

先端研究施設共用促進事業

「安定同位元素イメージング技術による産業イノベーション」利用成果報告書

北海道大学 創成研究機構長 殿

下記の通り、利用成果を報告します。

利用者名	北海道大学歯学研究科 硬組織発生生物学教室			
代表者	氏名	網塚憲生	役職	教授
	所属部署	北海道大学歯学研究科 硬組織発生生物学教室		
	所在地	〒060-8586 札幌市北区北 13 条西 7 丁目		
	電話番号		FAX 番号	
	メール			
連絡担当者	氏名	網塚憲生	役職	教授
	所属部署	北海道大学歯学研究科 硬組織発生生物学教室		
	所在地	〒060-8586 札幌市北区北 13 条西 7 丁目		
	電話番号		FAX 番号	
	メール			
利用課題名	骨組織におけるミノドロン酸の局在について			
利用施設名	北海道大学 同位体顕微鏡システム			
利用期間	平成 24 年 5 月 1 日 ~ 平成 25 年 3 月 31 日			
	<input type="checkbox"/> 報告書公開の延期を希望する。(平成 ____ 年 ____ 月まで)			

● 利用成果

【利用の目的・内容】 異分野の方にも理解できるよう簡潔に記述してください。

【背景】

ビスフォスフォネート製剤は、現在使用されている最も有用な骨粗鬆症治療薬であり、骨吸収を行う破骨細胞を抑制し、アポトーシスによる細胞死を誘導することで骨量減少を低下させる薬剤である。従来のビスフォスフォネートは連日投与を必要としたが、近年開発されたミノドロン酸は第三世代のビスフォスフォネート製剤であり、月一回投与という長期間の持続効果に大きな期待が寄せられている。しかしながら、従来のビスフォスフォネート製剤の効果と比較すると、何故、ミノドロン酸が長期にわたり効果を持続できるのか解明されておらず、学術的・臨床的に興味を持たれる。

【目的】

ミノドロン酸は骨基質のリン酸カルシウム結晶に結合することが指摘されているが、生体内における骨基質のどの部位に局在するか明らかにされていない。従って、今回の目的は、骨組織におけるミノドロン酸の局在性を明らかにすることにより、その細胞学的メカニズムの解明に繋げることである。ミノドロン酸に標識物質を付加すると作用に影響が生じてしまうため、安定同位体である ^{15}N を含むミノドロン酸を骨組織に投与し、同位体顕微鏡を用いてその骨組織内局在を検索した。

【成果の概要】

【材料と方法】

安定同位体 ^{15}N を含むミノドロン酸(以下、 ^{15}N ミノドロン酸)をアステラス製薬株式会社・化学研究所で合成し、北海道大学歯学研究科に提供(契約書・譲渡書作成済み)した。北海道大学歯学研究科では、生後8週齢の雄性ICRマウスに ^{15}N ミノドロン酸(1mg/kg)を外頸静脈から投与し、3時間、24時間、1週間、1ヶ月後に灌流固定を行い、大腿骨および脛骨を摘出後、パラフィンまたはエポキシ樹脂に包埋した(動物実験承認済み)。樹脂包埋した未脱灰サンプル(厚さ1.0mm程度)を作成し、同位体顕微鏡で ^{15}N ミノドロン酸の局在を観察した。歯学研究科では、同サンプルを用いて透過型電子顕微鏡による破骨細胞や骨吸収の状態を解析するとともに、アルカリフォスファターゼ(ALP)/酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP)、TRAP/カテプシンKの二重染色を行った。

【結果および考察】

1) 同位体顕微鏡による ^{15}N ミノドロン酸の局在について

^{15}N ミノドロン酸はマウス大腿骨の骨幹端における骨梁の形成面ならびに吸収面の両方の骨表面に検出された。現在、定量解析を行っていないものの、骨吸収面よりも骨形成面への集積が高い傾向を認めている。投与3時間後の ^{15}N ミノドロン酸は、投与直後では成長板直下の骨梁全ての骨表面に局在したが、1ヶ月後では、 ^{15}N ミノドロン酸は成長板直下の骨梁には認められず、二次骨梁の骨表層内部に局在する傾向を示した。

