

アディポネクチンの欠損では骨代謝の低下により下顎骨骨
密度は増加する

小林 明人

大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座
(主指導教員：篠原 淳 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士（歯学）学位申請論文

Adiponectin knockout increases mandibular bone mineral
density due to reduced bone metabolism

Akito Kobayashi

Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine
(Chief Academic Advisor : Professor Atsushi Shinohara)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

要旨

目的：アディポネクチンは脂肪から分泌されて血中に存在するホルモンであるが、その多寡と作用時間が下顎骨に及ぼす影響は不明である。そこで、本研究では持続的なアディポネクチンの欠如が下顎骨に及ぼす影響を調べた。

方法：10, 40 週齢の雄マウスのワイルドタイプ (WT) ・アディポネクチンノックアウト (KO) を各々5 匹用い、テトラサイクリンとカルセインによる骨二重標識を行った。DXA により下顎骨体部骨密度を、pQCT を用いて第一・二臼歯間断面の海綿骨と下顎下縁皮質骨の骨密度を測定した。40 週齢では、pQCT 測定部の非脱灰薄切切片を作成し、海綿骨部と皮質骨部の骨形態計測を行った。統計解析は骨密度では二元配置分散分析を行い、多重比較には Bone ferroni 解析を用い、さらに各週齢の群間差の解析は unpaired t 検定を用いた。骨形態計測の結果は F 検定の後に unpaired t 検定または Mann-Whitney' s U 検定を行った。

結果：下顎臼歯骨体部骨密度、下顎第一・二臼歯間の海綿骨と皮質骨の骨密度は40 週齢の KO 群で有意に高かった。しかし、下顎骨面積では群間差を認めなかった。蛍光顕微鏡所見では、骨新生部である二重標識部は海綿骨、皮質骨ともに KO 群では明らかに少なかった。

海綿骨の骨形態計測では骨量に群間差を認めなかったが、類骨量、骨芽細胞数、骨芽細胞面、補正石灰化速度、骨形成速度、骨吸収速度は KO 群で有意に低かった。しかし、破骨細胞数、骨吸収面には群間差を認めなかった。

皮質骨の骨形態計測では、骨量は KO 群で有意に多かった。皮質骨の骨内膜面部では骨芽細胞数、二重標識幅、補正石灰化速度、骨形成速度、骨吸収速度が KO 群で有意に低かった。また、破骨細胞数は KO 群で有意に多かったが骨吸収面では群間差を認めなかった。

考察：KO 群での海綿骨骨密度の増加は、骨芽細胞数と骨形成速度の低下、骨吸収速度の低下を認めたことから、骨新生の低下と低骨代謝回転型の発現によって、石灰化が進行した成熟骨の割合が増加したためと考える。

KO 群での皮質骨骨密度増加の理由は、時間の経過に伴う骨形成速度の低下に由来した低骨代謝回転型の発現によって増加した骨量を保ちつつ、以前からある骨の石灰化が進行した結果、成熟骨の割合が増加したためと考える。

緒言

骨粗鬆症を代表とする骨関連疾患の臨床では骨密度と骨代謝のコントロールが重要であり、近年では骨密度の維持あるいは増加を目的に PTH 薬、女性ホルモン薬、ビスフォスフォネート、デノスマブなどが用いられている。しかし、どの薬剤にも欠点があるため患者の状態、疾患の状態、副作用を考慮して使い分ける必要がある。そこで、多くの方法で骨密度や骨代謝のコントロールが可能になれば、治療の選択肢が増え、より効果的な治療が可能となる。さらに、骨関連疾患の治療に生体由来の因子を利用することで、より生理的かつ安全な治療が期待できる。アディポネクチンは脂肪から多量に分泌されて血中に多く存在するホルモンの一種で、動脈硬化、心肥大、糖尿病、および炎症の抑制作用がある。アディポネクチンの骨密度に及ぼす影響も報告されてきたが、骨密度は増加¹⁾、低下²⁻⁴⁾、作用しない⁵⁻⁷⁾の報告があり明確な結論が得られていない。骨芽細胞^{6,8)}と前破骨細胞⁶⁾ではアディポネクチンのレセプターが存在しており、骨芽細胞では自己分泌作用と傍分泌作用の経路によって骨形成促進作用⁶⁾を示し、前破骨細胞では破骨細胞への分化抑制⁹⁾による骨吸収抑制作用を示す。内分泌作用の経路では BMP 信号に関与した骨形成抑制作用とインスリン／IGF-1 感受性増加による間接的骨形成促進作用を示す⁶⁾。一方、中枢経路による骨量増加¹⁰⁾、骨芽細胞形成促進¹¹⁾、および破骨細胞抑制作用¹¹⁾の報告もある。また、アディポネクチンの増減による骨表現型の発現様式では、その作用時間が関与している可能性がある^{6,10-13)}。さらにカフェインの骨への影響は長管骨と下顎骨で異なるとの報告¹⁴⁾があることから、部位の異なる骨代謝の違いが影響している可能性もある。すなわち、アディポネクチンが骨密度や骨量に及ぼす影響は骨形成経路と骨吸収経路、作用時間、部位が複雑に絡んで決まると考えられる。

顎骨においても骨密度や骨代謝のコントロールが可能になれば顎骨骨折の治療、デンタルインプラントの治療、歯周炎による歯の喪失の防止、歯の喪失後の顎堤萎縮防止に役立つ。したがって、アディポネクチンの増減とその作用時間が顎骨の表現型に及ぼす影響は検討に値する。しかし、アディポネクチンが顎骨に及ぼす影響の検討はほとんどなく、下顎骨の化骨延長部へのアディポネクチンの間歇投与が化骨部の骨密度、骨量、骨量幅の増加に働くとの報告¹⁵⁾と、アディポネクチンノックアウトマウスの上顎歯槽骨の吸収量はワイルドタイプと差がないとの報告¹⁶⁾があるものの、持続的な内因性アディポネクチンの欠如が下顎骨に及ぼす影響は不明である。

そこで、我々は週齢の異なるアディポネクチンノックアウトマウスを用いて持続的な内因性アディポネクチンの欠如が下顎骨、およびその海綿骨と皮質骨に及ぼす影響を骨密度測定と骨形態計測によって検討した。

実験材料及び方法

動物

10 週齢，40 週齢の雄 C57/BL6 マウスのアディポネクチンノックアウト (KO)¹⁷⁾ とワイルドタイプ (WT) 各群 5 匹を用いた。マウスは SPF (specific pathogen free) 環境下で飼育した (各群の 5 匹は 1 ケージに 2 匹と 3 匹で飼育。水:滅菌水道水。照明:8:00 点灯，12:00 消灯。室温:23±1℃。湿度:50±15%。換気:26 回/時。飼育ケージ:オートクレーブ滅菌)。マウスにはテトラサイクリン (TC)，カルセイン (CL) による骨二重標識 (01TC:0.02mg/g 皮下注射-02-01CL:0.01mg/g 皮下注射:-01) を行い，体重測定後に安楽死させた。左側下顎骨を摘出し，骨重量を測定した後に 70%EtOH で固定した。尚、本研究は名古屋大学動物実験委員会の承認 (動物実験許可番号 27278) を受け，名古屋大学動物実験規定に従って行われた。

骨密度測定

下顎骨臼歯骨体部の総骨密度測定は DXA (Hologic Discovery; Hologic Japan, Inc. Tokyo, Japan) を用いて小動物モードにより測定した (図 1A)。下顎第一・二臼歯間の骨断面の海綿骨骨密度，皮質骨骨密度は pQCT (XCT Research SA+ ; Orthometrix, Inc. Naples ,FL,USA) により測定した (図 1B)。

