HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Intermittent administration of teriparatide with high and low frequencies showed different histological profile of bone formation in mice [an abstract of entire text]
Author(s)	山本, 知真也
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12160号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62185
Type	doctoral thesis
File Information	Tomomaya_Yamamoto_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要約

学位論文題目

Intermittent administration of teriparatide with high and low frequencies showed different histological profile of bone formation in mice

（マウスにおけるテリパラチド（PTH）の投与頻度の違いによる骨形成の組織学的変化について）

博士の専攻分野名称　　博士（歯学）　　氏名　山本　知真也

【背景と目的】　副甲状腺ホルモン（parathyroid hormone：PTH）を持続投与すると骨吸収が、また、間歇投与すると骨形成が優位に誘導されることが知られている。以前の我々の報告では、hPTH[1-34]をマウスに間歇投与すると、骨芽細胞が基質合成を活発に行い、また、前骨芽細胞は盛んに細胞増殖を行うことを明らかにしてきた。さらに、破骨細胞が存在しない環境では、PTH は前骨芽細胞の細胞増殖を促進するが、骨芽細胞への分化ならびに骨基質合成を誘導しないことを見出している。よって、我々は、PTH 間歇投与による骨芽細胞の骨基質合成は、破骨細胞とのカップリング基盤とした骨リモデリングによるものと推察してきた。

近年、開発された骨形成促進薬であるテリパラチド（teriparatide：合成型 hPTH[1-34]）は、わが国において、連日投与と週１回投与の二種類の処方が存在する。ところが、PTH 連日投与は骨形成マーカーと骨吸収マーカーを上昇させるが、PTH 週１回投与は骨形成マーカーを上昇させる一方、骨吸収マーカーを低下させることが報告されている。このことは、テリパラチドの投与頻度の違いは骨代謝マーカーの異なった動向を誘導することを強く示唆するものと考えられる。さらに、Ma らのグループは、PTH 投与による骨形成は、カップリングを基盤とした骨リモデリングだけでなく、ミニモデリングでも誘導されることを報告している。ミニモデリングとは破骨細胞の骨吸収に依存しない骨形成であり、休止期骨芽細胞が活性型骨芽細胞となり、新しい骨を古い骨基質上に添加してゆく現象をいう。

以上を踏まえると、テリパラチド、すなわち、hPTH[1-34]の投与頻度が異なる場合に、骨形成はカップリングに乗じた骨リモデリングだけによるものではない可能性がでてきた。そこで、我々は、hPTH[1-34]の投与頻度を変えてマウスに投与することで、骨の細胞群の組織学的反応、ならびに、骨形成の様式が骨リモデリングあるいはミニモデリングによるものか組織化学的に検索した。

【材料と方法】　本実験は、北海道大学動物実験に関する規定に基づき行われた（承認番号 15-0032）。生後６週の雄性 ICR マウスに hPTH[1-34]を 1 日の総投与量が 20μg/kg/日または 80μg/kg/日（1 日あたりの総投与量が 20 μg/kg または 80 μg/kg）、あるいは、1 回の投与量が

80μg/kg/回（１回における投与量が 80 μg/kg）となるように２週間腹腔内投与した。また、ラット・マウスの骨代謝回転（activation frequency）は、ヒトに比べて数倍高いという報告を踏まえて、投与頻度を１回/２日、１回/日、２回/日、４回/日（以下、１回/２日、１回/日を低頻度群、２回/日、４回/日を高頻度群）とした。これらのマウスをアルデヒド溶液で灌流固定後、大腿骨を摘出し、通法にてパラフィンまたは Epoxy 樹脂に包埋した。パラフィン切片では、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP: tartrate-resistant acid phosphatase)の酵素組織化学、アルカリフォスファターゼ(ALP: alkaline phosphatase)、Proliferating cell nuclear antigen(PCNA)、オステオポンチン、fibroblast growth factor (FGF)23 の免疫組織化学を行った。また Epox 樹脂では､未脱灰切片を用いて von Kossa 染色を､脱灰超薄切片を用いて透過型電子顕微鏡観察を行った。

