



|                     |                                                                                                 |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | AI駆動型形態計測法の確立と骨粗鬆症モデルラットを用いた病態薬理学的手法による歯槽骨骨小腔微細構造の動的特異性に関する研究                                   |
| Author(s)           | 木村, 徳子                                                                                          |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                           |
| Degree Name         | 博士(歯学)                                                                                          |
| Dissertation Number | 甲第15488号                                                                                        |
| Issue Date          | 2023-03-23                                                                                      |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k15488">https://doi.org/10.14943/doctoral.k15488</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/94352">https://hdl.handle.net/2115/94352</a>               |
| Type                | doctoral thesis                                                                                 |
| File Information    | Atsuko_Kimura.pdf                                                                               |



# 博 士 論 文

---

## AI 駆動型形態計測法の確立と 骨粗鬆症モデルラットを用いた病態薬理学的手法による 歯槽骨骨小腔微細構造の動的特異性に関する研究

---

令和 5 年 3 月申請

北海道大学  
大学院歯学院口腔医学専攻

木 村 徳 子

中西（木村）徳子<sup>1, 2)</sup>、佐藤嘉晃<sup>2)</sup>、飯村忠浩<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>北海道大学大学院歯学研究院・歯学院 薬理学教室

<sup>2)</sup>北海道大学大学院歯学研究院・歯学院 歯科矯正学教室

## 抄録

歯槽骨は、歯の支持および咬合力の受容を行う特有の骨組織であり、筋や腱とともに運動器を構成する他の骨とは異なる点が多い。他の骨組織と同様、歯槽骨も破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成という連続的なリモデリングプロセスによって維持され、骨基質内には、骨細胞群が細胞突起を伸長し細胞間のネットワーク（骨細胞ネットワーク）を構築している。骨細胞ネットワークは、破骨細胞や骨芽細胞の調節を介して骨リモデリングに関与し、また、機械的刺激の増幅装置（メカノセンサー）としても機能している。

機械的応力を用いて歯槽骨のリモデリングを制御することで不正咬合の治療を目的とする歯科矯正学の領域では、歯槽骨の骨リモデリングと骨細胞ネットワークの特異性を理解することは極めて重要である。しかしながら、これらに関する知見はまだない。本研究では、ラット卵巢摘出骨粗鬆症モデルラットへの骨代謝改善薬である PTH 制剂テリパラチド（以下 TPTD）投与実験系を用いて、全身骨代謝回転の変化における歯槽骨の代謝変化を他の骨組織と比較検討し、その特異性を明らかにすることを目的とした。12 週齢の SD 系雌性ラットに OVX（卵巢摘除）および Sham（偽手術）を施し、4 週後からテリパラチド（TPTD）（30  $\mu$ g/Kg）もしくは Vehicle（媒体）を週 3 回、4 週間皮下投与した。最終投与の 24 時間後に採材した。採材した下顎骨、および頭頂骨の切片を広視野顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮像し、形態計測、および骨小腔の定量化を行なった。その結果、頭頂骨では TPTD を投与することで骨髓層である中板の BV/TV の増加、類骨形成の亢進、骨の厚みの増加が見られたが、骨小腔の面積は変化がなかった。このことから、頭頂骨では外骨膜および骨髓内膜腔面での骨リモデリングが重要な役割を果たすと考えられた。また、顎骨では OVX または TPTD 投与による形態への影響はなかったが、OVX を行うことで骨小腔が拡大し、TPTD を投与することで骨小腔の面積が減少することから、歯槽骨を含む顎骨では骨細胞性リモデリングが、骨粗鬆症の病態や TPTD の薬理効果に関与することが示唆された。我々の結果より、歯槽骨を含む顎骨では骨細胞性リモデリングが動的に生じており、海綿骨のリモデリング

を主体とする中胚葉性の体幹・四肢骨とは異なる骨代謝特異性を有していることが考えられた。

キーワード：骨小腔、骨細胞ネットワーク、メカノセンサー、骨リモデリング、骨代謝回転

# 1 緒言

## 1.1 メカノセンサーとしての骨細胞

骨への機械的負荷は、主に骨細胞によって感知される<sup>1-4)</sup>。骨細胞は、骨を構成する細胞の90～95%を占める骨組織中で最も多い細胞集団であり、骨基質中で互いに細胞突起を伸ばし、ギャップ結合を介して細胞間ネットワークを構築している。骨細胞は、石灰化された骨組織中に存在するため細胞の単離が難しく、安定して表現型を発現する細胞の培養が困難であった。さらには、その表現型を確かめるための特異的分子マーカーの発見も遅れていたことなどから、研究対象としては骨芽細胞や破骨細胞に先んじられてきた。しかしながら、近年、骨への機械的負荷の受容細胞（メカノセンサー）として働き、その応答を骨芽細胞や破骨細胞の機能調節として変換しながら骨代謝を調節していることが明らかになってきた。したがって、新たな概念として、「骨代謝調節の中心的細胞（master orchestrator）であり、骨芽細胞や破骨細胞は、骨細胞により調節を受ける効果細胞（effectors）である」といった捉え方もできるようになってきた<sup>4)</sup>。骨細胞は骨基質中に埋没しており、樹状突起を伸ばして隣接する細胞と連絡を取っていることから、骨細胞は機械的刺激を感知して骨リモデリングを制御していると提唱されてきた<sup>1-4)</sup>。Tatsumiらは、骨細胞が骨のリモデリングや力学伝達に寄与しているかどうかを、骨細胞を特異的にアブレーションできる遺伝子改変マウスを作成し、検討した<sup>5)</sup>。本研究では、ジフテリア毒素受容体媒介細胞ノックアウト（toxin receptor-mediated cell knockout: TRECK）系をベースとしたトランスジェニックマウスモデルを構築し、骨細胞を誘導的かつ特異的に破壊した。その結果、骨細胞が70～80%アブレーションされると、皮質骨内の空隙や微小骨折を伴う脆弱な骨が観察され、また、骨芽細胞の機能不全、骨髓腔における微細構造の変化と脂肪組織の増殖を伴う海綿骨の損失が見られた。これらはすべて老化骨格の特徴であった。さらに重要な知見として、これらの骨細胞欠損マウスは、脱負荷によって誘導される骨量減少（廃用性骨粗鬆症あるいは骨減少症）に抵抗性があった。これらの結果から、骨細胞が正常な骨代謝調節に必須であり、また骨メカノセンサーとしての骨細胞の役割が証明された。

## 1.2 骨小腔・細管系による応力伝達機構

培養細胞による実験において、メカニカルストレス（機械的負荷）に対する細胞応答に必要な力の大きさは、実際の生体組織に加わる荷重の10倍から100倍である。すなわち、*in vitro*の実験で効果を発揮するほどの力が実際の

骨に加えられると、容易に骨折を起こしてしまう。したがって、骨細胞およびその周辺構造には、骨に加わった生理的な荷重負荷を増大させて骨細胞に伝える仕組みがあることが予想されてきた。その根本的な仕組みとして現在最も受け入れられているものは「ずり応力モデル (shear stress model)」である<sup>6-9)</sup>。このモデルによれば、骨に加わった負荷は骨細胞と骨細胞突起を囲む細胞周囲間隙における物質の流れ(fluid flow)を生じ、その細胞外液の動きが骨細胞に伝えられるとする。骨細胞周囲間隙が狭いほど、その流体速度は速くなるのは容易に理解される。骨小腔内および骨細胞管内の細胞周囲間隙は、それぞれ 500~1,000nm および 50~100nm と計測されているため、骨細胞の細胞体よりも細胞突起の方が、より鋭敏に荷重負荷を感知できる環境にあると考えられる<sup>10)</sup>。

### 1.3 骨粗鬆症とその治療

健常成人の骨は、骨表面で起こる骨形成と骨吸収のバランスのとれた活動により、常に新しく生まれ変わり、常に再構築が行われている。この再構築のプロセスは骨リモデリングと呼ばれ、正常な骨量、骨格、強度、ミネラルのホメオスタシスを維持するために極めて重要である<sup>11)</sup>。骨リモデリングは、骨を構成する細胞である破骨細胞、骨芽細胞、骨細胞間のコミュニケーションによって厳密に制御されている。20 歳前後に最大骨量に達した後、しばらく定常状態が維持される。しかし、閉経や加齢、あるいは寝たきり、関節リウマチなどの炎症性疾患、ステロイド過剰などにより骨代謝平衡が陰性化すると、骨密度の減少とともに構造や材質も劣化し、骨強度が低下し骨粗鬆症となる。骨粗鬆症治療の最大の目的は、骨折を防止し高齢者の健康寿命および生命予後を改善することにより、健全な長寿社会を実現することである。

超高齢社会である我が国において、高齢者の社会参画は必須となりつつある。全ての人に健康と福祉を提供するという持続可能な開発目標 (SDGs) の達成に向けて、サステイナブルな社会を築くためには、高齢者が社会に参画できる時間、すなわち健康寿命を伸ばすことが最も重要な課題の 1 つである。骨粗鬆症の治療薬としては、骨形成促進薬である PTH 製剤：テリパラチドに加え、週 1 回に加え月 1 回製剤も登場したビスホスホネートおよび抗 RANKL(receptor activator of NF- $\kappa$  B ligand)抗体で強力な骨吸収抑制作用を発揮するデノスマブ(denosumab)などの骨吸収抑制薬、さらには SERM(selective estrogen receptor modulator)、活性型ビタミン D<sub>3</sub>誘導体として初めて骨折防止効果が大規模臨床試験で示されたエルデカルシトールなどのステロイドホルモン誘導体などがある。

#### 1.4 骨粗鬆症治療薬としてのテリパラチド

骨形成促進剤であるテリパラチドは、投与直後には骨芽細胞の PTH1 受容体に作用して前骨芽細胞の増殖分化を促進するとともに、RANK/RANKL 経路を介して破骨細胞を活性化させる。血中骨代謝マーカーによる解析から、テリパラチドは、投与直後は骨吸収を促進するが、投与 5-6 時間後すなわち血中から消失した後、骨芽細胞系細胞の分化を促進することで骨形成を亢進させることがわかった。すなわち、テリパラチドは投与のたびに骨吸収と骨形成を活性化させる骨リモデリング亢進作用を持つ。1 日 1 回や週 1 回などのテリパラチドの間歇的投与は、骨形成促進作用が骨吸収作用を上回り、結果として、骨代謝回転を亢進しながら骨量の増加をもたらす。テリパラチドによる治療の対象は「骨折の危険性が高い骨粗鬆症」であり、WHO の骨粗鬆症診断基準には重症骨粗鬆症という範疇が設けられている。日本では一般的にはビスホスホネート製剤や SERM で治療されている患者のうち、新規骨折が発症した場合や骨密度が低下する場合に、テリパラチドへの切り替えを検討することが多い。