骨形態計測 (40 週齢)

40 週齢のマウス左側下顎骨は 5 日間 Villanueva bone stain に浸漬し，エタノールで脱水後，未脱灰で methyl-methacrylate (Wako Pure Chemical Co. Osaka, Japan) に包埋した。pQCT の測定部である第一・二臼歯間ではマイクロトーム (RM2255; Leica Microsystems K. K. Tokyo, Japan) を用いて切片を切り出し，厚さ 5 μ m の非脱灰薄切切片を作成した。

海綿骨の測定パラメーターは骨量 (BV/TV : %)，類骨量 (OV/TV : %)，骨梁幅 (Tb. Th : μ m)，骨芽細胞面 (Ob. S/BS : %)，吸収面 (ES/BS : %)，破骨細胞数 (N. Oc/TV : N/mm²)，骨芽細胞数 (N. Ob/TV : N/mm²)，補正石灰化速度 (Aj. Ar : μ m/day)，類骨成熟時間 (Omt : day)，骨石灰化遅延時間 (Mlt : day)，骨形成速度 (BFR/BS : mm³/mm²/year)，骨吸収速度 (BRs. R : mm²/mm²/year) および骨形成速度 (BFR/BS : mm²/mm²/year) と骨吸収速度 (BRs. R : mm²/mm²/year) の比とした。

皮質骨のパラメーターは面積 (BV : μ m²) と二重標識幅 (L. Th : μ m) とし，骨内膜面と骨膜面の測定パラメーターは類骨面 (OS/BS : %)，骨芽細胞面

(Ob. S/OS : %), 吸収面 (ES/BS : %), 破骨細胞面 (OcS. /BS : %), 骨芽細胞数 (N. Ob/OS : N/mm²), 破骨細胞数 (N. Oc/BS : N/mm²), 補正石灰化速度 (Aj. Ar : μm/day), 骨形成速度 (BFR/BS : mm²/mm²/year), 骨吸収速度 (BRs. R : mm²/mm²/year), 骨形成速度 (BFR/BS : mm²/mm²/year) と骨吸収速度 (BRs. R : mm²/mm²/year) の比とした。パラメーターの測定と用語は日本骨形態計測学会の指針に従った¹⁸⁾。

統計解析

骨重量と骨密度では二元配置分散分析を行い、多重比較には Bone ferroni /Dunn 解析を用い、さらに各週齢の群間差の解析は unpaired t 検定を用いた。骨形態計測の結果は、F 検定の後に unpaired t 検定または Mann-Whitney' s U 検定を行った。(State View 5.0 Japanese version; HULINKS Inc. Tokyo, Japan).

結果

体重

40 週齢では KO 群, WT 群ともに 10 週齢より有意に重かったが群間差は認めなかった.

骨重量

40 週齢の KO 群は WT 群に比べ有意に重かった (図 2) .

骨密度

下顎骨面積には群間差は認めず, 40 週齢の下顎臼歯骨体部骨密度, 下顎第一, 二臼歯間の海綿骨骨密度と皮質骨骨密度は KO 群が WT 群に比べ有意に高かった (図 3).

骨形態計測 (40 週齢)

1. 海綿骨

海綿骨骨量 (BV/TV : %) は群間差を認めなかった (図 4 A). 蛍光顕微鏡所見では, WT 群は骨新生部位である二重標識を確認できるが, KO 群では標識はほとんど認めなかった (図 4 B). 類骨量 (OV/TV : %), 骨芽細胞数 (N. Ob/TV : N/mm²), 骨芽細胞面 (Ob. S/BS : %), 補正石灰化速度 (Aj. Ar : $\mu\text{m}/\text{day}$), 骨形成速度 (BFR/BS : mm³/mm²/year), 骨吸収速度 (BRs. R : mm²/mm²/year) は KO 群が WT 群に比べ有意に低かった. 類骨成熟時間 (Omt : day) は KO 群が WT 群に比べ有意に長かった. 骨形成速度 (BFR/BS : mm³/mm²/year) と骨吸収速度 (BRs. R : mm²/mm²/year) の比には群間差は認めなかった (図 5 B, C, F, G, H, J, K, L).

2. 皮質骨

皮質骨骨量 (BV : μm^2) は KO 群が WT 群に比べ有意に大きかった (図 4 A). 蛍光顕微鏡所見では, 皮質骨骨内膜面において WT 群では骨新生部位である二重標識を確認できるが, KO 群では標識はほとんど認めなかった (図 4 B). 皮質骨の骨内膜面部では骨芽細胞数 (N. Ob/OS : N/mm²), 二重標識幅 (L. Th : μm), 補正石灰化速度 (Aj. Ar : $\mu\text{m}/\text{day}$), 骨形成速度 (BFR/BS : mm³/mm²/year), 骨吸収速度 (BRs. R : mm²/mm²/year) が KO 群では WT 群に比べ有意に低かった. 破骨細胞数 (N. Oc/BS : N/mm²) は KO 群が WT 群に比べ有意に多かった. 骨形成速度 (BFR/BS : mm³/mm²/year) と骨吸収速度 (BRs. R : mm²/mm²/year) の比に群間差は認めなかった (図 6 B, D, F, H, I, J, K).

皮質骨の骨膜面部では骨形態計測のどのパラメーターも KO 群と WT 群間で有意差を認めなかった.

考察

内因性アディポネクチンの欠如が骨密度や骨量へ及ぼす影響とその背景は、10 週齢前後のアディポネクチン KO マウスで調べられてきた。その結果、KO マウスでは RANKL の減少と OPG の増加によって破骨細胞が抑制されて大腿骨の骨密度は増加するとの報告¹⁹⁾、KO マウスの卵巣摘出群の大腿骨では ALP 活性、RUNX2, Osterix, および破骨細胞数の増加により間葉系細胞の骨化がもたらされて骨密度の低下が抑制されるとの報告²⁰⁾、KO マウスへの骨移植では、破骨前駆細胞での APPL1 の抑制が AKT1/PKα を抑制することで細胞核の NFAT の抑制が解除されて破骨細胞の分化が促進され破骨細胞数が増加することによって海綿骨量と皮質骨量が減少するとの報告がある⁹⁾。また、骨芽細胞のアディポネクチンレセプター2 受容体を抑制した研究では BMP2 と osteocalcin の発現量はアディポネクチンレセプター2 受容体の発現量と相関関係を有して低下したが、Type1 コラーゲンの発現量との間には有意差を示さなかったことからアディポネクチンの欠損は骨芽細胞の分化と骨形成の抑制に作用する²¹⁾と報告している。以上の研究結果から、アディポネクチンの欠損が骨形成系と骨吸収系に及ぼす影響は、間葉系細胞の骨化促進、骨芽細胞活性の抑制、破骨細胞活性の抑制、破骨細胞数の増加であり、これらのバランスが骨密度と骨形態計測の結果に反映されると考えられる。また、KO マウスにおける骨梁と齢の関係では、8 週齢の脛骨海綿骨の骨梁数と量は WT マウスとの差を認めないが^{6, 12)}、14 と 22 週齢の骨梁数と量は KO マウスで増加し¹²⁾、石灰化は減少する¹¹⁾との結果もあることから時間的要因が骨表現型に影響すると考えられる。

