

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 15日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791995

研究課題名（和文） DHNAを用いた新規骨粗鬆症治療法の開発

研究課題名（英文） An alternative treatment for osteoporosis with DHNA.

研究代表者

村上 純（MURAKAMI JUN）

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：40362983

研究成果の概要（和文）：卵巣摘出術（OVX）による骨粗鬆症モデルマウス作製し、閉経後の骨粗鬆症に対する DHNA の効果を検討し既存の骨粗鬆症治療剤である vitaminK2（VK）、risedronate（Ris）との比較を行った。DHNA は既存の骨粗鬆症治療薬剤よりも骨吸収を抑制する効果があることを示唆できるものとなった。また、in vitro での骨芽細胞への影響から、DHNA 投与によって骨芽細胞活性化すると考えられ、DHNA の骨粗鬆症薬剤としての可能性を示唆できるものであった。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to confirm the antiosteoporotic effect of DHNA in ovariectomized (OVX) mice. This study used female ICR OVX mice and female ICR sham operated mice. OVX mice were randomized into four groups: DHNA group, Vitamine K2 (VK) group, Risedronate (Ris) group and control group. Histological and radiographical analysis showed that in the OVX group, the trabecular bone was narrow and the bone marrow cavity was wide. On the other hand, these osteoporotic changes were improved in DHNA and Ris group. DHNA had some effects for improving bone mass reduction caused by osteoporosis and may become an alternative medicine for osteoporosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：骨粗鬆症、DHNA

1. 研究開始当初の背景

現在、骨粗鬆症は本邦で約1,000万人以上の患者がいると推測されており、急激な高齢化に

伴いその患者数は増加傾向にある。骨粗鬆症は高齢化社会の抱える大きな問題であり、その対策は今後の課題であるといえる。

骨粗鬆症自体は自覚症状のない沈黙の疾患であり、患者自身での予防は難しい。また骨粗鬆症に罹患した患者の治療は薬物療法が主体であり、長期にわたり薬剤の内服を強いられる。そのため患者は全身的、慢性的な様々の副作用を伴い、大きな負担を覚悟しなければならない。以上の理由から簡便で、副作用を伴わない安全・効果的な予防法および治療法の開発が切望されている。

これまで、申請者らは免疫抑制剤に関連由来する骨粗鬆症モデルマウスを作成し、骨粗鬆症を模し、様々な治療薬剤の投薬を試みてきた。そうした中で申請者らは免疫抑制剤FK506を使用し、再現性の高い骨粗鬆症モデルマウスの確立に成功している。さらにそれらの免疫抑制剤に引き起こされる骨粗鬆症に対しては、DHNAが有効であることを明らかにしてきた。

そこで、本申請研究課題では免疫抑制剤に関与しない骨粗鬆症に対してもDHNAの効果を検討し、様々な病因の骨粗鬆症の予防および治療にDHNAを応用できないか計画した。

2. 研究の目的

DHNAはチーズの発酵過程で産生され、ビフィズス菌を増殖させる等、生体に効果的に働く物質である。この特性からDHNAを含む食品は特定保健食品にも指定されている。

現在、骨粗鬆症に用いられている治療薬にはさまざまな副作用が認められるが、DHNAの最大のメリットは生体に対し無毒性であり、他の医薬品のような副作用を伴わないことである。また食品添加物として日常的に経口摂取が可能である。DHNAは安全かつ簡便、長期的に使用できる物質であり、これまでの治療法とは大きく異なる。DHNAの応用が可能に

なれば骨粗鬆症の効果的な予防・治療が可能となり、患者のQOL向上に貢献できると考える。本申請研究課題ではFK506免疫抑制剤に関与しない骨粗鬆にもDHNAが効果を有することを確認し、様々な病因の骨粗鬆症の予防および治療にDHNAを応用するための基礎的研究データを得ることを目的としている。

