



Title	Histological assessment on the biological function of vascular endothelial cells in the initial process of cortical porosity in mice with PTH administration [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	阿部, 未来
Citation	北海道大学. 博士(歯学) 甲第15938号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/92487">http://hdl.handle.net/2115/92487</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
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	Miki_Abe_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

# 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏名 阿部 未来

審査担当者 主査 教授 網塚 憲生  
副査 教授 飯村 忠浩  
副査 教授 山本 恒之  
副査 准教授 長谷川 智香

## 学位論文題名

Histological assessment on the biological function of vascular endothelial cells in the initial process of cortical porosity in mice with PTH administration  
(PTH 投与マウスの皮質骨多孔化初期過程における血管内皮細胞の生物学的作用に関する組織学的検索)

審査は、審査担当者全員の出席の下、はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われた。内容を以下に記す。

副甲状腺ホルモン（PTH）は、生理学的には骨吸収を促進し、血中カルシウム濃度を上昇させるホルモンである。一方、PTH製剤の間歇投与では骨量増加を誘導することから、骨粗鬆症治療薬として用いられる。しかし、長期連日間歇投与は皮質骨多孔化を誘導することも報告されている。本研究では、PTH投与で誘導される皮質骨多孔化の初期過程における病理組織メカニズムを解明するため、PTH投与後の大腿骨・脛骨皮質骨の骨芽細胞、破骨細胞、骨特異的血管の組織学的所見を検索した。

生後 6 週齢雄性 C57BL/6J マウスに、生理食塩水(コントロール群)、または、40 $\mu$ g/kg/day の hPTH[1-34] (PTH 投与群) を 1 日 4 回の投与頻度で 1, 3 日, 1, 2, 3 週間にわたって腹腔内投与した。これらのマウスをアルデヒド固定した後、右大腿骨はマイクロ CT 撮影後にパラフィン切片を作成した。皮質骨における解析領域を、成長板軟骨近位 950 $\mu$ m から 700 $\mu$ m ごとに、Zone1, Zone2, Zone3 として各種の組織化学解析を行った。また皮質骨内膜側に面する長さ 700 $\mu$ m・幅 100 $\mu$ m の領域において、血管-皮質骨間距離と TRAP 陽性破骨細胞数を計測し、Student's *t*-test による統計解析を実施した。一方、左大腿骨を用いて、未脱灰・脱灰樹脂切片を作成し、von Kossa 染色やトルイジンブルー染色、透過型電子顕微鏡解析を行った。左脛骨皮質骨は、total RNA を抽出し RNA-sequence 解析、real-time PCR 解析を行った。

PTH 投与マウス大腿骨では、皮質骨多孔化は投与 1 週後から認められ、骨幹端部から骨幹部に、骨内膜側から骨外膜側に経時的に進展していた。PTH 投与 1 週後の皮質骨を観察

すると、Zone1 で皮質骨内部に血管と多数の破骨細胞を認め、Zone2, 3 では皮質骨表面に多数の小径を示す血管と破骨細胞が観察された。また、一部の破骨細胞は、endomucin 陽性血管と共に皮質骨内部へ侵入していた。血管-皮質骨間距離は、Zone1-3 全てにおいて、PTH 投与群ではコントロール群と比較して有意に低下する一方、破骨細胞数が増加していた。透過型電子顕微鏡観察によって、血管侵入に先行して破骨細胞が骨基質吸収を行いながら骨基質内部に侵入する像が認められた。

PTH 投与群の皮質骨において、肥厚した前骨芽細胞層に ALP,  $\alpha$ SMA, VCAM1, RANKL 陽性反応が認められ、その内部で PDGFbb 陽性破骨細胞と endomucin 陽性血管が互いに近接して局在していた。このことから、PTH 投与群では endomucin 陽性血管と破骨細胞は共に連なり ALP/ $\alpha$ SMA/VCAM1/RANKL 陽性を示す前骨芽細胞層を足掛かりに皮質骨表面へと移動する可能性が示唆された。

RNA-sequence 解析では、PTH 投与群において多数の血管新生関連因子の遺伝子発現が上昇していた。特に、骨細胞由来である *Dkk1* と、その受容体である *Ckap4*, 下流で活性化する血管新生因子 *Plvap* の発現が PTH 投与群で有意に上昇しており、多くの骨細胞に *Dkk1* 強陽性反応を、皮質骨表面や内部に侵入する血管に PLVAP 陽性反応を認めた。従って、PTH 投与群では、骨細胞由来の *Dkk1* が血管内皮細胞に作用して血管新生を誘導する可能性が推察された。

以上より、PTH 投与マウスにおける皮質骨多孔化の初期段階では、皮質骨の骨内膜側の ALP/ $\alpha$ SMA/VCAM1/RANKL 陽性前骨芽細胞層に向かって、endomucin 陽性血管と破骨細胞が集積する可能性、また、その後、皮質骨の骨細胞が *Dkk1* を産生し、前骨芽細胞層の endomucin 陽性血管の血管新生および骨基質への侵入を誘導する可能性が推察された。

審査担当者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた。以下にその項目を記す。

- (1) PTH の生理学的作用と薬理学的作用について
- (2) 薬剤の投与間隔に関する適切な薬理学用語について
- (3) マウスの実験系で他の動物種よりも高用量の PTH 投与を必要とする理由について
- (4) 設定した観察領域の生物学的理由について
- (5) 皮質骨由来の total RNA 抽出方法について
- (6) ハバース系の存在する動物における皮質骨多孔化について
- (7) PTH 間歇投与後の皮質骨表面での細胞の形態学的特徴について

上記の質疑応答から、申請者は本研究の内容を中心とした専門分野はもとより、関連分野について十分な理解と学識を有していることが確認された。

以上、審査担当者全員は、学位申請者が博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認めた。