本研究では下顎骨密度への影響は 10 週齢の KO 群では認めず、40 週齢の KO 群での骨密度の増加が明らかになった。さらに、40 週齢 KO 群での下顎骨密度増加の背景を骨形態計測によって、海綿骨と皮質骨の各々で確認したところ、海綿骨では骨芽細胞数の減少、類骨の成熟と石灰化の遅延、骨形成速度の低下を認めた。これらの結果はアディポネクチン過剰発現マウスの海綿骨での骨形態計測の結果とは逆で矛盾はなく¹³⁾、Ueno ら²¹⁾が報告したアディポネクチンレセプター2 を介した BMP2 と osteocalcin の抑制による機序が時間の経過に伴い優位に働いた可能性が高いと考えられる。さらに、下顎海綿骨では破骨細胞数と骨吸収面には群間差はなく、アディポネクチン過剰発現マウスと同じ結果であった。また、6-8 ヶ月齢の KO マウスの上顎歯槽骨の吸収量は WT マウスと差がないとの報告がある¹⁶⁾。すなわちアディポネクチンの増減は海綿骨の破骨細胞と骨吸収面には影響しない。Mitsui ら¹³⁾はインスリンを介する経路ではアディポネクチンは破骨細胞数に影響しないことを明らかにしており、下顎海綿骨ではこの経路も優位である可能性がある。また、骨形態計測で得られた骨量には WT 群との有意差を認めなかった。

以上から、40 週齢の KO 群での下顎海綿骨骨密度の増加は骨芽細胞の抑制に由来する骨形成速度の低下がカップリング作用²²⁾により骨吸収速度の低下をもたらして低代謝回転型となり、骨量全体の中で石灰化の進行した骨（成熟骨）の割合が増加することによって発現したと考える（図 7）。

下顎皮質骨では皮質骨内膜側で骨芽細胞数の減少、二重標識幅、石灰化速度、および骨形成速度の低下を示した。これらの結果も下顎海綿骨と同様、Ueno ら²⁰⁾が報告した機序が優位に働いた可能性が考えられる。一方、下顎海綿骨とは異なり Wang ら²⁰⁾、Tu Q ら⁹⁾の報告と同じく、破骨細胞数は KO 群で多かった。しかし、骨吸収面では下顎海綿骨での結果と同じく差は認めず、骨形成速度低下に起因すると考えられる骨吸収速度の低下を認めた。また、40 週齢の KO 群では WT 群に比べて皮質骨密度と面積が増加していた。10 週齢 KO 群の脛骨皮質骨では WT 群よりも補正石灰化速度が高かったことから（図 8）、下顎皮質骨でも若齢時に同じ状況が存在したのではと考えられる。そして、加齢に伴う骨形成速度の低下によって低骨代謝回転型となり、骨量の増加を保ったまま、かつての新生骨の石灰化が進行した結果、石灰化の進行した骨（成熟骨）の割合が増加し、下顎皮質骨骨密度が増加したと考えられる（図 7）。

すなわち、40 週に及ぶアディポネクチンの欠損は下顎骨では海綿骨、皮質骨ともに骨芽細胞数の減少と骨形成速度の低下による低骨代謝回転を来とし、カップリング作用が働いて骨吸収速度の低下が発現することで骨化が進行して徐々に骨密度が増加したと考える。

結論

マウス下顎骨での内因性のアディポネクチンの欠如は長期になると骨芽細胞数と骨形成速度の低下を発現し、さらに骨形成速度に連動した骨吸収速度の低下を引き起こして既存骨の骨化が進行することで石灰化の進んだ成熟骨の割合が増加し、下顎骨密度の増加を示した。

謝辞

稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えて下さり，終始ご指導，ご校閲をいただきました松本歯科大学口腔顎顔面外科学講座の篠原淳教授に謹んで感謝の意を表します．また，本研究の遂行に際しまして，ご指導いただきました歯科放射線学講座の田口明教授，口腔インプラント科の八上公利准教授，口腔衛生学講座の定岡直先生，マウスとその情報を供与していただきました名古屋大学分子心血管病学寄附講座の大内乗有教授，名古屋大学循環器内科の室原豊明教授，柴田玲講師，研究の遂行にご協力いただきました愛知医科大学耳鼻咽喉科学講座の谷川徹准教授，DXA の測定にご協力いただきました愛知医科大学放射線医学講座の石口恒男教授ならびに放射線技師の皆様，さらに，ご支援，ご協力いただきました松本歯科大学口腔顎顔面外科学講座の皆様に深く感謝申し上げます．

参考文献

- 1) Oshima K, Nampei A, Matsuda M, Iwaki M, Fukuhara A, Hashimoto J, Yoshikawa H, Shimomura I. Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 331: 520-526.
- 2) Jürimäe J, Rembel K, Jürimäe T, Rehand M. Adiponectin is associated with bone mineral density in perimenopausal women. *Horm Metab Res*. 2005 37: 297-302.
- 3) Richards JB, Valdes AM, Burling K, Perks UC, Spector TD. Serum adiponectin and bone mineral density in women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 92: 1517-1523.
- 4) Peng XD, Xie H, Zhao Q, Wu XP, Sun ZQ, Liao EY. Relationships between serum adiponectin, leptin, resistin, visfatin levels and bone mineral density, and bone biochemical markers in Chinese men. *Clin Chim Acta*. 2008 387: 31-35.
- 5) Sabour H, Norouzi Javidan A, Latifi S, Shidfar F, Vafa MR, Emami Razavi SH, Larijani B, Heshmat R. Relationship between leptin and adiponectin concentrations in plasma and femoral and spinal bone mineral density in spinal cord-injured individuals. *Spine J*. 2015 15: 1-9.
- 6) Shinoda Y, Yamaguchi M, Ogata N, Akune T, Kubota N, Yamauchi T, Terauchi Y, Kadowaki T, Takeuchi Y, Fukumoto S, Ikeda T, Hoshi K, Chung UI, Nakamura K, Kawaguchi H. Regulation of bone formation by adiponectin through autocrine/paracrine and endocrine pathways. *J Cell Biochem*. 2006 99:

196–208.

- 7) Kontogianni MD, Dafni UG, Routsias JG, Skopouli FN. Blood leptin and adiponectin as possible mediators of the relation between fat mass and BMD in perimenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2004 19: 546–51.
- 8) Kamada A, Ikeo T, Yoshikawa Y, Do-mae E, Goda S, Tamura I, Kon-i H, Okazaki J, Kawamoto A, Komasa Y, Toda I, Suwa F. Influence of adipocytokines on differentiation of pro-osteoblastic cells. *J Oral Tissue Engin.* 2008 6: 17–23.
- 9) Tu Q, Zhang J, Dong LQ, Saunders E, Luo E, Tang J, Chen J. Adiponectin inhibits osteoclastogenesis and bone resorption via APPL1-mediated suppression of Akt1. *J Biol Chem.* 2011 286: 12542–12553.
- 10) Kajimura D, Lee HW, Riley KJ, Arteaga-Solis E, Ferron M, Zhou B, Clarke CJ, Hannun YA, DePinho RA, Guo XE, Mann JJ, Karsenty G. Adiponectin regulates bone mass via opposite central and peripheral mechanisms through FoxO1. *Cell Metab.* 2013 17: 901–915.
- 11) Wu Y, Tu Q, Valverde P, Zhang J, Murray D, Dong LQ, Cheng J, Jiang H, Rios M, Morgan E, Tang Z, Chen J. Central adiponectin administration reveals new regulatory mechanisms of bone metabolism in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014 306: 1418–1430.
- 12) Williams GA, Wang Y, Callon KE, Watson M, Lin JM, Lam JB, Costa JL, Orpe A, Broom N, Naot D, Reid IR, Cornish J. In vitro and in vivo effects of adiponectin on bone. *Endocrinology.* 2009 150: 3603–3610.
- 13) Mitsui Y, Gotoh M, Fukushima N, Shirachi I, Otabe S, Yuan X, Hashinaga T, Wada N, Mitsui A, Yoshida T, Yoshida S, Yamada K, Nagata K. Hyperadiponectinemia enhances bone formation in mice. *BMC Musculoskelet Disord.* 2011 12:18. doi: 10.1186/1471-2474-12-18.
- 14) Sasahara H, Ckeuk SL, Wink CS, Hashimoto K, Rossowska MJ, Nakamoto Y. Alteration of femoral structure in later life by chronically feeding caffeine during rapid growing period in newborn female rats. *Toxicol Lett.* 1994 1: 55–64.
- 15) Jiang X, Song D, Ye B, Wang X, Song G, Yang S, Hu J. Effect of intermittent administration of adiponectin on bone regeneration following mandibular osteodistracton in rabbits. *J Orthop Res.* 2011 29: 1081–1085.
- 16) Zhang L, Meng S, Tu Q, Yu L, Tang Y, Dard MM, Kim SH, Valverde P, Zhou X, Chen J. Adiponectin ameliorates experimental periodontitis in diet-induced obesity mice. *PLoS One.* 2014 9:e97824.
- 17) Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani

