では変化は認められなかった。また、これらのマウスの歯を解析したところ、抗 RANKL 抗体投与群では正常な歯の萌出を認めたが、下顎臼歯部歯槽骨において破骨細胞数が著しく減少していた。一方、ゾレドロネート投与群では、臼歯の歯根伸長が抑制され萌出不全を生じていた。歯槽骨における骨芽細胞数の顕著な減少と破骨細胞数の有意な増加を認めた。抗 RANK 抗体はマウスの成長発育に異常を示さなかったが、ゾレドロネートは成長および臼歯部の歯根伸長を抑制した。以上より、抗 RANKL 抗体はゾレドロネートよりも小児への安全性が高いと推察され、この薬剤が小児の成長や歯の発育に及ぼす影響について、今後さらなる解析が必要といえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Motoki Isawa	4. 巻 9
2. 論文標題 Biological Effects of Anti-RANKL Antibody and Zoledronic Acid on Growth and Tooth Eruption in Growing Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-56151-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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 井澤基樹
2. 発表標題 骨形成不全症のため歯科治療困難であった1例
3. 学会等名 日本小児歯科学会中部地方会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井澤基樹
2. 発表標題 下顎右側乳犬歯・第1乳臼歯部に発生した 歯牙腫の1例
3. 学会等名 日本小児口腔外科学会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------