



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Histochemical assessment of the anabolic effects of abaloparatide on the femoral metaphyses of ovariectomized mice [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	劉, 軒宇
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第16464号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95168
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Xuanyu_Liu_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 劉 軒 宇

審 査 担 当 者	主査	教授	網 塚 憲 生
	副査	教授	大 廣 洋 一
	副査	教授	飯 村 忠 浩
	副査	准教授	長谷川 智 香

学 位 論 文 題 名

Histochemical assessment of the anabolic effects of abaloparatide on the femoral metaphyses of ovariectomized mice

(アバロパラチド投与卵巣摘出マウスの大腿骨骨梁における組織化学的評価)

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た。内容を以下に記す。

骨粗鬆症治療薬であるアバロパラチド(abaloparatide: ABL)は間歇投与により骨形成作用を発揮し、骨粗鬆症患者の骨量を増加させることが報告されている。しかし、これまで骨粗鬆症モデル動物におけるアバロパラチドの骨形成作用を組織学的に解析した報告はほとんどない。そこで本研究では、卵巣摘出により骨粗鬆症を示すマウスにアバロパラチドを投与し、大腿骨の骨幹端骨梁を組織化学的に検索した。

生後 12 週齢雌性 C57BL/6J マウスに卵巣摘出術(OVX)を施し、アバロパラチド (30 μ g/kg/day : OVX+ABL 群)、または、溶媒 (生理食塩水 : OVX 群) を 1 日 1 回連日腹腔内投与した。また、試料採取 1, 3 日前に、マウスにカルセイン溶液を腹腔内投与し、骨石灰化面の標識を行った。投与開始 0, 2, 4, 6 週後に左右大腿骨を摘出し、左大腿骨は、マイクロ CT 撮影後にパラフィン切片を作製し、H-E 染色、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)酵素組織化学、および、cathepsin K, alkaline phosphatase (ALP), PHOSPHO1 免疫染色を実施するとともに、骨形態計測、TRAP 陽性破骨細胞数、cathepsin K 陽性破骨細胞数、ALP 陽性骨芽細胞系細胞領域、PHOSPHO1 陽性骨芽細胞領域の計測を行った。一方、右大腿骨は、未脱灰 MMA 樹脂切片を作成し、骨形成速度、骨リモデリングによる骨形成面とモデリングによる骨形成面を計測した。なお、パラフィン染色標本を用いた各種計測は、成長板軟骨直下 600 μ m (幅) $\times$ 1200 μ m (高さ) の領域を測定部位に用いた。一方、MMA 樹脂標本を用いた計測は、成長板軟骨直下 600 μ m (幅) $\times$ 1200 μ m (高さ) の領域を、成長板軟骨直下の close region と骨幹側の distant region に分けて実施した。

大腿骨のマイクロ CT 像および H-E 染色像を観察すると、OVX 群では溶媒投与 6 週後まで骨幹端部の骨梁が経時的に減少していたが、OVX+ABL 群では OVX 後も骨梁が維持されていた。骨形態計測の結果、OVX+ABL 群では、骨量 (BV/TV)、骨梁幅 (Tb.Th)、骨梁数 (Tb.N) が有意に増加する一方、骨梁間隙 (Tb.Sp) は有意に低下していた。

破骨細胞の局在を観察したところ、OVX 群の溶媒投与開始直後 (0 週) では、TRAP 陽性/cathepsin K 陽性破骨細胞は骨梁表面に観察されたが、その後、時間経過とともに破骨細胞数が減少する傾向を認めた。一方、OVX+ABL 群では、いずれの観察期間においても、

多数の TRAP 陽性/cathepsin K 陽性破骨細胞が骨表面に局在しており、組織量当たりの TRAP 陽性/cathepsin K 陽性破骨細胞数は、OVX 群に比較して有意に高い値を示した。ただし、骨面当たりの TRAP 陽性/cathepsin K 陽性破骨細胞数は、投与 4 週間後を除き、両群で有意な差は認められなかった。一方、骨芽細胞の局在を観察したところ、OVX 群では、骨梁表面の ALP 陽性骨芽細胞系細胞と PHOSPHO1 陽性成熟骨芽細胞が、いずれも経時的に減少していた。特に、骨形成・骨基質石灰化を担う PHOSPHO1 陽性成熟骨芽細胞は、その局在が骨軟骨移行部に限局する傾向がみられた。これに対して、OVX+ABL 群では、骨表面の ALP 陽性骨芽細胞系細胞と PHOSPHO1 陽性成熟骨芽細胞がともに増加していた。また、PHOSPHO1 陽性成熟骨芽細胞は、骨表面に長い列を形成しており、これら細胞集団の分布は骨幹側の骨梁表面にまで広がっていた。統計解析では、組織量・骨量当たりの ALP 陽性骨芽細胞系細胞領域は、投与 2 週以降でいずれも OVX+ABL 群が有意に高値を示していた。また、組織量・骨量当たりの PHOSPHO1 陽性成熟骨芽細胞領域も、投与 4 週後を除き、いずれも OVX+ABL 群で OVX 群より有意に上昇していた。このことから、アバロパラチドは、破骨細胞による骨吸収よりも骨芽細胞による骨形成を促進することで、卵巣摘出後の骨量減少を抑制し、骨量を増加させる可能性が推測された。

さらに、アバロパラチドで誘導される骨形成機序を明らかにする目的でカルセイン標識を解析したところ、close region および distant region いずれの計測部位においても、OVX 群では経時的に断片化した短いカルセイン標識がみられるのに対し、OVX+ABL 群では多数の連続した長いカルセイン標識が観察された。これらカルセイン標識面の平均値は、投与 6 週後で close region, distant region とともに OVX+ABL 群が有意に高い値を示すこと、また、OVX+ABL 群の骨形成速度(BFR/BS)は、distant region では投与 2 週から、close region では投与 6 週から有意に上昇したことから、アバロパラチドでは骨吸収に依存しない骨形成の促進が示唆された。そこで、アバロパラチド投与 6 週におけるモデリング・骨リモデリングによる骨形成面を計測したところ、OVX+ABL 群では OVX 群に比べて、骨リモデリングによる骨形成面は close region でのみ増加していたが、モデリングによる骨形成面は close region および distant region の両方で有意に増加していた。

以上のことから、アバロパラチドは、卵巣摘出後の骨吸収を抑制するのではなく、骨形成を促進することで骨量を増加させること、また、骨形成促進機序として骨リモデリングによる骨形成だけでなくモデリングによる骨形成を誘導することが示唆された。

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。以下にその項目を記す。

- (1) 本研究で使用したマウスの週齢と動物実験の limitation について
- (2) 卵巣摘出によって生じる性ホルモン産生低下以外の作用について
- (3) アバロパラチドが骨リモデリングまたはモデリングを誘導するメカニズムについて
- (4) close region と distant region におけるアバロパラチドの骨形成環境について
- (5) 卵巣摘出直後からアバロパラチドを投与開始した理由について
- (6) アバロパラチドの投与量と投与頻度の設定根拠について

上記の質疑応答から、申請者は本研究の内容を中心とした専門分野はもとより、関連分野について十分な理解と学識を有していることが確認された。

以上、審査担当者全員は、学位申請者が博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認めた。