



HOKKAIDO UNIVERSITY

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
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15938号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92487
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Miki_Abe_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 阿部未来

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)

キーワード（5つ）皮質骨多孔化，血管，骨細胞，破骨細胞，endomucin

副甲状腺ホルモン（parathyroid hormone: 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が、骨粗鬆症治療薬である PTH 製剤は、間歇投与により骨リモデリングを主体とした骨量増加を誘導する。しかし、PTH の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おり、その病理機序は明らかにされていない。一方、PTH は、骨芽細胞系細胞や破骨細胞のみならず、endomucin 陽性骨特異的血管や α SMA 陽性血管周囲細胞を増加させることが報告されている。このことから、PTH による皮質骨多孔化の病理機序を明らかにするためには、破骨細胞や骨芽細胞だけでなく骨特異的血管に対する PTH 作用についても検索する必要がある。本研究では、PTH 間歇投与マウスの大腿骨・脛骨を用いて、皮質骨多孔化の初期過程における骨芽細胞、破骨細胞、骨特異的血管の組織学的所見を検索することで、PTH 投与で誘導される皮質骨多孔化の病理組織メカニズム解明の一助とすることを目的とした。

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 μ 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。その後、麻酔下で左脛骨を摘出した後、パラホルムアルデヒド溶液を用いて灌流固定し、左右大腿骨と右脛骨を摘出した。右大腿骨はマイクロ CT 撮影後に EDTA 溶液で脱灰した後、パラフィン切片を作成し、各種組織化学解析に用いた。解析領域は、成長板軟骨近位 950 μ m から遠位 700 μ m の骨幹端領域 (Zone1)、Zone1 から遠位側に 700 μ m までの領域 (Zone2)、Zone2 から遠位側に 700 μ m までの領域 (Zone3) の 3 領域を観察領域とした。また各観察領域の皮質骨内膜側に面する長さ 700 μ m・幅 100 μ m の領域において、皮質骨表面から血管までの距離（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、未脱灰および脱灰樹脂切片を作成し、von Kossa 染色やトリイジンブルー染色、透過型電子顕微鏡解析を行った。左脛骨の皮質骨は、total RNA を抽出し RNA-sequence 解析を行うとともに、cDNA への逆

転写反応後に real-time PCR 法を用いて各種遺伝子発現を検索した。

PTH 投与マウス大腿骨では、骨幹端部の骨梁が増加する一方、投与 1 週後から皮質骨多孔化が認められた。多孔化は、骨幹端部から骨幹部に向かって、また、骨内膜側から骨外膜側に向かって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、コントロール群では、Zone 1-3 のいずれにおいても ALP 陽性骨芽細胞が皮質骨骨内膜表面を覆っており、endomucin 陽性血管はそれらの骨髄側に局在していた。一方、PTH 投与マウスでは、Zone 1 で皮質骨表面に多数の破骨細胞と厚い骨芽細胞層を認めたが、遠位側の Zone 2, 3 では骨芽細胞層がやや薄くなり、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と侵入していた。Zone 1-3 の全領域において、PTH 投与群の血管-皮質骨間距離が、コントロール群と比較して有意に低下する一方、破骨細胞数は増加していた。皮質骨内部に侵入する血管とその周囲組織の微細構造を観察すると、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 1 週後の皮質骨表面の骨芽細胞層に注目して検索すると、コントロール群では骨表面を覆う骨芽細胞層は ALP 陽性を示したが、PTH 投与群では一部肥厚した骨芽細胞層に α SMA 陽性反応が観察され、また *Acta2*(α SMA) 遺伝子発現も有意に上昇していた。さらに、ALP/ α SMA 陽性骨芽細胞層に一致して VCAM1 および RANKL の陽性反応が認められ、これら細胞層の内部で PDGFbb 陽性破骨細胞と endomucin 陽性血管が近接して局在していた。よって、PTH 投与群では endomucin 陽性血管と破骨細胞は共に連なり ALP/ α SMA/VCAM1/RANKL 陽性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。

血管の皮質骨への移動機序を明らかにする目的で RNA-sequence 解析を行うと、PTH 投与群で多数の血管新生関連因子の遺伝子発現上昇を認めた。その中から、骨細胞由来の血管新生因子として、Wnt シグナル阻害および血管新生作用を有する Dkk1 と、血管新生シグナル伝達を担う Dkk1 受容体である Ckap4, DKK1-Ckap4 シグナルの下流で活性化する血管新生因子 PLVAP に着目した。Dkk1 の遺伝子発現は、PTH 投与群で有意に上昇しており、多くの骨細胞で Dkk1 強陽性反応を観察した。さらに、PTH 投与群では、Ckap4, Plvap 遺伝子発現が有意に上昇し、皮質骨表面や内部に侵入する血管が PLVAP 陽性反応を示していた。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、ALP/ α SMA/VCAM1/RANKL 陽性骨芽細胞層に局在する endomucin 陽性血管が PDGFbb 陽性破骨細胞を伴い皮質骨に侵入することで進展する可能性、また、血管の皮質骨へ侵入する一因として Dkk1 など骨細胞由来の血管新生因子が関与する可能性が示唆された。