

# 博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

川添麻衣より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 586 号

学位申請者 : かわ ぞえ ま い  
川 添 麻 衣

学位審査論文 : Glucocorticoid therapy causes contradictory changes of serum Wnt signaling-related molecules in systemic autoimmune diseases

(膠原病患者において Wnt シグナル関連因子はステロイド治療により矛盾した変動をとる)

著 者 : Mai Kawazoe, Kaichi Kaneko, Kotaro Shikano, Natsuko Kusunoki, Toshihiro Nanki, Shinichi Kawai

公 表 誌 : Clinical Rheumatology DOI : 10.1007/s10067-017-3689-3

論文内容の要旨 :

ステロイドは膠原病患者において欠くことのできない重要な薬物であるが、長期にわたるステロイド投与はステロイド性骨粗鬆症をきたしうる。ステロイドは様々な機序により骨形成を抑制し、骨吸収を増加させるが、骨形成における重要な細胞内シグナル伝達機構として Wnt/ $\beta$ -catenin 経路が近年注目されている。しかしステロイド治療による Wnt シグナルへの影響は未だ十分に検討されていない。そこで、本経路のリガンドである Wnt3a および抑制因子である sclerostin と Dickkopf-1 (Dkk-1) に着目し、患者血清におけるステロイド治療後のそれらの濃度の変動や、骨芽細胞での発現に対するステロイドの影響を調べることにより、ステロイド性骨粗鬆症における Wnt シグナルの臨床的意義を明らかにすることを目的とし、本研究を行った。

東邦大学医療センター大森病院膠原病科において新規にステロイド治療を開始した未治療の活動期膠原病患者 91 名 (56.9  $\pm$  1.9 歳 [平均  $\pm$  SEM]、女性 54 名・閉経 32 名) を対象に、プレドニゾロン 30~60 mg/日 (45.8  $\pm$  1.1 mg/日 [平均  $\pm$  SEM]) による治療前、治療 1, 2, 3, 4 週後の血清 Wnt シグナル関連因子、および骨形成マーカーである N-terminal peptide of type I procollagen (PINP)、bone alkaline phosphatase (BAP)、骨吸収マーカーである tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b (TRACP-5b)、N-telopeptide cross-linked type I collagen (NTX) を測定した。また、治療開始時および治療開始平均 15.6 ヶ月後の腰椎骨密度を比較した。なおステロイド性骨粗鬆症の管理と治療ガイドラインに従い、全症例で骨粗鬆症予防を目的にステロイド治療

開始と同時にビスホスホネート製剤（常用量のアレンドロネートまたはリセドロネート）を併用した。さらにヒト骨芽細胞を各種濃度のデキサメタゾンで刺激し、sclerostin およびDkk-1 の mRNA 発現を RT-PCR で検討し、培養上清中の各々の蛋白発現量を ELISA 法にて測定した。

血清 sclerostin、Dkk-1 はステロイド投与後 1 週目に有意に増加し、2 週目以降は減少した。血清 Wnt3a は減少傾向がみられたものの、有意な変動はなかった。血清 P1NP は 1 週目より有意に減少し、その後も低値が持続した。以上より、ステロイド開始後早期においては Wnt シグナル抑制因子が増加することが骨形成低下の一因と考えられた。しかしその後の骨形成低下については、Wnt シグナル以外のメカニズムも関与している可能性が示唆された。ヒト骨芽細胞を用いた *in vitro* の検討では、sclerostin の mRNA および蛋白発現は観察されなかった。一方で、Dkk-1 の mRNA および蛋白発現は検出され、デキサメタゾン濃度依存性に両者の発現量増加が認められたことから、患者で認められたステロイド治療開始後 1 週目の血清 Dkk-1 濃度増加の原因の一部を説明するものと考えられた。

血清 Wnt3a については、75 パーセンタイル値で 2 群に分け、Wnt3a 高値群・低値群で比較したところ、患者背景や骨代謝マーカーおよび sclerostin、Dkk-1 の変動に有意な差はなかったが、Wnt3a 高値群では血清 Wnt3a 濃度がステロイド開始後より有意に減少した。また、平均 15.6 ヶ月後の腰椎骨密度については、有意差はないものの Wnt3a 高値群でより低下する傾向が認められたことから、ステロイド治療前には高濃度の Wnt3a が骨形成を刺激していた患者では、治療後に Wnt3a が減少することで骨密度がより低下傾向となる可能性が示唆された。すなわち、ステロイド治療前の Wnt3a 濃度がステロイド性骨粗鬆症の合併しやすいの予測因子になる可能性があり、今後さらに症例を集積して検討すべき課題と考えられた。なお、全症例で骨吸収抑制剤であるビスホスホネート製剤を併用していたものの、骨吸収マーカーである血清 TRACP-5b は 1 週目より有意に増加し、その後も高値であった。すなわち、ステロイド治療による骨吸収増加に対する常用量のビスホスホネート製剤の効果は十分とは言えないと考えられた。

