

【要約】

Bone union and strength effect of Romosozumab:

An imaging and mechanical study using a rat posterolateral lumbar fusion model

(ロモソズマブの骨癒合および骨強度に与える影響:

ラット腰椎後側方固定術モデルを用いた画像的および力学的試験での検討)

千葉大学大学院医学研究院 医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：大鳥 精司 教授)

向畑 智仁

【Title】

ラット脊椎固定術モデルを用いた Romosozumab 投与による骨癒合促進および骨強度上昇効果
についての検討

【Affiliation facility】

- (1) 千葉大学大学院医学研究院 整形外科
- (2) 筑波大学医学医療系 整形外科
- (3) 聖隷佐倉病院 整形外科
- (4) 東千葉メディカルセンター 整形外科
- (5) 聖マリアンナ医科大学 整形外科講座/脊椎センター
- (6) 千葉大学 フロンティア医工学センター

【Key word】

Romosozumab , ヒト化抗スクレロスチンモノクローナル抗体, 骨癒合, 腰椎後側方固定術, ラ
ット, 力学試験

Romosozumab, a humanized monoclonal sclerostin antibody, bone union, posterolateral lumbar
fusion, rat, mechanical strength examination

【Conflict of interest】 なし

初めに

近年では高齢社会を背景に、骨粗鬆症患者に対する脊椎固定術が増加し、椎体骨折やペディクルスクリュー(PS)ルースニングなどの術後合併症が問題となっている。骨粗鬆症患者においては引き抜き強度が弱く、PS ルースニングが生じやすいという報告がある[1]。今後、骨粗鬆症患者の脊椎手術は増加することが予想され、術後合併症を予防することが急務である。

骨粗鬆症薬は、骨リモデリングに作用し、骨強度を改善する効果がある。近年本邦に導入された Romosozumab は、骨形成の抑制因子であるスクレロスタチンに結合し、骨芽細胞系細胞における古典的 Wnt シグナル伝達抑制を阻害し骨形成を増加、骨吸収を低下させ、皮質骨及び海綿骨の骨量及び骨強度の増加をもたらす。[3-5]。

以上のことより Romosozumab は骨癒合促進および骨強度上昇効果も期待されている。

本研究では、ラット脊椎固定術モデルを用いて、Romosozumab による骨癒合促進および骨強度上昇効果について検討することを目的とした。

方法

本研究では 8 週目齢の Sprague-Dawley 雄ラット、12 匹を用いた。

すべてのラットに 3 種混合麻酔薬(Domitol 0.15ml/kg+Dormicum 2mg/kg+ Vetorphale 2.5mg/kg+ Saline 1.45ml/kg)を腹腔内に注射した。その後、抗菌薬(Ampicillin Sodium 20,000U/kg)を術前皮下投与した。[5]

背部正中に皮膚切開をおき、両側の傍脊柱筋筋膜を切開し、左右の第 4, 5, 6 腰椎の椎弓と横突起、第 4/5, 5/6 腰椎椎間関節を露出した。第 10 胸椎から第 2 腰椎までの棘突起から移植骨として 40mg 採取し、左右両側の椎間関節部から横突起まで間に置き、自家骨移植とした。[4,6,7]。体格による差異を除くため、体重を基準に Romosozumab 群(R group): 6 匹と Control 群(C group):6 匹に群分けを行った。

R group には Romosozumab を、C group には生理食塩水を、25mg/kg の量で、10 週目間毎週 2 回皮下注射で投与した。[7,8]

CT 装置(in vivo micro-CT system, R_mCT2, Rigaku Co., Tokyo, Japan)で術直後に骨移植部位を撮影した[5]。術後 10 週目に 3 種混合麻酔の overdose による安楽死後、腰椎と左大腿骨を摘出し、再度撮影を行った。

取得した画像データを本研究と関連のない 3 名の脊椎外科医で、両群における椎間関節および横突起間の骨癒合率を評価した。加えて骨癒合の定量評価として Analyze 12

software(AnalyzeDirect, Overland Park, KS, USA)(18)、Ziostation2 software(Ziosoft Inc., Tokyo, Japan)を用いて、両群における骨癒合部の体積を計測し比較検討した。

術後 10 週目に 3 種混合麻酔の overdose による安楽死後、右股関節から右大腿骨を離断し、同様の CT 装置で大腿骨を撮影した。得られた画像データから、各個体における骨密度を専用のソフトウェア(Bone analysis software, Rigaku Co.)を用い計測した。[4,5,9]

ラットから L4-L6 腰椎標本を採取し、その両側をプラスチックホルダー (Cryomold #2, Sakura Finetek, Tokyo, Japan) で固定し、3 点曲げ試験装置 (Shimadzu, Tokyo, Japan) 上にセットした。腹側を 2 点で、背側を 1 点で固定して圧力をかけることで PLF を施行した脊椎背側の圧縮強度を評価した。そののちに CT 撮影を行い、骨折部位を確認した。
全ての各群データの比較は対応のない t 検定を用いて、有意水準(p)は 5%未満とした。