H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med.* 2002 8: 731-737.

18) Shinya Tanaka, Noriaki Yamamoto, Satoshi Mori, Naoto Endo, Masako Ito. Japanese Nomenclature of Bone Histomorphometry (A 2014

Revised-Supplemented Version) *J. Jpn. Soc. Bone Morphom.* 2015 252: 1-8.

19) Wang QP, Li XP, Wang M, Zhao LL, Li H, Xie H, Lu ZY. Adiponectin exerts its negative effect on bone metabolism via OPG/RANKL pathway: an in vivo study. *Endocrine.* 2014 47: 845-853.

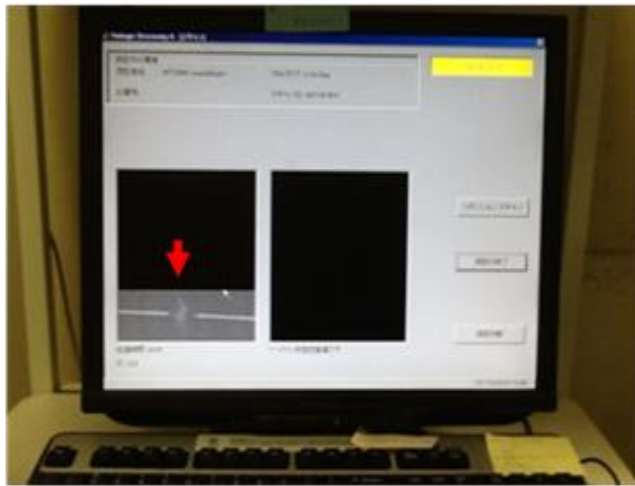
20) Wang F, Wang PX, Wu XL, Dang SY, Chen Y, Ni YY, Gao LH, Lu SY, Kuang Y, Huang L, Fei J, Wang ZG, Pang XF. Deficiency of Adiponectin Protects against Ovariectomy-induced Osteoporosis in Mice. *PLoS One.* 2013 8:e68497.

21) Ueno M, Kamada A, Ikeo T. Failure of adiponectin action influences osteoblast-related gene expression. *J Oral Tissue Engin* 2009 6: 159-166.

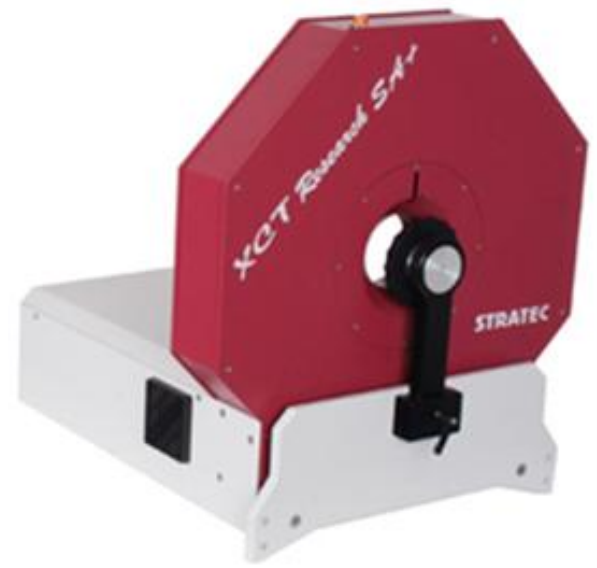
22) Yamashita T, Takahashi N, Udagawa N. New roles of osteoblasts involved in osteoclast differentiation. *World J Orthop.* 2012 3: 175-181.



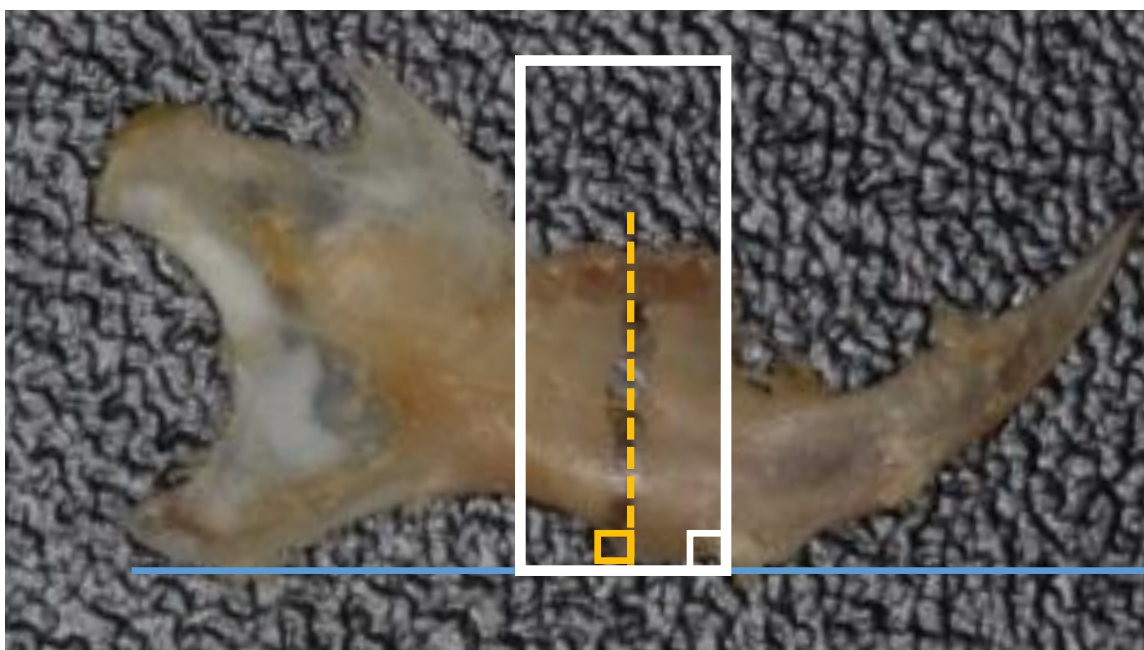
二重エネルギーx線吸収
骨密度測定装置(DXA)
Hologic Discovery