従来のビスフォスフォネート製剤であるアレンドロネートは破骨細胞直下の骨吸収面に集積する傾向が報告されているが、今回の同位体顕微鏡の解析から、 ^{15}N ミノドロン酸は骨吸収面だけでなく、骨形成面に比較的多量に局在することが明らかになった。また、 ^{15}N ミノドロン酸は石灰化骨基質と結合と遊離を繰り返すのではなく、一度、骨表面に結合した部位に留まることが強く示唆された。

2) ¹⁵N ミドロン酸投与後の破骨細胞と骨芽細胞の変化について

ミドロン酸 (1mg/kg) の投与3時間では、ALP/TRAP および TRAP/カテプシンKの局在性は、コントロール群と大きく変わらなかった。透過型電子顕微鏡観察では、破骨細胞は明帯(基質と接着する細胞部位)で骨基質と接着しており、また、発達した波状縁(骨吸収を行う細胞部位)を形成していたことから、活発な骨吸収が示唆された。ミドロン酸投与24時間では、破骨細胞の形状がやや扁平化しており活発な骨吸収像を示さなかったが、破骨細胞のアポトーシスはほとんど認めなかった。しかし、1週間後では、多くの破骨細胞は波状縁を有さないこと、また、骨表面には明帯ではなく細胞突起にて接着する程度であったことから、ほとんど骨吸収をおこなっていないと考えられた。組織化学では、TRAP/カテプシンK陽性を示す一部の破骨細胞がアポトーシス像を示しており、扁平化したALP陽性骨芽細胞が観察された。1ヶ月経つと、破骨細胞はコントロール群ほどではないがやや骨吸収活性を取り戻しつつあること、また、活発に骨基質合成を行うと考えられる骨芽細胞を観察した。

組織化学検索では、投与量が1mg/kgという高濃度¹⁵Nミドロン酸を外頸静脈から投与したにも関わらず、破骨細胞を速やかにアポトーシスによる細胞死に到らせるのではなく、長期間において骨吸収抑制を持続することが明らかとなった。つまり、ミドロン酸は、破骨細胞がアポトーシスによる細胞死を起こさない程度で、かつ、波状縁の形成や骨基質への接着を抑制することで、骨吸収抑制を可能にしていると考えられた。また、破骨細胞が死滅しないため、骨芽細胞とのカップリングも維持されていると推測された。

【結語】

同位体顕微鏡による解析から、¹⁵Nミドロン酸は破骨細胞の骨吸収面に入り込んで、速やかに破骨細胞を抑制・アポトーシスに到らせるのではなく、一度、骨形成面に入り込むことによって、破骨細胞の骨吸収を受けにくい骨基質を形成すると推測される。従って、破骨細胞の抑制効果は持続することができ、かつ、破骨細胞を速やかに死滅させるものではないため、骨芽細胞とのカップリングがある程度、維持されたと考えられる。

【社会・経済への波及効果の見通し】 研究成果によってもたらされる知的資産の形成、新技術の創製などを記述してください。

骨粗鬆症治療薬の体内分布を示すかを明らかにすることは、その作用機序を解明するだけでなく、薬剤投与方法による作用効率などを検討する上でも有用である。特に、近年、ミドロン酸の月一回投与が可能となり、現在、多くの医療機関で処方されているが、従来の毎日投与と比べて、異なる骨代謝の動態を示すことが示唆されている。

本研究のように、医療科学の分野にも同位体顕微鏡を導入することで、蛍光標識をすることで活性が消失する薬剤の体内分布、ならびに、その場における細胞や基質の状態を明確にすることは、医療科学の分野に新しい検索方法を提示するものと思われる。

また、今回の検索結果は、ミドロン酸という次世代のビスフォスフォネートが、これまでのビスフォスフォネートとは異なり、何故、長期間の効果が持続できるのか、生体内において微細構造レベルで明らかにすることができた重要な解析結果であると考えられる。

受付日	平成 25 年 8 月 20 日	受付者	阿部
-----	------------------	-----	----