HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	A quantitative analysis of bone lamellarity and bone collagen linearity induced by distinct dosing and frequencies of teriparatide administration in ovariectomized rats and monkeys [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	佐藤, 孝紀
Citation	北海道大学. 博士(歯学) 甲第15022号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/86002
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Takanori_Sato_abstract.pdf (論文内容の要旨)

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（歯学）　　氏　名　佐 藤　孝 紀

学　位　論　文　題　名

A quantitative analysis of bone lamellarity and bone collagen linearity induced by distinct dosing and frequencies of teriparatide administration in ovariectomized rats and monkeys

（卵巣摘出ラットおよびサルにおけるテリパラチドの投与量および投与頻度の違いにより生じる、骨の層板構造および骨コラーゲンの直線性の変化の定量的解析）

キーワード
Teriparatide, Bone lamellarity, Collagen linearity,
SHG (Second Harmonic Generation), AI-based automatic recognition system

骨粗鬆症は、骨量の低下と骨質の劣化によって骨強度が低下し、骨折リスクが増加する骨の脆弱化疾患である。骨粗鬆症患者は、易骨折性により日常生活動作(ADL)が制限され、生活の質(QOL)が著しく低下する。骨粗鬆症治療薬の一つであるPTH製剤:テリパラチド(TPTD)は、骨形成促進作用により骨量を改善し骨折の予防効果を示す。近年、TPTDには、骨量のみならず骨質の改善効果もあるとされ、骨質改善効果のある唯一の骨粗鬆症治療薬として注目されている。TPTD の骨質改善効果として、コラーゲン線維同士をつなぐコラーゲン架橋の生化学的性質の改善や、骨の微小な損傷をリカバリーすることが明らかになっており、このような効果により骨の柔軟性を向上させると考えられる。骨の柔軟性には、骨コラーゲンの配向や配列など空間（トポロジー）特性が重要な要因であると考えられる。しかしながら、骨コラーゲン線維の空間的な配列に対するTPTDの効果を定量的に評価した報告はない。

そこで我々は、ラットおよびカニクイザルの骨粗鬆症モデル動物に対して、先進的なイメージング方法やAIを活用した自動形態認識システムを応用し、骨質を規定する骨微細構造パターンやコラーゲン線維のトポロジー特性を定量評価する手法の構築、ならびにTPTDの骨質に対する薬理効果の検討を行った。

実験モデルとして、雌性ラット（3週齢）およびカニクイザル（9~15歳齢）を用いて卵巣摘出術(OVX)を行い、骨粗鬆症モデルとした。ラットを用いた実

験系は、TPTDの投与用量（0, 1.2, 6, 30 μg/kg）および頻度（3/week, 1/day, 2/day, 3/day）の組み合わせによる14群と偽手術群を含めた計15群で構成した。TPTDは手術後3週目より投与を開始し4週間投与した。また、組織採取の8日前および3日前にカルセインを投与し、二重蛍光標識を行った。カニクイザルを用いた実験系は、OVX 群（vehicle, 1/week）、TPTD-L群（1.2μg/kg, 1/week）、TPTD-H群（6.0μg/kg, 1/week）、偽手術群の4群で構成した。TPTDは手術後1週目から18か月間投与した。また組織採取の21日前および3日前にカルセインを投与し、二重蛍光標識を行った。

TPTD投与期間終了後、骨代謝マーカー、骨形態計測により、OVX 群、TPTD投与群、偽手術群の比較検討を行なった。さらには、腰椎を採取し非脱灰骨組織切片を作成し、カルセイン由来の新生骨蛍光シグナルと、骨コラーゲン由来の第二次高調波（Second Harmonic Generation: SHG）シグナルを、網羅的にイメージングした。SHGイメージングは、コラーゲン構造に特異的な光シグナルを検出できる方法である。これにより、骨コラーゲン線維を特異的に可視化することが可能である。また本研究では、蛍光シグナルの解析において、A Iを活用した形態計測の手法を応用した自動空間蛍光解析法を構築し、骨新生の空間パターンおよび骨コラーゲン線維のトポロジー特性を定量的に解析した。

カルセイン由来の新生骨蛍光シグナルの数、面積、長さ、外周を測定するパラメータ解析により、骨形成の空間的パターンの定量化を行った。解析の結果、カルセイン由来シグナル連続性が、TPTDの投与により用量依存的に増強されることが明らかになった。また明視野微分干渉（DIC） 顕微鏡で骨組織を観察した結果、カルセイン由来の蛍光シグナルの連続性などの空間分布パターンが，海綿骨の層板構造形成と関連していた。これらのことは、TPTD投与により、骨形成の同期性が向上することすなわち時空間的に同調した骨形成が増強することにより既存の骨表面に層板様の構造が形成されることを示していた。

この知見をもとに，サル腰椎の非脱灰切片に対して、多光子励起顕微鏡を応用したSHGイメージングを行った。また、画像解析により、骨コラーゲンの空間（トポロジー）特性を定量化する方法を確立し、TPTDによる効果を比較検討した。解析の結果、OVX群では、面積や長さのパラメーターがSham群に対して減少がみられたが、TPTD投与により用量依存性に増加が認められた。特に長さについてはTPTD-H群でOVX群に対して有意な増加が認められた。一方、シグナルの数は、面積や長さのパラメーターの結果と逆の傾向を示し、OVX群

では増加しTPTD-H群では有意な減少が認められた。これらの知見は、OVX群ではコラーゲン線維の空間的配列が分断されて異方的であるため、連続性が低下しているのに対し、TPTD 投与用量依存的にコラーゲン線維の直線的で等方的な配列が促進され、連続性が向上していると考えられた。以上のことから、骨新生空間パターンならびに骨コラーゲンのトポロジー特性の定量解析により、TPTD投与用量依存的に新生骨形成面の連続性および骨コラーゲン線維の連続性が増大することが明らかとなった。

本研究により、骨質の重要な要因である骨微細構造を規定する骨形成の空間パターンや骨コラーゲン線維のトポロジー特性を可視化・定量化することが可能になった。また本研究にて構築した自動空間蛍光解析法は、AI活用による主観性を排除した手法であるため、バイアスを排除した客観的な画像解析を短時間かつ網羅的に行うことが出来る有用な解析ツールでとなると考えられた。さらにTPTDの薬理効果として、生理的コラーゲン架橋の回復のみならず、骨微細構造および骨コラーゲン線維の配列を整える効果すなわち骨コラーゲンの整調効果があることが明らかとなった。これは、骨に荷重が加わった際に、荷重の散逸機構を促進することで骨の柔軟性向上に寄与し、骨強度の改善に貢献していると考えられる。上記のことから、本研究成果は、新規の骨粗鬆症の病態評価基準と解析ツールを提供し、TPTD をはじめとする骨粗鬆症治療薬の薬理効果の評価法としても応用可能であり、骨粗鬆症の克服に大きく貢献するものであると考えられた。