#### 1.5 力学的負荷に対する骨細胞由来スクレロスチンの発現応答

寝たきり患者や宇宙飛行士は、骨への機械的負荷の減少により廃用性骨粗鬆症を引き起こすことがよく知られている。このように、機械的負荷は、骨量を制御する重要な因子であり、骨への機械的負荷の減少は、著しい骨量減少を誘発することが知られている。骨細胞における荷重応答遺伝子として、SOST 遺伝子およびその産物であるスクレロスチンが注目されている。スクレロスチンは、LRP 5、LRP 6、frizzled receptor に結合し、Wnt/ $\beta$ catenin 経路に拮抗して骨芽細胞による骨形成を負に制御する分子である<sup>12-19)</sup>。スクレロスチンは骨形成を担う骨芽細胞の分化・石灰化を抑制し、アポトーシスを誘導する。スクレロスチンは骨細胞に特異的に発現し、機械的負荷のない状態ではその産生が増加し、機械的負荷がかかると減少することが知られている<sup>20-24)</sup>。PTH による骨形成促進にも、骨細胞における SOST 発現低下が一部関与している。したがって、脱負荷による骨量減少は、骨細胞でのスクレロスチンの発現上昇による骨芽細胞機能すなわち骨形成の抑制として説明が可能である。

さらに、Osumi らは、廃用性骨粗鬆症のモデルラットを用いてスクレロスチンの詳細な分布を解析した。その結果、力学的負荷を受けた皮質骨では、スクレロスチンは骨細胞体内部に局在しているが、負荷のかかっていない皮質骨では、スクレロスチンは骨細胞体内だけでなく、骨小腔・骨細管系にも分布することが明らかにした<sup>25)</sup>。この観察は、骨へのメカニカルストレスが、スクレロスチンの産生量のみならず、骨小腔・骨細管系内で分子構造にも関与していることを示唆していた。

## 1.6 歯科矯正時の歯槽骨内スクレロステチンの分布の変化

矯正治療は歯を通して骨にメカニカルストレスを加え、空間的にバランスのとれた歯槽骨のリモデリングのプロセスを経て、理想の歯列および咬合を達成する治療を主とする。歯は歯槽骨と言われる骨の中に植立しており、歯の周りには歯根膜が存在している。歯根膜には歯の表面から歯槽骨頂に向かって走る線維であり、歯と歯槽骨を間接的に結合させる役割を担っている。歯科矯正力が歯冠に負荷されると、移動方向の歯根膜を圧迫し（圧迫側）、反対側の歯根膜を牽引する（牽引側）。圧迫側では歯槽骨との距離が小さくなり、歯根膜に硝子様変性組織が出現する。硝子様変性組織に隣接する歯根膜腔に多数の破骨細胞の出現が見られ、活発な骨吸収が行われると報告されている。一方、牽引側では初期に歯根膜腔が拡大し、歯根膜繊維の緊張が起こるようになる。牽引1日目より歯槽骨表面の緊張した歯根膜側に骨芽細胞、繊維芽細胞が増殖し、オステオカルシンの産生が活発に行われ、5日後には骨表面での骨芽細胞の分化増殖が活発化し、骨形成を行う<sup>26)</sup>。これらの異なる力に対して、骨細胞がどのように反応するのか、これまで解明されていなかった。Nishiyamaらは、抗スクレロステチン抗体を用いた免疫蛍光法を用いて、歯槽骨の矯正力に対するスクレロステチンの空間応答を解析した<sup>27)</sup>。その結果、牽引側におけるスクレロステチンの分布と発現は、矯正力を付与していないコントロール部位に比べて有意に低下していることが定量的に示された。さらに、圧迫側のスクレロステチンの発現シグナルのレベルはコントロール部位よりも高い傾向にあった。すなわち、歯列矯正時の初期においては、牽引側での力学的負荷による歯槽骨でのスクレロステチンの発現低下が骨形成を促進し、一方、圧迫側では一時的な脱負荷による発現上昇が骨形成を抑制し、結果的に骨吸収を優位に誘導していることが考えられた。以上のことから、歯列矯正時の歯を介した歯槽骨への荷重により、歯槽骨の骨小腔・骨細管系のスクレロステチンの空間的分布変化が誘導されることが、その後の連続的な歯槽骨のリモデリングに寄与する重要な初期変化であると考えられた。これらの知見から、歯科矯正治療において、歯槽骨の骨細胞がメカノセンサーとして極めて重要な働きをしていることが明らかとなっている。

## 1.7 生理的咬合力による多能性幹細胞の制御

歯は歯根膜を通じて歯槽骨に接着しており、歯根膜には組織のターンオーバーを支える幹細胞が存在する。歯根膜、セメント質、歯槽骨はすべて胚発生時の神経堤細胞に由来することがわかっており<sup>28)</sup>、Menらは、成熟マウス臼歯部の歯根膜に存在するGli1陽性細胞が、歯根膜、歯槽骨、



セメント質を形成する歯根膜多能性幹細胞（periodontal ligament stem cells: PDLSC）であることを明らかにした<sup>29)</sup>。Wnt シグナルは Axin2 陽性歯根膜細胞を含む様々な幹細胞集団において重要な制御的役割を果たすことで知られている<sup>30, 31)</sup>。Men らは、Wnt シグナルがない場合、Gli1 陽性多能性幹細胞は活性化できず、最終的に重度の歯周組織喪失につながったことから、多能性幹細胞の活性化には、Wnt シグナルが必須であることを見出した。また、Sost をノックアウトすることで Wnt 活性が上昇し、Gli1 陽性多能性幹細胞の歯根膜および骨細胞への分化が亢進されることから、歯槽骨の骨細胞は、Wnt 阻害剤であるスクレロスチンを介して Gli1 陽性多能性幹細胞の活性を負に制御していることがわかった。さらに、生理的咬合力が多能性幹細胞に及ぼす影響を調べるために、マウスから片側の上顎臼歯を抜歯し、下顎臼歯の負荷を軽減させた。その結果、下顎臼歯の歯根膜では Wnt 活性が不活化され、Gli1 陽性細胞の活性化が停止した。これは、Gli1 陽性多能性幹細胞の活性化には生理的咬合力が必須であることを示している。以上のことから、Gli1 陽性細胞は生体内で多能性を持つ幹細胞であり、骨細胞は多能性幹細胞に負のフィードバックを与え、スクレロスチンを介してその活性を抑制する。生理的咬合力は、このフィードバックループを微調整することにより、間接的に Gli1 陽性多能性幹細胞の活性を制御していることが示唆された。

これらの知見から、歯根膜や歯槽骨を含む歯周組織は、生理的な咬合力によるメカニカルストレスにより維持されていることが明らかとなり、筋や腱とともに運動器を構成する他の骨比べて、特異的な恒常性維持システムを有していると考えられた。

## 1.8 骨細胞由来 RANKL による破骨細胞形成の媒介

骨吸収を担う破骨細胞は、骨形成に関わる骨芽細胞とともに骨リモデリングを円滑に行い、骨の強度維持に関わる。RANKL は破骨細胞の RANK に作用し、破骨細胞の骨吸収活性を誘導する。RANKL は *Tnfsf11* 遺伝子によってコードされるタンパク質であり、*Tnfsf11* 遺伝子を欠損したマウスでは破骨細胞が欠損しているため、破骨細胞の発生には RANKL が必須であることが明らかとなっている<sup>32)</sup>。これまでの研究から、歯列矯正時には歯周組織構成細胞が RANKL を発現して破骨細胞を誘導することが示唆されてきたが<sup>33, 34)</sup>、歯の移動における RANKL の発生源は不明な点が多かった。Shoji-Matsunaga らは、歯槽骨リモデリングの制御機構の分子基盤を解明するために、骨細胞特異的に RANKL を欠損させたマウスを用いて解析を行なった<sup>35)</sup>。実験では、骨細胞特異的に RANKL を欠損させると、コントロールと比較して歯列矯正力による圧

迫側の破骨細胞数が劇的に減少し、歯列矯正の動きが低下していることが明らかになった。これらの結果から、骨細胞特異的に RANKL を欠損させたマウスでは、歯周組織の破骨細胞形成が阻害されるため、歯列矯正力による歯の移動に抵抗性があることが明らかとなった。これらの実験観察から、骨細胞が歯周組織における RANKL の主要な供給源であり、骨細胞由来の RANKL が歯列矯正時の歯槽骨のリモデリングに重要な役割を果たしていることが示された。

## 1.9 本研究の目的

歯槽骨は、歯の支持および咬合力の受容を行う特有の骨組織であり、筋や腱とともに運動器を構成する他の骨とは異なる点が多い。これまでの知見により、歯科矯正時には歯を通して歯槽骨にメカニカルストレスが加わることで、骨細胞からのスクレロスチンや RANKL の発現および分泌が調節され、骨吸収と骨形成という連続的なリモデリングプロセスが維持されていることが解明された<sup>27, 35, 36)</sup>。骨細胞を囲む骨小腔の微細形態は、骨の生理的荷重応答や、代謝回転、骨粗鬆症治療薬である PTH 製剤投与で、動的に変化していることが報告されている<sup>37, 38)</sup>。そこで、我々は歯槽骨の骨代謝の特異性を解明するために、AI 駆動型の骨小腔微細形態計測法を確立し、骨粗鬆症モデルラットおよび PTH 製剤投与による病態薬理学的実験系において、歯槽骨と頭頂骨、顎骨、それぞれにおける骨小腔微細形態の定量比較を試みた。

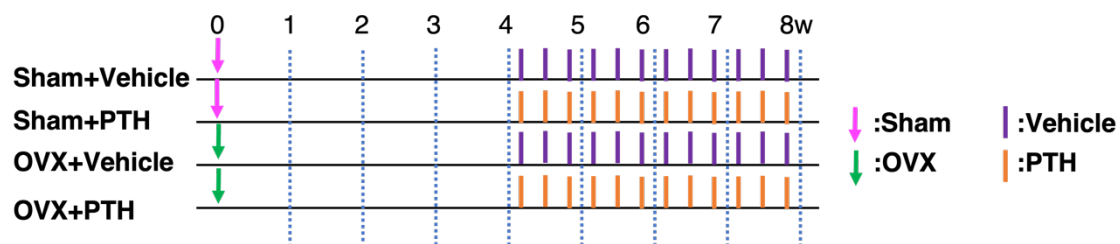
## 2 材料と方法

### 2.1 閉経後骨粗鬆症モデル病態動物実験および薬物投与法

12 週齢の SD 系雌性ラットに OVX（卵巣摘除）および Sham（偽手術）を施し、4 週後からテリパラチド（TPTD）（30  $\mu$ g/Kg）もしくは Vehicle（媒体）を週 3 回、4 週間皮下投与した（図 1）。最終投与の 24 時間後に採材した。群構成は下記の通りである。

