

氏名	仲田直樹
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博甲第 号
学位授与の日付	平成16年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	免疫抑制剤(FK506)による骨吸収亢進機構に関する研究
論文審査委員	教授 佐々木 朗 教授 永井 教之 教授 山本 敏男

学位論文内容の要旨

目的

近年臓器、骨髄の他家移植が盛んに行われるようになり、術後の拒絶反応を抑えるため免疫抑制剤の投与が不可欠となっている。一方、免疫抑制剤を長期に服用することの副作用として骨粗鬆症及び病的骨折の増加が指摘されているが、免疫抑制剤と骨粗鬆症の病態に関する解明はまだまだ十分なされていない。

骨吸収は、破骨細胞が活性化されることにより骨リモデリングのバランスが崩れ、骨吸収が骨形成よりも亢進することで引き起こされる。また近年、T細胞を介しての液性因子の破骨細胞分化への深い関与が報告されている。この研究では免疫抑制剤 FK506 投与によるラット骨粗鬆症モデルおよびT細胞の関与を検証するためにT細胞欠損ヌードマウスを用いて、骨吸収過程の組織学的観察および骨吸収マーカーを用いた血液生化学的検討を行い、免疫抑制剤による骨粗鬆症発症のメカニズムを検討した。

材料と方法

1, ラット骨粗鬆症モデルを用いた検討

10週齢の雄性 Sprague-Dawley (SD) 系ラットを FK506 投与群とコントロール群に分けた (各群 15 匹)。FK506 投与群には FK506 (tacrolimus, 藤沢薬品より供与) を連日前肢部に筋肉注射 (1mg/kg) し、投与 1 週間群, 2 週間群, 4 週間群の FK506 投与群 3 群 (各 5 匹) とした。コントロール群は生理食塩水を投与し、実験群のそれぞれの投与期間に対応した 3 群 (各 5 匹) とした。各群投与終了翌日に 4%パラホルムアルデヒド固定液にて灌流固定し脛骨を採取した。軟X線撮影 (4mA, 40kV, 20sec) を行った後に脱灰, エタノール系列脱水し, パラフィンまたは OCT コンパウンドに包埋した。切片作製後, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色で脛骨近心端成長板軟骨下の骨梁面積を画像処理ソフト (NIH Image) を用いて計測し, ならびに破骨細胞のマーカーとして酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP) 染色を行い, 骨表面に占める破骨細胞の割合を画像処理ソフト (MacSCOPE) を用いてコントロールと比較検討した。また骨芽細胞のマーカーとしてはアルカリホスファターゼ (ALP) 染色を行った。

2, T細胞欠損ヌードマウスを用いた検討

T細胞系の関与を明らかにするために 8 週齢雄性 T細胞欠損ヌードマウス 8 匹 (各群 2 匹) を用い, 前記同様に FK506 を毎日注射 (1mg/kg) した。投与開始 1, 3 週後に灌流固定し, 脛骨を採取し, パラフィン切片を用いて HE, TRAP 染色を施し組織学的に観察した。

3, ラット血清の TRAP, IFN- γ 濃度の検討

骨吸収機構における T 細胞との関連を明らかにする目的で、破骨細胞分化の抑制因子であるインターフェロン- γ (IFN- γ) の血中濃度を ELISA キット (ENDOGEN 社) で測定し、また TRAP 濃度についても ELISA キット (SBA 社) で測定した。

結果

1, ラット骨粗鬆症モデルを用いた検討

ラット脛骨の軟 X 線像を比較すると、FK506 投与群ではコントロールと比べ海面骨の透過性が亢進し、特に近心端の成長板軟骨の下方で顕著であった。

HE 染色像では、FK506 の 1 週投与群でコントロールよりも脛骨近心端の成長板軟骨下の骨梁が減少しており、2, 4 週群ではさらに減少した。成長板軟骨下の骨梁面積を計測したところ、各 1, 2, 4 週群において投与群で有意に減少していた。

TRAP 染色を行って骨表面に対する破骨細胞の割合を計測したところ、1 週後のコントロール群では 10%であったのに対し、投与群では 19%であった。同様に 2 週では 17%に対し 27%, 4 週では 18%に対し 38%であった。骨表面 1mm あたりに対する破骨細胞数は、1 週ではコントロール群の約 1.5 倍、2, 4 週では約 2 倍であった。ALP 活性は、投与群およびコントロール群において成長板軟骨下の骨芽細胞、軟骨細胞共に差は見られなかった。

2, T 細胞欠損ヌードマウスを用いた検討

脛骨近心端の骨梁の長さについては、FK506 投与群とコントロール群に差は認められなかった。また、TRAP 染色による破骨細胞の分布にも差はなかった。

3, ラット血清中の TRAP, IFN- γ 濃度の検討

1 週後の血中 TRAP 濃度は、コントロールでは 2.1U/L に対し FK506 投与群では 2.7U/L と高い傾向を示した。また IFN- γ 濃度はコントロールでは 88pg/ml に対し投与群では 48pg/ml と有意に低下していた。

まとめ

1. 免疫抑制剤 FK506 投与は骨量減少を引き起こすことが確認された。
2. FK506 投与群では TRAP 陽性破骨細胞数、骨梁表面に占める破骨細胞の割合が増加し、血中の TRAP 濃度も上昇していたことから、FK506 投与により破骨細胞分化、骨吸収が亢進していることが示された。
3. T 細胞欠損ヌードマウスでは FK506 を投与しても骨梁構造や TRAP 陽性破骨細胞の分布に差が認められず、FK506 の破骨細胞分化促進作用に T 細胞系の関与が示唆された。
4. FK506 投与群では血中 IFN- γ 濃度が低下していたことから、FK506 は T 細胞の IFN- γ 産生を抑制することにより破骨細胞分化を促進し、骨量減少を引き起こすことが示唆された。

以上のことから、FK506 による骨吸収亢進は、IFN- γ 産生を介した T 細胞の破骨細胞分化系への関与によるものと考えられた。

論文審査結果の要旨

臓器、骨髄の他家移植等の術後拒絶反応抑制のため免疫抑制剤が不可欠となっているが、長期服用の副作用として骨粗鬆症及び病的骨折の増加が指摘されている。免疫抑制剤と骨粗鬆症の病態および発症メカニズムに関する詳細は不明である。本研究は免疫抑制剤 FK506 投与による骨量減少機構と免疫細胞の関与を、SD ラット及びT細胞欠損ヌードマウスを用いて形態学的ならびに血液生化学的に調べたものである。

その結果、FK506 投与期間の長期化とともに骨量の減少が組織学的ならびに形態計測学的に示された。この骨量の減少は骨芽細胞の機能低下ではなく、破骨細胞の増加、活性化に起因することが明らかとなった。また、T細胞欠損ヌードマウスにFK506 を投与しても骨梁構造や破骨細胞に影響が認められないことから、FK506 はT細胞系を介して破骨細胞の分化、活性化を促進させることが示された。さらに、FK506 投与群では破骨細胞分化抑制因子の血中インターフェロン γ 濃度が低下していたことから、FK506 はT細胞のインターフェロン γ 産生を抑制し、その結果、骨吸収が亢進したものと考えられた。

以上の結果は、臓器、骨髄の他家移植に際して多用される免疫抑制剤 FK506 の副作用としての骨粗鬆症の病態および発症メカニズムの解明に有用な知見である。

よって、本論文は博士（歯学）の学位論文に値するものと認められた。