



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Enhanced Bone Anabolic Window with Increased Bone Formation by Abaloparatide Showed Greater Gains in Trabecular and Cortical Bone in Mice : A Comparison with Teriparatide [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	槇野, 彰人
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13868号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78606
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Akito_Makino_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 槇 野 彰 人

学 位 論 文 題 名

Enhanced Bone Anabolic Window with Increased Bone Formation by Abaloparatide Showed Greater Gains in Trabecular and Cortical Bone in Mice: A Comparison with Teriparatide
(アバロパラチドは骨形成促進作用により骨アナボリックウインドウを拡大させ、マウスの海綿骨及び皮質骨を増加させるーテリパラチドとの比較ー)

キーワード（5つ）アバロパラチド、テリパラチド、骨形成促進剤、骨代謝、骨粗鬆症

アバロパラチドは、ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパク質のN末端の34アミノ酸を一部改変したポリペプチドであり、米国において近年承認された新規の骨粗鬆症治療薬である。既存の骨粗鬆症治療薬であるテリパラチド（ヒト副甲状腺ホルモンのN末端の34アミノ酸）と同様に、アバロパラチドは、骨芽細胞や骨細胞に発現するPTH1型受容体に結合することで、骨芽細胞による骨形成作用と破骨細胞による骨吸収作用の両方を促進する。両剤は間歇的に皮下投与することにより、骨形成作用が骨吸収作用を上回るため、骨アナボリックウインドウ（骨形成作用と骨吸収作用の差分、実質的な骨量増加作用）が拡大し、骨密度が増加すると考えられている。閉経後骨粗鬆症患者を対象とした臨床試験において、アバロパラチドはテリパラチドより強力に骨密度を増加させ、骨折発生率を低下させることが報告された。この時、骨代謝マーカーの解析結果より、アバロパラチドはテリパラチドより骨形成、骨吸収の両マーカーに対する増加作用が弱く、アナボリックウインドウと骨密度増加作用の関係が明確ではなかった。このため、本研究では、アバロパラチドが骨密度及び骨代謝に及ぼす作用についてマウスを用いて評価し、テリパラチドと比較した。比較の際、げっ歯類はヒトより骨代謝回転が数倍速いこと、両剤のヒトにおける投与頻度は1日1回であることを考慮し、両剤の投与頻度を1日1回から最大で1日3回まで変化させて以下の実験を実施した。

実験では、6週齢の雄性C57BL6/Jマウスにアバロパラチド又はテリパラチドを28日間皮下投与した。この時、両剤の投与用量及び頻度は、1日当たりの投与用量を一定（30 $\mu\text{g/kg/day}$ ）とし、1日1回（30 $\mu\text{g/kg}$ を24時間毎）、1日2回（15 $\mu\text{g/kg}$ を12時間毎）又は1日3回（10 $\mu\text{g/kg}$ を8時間毎）の投与を実施した。投与開始日をDay 0とし、Day 26に麻酔下で大腿骨及び腰椎骨密度を測定した。Day 22及びDay 25に骨標識のためにカルセインを皮下投与した。Day 28に絶食下で採血及び採尿を行い、左右大腿骨及び脛骨を採取した。血液及び尿は骨代謝マーカー等の測定に用いた。左大腿骨はマイクロCTを用いて骨構造解析を実施後、未脱灰のままメタクリル酸メチル樹脂で包埋してVillanueva bone染色を行い、蛍光顕微鏡で遠位骨幹端部及び骨幹部の骨標識を観察した。右大腿骨は脱灰後にパラフィン包埋し、免疫組織化学法によりTissue nonspecific alkaline phosphatase（ALP）染色又は酵素組織化学法によりTartrate-resistant acid phosphatase（TRAP）染色を実施し、光学顕微鏡にて遠位骨幹端部を観察した。脛骨は脱灰後にエポキシ樹脂に包埋し、酢酸ウランとクエン酸鉛にて電子染色を施して透過型電子顕微鏡観察を行った。また、遺伝子発現量の解析を目的とした実験では、6週齢の雄性C57BL6/Jマウスにアバロパラチド又はテリパラチドを1日3回（10 $\mu\text{g/kg}$ を8時間毎）の投与頻度で9日間皮下投与した。最終投与2、4及び8時間後に大腿骨を摘出し、RT-PCR法にて種々の遺伝子の相対発現量を定量した。