- (I) Sham + 媒体（生理食塩水）
- (II) Sham + PTH 製剤（TPTD テリパラチド）
- (III) OVX + 媒体（生理食塩水）
- (IV) OVX + PTH 製剤（TPTD テリパラチド）

図 1



(図 1) 骨粗鬆症モデルラットへの PTH 製剤 (テリパラチド：TPTD) 投与実験スケジュール

## 2.2 顕微鏡設定および観察

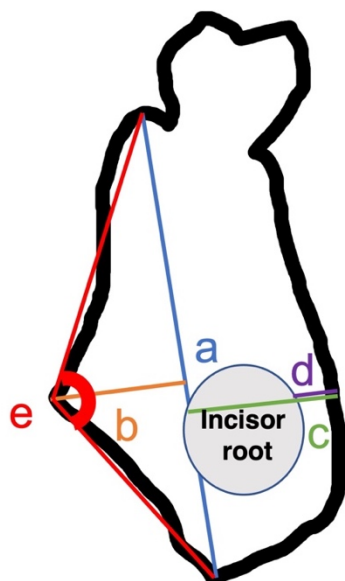
採材したサンプルは Villanueva Bone 染色を行い、非脱灰 MMA 包埋骨の薄切 Dry 標本を作成した。下顎骨および頭頂骨の非脱灰横断切片を、微分干渉フィルターを搭載した広視野蛍光顕微鏡 ECLIPSE Ni (Nikon、Tokyo、Japan) および 10x、20x 対物レンズ (Plan Apo  $\lambda \times 10$  [numerical aperture (NA) = 0.45], Plan Apo  $\lambda \times 20$  (NA = 0.75)) を用いて、蛍光および微分干渉 (Differential Interference Contrast: DIC) 観察を行なった。蛍光フィルターは、TxRed (Excitation length 540nm-580nm, dichroic mirror (DM): 595nm, Emission Wave length 600nm-660nm) を用い、自家蛍光を撮像することで下顎骨および頭頂骨の形態計測を行なった。

## 2.3 骨形態計測

取得した画像から、下顎骨の形態計測を、Inoue らの方法を参考に、以下のよう に計測項目を設定した (図 2A) <sup>39)</sup>。第一大臼歯部での横断切片を観察および計測した。計測パラメーターとして、a:下顎骨最下縁点から歯槽頂点までの距離、b:下顎骨頬側の最尖点から a に対して引いた垂線、c:下顎骨舌側最突出点から a に対して引いた垂線、d:c と前歯歯根の交点までの距離、e:下顎骨最下縁点、歯槽頂点、下顎骨頬側の最尖点がなす角度を設定した。

歯槽骨の骨量/組織量：BV/TV の計測は、根分岐部、根尖部からそれぞれ正方形 (縦 0.5mm×横 0.5mm) の対象領域 (Region of interest: ROI) を設定し行なった (図 2B)。

図 2(A)



(B)



- : a.根分岐部（骨髄があまり含まれていない）
- : b.根尖部（骨髄が豊富に含まれている）

（図 2）下顎骨および歯槽骨の計測部位および ROI の設定

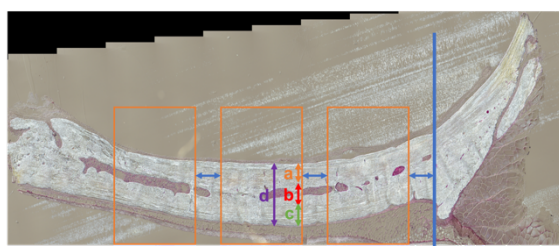
(A) 下顎骨の形態解析で測定した長さおよび角度を示す模式図。(B)下顎骨の骨量/組織量：BV/TV の測定で使用した ROI を示す。

頭頂骨の形態計測は、頭頂部横断切片から 3 箇所の ROI（縦  $1000\mu\text{m}$  × 横  $1400\mu\text{m}$ ）を設定し、微分干渉画像の組織学的観察から、頭頂骨を、表皮側の層板骨である内板（a）、骨髄を含む層である中板（b）、髄膜側の層板骨である外板（c）の 3 層に分けた。ROI として設定した長方形の両端の長さを各層の厚みとし、計測した。また、3 層の合計の厚み(d)を計測した（図 3A）。

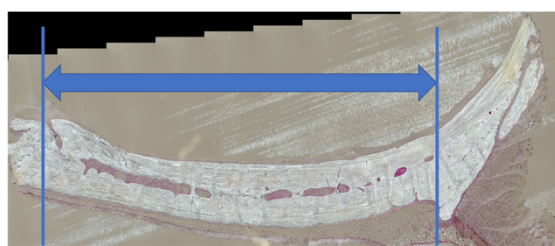
頭頂骨の骨量/組織量：BV/TV の計測は、上記の形態計測と同じく、1 つの切片ごとに ROI（縦  $1000\mu\text{m}$  × 横  $1400\mu\text{m}$ ）を 3 つ設定し、各 ROI を 3 層に分けて計測を行なった。

頭頂骨中板の骨形態計測では、ROI を設定せずに計測を行なった（図 3B）。骨髄面の組織量：TV、骨量：BV、類骨量：OV、類骨長：osteoid length、類骨幅：osteoid width、骨髄面積：bone marrow area、骨表面積：bone surface、類骨量/組織量：OV/TV、類骨量/骨量：OV/BV、類骨長/骨表面積：osteoid length/bone surface、さらに静止期または吸収期の骨髄周長：bone surface-osteoid length を計測した。

図 3 (A)



(B)



(図 3) 頭頂骨の計測部位および ROI の設定

(A)頭頂骨の形態解析および BV/TV を測定した ROI (縦  $1000\mu\text{m}$  × 横  $1400\mu\text{m}$ ) を示す (B)頭頂骨中板の骨形態計測を行なった部位を矢印で示す。

## 2.4 骨小腔の AI 駆動型自動形態計測

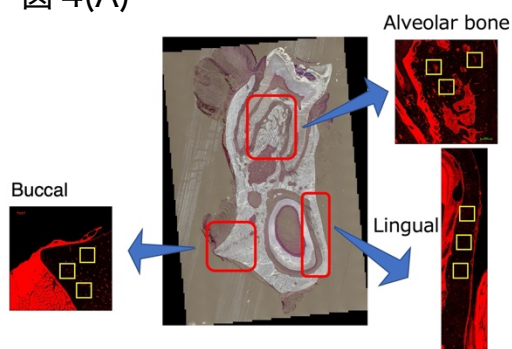
Nikon 共焦点レーザー顕微鏡システム (A1-ECLIPSE Ti2; Nikon) を用いて下顎骨および頭頂骨の共焦点画像を撮像した。対物レンズは Plan Apo VC 20× DIC N2 (NA = 0.75)、蛍光フィルターは、TxRed (Excitation wavelength 561.3nm, Emission wavelength 560nm-640nm) を使用した。得られた画像からそれぞれの骨小腔の計測および定量化を行なった。

骨小腔の計測には画像解析ツール (NIS-Elements AR、NIS.ai、Nikon、Tokyo、Japan) を用いた。

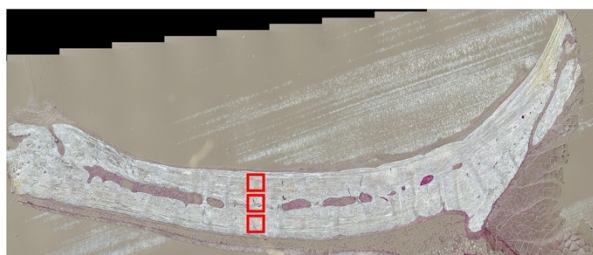
下顎骨の横断切片から、頬側、舌側、歯槽骨の各部位ごとに ROI (縦  $200\mu\text{m}$  × 横  $200\mu\text{m}$ ) をそれぞれ 3 箇所取得し、得られた画像から解析を行なった (図 4A)。

頭頂骨の横断切片から、外板、中板、内板の 3 層の各部位から ROI (縦  $100\mu\text{m}$  × 横  $100\mu\text{m}$ ) をそれぞれ 3 箇所取得し計測を行なった。(図 4B)

図 4(A)



(B)

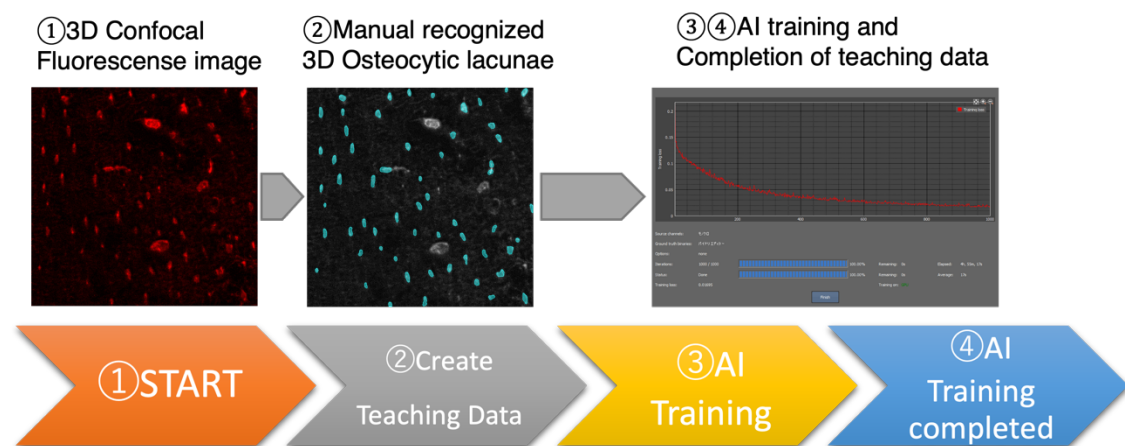


(図 4) 骨小腔の計測部位の設定

(A)下顎骨の骨小腔の計測を行なった ROI (縦  $200\mu\text{m}$  × 横  $200\mu\text{m}$ ) を示す。(B) 頭頂骨の骨小腔の計測を行なった ROI (縦  $100\mu\text{m}$  × 横  $100\mu\text{m}$ ) を示す。

