

骨形成抑制因子であるスクレロスチン欠損マウスにおける BMP-2誘導性異所性骨の解析

中村 圭吾

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 健康増進口腔科学講座
(主指導教員：吉成 伸夫 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

Analysis of BMP-2-induced ectopic bone in sclerostin-deficient mice

KEIGO NAKAMURA

*Department of Oral Health Promotion, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University
(Chief Academic Adviser : Professor Nobuo Yoshinari)*

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

歯周炎は進行に伴い歯槽骨が吸収し、歯の喪失につながる疾患である。しかし現在の歯科治療では、高度に吸収された骨を完全に回復することは困難であり、歯槽骨の再生治療の発展が期待されている。近年、骨細胞から分泌されるスクレロスチンは、Wnt/ β -catenin シグナルを阻害し骨形成を阻害するタンパク質であることが報告された。スクレロスチンをコードする *SOST* 遺伝子の喪失は頭蓋骨における骨の過形成を特徴とする硬結性骨硬化症を引き起こす。スクレロスチンの働きを阻害する抗スクレロスチン抗体は骨形成を促進して骨量を増加することが報告されている。しかし、骨再生におけるスクレロスチン抑制の影響についての詳細は不明である。一方、骨誘導因子（Bone morphogenetic protein 2, BMP-2）は、骨基質中に存在し、異所性骨形成を誘導するタンパク質である。本研究では、BMP-2誘導性異所性骨におけるスクレロスチン発現を検討す

る。更に、スクレロスチン欠損マウスにおいて異所性骨を作製し、その骨量や骨密度が増加するかを検討することを目的とした。

Sost のプロモーター下に造礁サンゴ由来蛍光タンパク質（Zs-Green）の遺伝子を挿入した *Sost-Green* レポーターマウス（*Sost*^{G/+}）が松本歯科大学総合歯科医学研究所にて作製された。この *Sost*^{G/+} マウスは Exon1 へのノックインマウスである。このノックインにより *Sost* 遺伝子が欠損した *Sost* 遺伝子ホモ欠損マウス（*Sost*^{G/G}）マウスを得た。コントロールマウス（Wild-type, WT）として C57BL/6 マウスを使用した。これらの 8 週齢雄マウスの右側大腿部内側の筋膜下に、BMP-2 を浸漬した直径 2 mm の円柱のコラーゲンペレットを埋入し、14 日、28 日後に誘導された異所性骨を採取した。マイクロ CT および各種染色により、異所性骨の組織学的解析を行った。また、異所性骨における *Sost* 遺伝子発現の経時的

変化やスクレロシン欠損マウスに埋入した異所性骨の骨形成関連遺伝子への影響を検討するために、埋入後14日目の異所性骨の mRNA 発現を real-time RT-PCR にて解析した。また、骨芽細胞マーカーとして、アルカリホスファターゼ (Alkaline phosphatase, ALP) の免疫染色を行った。

WT マウスの BMP-2ペレットを埋入後14日目に回収した異所性骨は、直径3~4 mm の球形の骨が形成された。埋入後28日目に回収した WT の異所性骨では、扁平な形状の骨が形成された。*Sost^{G/G}* の異所性骨は WT と同程度の大きさだが、凸凹な形状の骨が形成された。

外殻の骨組織の蛍光観察では、埋入後14、28日目の *Sost^{G/G}* の異所性骨において、Zs-Green 陽性の骨細胞を認めたが、WT のマウスでは、Zs-Green 陽性の骨細胞は認められなかった。スクレロシンの免疫染色では、BMP-2ペレット埋入後14、28日目の *Sost^{G/G}* の異所性骨においてスクレロシン陽性骨細胞は認めなかったが、WT においてスクレロシン陽性の骨細胞を認めた。以上より、WT マウスの BMP-2誘導性異所性骨ではスクレロシン陽性骨細胞が出現するが、*Sost^{G/G}* マウスの異所性骨ではスクレロシン陽性骨細胞は消失していた。real-time RT-PCR に

よる解析では、WT の異所性骨において *Sost* 遺伝子の発現は、埋入後7日目では検出されず、10、14、28日目に検出され、14日目にピークを示した。

マイクロ CT を用いて、形成された異所性骨の骨量と骨塩量を定量的に解析した。埋入後14日目の異所性骨のマイクロ CT 水平断面画像より、異所性骨の外殻に多孔質な石灰化像を認めた。WT と比較して *Sost^{G/G}* の異所性骨の BV/TV (WT=4.59 %, *Sost^{G/G}*=9.04 %) と BMD (WT = 468mg/cm³, *Sost^{G/G}*=602mg/cm³) は有意に増加した。埋入後28日目の異所性骨のマイクロ CT 水平断面画像より、BMP ペレットを取り囲む外殻に層板様構造の石灰化像を認めた。WT と比較して *Sost^{G/G}* の異所性骨の BV/TV (WT=5.27 %, *Sost^{G/G}*=9.58 %) と BMD (WT=763mg/cm³, *Sost^{G/G}*=943mg/cm³) は有意に増加した。

以上の結果より、BMP-2ペレット埋入後14、28日目の異所性骨は、*Sost* 遺伝子とスクレロシンタンパク質が発現していた。スクレロシン欠損マウスにおいて、BMP-2ペレット埋入後14日、28日目の異所性骨の骨量が増加した。このことから、歯槽骨の再生治療において、スクレロシンの抑制は、骨量を増加させる可能性が示された。