



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
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15022号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/86002
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takanori_Sato_review.pdf, 審査の要旨



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 佐 藤 孝 紀

審 査 担 当 者	主査	教授	飯 村 忠 浩
	副査	教授	網 塚 憲 生
	副査	教授	山 本 恒 之

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)

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、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。申請者は論文の概要を以下のように説明した。

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、網羅的かつ高分解能の蛍光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。動物実験群は、骨粗鬆症モデルとして卵巣摘出術(OVX)を施したOVX 群および対象としての偽手術群に分け、さらにTPTDの異なる投与量および異なる投与頻度を設定し、ラットで15群、サルで4群を構成した。TPTDおよびVehicle 投与期間終了後、血中骨代謝マーカーの測定や骨形態計測といった従来法によりTPTDの薬理効果を確認した。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。

カルセイン由来の新生骨蛍光シグナル解析の結果、蛍光シグナルの連続性が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、蛍光シグナルの連続性などの空間分布パターンは、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。

また、サル腰椎に対するSHGイメージング解析の結果、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。

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。

引き続き論文内容及び関連事項について、以下の項目を中心に質疑応答がなされた。

- 1) 海綿骨に形成される骨層板構造と、皮質骨に形成される骨層板構造の組織学的違いについて
- 2) 骨層板構造におけるコラーゲン線維の配列様式について
- 3) 骨粗鬆症モデル(OVX群)およびTPTD高用量投与群(TPTD-H群)における、骨梁あるいはコラーゲン線維の、荷重方向に対する角度の違いについて
- 4) 臨床で使用されるTPTDの薬用量と本研究における薬用量設定の関係性について
- 5) カルセインラベルの幅を計測することの意義について
- 6) 本研究にて構築した自動空間蛍光解析法の、従来の骨形態計測法と比較した利点について

以上の質問に対して申請者から適切かつ明確な回答が得られた。審査担当者との質疑応答を通じて、申請者が本研究ならびに関連分野に対する理解が十分なされており、幅広い知識を有し、本研究のさらなる発展が期待された。

以上のことから、審査委員会は全員、本研究が学位論文に十分に値し、申請者が博士(歯学)の学位を授与される資格を有するものと認めた。