骨小腔の自動形態認識は、Artificial Intelligence (AI)による深層機械学習の手法（NIS.ai、segment ai）を用いて実施した（図 5, 6）。まず、図 5 のフローチャートに示すように、マニュアルで骨小腔の形態を認識し、AI に形態認識学習をさせるための教師データを作成した。その後、AI による機械学習を 1000 回行い、骨小腔を適切に認識するための AI 教師データが完成した。また、部位ごとに骨小腔の形態が異なるため、AI 教師データも部位ごとにそれぞれ作成した。頭頂骨および下顎骨のすべての切片から得られた画像に、この作成した AI 教師データを適用し、骨小腔の二値化を行なった（図 6 STEP1）。AI 教師データ適用後は、図 6 STEP2&3 で示すように、骨小腔の認識が完全であるもの（緑矢頭）と不完全であるもの（赤矢頭）が存在した。骨小腔の認識が不完全であるものは、マニュアルで修正を加えた。このステップを経ることで、骨小腔は適切に二値化され、定量的な形態分析を行うことが可能となった（図 6）。

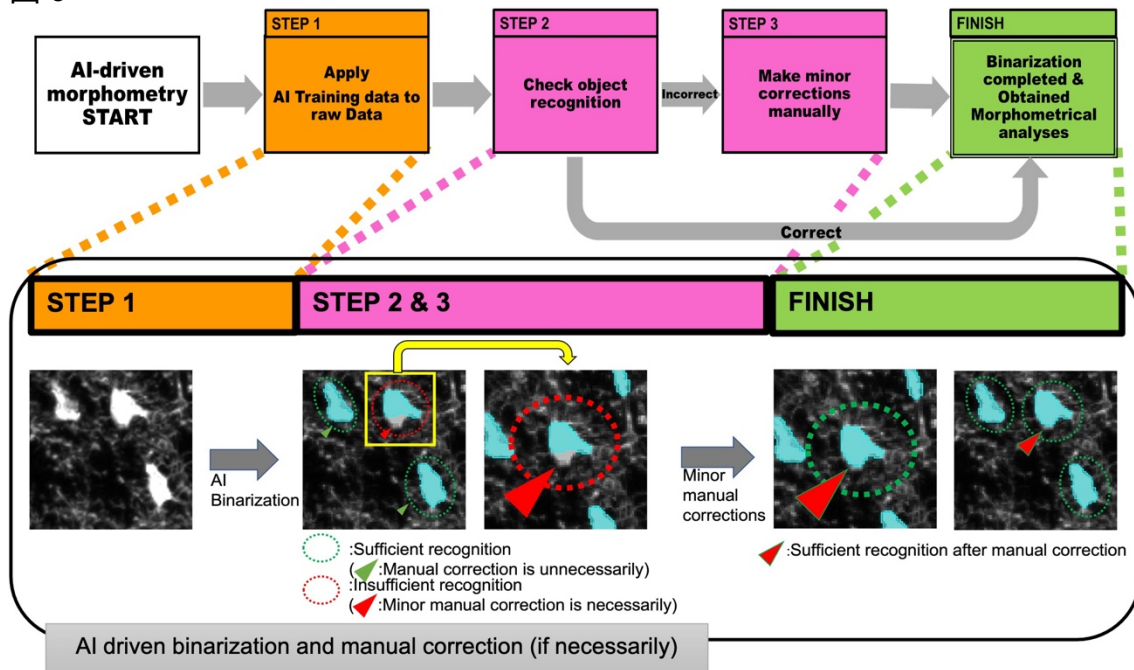
図 5



（図 5） AI 教師データの作成および機械学習のフローチャート。



図 6

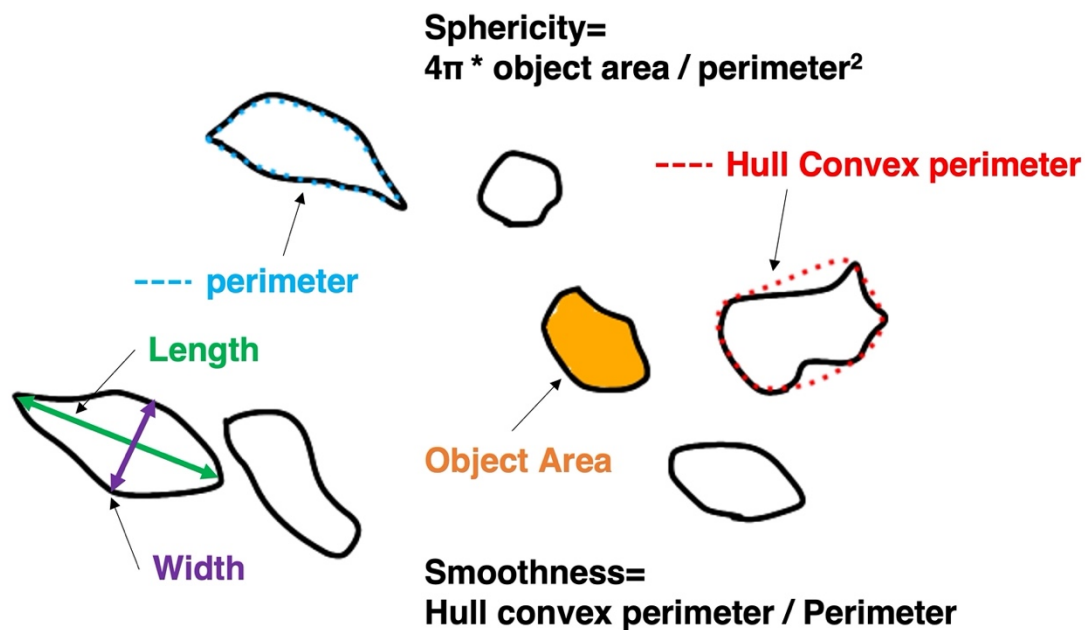


(図 6) 骨小腔の AI 駆動型自動形態計測のフローチャート

この AI による計測を利用して、認識された骨小腔の以下のパラメータを計測し、統計的に比較した：骨小腔数：object number、骨小腔面積：object area、骨小腔長：length、骨小腔周長：perimeter、骨小腔円形度：Sphericity( $=\frac{4\pi \times \text{object area}}{\text{perimeter}^2}$ )、and 骨小腔平滑度：smoothness( $=\frac{\text{convex hull perimeter}}{\text{perimeter}}$ )

図 7 に、骨小腔の自動形態計測のための 2 次元測定パラメータの計測法を模式的に示す。骨小腔の測定において、ROI は、実際の組織サイズを考慮し、下顎骨では  $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$ 、頭頂骨では  $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$  に設定した。

図 7



(図 7) 骨小腔の自動形態計測の計測パラメーターを示す模式図

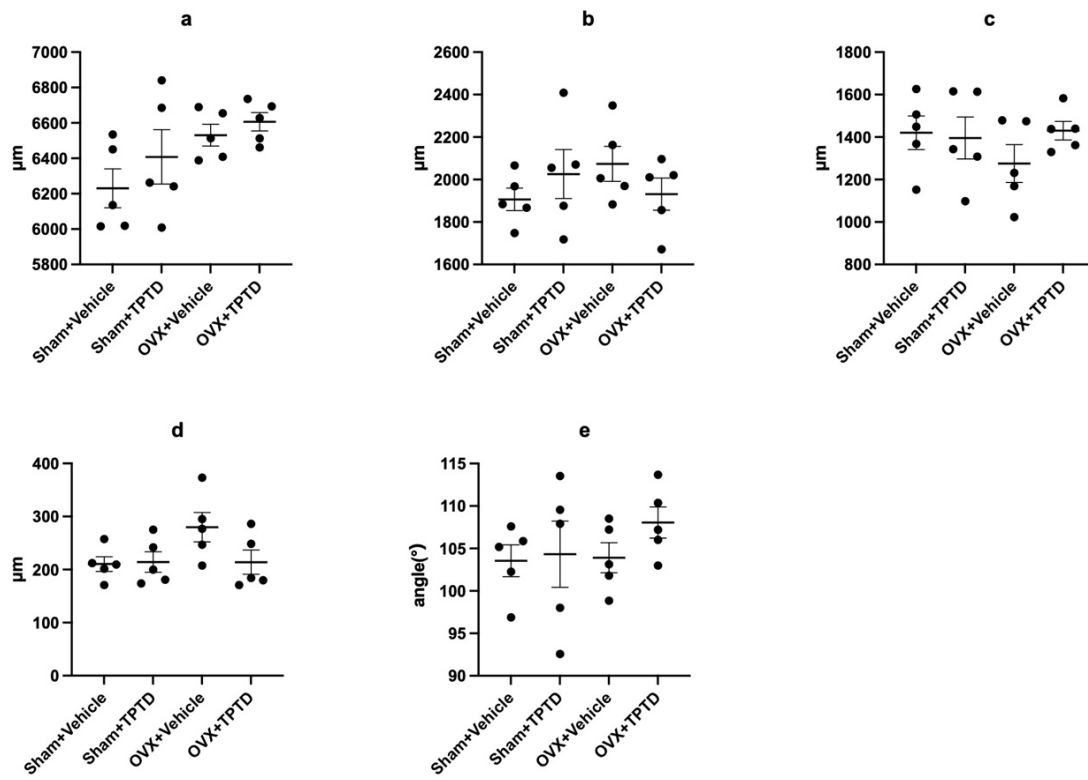
### 3 結果

下顎骨の形態計測は、Inoue らの方法を参考に、計測項目を設定した (図 2A)。a:下顎骨最下縁点から歯槽頂点までの距離、b:下顎骨頬側の最尖点から a に対して引いた垂線、c:下顎骨舌側最突出点から a に対して引いた垂線、d:c と前歯歯根の交点までの距離、e:下顎骨最下縁点、歯槽頂点、下顎骨頬側の最尖点がなす角度と設定した。a~e のいずれの計測項目においても有意な差は認められなかった (図 8A)。

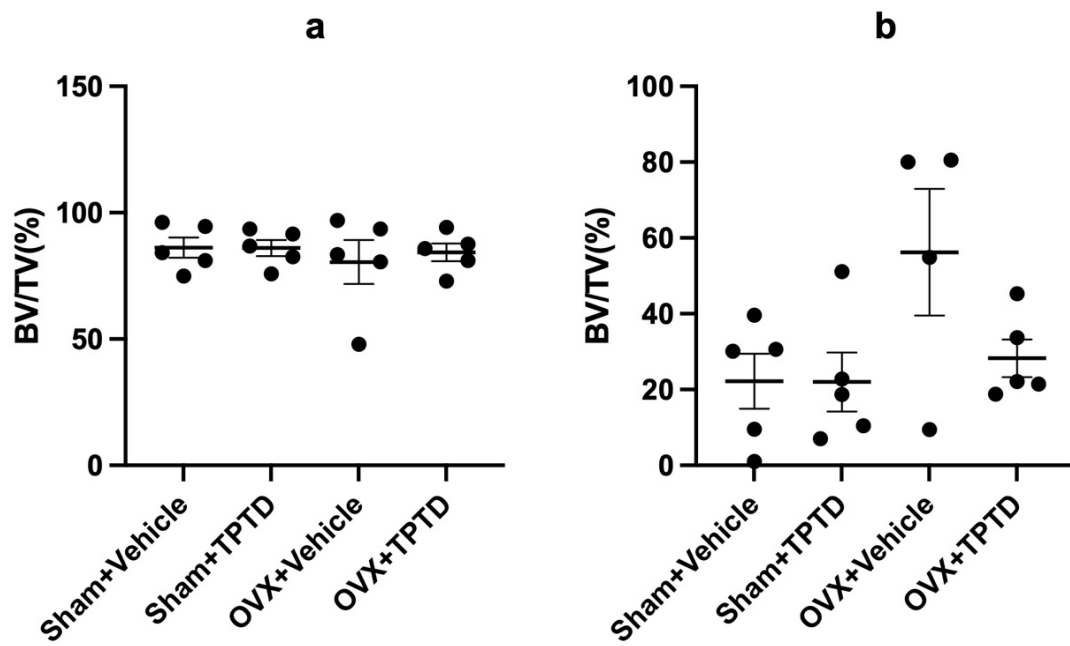
次に、歯槽骨の骨量/組織量：BV/TV の計測を行なった。根分岐部、根尖部からそれぞれ正方形 (縦  $500\mu\text{m}$  × 横  $500\mu\text{m}$ ) の ROI を設定し計測した (図 2B)。根分岐部、根尖部ともに各群に有意な差は認められなかった (図 8B)。