結果

両群における椎間関節および横突起間の平均骨癒合率は 92%(標準偏差値 5.6)の C 群に対し、R 群は 100%(標準偏差値 0)と有意に高かった。

両群における骨癒合部の体積は、術直後は C group が 315.6mm³(標準偏差値 18.7), R group が 320.3mm³(標準偏差値 11.4)で両群間の有意差はなかったが、術後 8 週目の平均体積は C group が 652.6mm³(標準偏差値 30.7)に対し、R group が 826.7mm³(標準偏差値 27.5)と有意に大きかった(p < 0.05)。

骨癒合部体積の増加率についても、C group が 106.8% (標準偏差値 10.4)に対し、R group が 158.1%(標準偏差値 12.9) (p < 0.05)。

大腿骨の遠位骨幹端の平均骨密度についても C group が 725.5mgHA/cm³(標準偏差 12.1)に対し R group が 830.2mgHA/cm³ (標準偏差 11.1) と有意に大きかった(p < 0.05)。

破断時の圧力の平均値は以下の通りであった。C 群：209.3N(標準偏差 35.4), R 群：312.5N(標準偏差 43.2)。R 群は C 群より有意に高かった (p < 0.05)。破断後の CT で、骨折部位は全例で椎体軟骨の終板上に認められた。

考察と結語

本研究においてラット腰椎後側方固定術(PLF)モデルにおける Romosozumab 投与による骨癒合・骨強度促進効果に関する検討を行った。CT による評価では、Romosozumab 投与により Control 群と比較し明らかに高い骨癒合であった。また、骨癒合部の最終観察時の骨癒合部の体積は有意に高値であった。骨癒合部体積の増加率も有意に増加していた。3 点曲げにおける PLF 部の圧縮に対する強度は Control 群に比べ Romosozumab 群が有意に高かった。よってこれらの結果から、Romosozumab 投与により骨癒合促進及び骨強度増加することが示唆された。

【References】

1. Lehman RA, Dmitriev AE, Cardoso MJ, Helgeson MD, Christensen CL, Raymond JLW, Eckel TT, Riew KD. Effect of teriparatide [rhPTH(1,34)] and calcitonin on intertransverse process fusion in a rabbit model. Spine [Internet]. 2010 Jan [cited 2022 Jan 28];35(2):146–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20081509/>

2. Saag KG, Petersen J, Brandi ML, Karaplis AC, Lorentzon M, Thomas T, Maddox J, Fan M, Meisner PD, Grauer A. Romosozumab or Alendronate for Fracture Prevention in Women with Osteoporosis. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2017 Oct 12 [cited 2022 Jan 28];377(15):1417–27. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1708322>
3. Semënov M, Tamai K, He X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *The Journal of biological chemistry* [Internet]. 2005 Jul 22 [cited 2022 Jan 28];280(29):26770–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15908424/>
4. Shiga Y, Orita S, Kubota G, Kamoda H, Yamashita M, Matsuura Y, Yamauchi K, Eguchi Y, Suzuki M, Inage K, Sainoh T, Sato J, Fujimoto K, Abe K, Kanamoto H, Inoue M, Kinoshita H, Aoki Y, Toyone T, Furuya T, Koda M, Takahashi K, Ohtori S. Freeze-Dried Platelet-Rich Plasma Accelerates Bone Union with Adequate Rigidity in Posterolateral Lumbar Fusion Surgery Model in Rats. *Scientific Reports* 2016 6:1 [Internet]. 2016 Nov 11 [cited 2022 Jan 28];6(1):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep36715>
5. Kaito T, Morimoto T, Kanayama S, Otsuru S, Kashii M, Makino T, Kitaguchi K, Furuya M, Chijimatsu R, Ebina K, Yoshikawa H. Modeling and remodeling effects of intermittent administration of teriparatide (parathyroid hormone 1-34) on bone morphogenetic protein-induced bone in a rat spinal fusion model. *Bone reports* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2022 Jan 28];5:173–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28580385/>
6. Hayashi T, Lord EL, Suzuki A, Takahashi S, Scott TP, Phan K, Tian H, Daubs MD, Shiba K, Wang JC. A comparison of commercially available demineralized bone matrices with and without human mesenchymal stem cells in a rodent spinal fusion model. *Journal of Neurosurgery: Spine* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2022 Jan 28];25(1):133–7. Available from: <https://thejns.org/spine/view/journals/j-neurosurg-spine/25/1/article-p133.xml>
7. Ominsky MS, Brown DL, Van G, Cordover D, Pacheco E, Frazier E, Cherepow L, Higgins-Garn M, Aguirre JI, Wronski TJ, Stolina M, Zhou L, Pyrah I, Boyce RW. Differential temporal effects of sclerostin antibody and parathyroid hormone on cancellous and cortical bone and quantitative differences in effects on the osteoblast lineage in young intact rats. *Bone*. 2015 Dec 1;81:380–91.
8. Li X, Ominsky MS, Villasenor KS, Niu QT, Asuncion FJ, Xia X, Grisanti M, Wronski TJ, Scott Simonet W, Ke HZ. Sclerostin Antibody Reverses Bone Loss by Increasing Bone Formation and Decreasing Bone Resorption in a Rat Model