小動物モードでの
測定中の画面

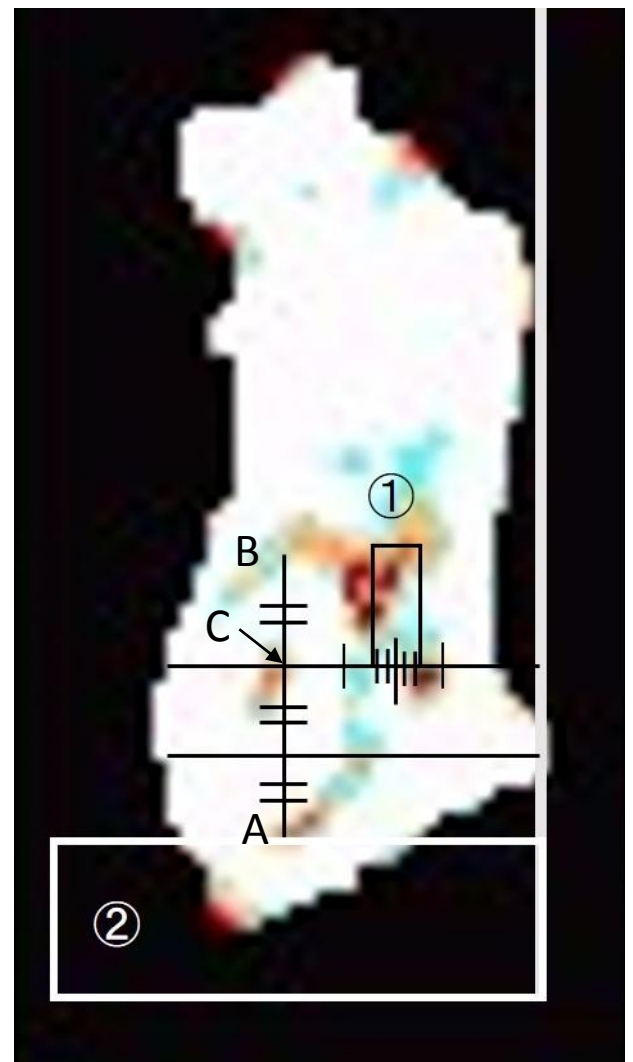


pQCT (XCT Research SA+)