図8 (A)下顎骨形態計測



(B)下顎骨 BV/TV 計測



### (図 8) 下顎骨の形態計測

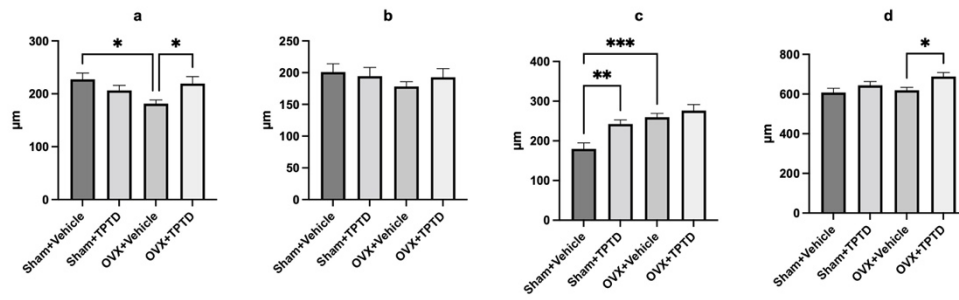
(A)下顎骨の角度および直線解析 (a:下顎骨最下縁点から歯槽頂点までの距離、b:下顎骨頬側の最尖点から a に対して引いた垂線、c:下顎骨舌側最突出点から a に対して引いた垂線、d:c と前歯歯根の交点までの距離、e:下顎骨最下縁点、歯槽頂点、下顎骨頬側の最尖点がなす角度) (平均値±標準誤差、Šídák 検定) (B)骨量/組織量: BV/TV 計測 a:根分岐部、b:根尖部を示す。(平均値±標準誤差、Šídák 検定)

続いて、頭頂骨の形態計測を行なった。頭頂骨を、表皮側の層板骨である内板: a、骨髓を含む層である中板: b、髄膜側の層板骨である外板: c の 3 層に分け、各層の厚みを計測した。また、3 層の合計の厚み: d を計測した (図 3A)。OVX モデルでは、全ての層で TPTD を投与することで厚みが増す傾向が見られ、全体の厚みも TPTD を投与することで有意に増加した (図 9A)。

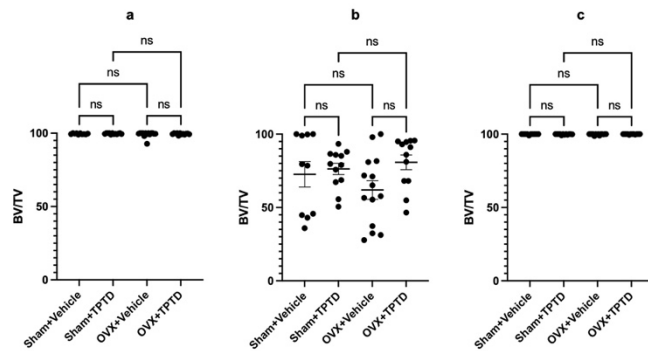
次に、頭頂骨の骨量/組織量: BV/TV の計測を行なった。上記の形態計測と同じく、1 つの切片ごとに ROI を 3 つ設定し、各 ROI を 3 層に分けて計測を行なった。骨髓が含まれる中板では、OVX モデルにおいて TPTD を投与することで BV/TV が増加する傾向が見られた(図 9B)。

さらに、頭頂骨中板の以下のパラメーターについて ROI を設定せずに計測を行なった (図 4B)。骨髓面の組織量: TV、骨量: BV、類骨量: OV、類骨長: osteoid length、類骨幅: osteoid width、骨髓面積: bone marrow area、骨髓面表面積: bone surface、類骨量/組織量: OV/TV、類骨量/骨量: OV/BV、類骨長/骨表面積: osteoid length/bone surface、さらに静止期または吸収期の骨髓周長: bone surface-osteoid length を計測した。骨量、類骨量、類骨長、類骨幅は全て Sham モデル、OVX モデルともに TPTD を投与することで増加する傾向が見られた。また、骨髓面積および骨髓面表面積は、特に OVX モデルにおいて TPTD を投与することで減少する傾向が見られた。類骨量/組織量、類骨量/骨量も TPTD を投与することで増加する傾向が見られた。類骨長/骨表面積は OVX モデルにおいて TPTD を投与することで有意に増加することがわかった。また、静止期または吸収期の骨髓周長は、TPTD を投与することで特に OVX モデルにおいて減少する傾向が見られた (図 9C)。