【結果と考察】 80 μg/kg/日群と 80 μg/kg/回群において、hPTH[1-34]を１回/２日、１回/日、２回/日、４回/日の間隔で２週間投与した結果、PTH 投与頻度が高いほど大腿骨遠位部の骨幹端の骨梁数および骨量が増加しており、80 μg/kg/日群と 80 μg/kg/回群では明らかな組織学的な違いは認められなかった。このことから１日あたりの PTH 総投与量を一定にした場合、PTH の投与頻度が高いほど、骨梁および骨量が増加すると考えられた。しかし、高頻度投与では多孔化した皮質骨が認められたため、マウスとしては比較的投与量が少ない 20 μg/ｋｇ/日の hPTH[1-34]を用いて同様の実験を行った。その結果、やはり、PTH の投与頻度が高くなるにつれて骨梁が増加することが確認されたが、骨幹端を拡大観察すると、低頻度投与群（１回/２日，１回/日）では数は多くないが太く滑らかな骨梁が、また、高頻度投与群（２回/１日，４回/１日）では多数の細い骨梁が発達することが明らかとなった。

同サンプルの連続切片を用いて TRAP 染色を行うと、コントロール群と比較して、PTH 低頻度投与群は破骨細胞の増加を示さなかったが、PTH 高頻度投与群は多くの破骨細胞を有しており、網目状を示す多数の TRAP 陽性セメントラインが形成されていた。ALP 染色を行うと、コントロール群より PTH 低頻度投与群が、また、PTH 低頻度投与群より PTH 高頻度投与群が、より強い ALP 陽性

骨芽細胞と前骨芽細胞の厚い細胞層を発達させていた。従って、PTH 高頻度投与群では、活発な骨リモデリングが起きていると推察された。そこで、von Kossa 染色にて骨基質石灰化を検索すると、PTH 低頻度投与では緻密な石灰化骨基質が観察されたが、PTH 投与頻度が高くなるにつれて、幼弱な石灰化骨基質である類骨層が広範囲に渡って形成されていた。以上から、PTH 高頻度では骨代謝回転型の骨リモデリングが誘導され、一方、PTH 低頻度投与では骨代謝回転はそれほど上昇しないと推察された。

前骨芽細胞は骨芽細胞の前駆細胞だけでなく、破骨細胞の分化・形成に深く関与していることから、ALP と細胞増殖マーカーである PCNA の二重染色を行うことで前骨芽細胞を同定し、また、骨芽細胞や破骨細胞の分布についても組織学的に検索した。その結果、PTH 高頻度投与群では、鋸歯状の骨表面に骨基質を活発に合成・分泌する活性型骨芽細胞が局在する一方、その周囲には成熟した破骨細胞も観察された。ALP/PCNA 陽性を示す前骨芽細胞の厚い細胞層が骨芽細胞を取り囲むように形成されており、また、前骨芽細胞層の中には多数の破骨細胞・前破骨細胞が局在していた。これに対して、PTH 低頻度投与群では、骨リモデリングを示唆する部位も観察されたが、多くの骨梁は滑らかに隆起しており、その上には多数の活性型骨芽細胞が局在していた。活性型骨芽細胞の血管側には前骨芽細胞の発達した細胞層は認められず、また、破骨細胞による活発な骨吸収もそれほど観察されなかった。骨基質内部には、滑らかなセメントライン、すなわち、休止線（アレストライン）が認められた。

以上から、PTH 高頻度投与では骨代謝回転型の骨リモデリングによって骨形成を亢進するのに対して、PTH 低頻度投与では、骨リモデリングだけでなく、破骨細胞の骨吸収に依存しないミニモデリングによっても骨形成が誘導されると推測された。

【結語】 PTH の一日の投与量を一定にした場合、投与頻度が高いほど、多くの骨梁および骨量が誘導されることが示唆された。しかし、PTH 投与頻度は骨梁の組織構造にも影響を与え、高頻度投

与では活発な骨リモデリングで大量の骨を誘導するのに対して、低頻度投与では太くしっかりとした骨梁を形成していくと考えられた。