骨密度測定領域の設定

A



海綿骨と皮質骨の
骨密度測定領域の設定

B

図1

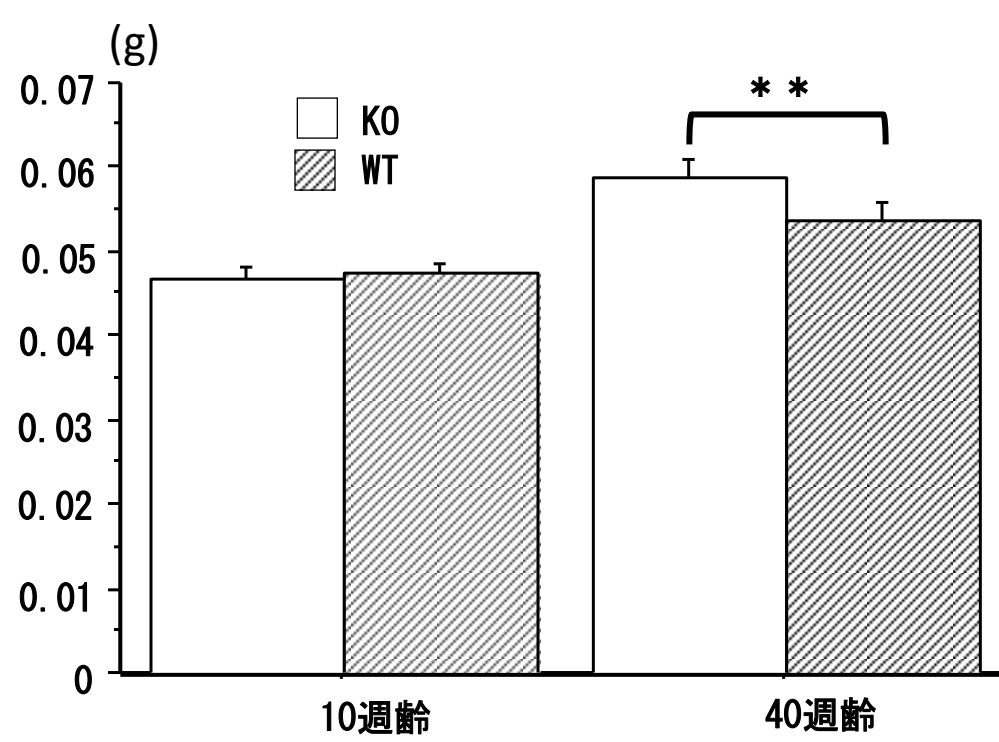


图2

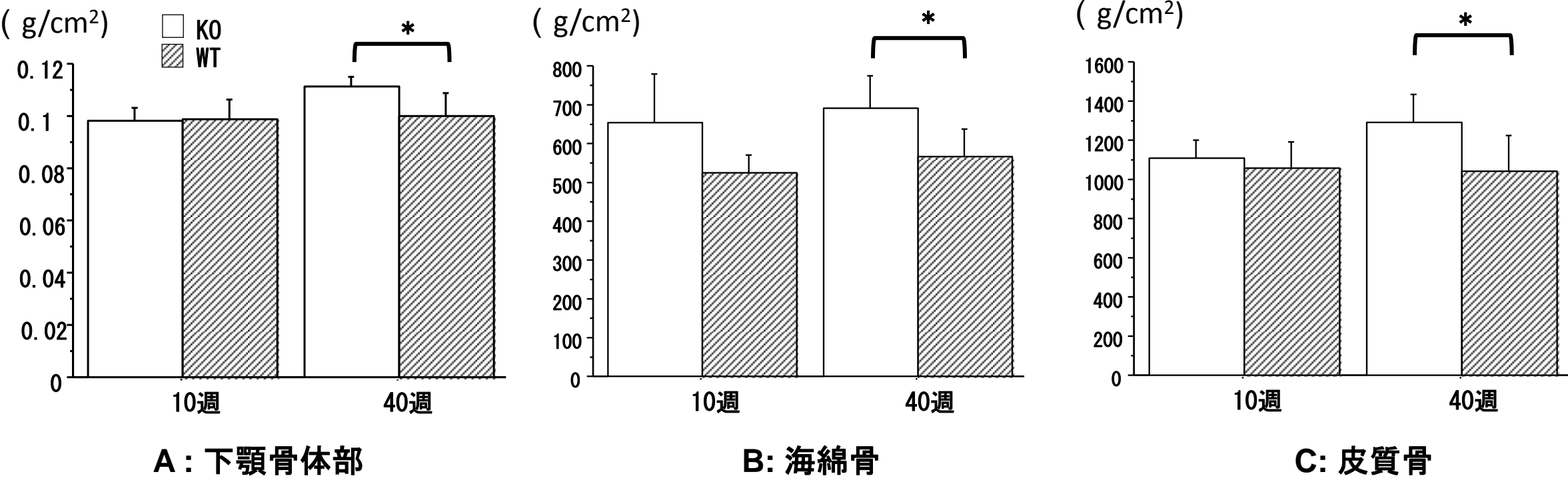


図3

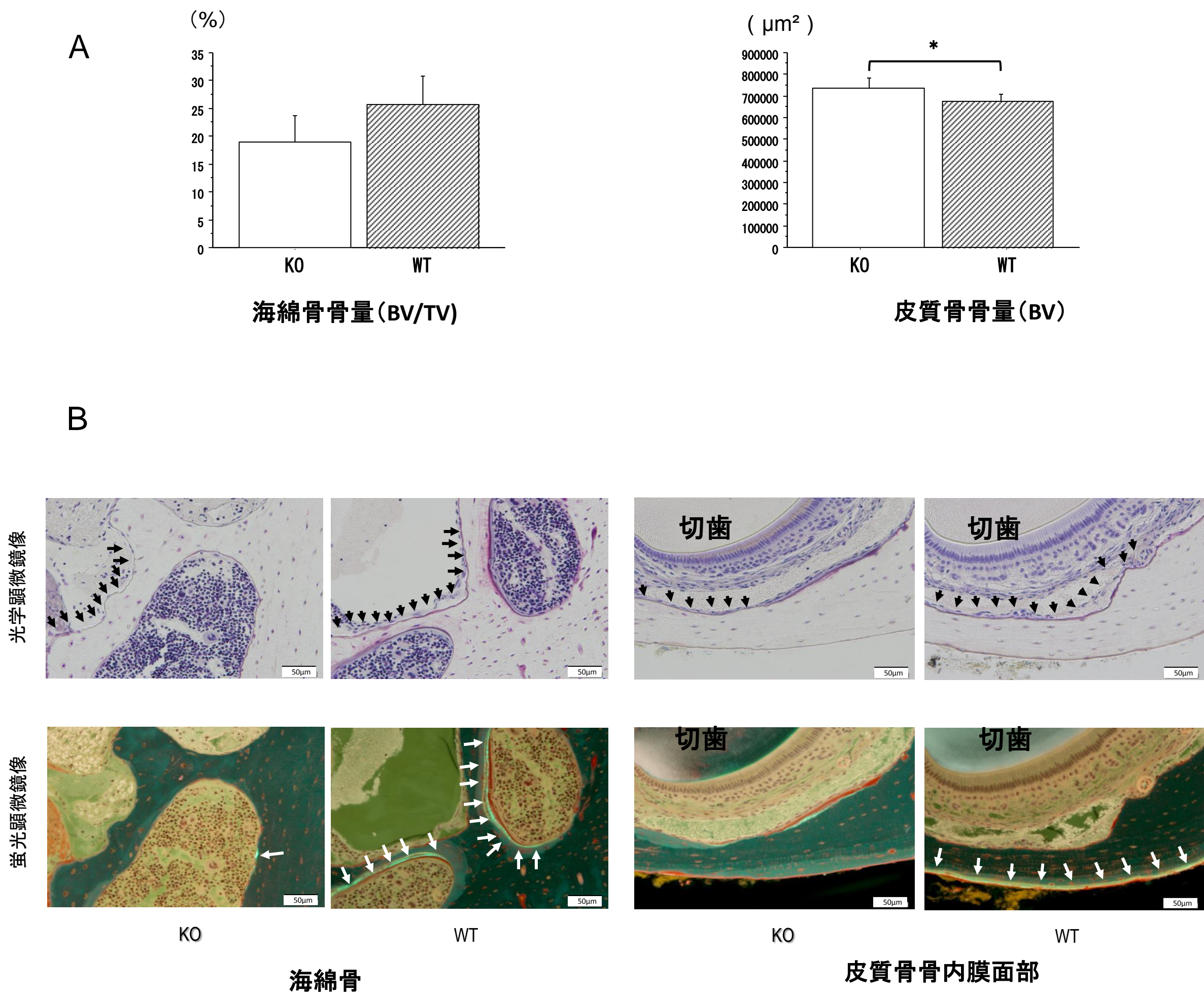


図4