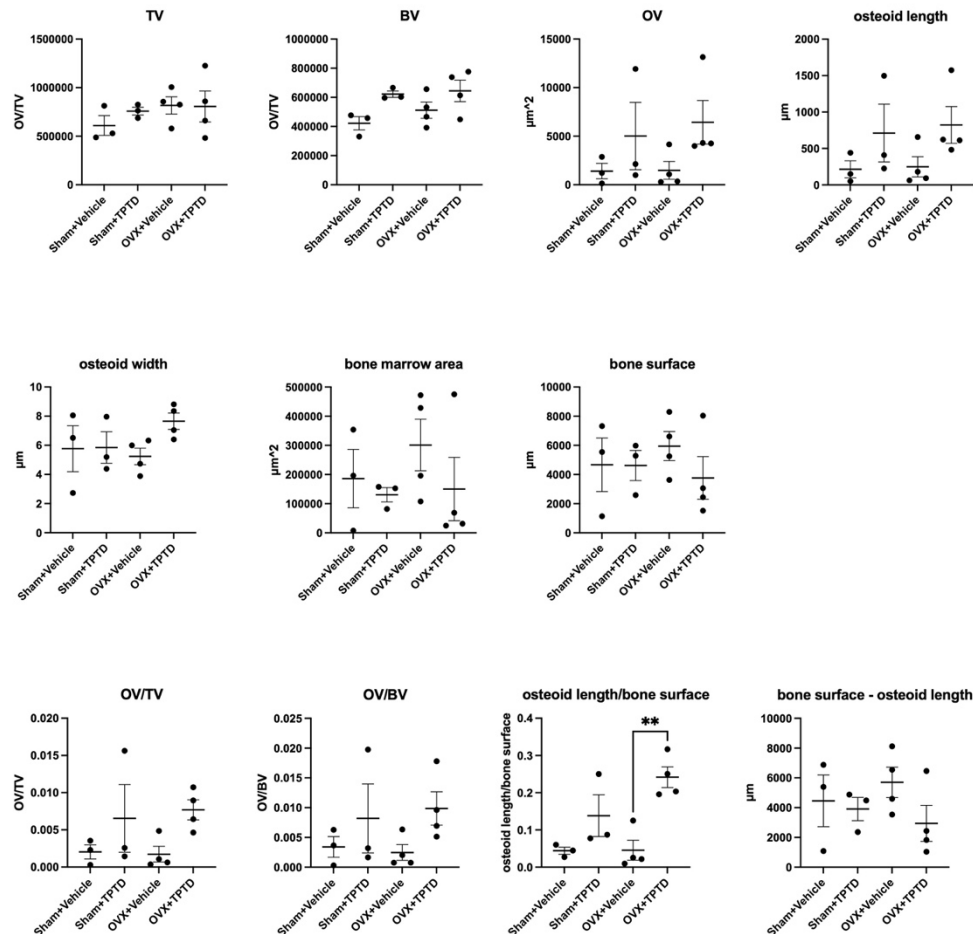
圖 9 (A)頭頂骨形態計測



(B)頭頂骨 BV/TV 計測



(C)頭頂骨中板骨髓面骨形態計測



**(図 9) 頭頂骨の形態計測**

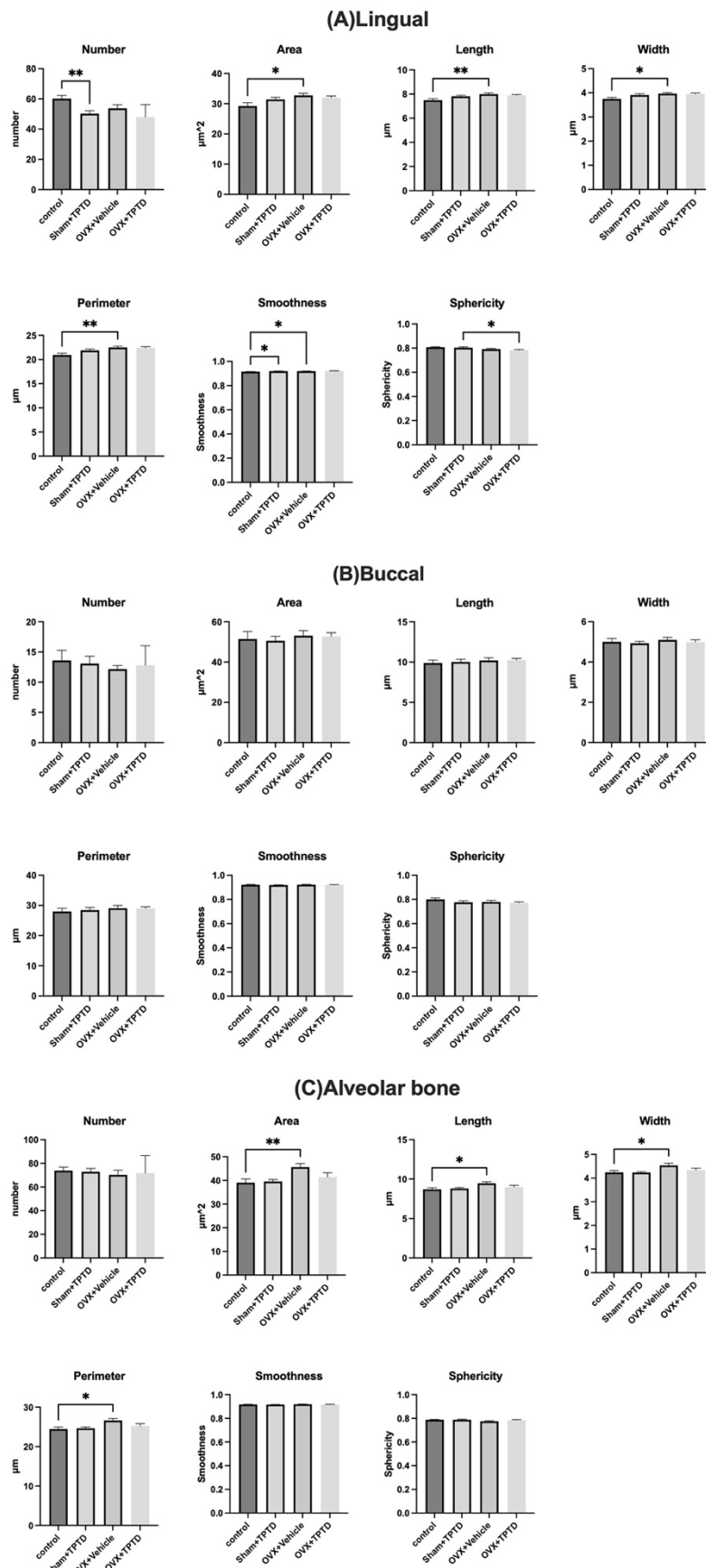
**(A) 頭頂骨の形態計測。** a.内板、b.中板、c.外板、d.合計の厚みを示す。(平均値±標準誤差、Šídák 検定、\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.001$ ) **(B) 頭頂骨骨量/組織量：** BV/TV 計測。a.内板、b.中板、c.外板 (平均値±標準誤差、Šídák 検定、ns：有意差無し) **(C) 頭頂骨中板の骨形態計測。** 組織量：TV、骨量：BV、類骨量：OV、類骨長：osteoid length、類骨幅：osteoid width、骨髓面積：bone marrow area、骨表面積：bone surface、類骨量/組織量：OV/TV、類骨量/骨量：OV/BV、類骨長/骨表面積：osteoid length/bone surface、さらに静止期または吸収期の骨髓周長：bone surface-osteoid length (平均値±標準誤差、Šídák 検定、\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ )

次に、下顎骨の骨小腔の計測および定量化を行なった。骨小腔の形態やオステオサイトネットワークのパターンは、骨の部位や機能によって異なることが報告されていることから、骨小腔の形態を AI を用いて計測した。

下顎骨の横断切片から、頬側、舌側、歯槽骨の各部位ごとに ROI (縦  $200\mu\text{m}$  × 横  $200\mu\text{m}$ ) をそれぞれ 3 箇所取得し、得られた画像から解析を行なった (図 4A)。

下顎骨の骨小腔は、舌側および歯槽骨では、OVX をすることで有意に骨小腔の面積：Area が大きくなることがわかった。また、骨小腔長：Length、骨小腔幅：Width、骨小腔周囲長：Perimeter も同じく有意に大きくなることがわかった。歯槽骨では、OVX モデルにおいて TPTD を投与することで骨小腔面積：Area は小さくなる傾向が見られた (図 10 A,B,C)。

図 10 下顎骨骨小腔微細形態計測



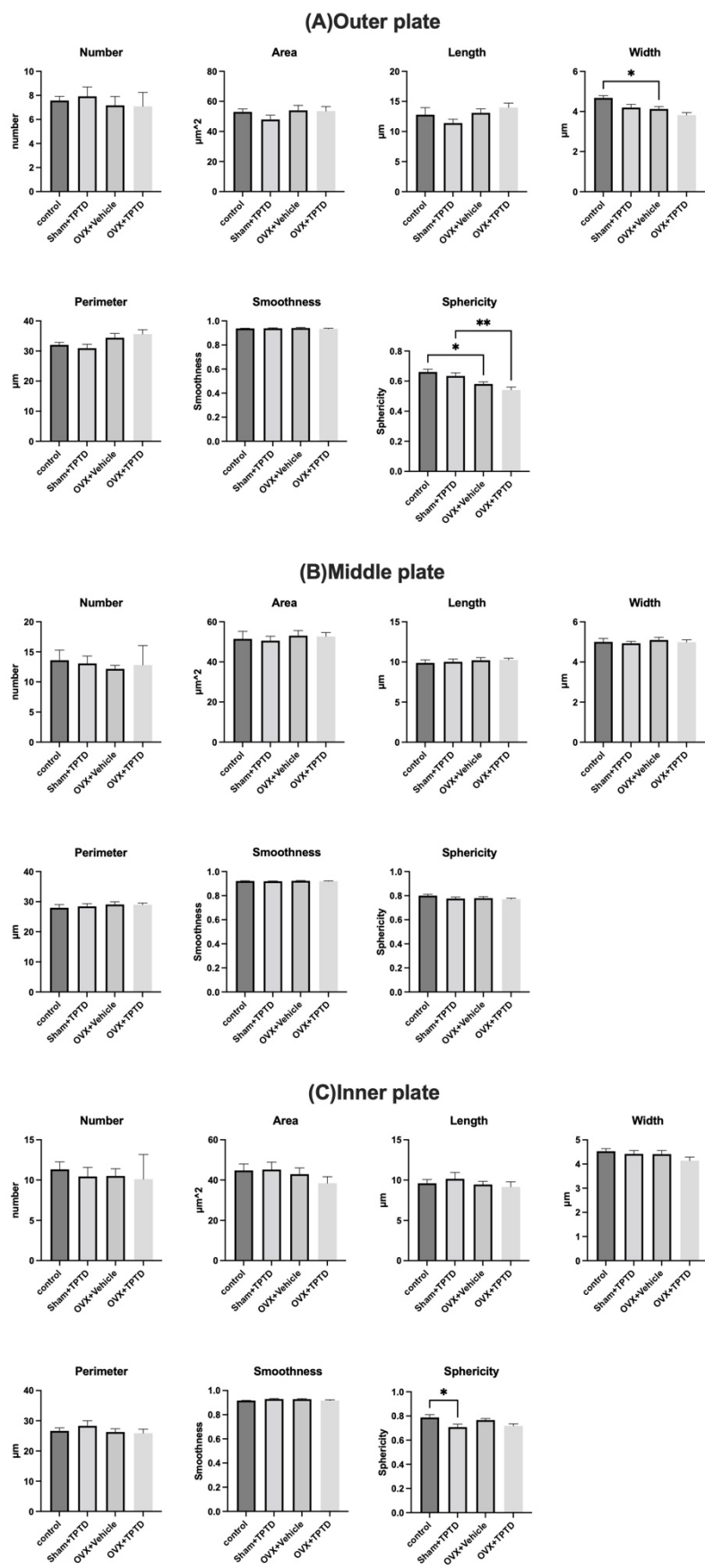
(図 10) 下顎骨骨小腔微細形態計測

(A)舌側、(B)頬側、(C)歯槽骨を示す。(平均値±標準誤差、Šídák 検定、\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ ) 骨小数：Number、骨小腔面積：Area、骨小腔長：Length、骨小腔幅：Width、骨小腔周囲長：Perimeter、表面平滑度：Smoothness、骨小腔円形度：Sphericity

続いて、頭頂骨においても骨小腔の計測および定量化を行なった。頭頂骨の横断切片から、外板、中板、内板の3層の各部位から ROI (縦  $100\mu\text{m}$  × 横  $100\mu\text{m}$ ) をそれぞれ3箇所取得し計測を行なった。(図 4B)

頭頂骨の外板では OVX をすることで骨小腔幅：Width、骨小腔円形度：Sphericity が有意に減少したが、骨小腔面積：Area には変化は見られなかった。また、中板、内板に関しても、骨小腔面積：Area は TPTD 投与および OVX の影響を受けなかった(図 11A, B, C)。

圖 11 下顎骨骨小腔微細形態計測



#### (図 11) 頭頂骨骨小腔微細形態計測

(A)外板、(B)中板、(C)内板を示す。(平均値±標準誤差、Šídák 検定、\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ )

## 4 考察

### 4.1 エストロゲン低下による下顎骨および頭頂骨形態への影響

臨床的には、閉経後骨粗鬆症による骨密度低下によって生じる骨折は、橈骨や大腿骨などの長管骨、および椎骨である。頭蓋顔面骨において、骨粗鬆症による骨密度低下は顕著ではないとされている。実際、本研究においても、Sham-Vehicle 群と OVX-Vehicle 群を比較した場合、頭頂骨および下顎骨の外形に有意な変化は見られなかった。長管骨や椎骨は、内面に海綿骨を有し、海面骨の表面が活発な骨吸収と骨形成を行って、全身のカルシウム恒常性に寄与している。しかしながら、頭頂骨および下顎骨には、このように活発な代謝を行う骨面が見られない。本研究において、下顎骨の形態計測では、Sham-Vehicle 群と OVX-Vehicle 群の比較において有意な差は観察されなかった。このことから、下顎骨骨体部の形態および骨量はエストロゲン低下の影響を受けない可能性が示唆された。本研究での頭頂骨の計測では、頭頂骨中板の骨髄面に類骨が観察され、頭頂骨においては最も骨代謝活性が高い部位であると思われる。しかしながら、この部位においても、卵巣摘出、すなわちエストロゲン欠乏の有意な影響は観察されなかった。本研究の観察から、エストロゲン低下による頭蓋顔面骨形態への明瞭な変化は観察されなかった。

### 4.2 骨形成促進薬 TPTD の下顎骨および頭頂骨形態への影響

臨床骨薬理学的試験から、TPTD の連日製剤 ( $20 \mu\text{g/day}$ ) および週 1 回投与製剤 ( $56.5 \mu\text{g/week}$ ) には、ともに、大腿骨および椎体の骨密度を上昇させる効果が報告されている<sup>40-43)</sup>。これらの試験では、TPTD は皮質骨および海綿骨の両方の骨密度を増加させる。しかしながら、頭蓋顔面骨への効果は知られていない。本研究における観察では、TPTD 投与は下顎骨骨体部への影響は観察されなかった。Nakajima らは、本研究と同様にラット卵巣摘出モデルに TPTD を投与し、下顎骨関節部の骨形成亢進を報告している<sup>44)</sup>。このことは、同じ下顎骨でも、骨代謝および TPTD への感受性が部位によって異なることを示唆している。頭頂骨の計測では、OVX-Vehicle 群と OVX-TPTD 群を比較した場合、全体の厚みと、頭頂骨骨髄面の骨形成は、有意に増加しており、TPTD による骨形成効果が観察された。一方で、同部位の骨形成を、Sham-Vehicle 群