本研究の結果から、ステロイド性骨粗鬆症の予防対策としては、骨吸収を増加させない治療のみならず、特にステロイド開始直後に Wnt/ $\beta$ -catenin 経路を抑制させないことが重要であると考えられた。現在、Wnt シグナル阻害因子を中和する機序で骨形成を増加させる可能性のある抗 sclerostin 抗体などの骨形成刺激剤が臨床開発中であり、新たなステロイド性骨粗鬆症の治療薬として期待される。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 586 号	氏 名	川 添 麻 衣
学位審査担当者	主 査	龍 野 一 郎
	副 査	高 橋 寛
	副 査	亀 田 秀 人
	副 査	近 藤 元 就
	副 査	中 野 裕 康

学位審査論文の審査結果の要旨 :

成人において骨は常に骨吸収と骨形成による骨リモデリングによってその恒常性を保っている。この骨吸収と骨形成のバランスが崩れて骨量が減少した状態が骨粗鬆症である。代表的な骨粗鬆症として閉経後骨粗鬆症があるが、エストロゲン欠乏により骨吸収が亢進し、骨形成も亢進しているにもかかわらず、相対的な骨吸収の増加により骨量が減少する。ステロイドは膠原病患者をはじめとして、喘息などの自己免疫性疾患など幅広く使われているが、その副作用としてのステロイド性骨粗鬆症が大きな問題となっている。ステロイドは骨吸収の増加に加えて、骨形成をも抑制し、早期に過剰な骨量減少を起こす重篤な病態である。近年の研究により、骨形成にかかわる骨芽細胞の分化に Wnt/ $\beta$ -catenin 経路が深くかかわっていることがわかっているが、ステロイド治療による骨代謝にかかわる Wnt シグナルへの影響は未だ十分に検討されていない。そこで、申請者はそのリガンドである Wnt3a および抑制因子である sclerostin と Dickkopf-1 (Dkk-1) に着目し、東邦大学医療センター大森病院膠原病科において新規にステロイド治療を開始した未治療の活動期膠原病患者 91 名についてステロイド治療前後の患者血清中のこれらの因子、骨代謝マーカーの変動および腰椎骨密度に及ぼす影響を検討した。更に、ステロイドの作用を探索するために、培養系骨芽細胞を用いて、Wnt/ $\beta$ -catenin 系に対するステロイドの影響を解析した。

血清 sclerostin、Dkk-1 はステロイド投与後 1 週目に有意に増加し、2 週目以降は減少した。血清 Wnt3a は減少傾向がみられたものの、有意な変動はなかった。血清 PINP は 1 週目より有意に減少し、その後も低値が持続した。以上より、ステロイド開始後早期においては Wnt シグナル抑制因子が増加することが骨形成低下の一因と考えられた。ヒト骨芽細胞を用いた *in vitro* の検討では sclerostin の mRNA および蛋白発現は観察されなかったが、Dkk-1 の mRNA および蛋白発現はデキサメタゾン濃度依存性に発現量増加が認められた。加えて、血清 Wnt3a については、75 パーセントイル値で 2 群に分け、Wnt3a 高値群・低値群で比較したところ、Wnt3a 高値群では血清 Wnt3a 濃度がステロイド開始後より有意に減少し、腰椎骨密度が低下する傾向が認められたことから、ステロイド治療前の Wnt3a 濃度がステロイド性骨粗鬆症の合併の予測因子になる可能性が示唆された。本研究より、ステロイド性骨粗鬆症の病態形成には骨芽細胞の分化に深く関わっている Wnt/ $\beta$ -catenin 経路への影響、特にステロイド開始直後の Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の抑制が病態と深く関与していると結論付けた。

平成 29 年 10 月 24 日に行われた学位審査会において Wnt/ $\beta$ -catenin の生物学的意義、今回の研究実施する上での選択した患者集団特徴と限界、臨床倫理、認められた骨代謝マーカーの変化の臨床的意義、血液中の Wnt/ $\beta$ -catenin マーカーの意義、骨粗鬆症治療薬として、現在開発中の Wnt/ $\beta$ -catenin 系にかかわる抗体製剤の本研究からみた意義などへの多くの質問に的確に答えた。

審査委員一同は申請者に十分な学識があることを確認し、学位に値する研究内容であると評価した。