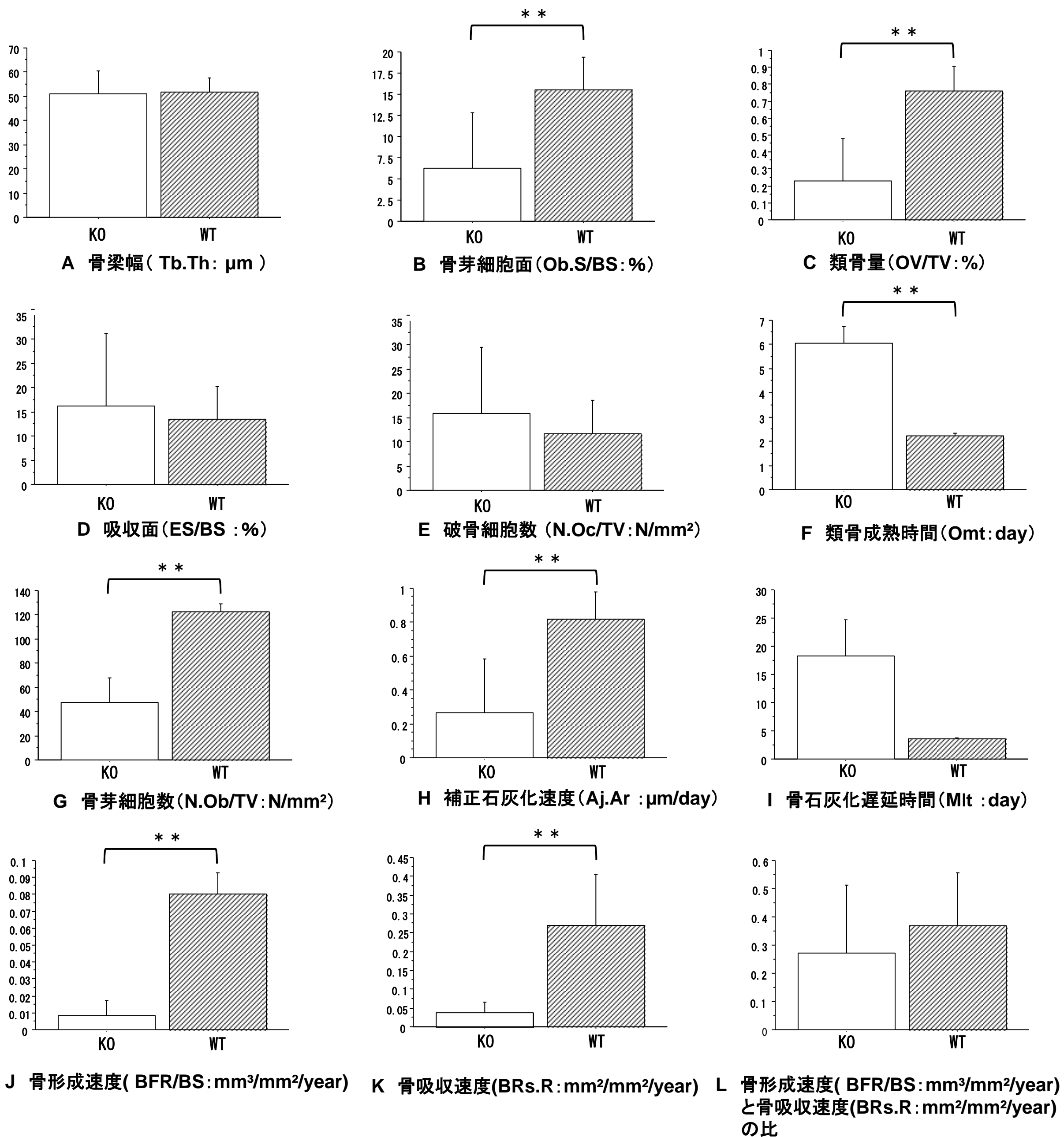


図5

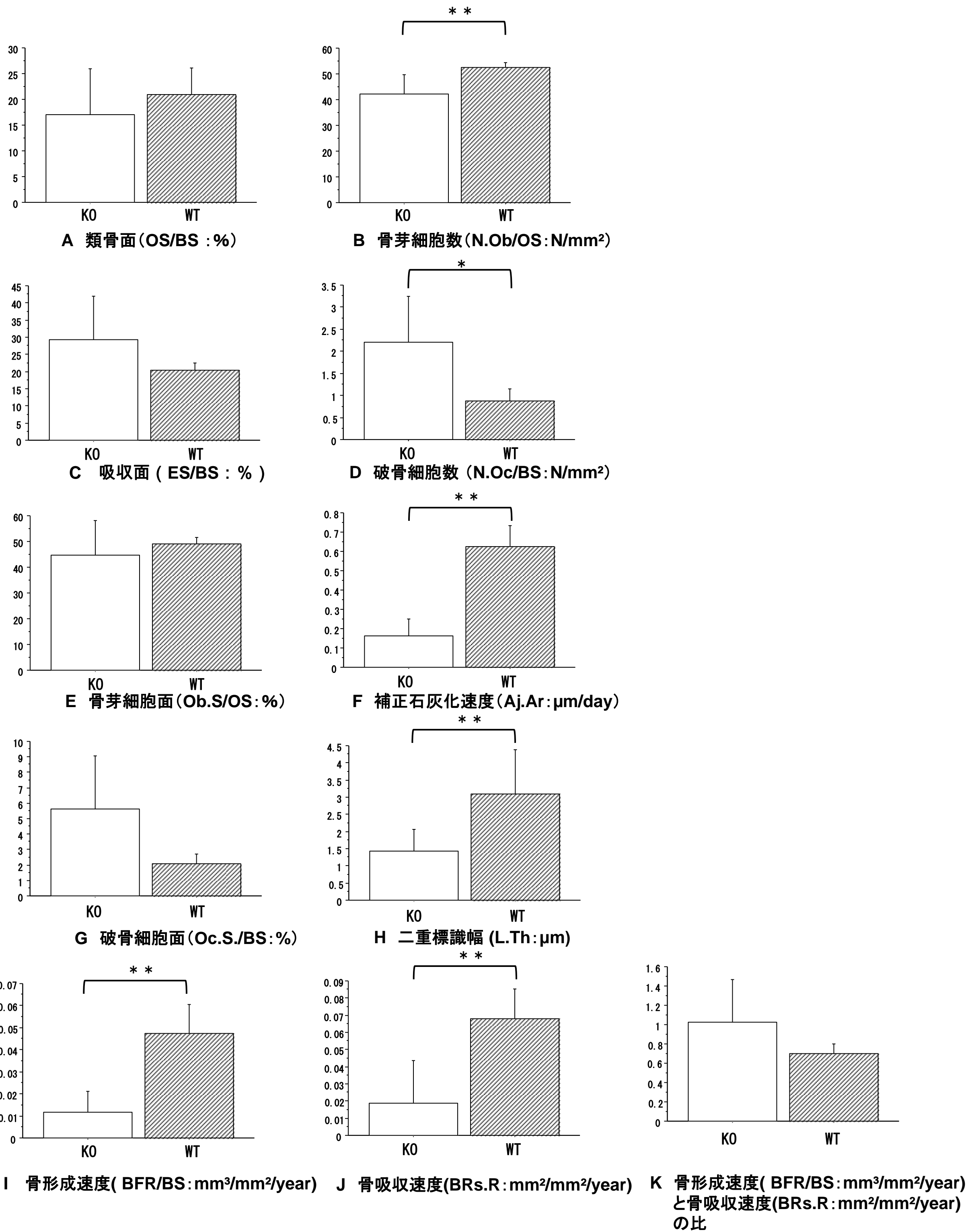
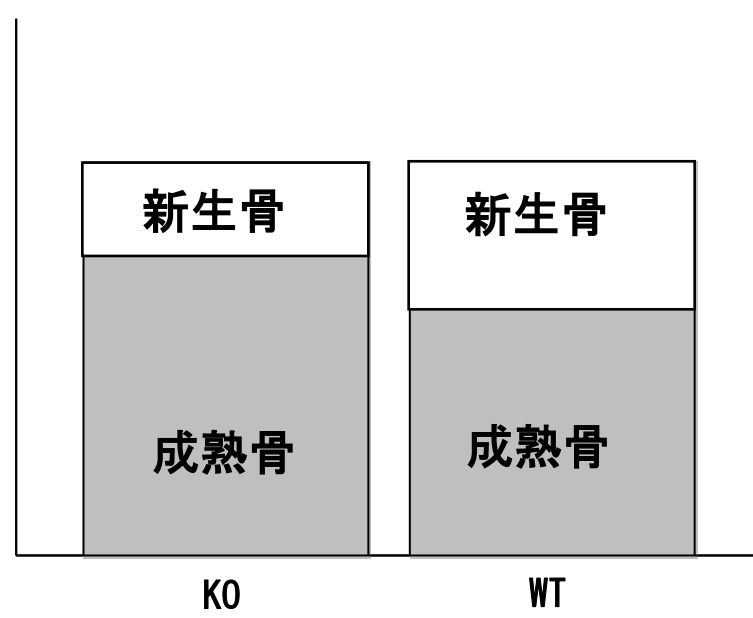


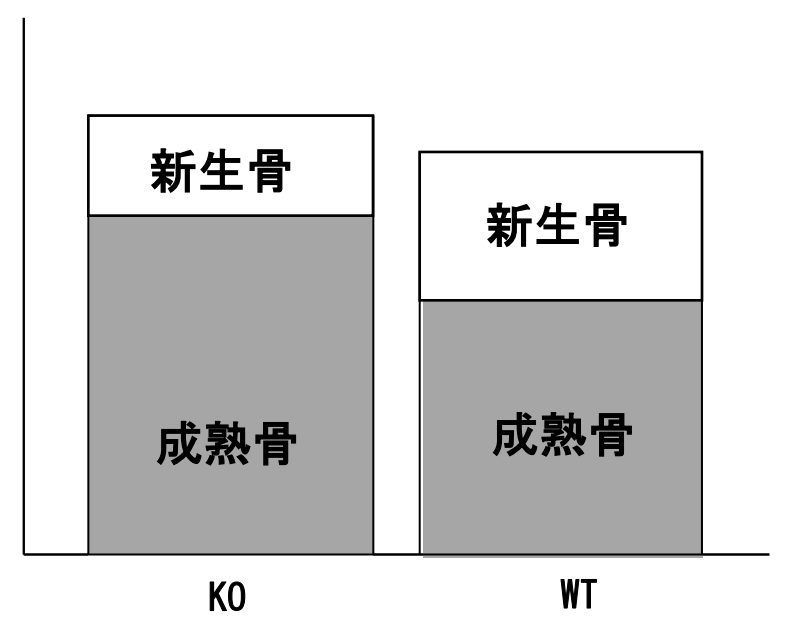
図6

(BV/TV : %)



海綿骨

(BV μm^2)