と OVX-Vehicle 群を比較した場合には有意な差は観察されなかった。このことは、卵巣摘出によるエストロゲンの低下が、この頭頂骨骨髓面における TPTD への感受性を高めている可能性を示唆していた。

#### 4.3 エストロゲン低下による下顎骨骨小腔形態への影響

下顎骨の骨小腔の計測の結果、歯槽骨、舌側、頬側の全ての部位において骨小腔面積は OVX-Vehicle 群で Sham-Vehicle 群より増加した。特に歯槽骨と舌側では OVX-Vehicle 群と Sham-Vehicle 群を比較すると有意に面積が増加した。それに伴い、骨小腔長、骨小腔幅、骨小腔周囲長も増加が見られた。頭頂骨の骨小腔面積の計測では、外板、中板、内板の全ての層において、骨小腔の面積に群間の変化は見られなかった。骨小腔の拡大は、授乳時において観察され、「骨細胞性骨融解」として知られている<sup>45)</sup>。授乳時は、胎児へカルシウムを供給する必要があることから、母体の骨格系の外形や機械強度に影響を与えずにカルシウムを供給する恒常性維持機構であると考えられている。また、この骨細胞性骨融解は、甲状腺機能亢進症、ステロイド誘発性骨粗鬆症、廃用性骨粗鬆症、がん骨転移など、急激な骨量減少を伴う疾患でも報告されている。また、私たちの研究室の Takakura らは、ウサギ脛骨による観察から、PTH の高頻度投与によって、部位特異的な骨小腔の拡大が生じることを報告している<sup>38)</sup>。今回の観察では、下顎骨舌側部や歯槽骨では、部位特異的に、エストロゲン低下に伴い骨細胞性骨融解が起きている可能性を示唆し、非常に興味深い結果であった。

#### 4.4 骨形成促進薬 TPTD による下顎骨骨小腔形態への影響

歯槽骨では、OVX-TPTD 群では OVX-Vehicle 群より面積が、有意ではないものの、やや減少する傾向が見られた。一方、頭頂骨の骨小腔面積の計測では、外板、中板、内板の全ての層において、骨小腔の面積に群間の変化は見られなかった。これらの結果から、頭頂骨の骨小腔の面積は TPTD 投与の影響を受けない可能性が示唆された。骨小腔内での骨形成と骨吸収は、局所的骨リモデリング：local bone remodeling とも記載され、その生理的意義およびメカニズムが議論されている<sup>46)</sup>。今回の観察は、歯槽骨の恒常性維持に骨細胞性の局所骨リモデリングが関与している可能性を示唆するものであり、今後の詳細な検討が重要であると思われる。

#### 4.5 下顎骨の恒常性維持における骨細胞の重要性

本研究成果およびこれまでの知見から、下顎骨の恒常性維持には、メカノセンサーとしての骨細胞の重要性がさらに支持された。Inoue らは、生後マウス

の食餌の硬さを調節することで、異なる咀嚼回数による下顎骨形態への影響を観察した。その結果、硬い食事による咀嚼回数の上昇は、下顎骨の外側への骨形成を促進し、その際には骨細胞から発現誘導される IGF1 が関与することを報告している<sup>39)</sup>。下顎骨の恒常性維持における骨細胞の機能調節に、PTH がどのように関与するのかは、今後の重要な研究テーマであると思われる。

#### 4.6 歯槽骨リモデリングにおける PTH シグナルの重要性

PTH 製剤である TPTD は、骨芽細胞の PTH1 受容体に作用して前骨芽細胞の増殖分化を促進する。副甲状腺ホルモン 1 型受容体 1 (PTH1R 受容体) の機能喪失型変異は、ヒトにおける原発性萌出不全 (Primary failure of eruption: RFE) と関連している<sup>47-54)</sup>。PFE とは、Proffit と Vig によって最初に報告された疾患で、機械的障害がないにも関わらず永久歯が萌出不全を起こす常染色体優性遺伝の稀な疾患である。この疾患の特徴は、(1) 罹患歯の低位咬合

(2) 正常な顔面垂直成長を伴う著しい臼歯部開咬の増加 (3) 罹患歯の矯正的移动が不可能であることである。Decker らは、PFE が PTHR1 をコードする遺伝子のヘテロ接合性変異によって引き起こされることを示した<sup>47)</sup>。この疾患は、PTH シグナルが、永久歯の萌出に伴う歯槽骨のリモデリングに重要であることを示している。

PTH の標的細胞は骨芽細胞系であることはよく知られているが、その分化の正確な段階は不明な点が多い<sup>55)</sup>。しかしながら、マウスの後期骨芽細胞および初期骨細胞で特異的に活性化される DMP1 プロモーターの制御下で PTH 受容体を遺伝的に活性化または欠損させることにより、骨細胞における PTH 受容体が RANKL および OPG の発現調節を介して破骨細胞形成の調節因子として機能する関連性が示された<sup>56, 57)</sup>。これらの知見は、PTH が、骨細胞性の局所骨リモデリングに関与することを示している。本研究の知見から、歯槽骨の恒常性維持における、骨細胞および PTH の歯槽骨特異的な分子メカニズムを解明していくことが今後重要であることが考えられた。

## 5 結論

頭頂骨の形態計測では、OVX すなわちエストロゲン減少による骨量の変化は観察されなかった。しかしながら、OVX 群に TPTD を投与することで骨髓層である中板の骨髓面での骨量の増加、外骨膜性の骨形成が見られたが、骨小腔の面積は変化がみられなかった。このことから、頭頂骨においては、TPTD は

外骨膜性および骨髄内腔面を標的として骨形成を示すことが明らかとなった。

また、顎骨では OVX または TPTD 投与による明瞭な骨量の変化はなかったが、OVX を行うことで骨小腔の面積が拡大し、TPTD を投与することで骨小腔の面積が減少する傾向を示したことから、歯槽骨を含む顎骨では骨細胞性のリモデリングを標的として骨形成を促進することが示唆された。我々の結果より、歯槽骨を含む顎骨では骨細胞性リモデリングが動的に生じており、骨膜や海綿骨のリモデリングを主体とする中胚葉性の体幹・四肢骨とは異なる骨代謝特異性を有していることが考えられた。

## 文献

- 1) Plotkin LI, Bellido T : Osteocytic signalling pathways as therapeutic targets for bone fragility. Nat Rev Endocrinol 12 : 593-605, 2016.
- 2) Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF : The osteocyte: an endocrine cell ... and more. Endocr Rev 34 : 658-690, 2013.
- 3) Robling AG, Bonewald LF : The Osteocyte: New Insights. Annu Rev Physiol 82 : 485-506, 2020.
- 4) Bonewald LF : The amazing osteocyte. J Bone Miner Res 26 : 229-238, 2011.
- 5) Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, Ito M, Takeshita S, Ikeda K : Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. Cell Metab 5 : 464-475, 2007.
- 6) Weinbaum S, Cowin SC, Zeng Y : A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. J Biomech 27 : 339-360, 1994.
- 7) Han Y, Cowin SC, Schaffler MB, Weinbaum S : Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes. Proc Natl Acad Sci U S A 101 : 16689-16694, 2004.
- 8) Anderson EJ, Kaliyamoorthy S, Iwan J, Alexander D, Knothe Tate ML : Nano-microscale models of periosteocytic flow show differences in stresses imparted to cell body and processes. Ann Biomed Eng 33 : 52-62, 2005.
- 9) You L, Cowin SC, Schaffler MB, Weinbaum S : A model for strain

- amplification in the actin cytoskeleton of osteocytes due to fluid drag on pericellular matrix. *J Biomech* 34 : 1375-1386, 2001.
- 10) You LD, Weinbaum S, Cowin SC, Schaffler MB : Ultrastructure of the osteocyte process and its pericellular matrix. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 278 : 505-513, 2004.
  - 11) Baron R, Hesse E : Update on bone anabolics in osteoporosis treatment: rationale, current status, and perspectives. *J Clin Endocrinol Metab* 97 : 311-325, 2012.
  - 12) Yavropoulou MP, Xygonakis C, Lolou M, Karadimou F, Yovos JG : The sclerostin story: from human genetics to the development of novel anabolic treatment for osteoporosis. *Hormones (Athens)* 13 : 323-337, 2014.
  - 13) Watanabe T, Tamamura Y, Hoshino A, Makino Y, Kamioka H, Amagasa T, Yamaguchi A, Iimura T : Increasing participation of sclerostin in postnatal bone development, revealed by three-dimensional immunofluorescence morphometry. *Bone* 51 : 447-458, 2012.
  - 14) Kramer I, Halleux C, Keller H, Pegurri M, Gooi JH, Weber PB, Feng JQ, Bonewald LF, Kneissel M : Osteocyte Wnt/beta-catenin signaling is required for normal bone homeostasis. *Mol Cell Biol* 30 : 3071-3085, 2010.
  - 15) Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE, Wu D : Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 280 : 19883-19887, 2005.
  - 16) van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, Hamersma H, Papapoulos SE, ten Dijke P, Löwik CW : Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med* 199 : 805-814, 2004.
  - 17) Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, Shpektor D, Jonas M, Kovacevich BR, Staehling-Hampton K, Appleby M, Brunkow ME, Latham JA : Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *Embo j* 22 : 6267-6276, 2003.
  - 18) Poole KES, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Lowik CW, Reeve J : Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *Faseb Journal* 19 : 1842-+, 2005.