- of Male Osteoporosis. *Endocrinology* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2022 Jan 28];159(1):260–71. Available from:
<https://academic.oup.com/endo/article/159/1/260/4560159>
9. Lehman RA, Dmitriev AE, Cardoso MJ, Helgeson MD, Christensen CL, Raymond JLW, Eckel TT, Riew KD. Effect of teriparatide [rhPTH(1,34)] and calcitonin on intertransverse process fusion in a rabbit model. *Spine* [Internet]. 2010 Jan [cited 2022 Jan 28];35(2):146–52. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20081509/>
 10. Bosemark P, Isaksson H, Tägil M. Influence of systemic bisphosphonate treatment on mechanical properties of BMP-induced calluses in a rat fracture model: Comparison of three-point bending and twisting test. *Journal of Orthopaedic Research* [Internet]. 2014 May 1 [cited 2022 Jan 28];32(5):721–6. Available from: <https://portal.research.lu.se/en/publications/influence-of-systemic-bisphosphonate-treatment-on-mechanical-prop>
 11. Poole KES, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Löwik CW, Reeve J. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* [Internet]. 2005 Nov [cited 2022 Jan 28];19(13):1842–4. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16123173/>
 12. Kim G, Kazuhide Inage |, Shiga Y, Tomohito Mukaihata |, Tajiri I, Eguchi Y, Suzuki-Narita M, Hiromitsu Takaoka |, Hozumi | Takashi, Mizuki N, Tsuchiya R, Otagiri T, Hishiya T, Arai T, Toshi N, Furuya T, Maki | Satoshi, Nakamura J, Hagiwara S, Aoki Y, Koda M, Takahashi | Hiroshi, Akazawa T, Ohtori S, Sumihisa Orita |. Bone union-promoting effect of romosozumab in a rat posterolateral lumbar fusion model. *Journal of Orthopaedic Research®* [Internet]. 2022 Feb 4 [cited 2022 Feb 8]; Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jor.25287>
 13. van Bezooijen RL, Svensson JP, Eefting D, Visser A, van der Horst G, Karperien M, Quax PHA, Vrieling H, Papapoulos SE, ten Dijke P, Löwik WGMC. Wnt but not BMP signaling is involved in the inhibitory action of sclerostin on BMP-stimulated bone formation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* [Internet]. 2007 Jan [cited 2022 Jan 28];22(1):19–28. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17032150/>

14. Krause C, Korchynskyi O, de Rooij K, Weidauer SE, de Gorter DJJ, van Bezooijen RL, Hatsell S, Economides AN, Mueller TD, Löwick CWGM, ten Dijke P. Distinct modes of inhibition by sclerostin on bone morphogenetic protein and Wnt signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* [Internet]. 2010 Dec 31 [cited 2022 Jan 28];285(53):41614–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20952383/>
15. Brown JP, Engelke K, Keaveny TM, Chines A, Chapurlat R, Foldes AJ, Nogues X, Civitelli R, de Villiers T, Massari F, Zerbini CAF, Wang Z, Oates MK, Recknor C, Libanati C. Romosozumab improves lumbar spine bone mass and bone strength parameters relative to alendronate in postmenopausal women: results from the Active-Controlled Fracture Study in Postmenopausal Women With Osteoporosis at High Risk (ARCH) trial. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2022 Jan 28];36(11):2139–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34190361/>
16. Chavassieux P, Chapurlat R, Portero-Muzy N, Roux JP, Garcia P, Brown JP, Libanati C, Boyce RW, Wang A, Grauer A. Bone-Forming and Antiresorptive Effects of Romosozumab in Postmenopausal Women With Osteoporosis: Bone Histomorphometry and Microcomputed Tomography Analysis After 2 and 12 Months of Treatment. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2022 Feb 8];34(9):1597–608. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31233639/>
17. Müller R. Bone microarchitecture assessment: current and future trends. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* [Internet]. 2003 Sep [cited 2022 Feb 8];14 Suppl 5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14504712/>
18. Padhi D, Jang G, Stouch B, Fang L, Posvar E. Single-dose, placebo-controlled, randomized study of AMG 785, a sclerostin monoclonal antibody. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* [Internet]. 2011 Jan [cited 2022 Jan 28];26(1):19–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20593411/>