その結果、アバロパラチド又はテリパラチドの投与により、大腿骨及び腰椎の骨密度が投与頻度

依存的に増加した。この時、1日1回投与では両剤の骨密度増加作用に有意な差は認められなかったが、1日3回の投与ではアバロパラチドはテリパラチドより強い骨密度増加作用を示し、その差は有意であった。また、マイクロCTによる解析結果から、アバロパラチドの投与頻度を上げると、同投与頻度のテリパラチドより海綿骨と皮質骨の骨量が増加し、骨構造パラメーターが増加した。これらの結果より、げっ歯類とヒトの骨代謝回転の違いを考慮してマウスに1日3回の投与を実施すると、臨床試験の結果と同様に、アバロパラチドはテリパラチドより強い骨密度増加作用を示すことが明らかとなった。

次に、両剤の骨代謝に及ぼす作用を検討した結果、アバロパラチド又はテリパラチドの投与により、骨形成マーカー（血清P1NP）が増加した。この時、1日2回以上投与するとアバロパラチドの方がテリパラチドより血清P1NPの増加作用が強かった。一方、骨吸収マーカー（血清CTx及び尿DPD/Cr）も両剤の投与で増加したが、全ての投与頻度において両剤間で有意な差は認められなかった。また、組織学的解析から、1日3回のアバロパラチド又はテリパラチドの投与により、ALP陽性面積（ALP⁺ area/total area）や骨形成速度（BFR/BS）が増加し、その作用はアバロパラチドの方がテリパラチドより強かった。一方、TRAP陽性破骨細胞（N.Oc/BS）に対する増加作用は、1日1回及び1日2回投与では両剤間で有意な差は認められず、1日3回投与ではアバロパラチドの作用はテリパラチドより弱かった。さらに、遺伝子発現に対する両剤の作用を評価したところ、1日3回のアバロパラチド又はテリパラチドの投与により、大腿骨における骨形成関連遺伝子（*alpl*、*col1a1*、*ephb4*）の発現量が増加し、骨形成を阻害するsclerostinをコードする*sost*の発現量が減少した。この時、アバロパラチドはテリパラチドより*alpl*、*col1a1*、*ephb4*の発現量を強く増加させた。一方、破骨細胞の分化や骨吸収に関わる*rankl/opg*の発現比や*trap*の発現量は両剤の投与によって増加したが、両剤の作用に有意な差は認められなかった。これらの結果より、マウスにおいて、アバロパラチドはテリパラチドより強い骨形成促進作用を示す一方、アバロパラチドの骨吸収促進作用はテリパラチドと同等以下であると考えられ、骨形成と骨吸収に対する促進作用のバランスがテリパラチドより良好であると考えられた。骨代謝マーカーの測定値から両剤の骨アナボリックウインドウを算出したところ、アバロパラチドはテリパラチドより骨アナボリックウインドウが大きく、投与頻度が上がると両剤の差が拡大することが示された。この時、骨アナボリックウインドウと骨密度の間に正の相関が認められた。

最後に、透過型電子顕微鏡観察にて、アバロパラチド投与群ではテリパラチド投与群より多数の細胞突起が発達した前骨芽細胞が認められた。このことから、アバロパラチド投与群では、発達した細胞突起を介して前骨芽細胞と破骨細胞の接触が活発化し、Ephb4等を介して破骨細胞から前骨芽細胞に骨形成シグナルが伝達され、骨形成が優位に促進されている可能性が示唆された。

以上の結果より、アバロパラチドは骨形成と骨吸収に対する促進作用のバランスがテリパラチドより良好であり、テリパラチドより骨形成優位に骨代謝を促進することが示された。このため、げっ歯類とヒトの骨代謝回転の違いを考慮してマウスに1日3回の投与を実施すると、アバロパラチドはテリパラチドより広い骨アナボリックウインドウを示し、海綿骨及び皮質骨量を増加させ、臨床試験と同様に強い骨密度増加作用を示すと考えられた。