皮質骨

図7

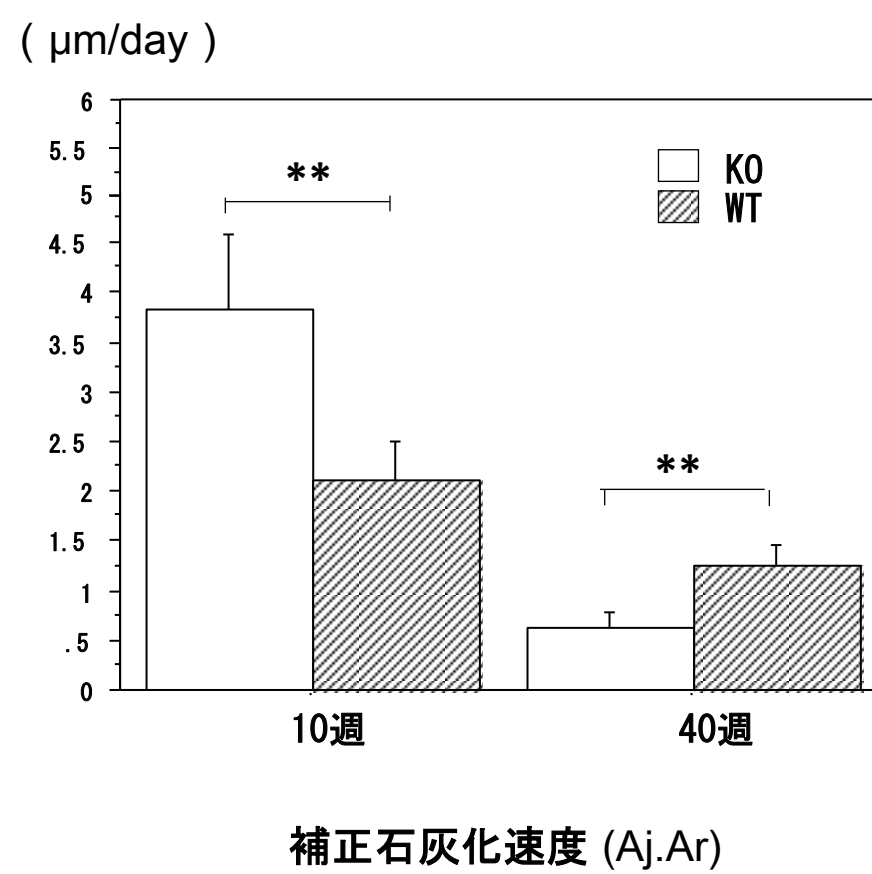


図8

図の説明

図1. 骨密度の測定領域の設定

(A) 白枠(下顎下縁平面に垂直かつ第一臼歯近心面を通る垂線, 最後方臼歯遠心面を通る垂線, 下顎下縁平面線とその平行線で筋突起を通る線で囲まれた領域)は二重エネルギーX線吸収骨密度測定装置(DXA), 小動物測定モードで測定する下顎骨体部の測定領域を示す.

点線(下顎平面に垂直かつ第一・二臼歯間を通る線)はpQCTによって測定される下顎骨の断面を示す.

(B) pQCTによる海綿骨と皮質骨の骨密度測定領域の設定: ①の領域は海綿骨の測定領域(0.2mm × 0.45mm)を示す. ②の領域に含まれる皮質骨部が皮質骨の測定領域.

皮質骨部では舌側面を下面にして、この面との垂線かつ下顎下縁皮質骨内側面に接する線より下縁の皮質骨部の領域を

pQCTで測定した.

海綿骨部では舌側面を下面にして、この面との垂線かつ切歯下縁の線(A)と、この面との垂線かつ切歯上縁の線(B)を設定. 次にAB間を3等分しC点を設定. 舌側面を下面にして、この面の垂線かつC点を通るラインを設定. このライン上での切歯舌側点と舌側皮質骨までの線分の midpoint を中心とした長さ0.2mmの1辺を有しかつ歯冠方向に長さ0.45mmの長方形を設定. この長方形部領域をqCTで測定した.

図2. 下顎骨重量の結果

群と週齢の関係の二元配置分散分析では 群*, 週齢**, 交互作用** に有意差を認めた. 下顎骨重量はKO群, WT群ともに 40週齢では10週齢に比べ重かった**. また, 交互作用は群の影響を受けていた. KO群とWT群間の下顎骨重量の比較をさらに unpaired t検定で行った結果, 40週齢のKO群はWT群に比べ有意に重かった**. 一方, 下顎骨面積では有意差を認めなかった.

グラフ: 平均値 ± 標準偏差 (n=5). *: P<0.05, **: P<0.01.

図3. 下顎骨骨体部(A), 海綿骨(B), 皮質骨(C)の骨密度

下顎骨骨体部(A)の骨密度について群と月齢の関係を二元配置分散分析で解析したところ, 月齢*, 交互作用*に有意差を認めた. 40週齢のKO群の骨密度はWT群よりも有意に大きいことがunpaired t検定により明らかになった*.

海綿骨(B)と皮質骨(C)の骨密度について群と月齢の関係を二元配置分散分析で検討したところ, 群(海綿骨**, 皮質骨*)に有意差を認めた. 海綿骨, 皮質骨ともに40週齢のKO群の骨密度*がWT群よりも大きいことがunpaired t検定により明らかになった. *: P<0.05, **: P<0.01.

図4. 海綿骨骨量と皮質骨骨量の結果と組織像

(A) 骨形態計測での海綿骨骨量と皮質骨骨量の結果(40週齢): 皮質骨骨量は KO群で有意に多い. *: P<0.05.

(B) 海綿骨と皮質骨の組織像(40週齢): テトラサイクリン-カルセイン骨二重標識(01TC-02-01CL-01)を行った海綿骨と皮質骨の光学顕微鏡像と蛍光顕微鏡像を示す. 黒矢印は骨吸収面を, 白矢印は標識された新生骨部を示す. 海綿骨と皮質骨ともにKO群では白矢印で示す新生骨部はほとんど見られない.

図5. 下顎海綿骨部の骨形態計測の結果(40週齢)

B 骨芽細胞面 (Ob.S/BS : %), C 類骨量 (OV/TV : %), G 骨芽細胞数 (N.Ob/TV : N/mm²), H 補正石灰化速度 (Aj.Ar),

J 骨形成速度 (BFR/BS), K 骨吸収速度 (BRs.R)はKO群ではWT群に比べて有意に低い. 一方, F 類骨成熟時間 (Omt)はKO群が

WT群に比べ有意に長い.

グラフ: 平均値 ± 標準偏差 (n=5). *: P<0.05, **: P<0.01.

図6. 下顎皮質骨の骨内膜面部の骨形態計測の結果(40週齢)

B 骨芽細胞数(N.Ob/OS), F 補正石灰化速度(Aj.Ar), H 二重標識幅(L.Th), I 骨形成速度(BFR/BS), J 骨吸収速度(BRs.R)はKO群ではWT群に比べて有意に低い.

D 破骨細胞数(N.Oc/BS)はKO群ではWT群に比べて有意に多い.

グラフ: 平均値 ± 標準偏差 (n=5). *: P<0.05, **: P<0.01.

図7. 新生骨と成熟骨の割合の模式図

海綿骨,皮質骨ともに成熟骨の割合が増加したことにより骨密度の増加をきたしたと考えられる.

図8. (補助データ) 脛骨近位部皮質骨: 骨内膜面部の骨形態計測の結果

10週齢のKO群の補正石灰化速度(Aj.Ar)はWT群に比べ有意に高い値を示した.

一方、40週齢では下顎骨の皮質骨骨内膜面部と同じくKO群がWT群に比べ有意に低くなっている.

グラフ: 平均値 ± 標準偏差(n=5). **: P<0.01.