(1) これまで薬物療法が主体であった骨粗鬆症の治療が、医薬品に依存せず安全・効果的に行うことが期待される。

(2) DHNAの骨への影響を解明することで、骨粗鬆症のみならず、他の骨疾患への応用も期待される。

3. 研究の方法

(1) 卵巣摘出マウス(OVX)、各種ノックアウトマウス等、様々な病因からなる骨粗鬆症モデルマウスに対してDHNAの投与を行い、マイクロCT、軟X線、骨塩量の測定等、多角的に解析することにより、その治療効果を客観的に評価。卵巣摘出マウス(OVX)を骨粗鬆症モデルマウスに対してDHNAの投与を行い、治療効果について客観的に評価した。OVXマウスを高回転型骨粗鬆症モデルマウスとして使用した。ICR雌性マウス(4週齢)に卵巣摘出術(OVX)を施行し偽摘出術(Shem)マウスとの比較を行った。手術施行後回復のため1週間飼育を行い、OVX・ShemマウスともにDHNAの投与下で飼育を行った。DHNA非投与(DHNA-)の条件下で飼育したマウスをコントロールとした。

(2) 同実験動物の血液、主要臓器、骨組織等を摘出し、組織学的解析、生化学的解析を行い、DHNAの骨粗鬆症に対する全身的な病態変化、局所的な骨の器質的变化について検討。

① X線学的検討

軟X線撮影装置 (Sofron) にて骨吸収の発生部位を確認した。軟X線画像をもとにマイクロCT撮影装置 (松本歯科大学より提供) にて2 μm のスライスで撮影を行い、画像処理にて3D構築画像を作成した。画像解析ソフトウェア (3D-BONE TRI・松本歯科大学より提供) にて三次元的に骨解析を行い、同時に骨密度の計測・骨形態の計測を行った。また動物用骨塩量計測装置 (DCS-600) にて骨塩量の測定を行った。(イナリサーチ社に依頼)

② 組織学的検討

上記実験にて作製・入手した骨粗鬆症モデルマウスを解剖し左右脛骨・大腿骨を採取。左側大腿骨は組織標本作製し、骨形態変化についてはHE染色した標本を光学顕微鏡にて観察し、得られた画像は二次元画像解析ソフトウェア (Mac Scope) にて骨面積量の測定を行った。また免疫染色を行い破骨細胞の活性 (TRAP染色) 骨芽細胞への影響 (Osteocalcin) についても観察を行った。

(3) 同実験動物から摘出した細胞、または骨関連培養細胞株を用いて、DHNAの骨粗鬆症関連因子に対する分子間相互作用について解析。炎症性サイトカインおよび破骨細胞誘導因子の計測を行った。マウス眼窩下静脈より経時的に血液を採取、血清を分離し血清中の炎症性サイトカインおよび破骨細胞誘導因子等、骨組織関連因子のモニタリングを行う。得られた実験データを対照群と比較することによりDHNAの影響について検討した。

① 破骨細胞分化誘導干渉実験：マウス解剖時に右側脛骨・大腿骨内部より骨髓細胞を回収し、破骨細胞分化・誘導因子 (RANKL・M-CSF) を添加、37℃、

5 %Co₂ 濃度、10%FBS,100mg/ml Kanamycin+D-MEN培地にて破骨細胞の誘導培養を行った。培養中48時間間隔で培地の交換およびDHNA添加 (10ng/ml) を行い10日間培養後TRAP染色にて破骨細胞の観察を行った。

② 骨芽細胞分化誘導干渉実験：10mM beta-glycerophosphate,100nMdexamethasone, および 50 $\mu\text{g/ml}$ ascorbic acid-2-phosphateを添加したD-MEN培地にて骨芽細胞への誘導を行った細胞にDHNA添加 (48h,10ng/ml) した。経時的にアルカリフォスファターゼ・カルシウム・オステオカルシンをELISA法にて計測し骨芽細胞への影響を評価した。