- 19) Kamiya N, Ye L, Kobayashi T, Mochida Y, Yamauchi M, Kronenberg HM, Feng JQ, Mishina Y : BMP signaling negatively regulates bone mass through sclerostin by inhibiting the canonical Wnt pathway. *Development* 135 : 3801-3811, 2008.
- 20) Spatz JM, Wein MN, Gooi JH, Qu Y, Garr JL, Liu S, Barry KJ, Uda Y, Lai F, Dedic C, Balcells-Camps M, Kronenberg HM, Babij P, Pajevic PD : The Wnt Inhibitor Sclerostin Is Up-regulated by Mechanical Unloading in Osteocytes in Vitro. *J Biol Chem* 290 : 16744-16758, 2015.
- 21) Moustafa A, Sugiyama T, Prasad J, Zaman G, Gross TS, Lanyon LE, Price JS : Mechanical loading-related changes in osteocyte sclerostin expression in mice are more closely associated with the subsequent osteogenic response than the peak strains engendered. *Osteoporos Int* 23 : 1225-1234, 2012.
- 22) Suzuki N, Aoki K, Marcián P, Borák L, Wakabayashi N : A threshold of mechanical strain intensity for the direct activation of osteoblast function exists in a murine maxilla loading model. *Biomech Model Mechanobiol* 15 : 1091-1100, 2016.
- 23) Galea GL, Lanyon LE, Price JS : Sclerostin's role in bone's adaptive response to mechanical loading. *Bone* 96 : 38-44, 2017.
- 24) Lv J, Sun X, Ma J, Ma X, Xing G, Wang Y, Sun L, Wang J, Li F, Li Y : Involvement of periostin-sclerostin-Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in the prevention of neurectomy-induced bone loss by naringin. *Biochem Biophys Res Commun* 468 : 587-593, 2015.
- 25) Osumi R, Wang Z, Ishihara Y, Odagaki N, Iimura T, Kamioka H : Changes in the intra- and peri-cellular sclerostin distribution in lacuno-canalicular system induced by mechanical unloading. *J Bone Miner Metab* 39 : 148-159, 2021.
- 26) Takano-Yamamoto T, Takemura T, Kitamura Y, Nomura S : Site-specific expression of mRNAs for osteonectin, osteocalcin, and osteopontin revealed by in situ hybridization in rat periodontal ligament during physiological tooth movement. *J Histochem Cytochem* 42 : 885-896, 1994.
- 27) Nishiyama Y, Matsumoto T, Lee JW, Saitou T, Imamura T, Moriyama K, Yamaguchi A, Iimura T : Changes in the spatial distribution of sclerostin in the osteocytic lacuno-canalicular system in alveolar bone due to orthodontic forces, as detected on multimodal confocal fluorescence

- imaging analyses. *Arch Oral Biol* 60 : 45-54, 2015.
- 28) Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P, Jr., Han J, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM : Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development* 127 : 1671-1679, 2000.
  - 29) Men Y, Wang Y, Yi Y, Jing D, Luo W, Shen B, Stenberg W, Chai Y, Ge WP, Feng JQ, Zhao H : Gli1+ Periodontium Stem Cells Are Regulated by Osteocytes and Occlusal Force. *Dev Cell* 54 : 639-654.e636, 2020.
  - 30) An Z, Akily B, Sabalic M, Zong G, Chai Y, Sharpe PT : Regulation of Mesenchymal Stem to Transit-Amplifying Cell Transition in the Continuously Growing Mouse Incisor. *Cell Rep* 23 : 3102-3111, 2018.
  - 31) Lim WH, Liu B, Cheng D, Hunter DJ, Zhong Z, Ramos DM, Williams BO, Sharpe PT, Bardet C, Mah SJ, Helms JA : Wnt signaling regulates pulp volume and dentin thickness. *J Bone Miner Res* 29 : 892-901, 2014.
  - 32) Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM : OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397 : 315-323, 1999.
  - 33) Ogasawara T, Yoshimine Y, Kiyoshima T, Kobayashi I, Matsuo K, Akamine A, Sakai H : In situ expression of RANKL, RANK, osteoprotegerin and cytokines in osteoclasts of rat periodontal tissue. *J Periodontal Res* 39 : 42-49, 2004.
  - 34) Kim T, Handa A, Iida J, Yoshida S : RANKL expression in rat periodontal ligament subjected to a continuous orthodontic force. *Arch Oral Biol* 52 : 244-250, 2007.
  - 35) Shoji-Matsunaga A, Ono T, Hayashi M, Takayanagi H, Moriyama K, Nakashima T : Osteocyte regulation of orthodontic force-mediated tooth movement via RANKL expression. *Sci Rep* 7 : 8753, 2017.
  - 36) Odagaki N, Ishihara Y, Wang Z, Ei Hsu Hlaing E, Nakamura M, Hoshijima M, Hayano S, Kawanabe N, Kamioka H : Role of Osteocyte-PDL Crosstalk in Tooth Movement via SOST/Sclerostin. *J Dent Res* 97 : 1374-1382, 2018.
  - 37) Himeno-Ando A, Izumi Y, Yamaguchi A, Imura T : Structural differences in the osteocyte network between the calvaria and long bone revealed by three-dimensional fluorescence morphometry, possibly reflecting distinct

- mechano-adaptations and sensitivities. *Biochem Biophys Res Commun* 417 : 765-770, 2012.
- 38) Takakura A, Sato T, Lee JW, Hirano K, Takao-Kawabata R, Ishizuya T, Iimura T : Expansion of the osteocytic lacunar-canalicular system involved in pharmacological action of PTH revealed by AI-driven fluorescence morphometry in female rabbits. *Sci Rep* 12 : 16799, 2022.
  - 39) Inoue M, Ono T, Kameo Y, Sasaki F, Ono T, Adachi T, Nakashima T : Forceful mastication activates osteocytes and builds a stout jawbone. *Sci Rep* 9 : 4404, 2019.
  - 40) Miyauchi A, Matsumoto T, Sugimoto T, Tsujimoto M, Warner MR, Nakamura T : Effects of teriparatide on bone mineral density and bone turnover markers in Japanese subjects with osteoporosis at high risk of fracture in a 24-month clinical study: 12-month, randomized, placebo-controlled, double-blind and 12-month open-label phases. *Bone* 47 : 493-502, 2010.
  - 41) McClung MR, San Martin J, Miller PD, Civitelli R, Bandeira F, Omizo M, Donley DW, Dalsky GP, Eriksen EF : Opposite bone remodeling effects of teriparatide and alendronate in increasing bone mass. *Arch Intern Med* 165 : 1762-1768, 2005.
  - 42) Fujita T, Inoue T, Morii H, Morita R, Norimatsu H, Orimo H, Takahashi HE, Yamamoto K, Fukunaga M : Effect of an intermittent weekly dose of human parathyroid hormone (1-34) on osteoporosis: a randomized double-masked prospective study using three dose levels. *Osteoporos Int* 9 : 296-306, 1999.
  - 43) Nakamura T, Sugimoto T, Nakano T, Kishimoto H, Ito M, Fukunaga M, Hagino H, Sone T, Yoshikawa H, Nishizawa Y, Fujita T, Shiraki M : Randomized Teriparatide [human parathyroid hormone (PTH) 1-34] Once-Weekly Efficacy Research (TOWER) trial for examining the reduction in new vertebral fractures in subjects with primary osteoporosis and high fracture risk. *J Clin Endocrinol Metab* 97 : 3097-3106, 2012.
  - 44) Nakajima M, Ejiri S, Tanaka M, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H : Effect of intermittent administration of human parathyroid hormone (1-34) on the mandibular condyle of ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab* 18 : 9-17, 2000.
  - 45) Tsourdi E, Jähn K, Rauner M, Busse B, Bonewald LF : Physiological and

- pathological osteocytic osteolysis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 18 : 292-303, 2018.
- 46) Qing H, Bonewald LF : Osteocyte remodeling of the perilacunar and pericanalicular matrix. *Int J Oral Sci* 1 : 59-65, 2009.
  - 47) Decker E, Stellzig-Eisenhauer A, Fiebig BS, Rau C, Kress W, Saar K, Rüschemdorf F, Hubner N, Grimm T, Weber BH : PTHR1 loss-of-function mutations in familial, nonsyndromic primary failure of tooth eruption. *Am J Hum Genet* 83 : 781-786, 2008.
  - 48) Frazier-Bowers SA, Hendricks HM, Wright JT, Lee J, Long K, Dibble CF, Bencharit S : Novel mutations in PTH1R associated with primary failure of eruption and osteoarthritis. *J Dent Res* 93 : 134-139, 2014.
  - 49) Frazier-Bowers SA, Simmons D, Wright JT, Proffit WR, Ackerman JL : Primary failure of eruption and PTH1R: the importance of a genetic diagnosis for orthodontic treatment planning. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 137 : 160.e161-167; discussion 160-161, 2010.
  - 50) Grippaudo C, Cafiero C, D'Apolito I, Ricci B, Frazier-Bowers SA : Primary failure of eruption: Clinical and genetic findings in the mixed dentition. *Angle Orthod* 88 : 275-282, 2018.
  - 51) Jelani M, Kang C, Mohamoud HS, Al-Rehaili R, Almramhi MM, Serafi R, Yang H, Al-Aama JY, Naeem M, Alkhiary YM : A novel homozygous PTH1R variant identified through whole-exome sequencing further expands the clinical spectrum of primary failure of tooth eruption in a consanguineous Saudi family. *Arch Oral Biol* 67 : 28-33, 2016.
  - 52) Risom L, Christoffersen L, Dagaard-Jensen J, Hove HD, Andersen HS, Andresen BS, Kreiborg S, Duno M : Identification of six novel PTH1R mutations in families with a history of primary failure of tooth eruption. *PLoS One* 8 : e74601, 2013.
  - 53) Roth H, Fritsche LG, Meier C, Pilz P, Eigenthaler M, Meyer-Marcotty P, Stellzig-Eisenhauer A, Proff P, Kanno CM, Weber BH : Expanding the spectrum of PTH1R mutations in patients with primary failure of tooth eruption. *Clin Oral Investig* 18 : 377-384, 2014.
  - 54) Yamaguchi T, Hosomichi K, Narita A, Shirota T, Tomoyasu Y, Maki K, Inoue I : Exome resequencing combined with linkage analysis identifies novel PTH1R variants in primary failure of tooth eruption in Japanese. *J Bone Miner Res* 26 : 1655-1661, 2011.
  - 55) Bellido T, Saini V, Pajevic PD : Effects of PTH on osteocyte function.



- Bone 54 : 250-257, 2013.
- 56) O'Brien CA, Plotkin LI, Galli C, Goellner JJ, Gortazar AR, Allen MR, Robling AG, Bouxsein M, Schipani E, Turner CH, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, Bellido T : Control of bone mass and remodeling by PTH receptor signaling in osteocytes. PLoS One 3 : e2942, 2008.
- 57) Powell WF, Jr., Barry KJ, Tulum I, Kobayashi T, Harris SE, Bringhurst FR, Pajevic PD : Targeted ablation of the PTH/PTHrP receptor in osteocytes impairs bone structure and homeostatic calcemic responses. J Endocrinol 209 : 21-32, 2011.

## 謝辞

本研究を遂行し、学位論文をまとめるにあたり、ご指導を頂きました北海道大学大学院歯学研究院薬理学教室教授 飯村忠浩先生、歯科矯正学教室教授 佐藤嘉晃先生に深く感謝いたします。また、常に建設的なご意見を頂きました薬理学教室および歯科矯正学教室の教員・大学院生の諸先生方に御礼申し上げます。本研究の実験や解析、考察に協力いただき、ご助言、ご指導をいただいた旭化成ファーマ株式会社医薬研究センター薬理研究部の高尾亮子先生ならびに高倉綾先生に感謝の意を表します。本研究は、JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム JPMJSP2119「北海道大学 DX 博士人材フェローシップ」の支援を受けたものです。