以上の各実験データを総合的に解析を行い、DHNAのヒト骨粗鬆症に対する臨床応用に向けて検討を行った。

4. 研究成果

卵巣摘出術 (OVX) による骨粗鬆症モデルマウス作製手法が安定し、様々な実験に供することとなった。8週齢雌性マウスにOVXを施術し、閉経後の骨粗鬆症に対するDHNAの効果を検討し既存の骨粗鬆症治療剤であるvitaminK₂(VK)、risedronate(Ris)との比較を行った。実験群はDHNA投与群、VK投与群、Ris投与群とし、各薬剤を連日経口にて8週間投与した。投与後大腿骨および第5腰椎を採取し、まず、X線学的検討を行った。X線学的検討としては、軟X線撮影装置 (Sofron) にて骨吸収の発生部位を確認した後、軟X線画像をもとにマイクロCT撮影装置にて2 μm のスライスで撮影を行い、画像処理にて3D構築画像を作製。画像解析ソフトウェア (3

D-BONE TRI) にて三次元的に骨解析を行い、同時に骨密度の計測・骨形態の計測を行った。その結果、マイクロ CT にて計測した骨密度 (BMD) は DHNA 群で上昇し、骨形態計測では海綿骨の骨梁構造の維持を確認できた。次いで、同時に採取した血清を用いて、骨代謝マーカーの計測を行い、その上昇を確認できた。

また、in vitro での確認実験として、マウス骨芽細胞株 (MC-3T3) を培養し、液体培地に DHNA 添加し、分泌されるアルカリフォスファターゼ (ALP) を ELISA 法にて計測し、DHNA の骨芽細胞への影響を検討したところ、DHNA 添加後に ALP 活性が有意に上昇することを確認した。

これらの得られた結果より、DHNA は骨粗鬆症治療薬剤 VK よりも骨吸収を抑制する効果があることを示唆できるものとなった。また、in vitro での骨芽細胞への影響から、DHNA 投与によって高い ALP 活性を誘導し、骨芽細胞活性化すると考えられ、DHNA の骨粗鬆症薬剤としての可能性を示唆できるものであった。

本研究に関連した成果は 2011 年、18th International Congress of Dento-Maxillo-Facial Radiology (広島) にて報告した。一連の研究成果は、Osteoporos Int (2010 21(8) 1434-47) 誌に英文原著論文 *Suppressive effects of 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid administration on bone resorption* として発表した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Matsubara M, Murakami J et al. *Suppressive effects of 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid administration on bone resorption* Osteoporos Int 査読有 (2010 21(8) 1434-47)
- ② Matsumoto Y, Murakami J et al. *In vitro experimental study of the relationship between the apparent diffusion and changes in cellularity and cell morphology* Oncol Rep 査読有 (2009 22(3) 641-8)

[学会発表] (計 3 件)

- ① Kita K, Murakami J et al. *An alternative treatment for osteoporosis with DHNA-microCT analysis.* 18th International Congress of Dento-Maxillo-Facial Radiology 5/25-26/2011 広島国際会議場
- ② 村上純、畝坪輝寿、芦田昌和、片嶋和典、藤田麻里子、本多康聡、柳文修、浅海淳一 in vitro 条件下において細胞外基質を賛成する象牙芽幹細胞株の樹立に関する研究 第 51 回日本歯科放射線学会総会 4/23-25/2010 鶴見大学記念館
- ③ 村上純、畝坪輝寿、松崎秀信、柳文修、浅海淳一 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) による骨吸収抑制作用について 第 50 回日本歯科放射線学会総会 5/29-30/2009 大阪国際会議場

[図書] (計 3 件)

- ① Jun Murakami et al. *Nova science publishers, Inc. Encyclopedia of DNA research* 2011年発行
- ② Jun Murakami et al. *Nova science publishers, Inc. Drug resistant neoplasms* 2009年発行 (p33-71)
- ③ Jun Murakami et al. *Nova science publishers, Inc. Bacterial DNA, DNA polymerase and DNA*

helicases

2009年発行 (p187-224)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 純 (MURAKAMI JUN)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：40362983

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者