HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Histochemical assessment of the anabolic effects of abaloparatide on the femoral metaphyses of ovariectomized mice [an abstract of entire text]
Author(s)	劉, 軒宇
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/95172
Type	doctoral thesis
File Information	Xuanyu_Liu_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要約

学位論文題目

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）

博士の専攻分野名称　　博士（歯学）　　氏名　劉 軒 宇

アバロパラチド（abaloparatide: ABL）は、副甲状腺ホルモン関連ペプチドの N 末端から 34 個のアミノ酸配列の一部を改変したポリペプチドであり、骨粗鬆症治療薬として用いられている。アバロパラチド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 週齢の雌性 C57BL/6J マウスに卵巣摘出術（ovariectomy: OVX）を施し、アバロパラチド（30μg/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。投与開始 0, 2, 4, 6 週後に、麻酔下にてパラホルムアルデヒド溶液を用いて灌流固定し、左右大腿骨を摘出した。なお、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。摘出した左大腿骨は、マイクロ CT 撮影後、EDTA 溶液にて脱灰し、パラフィン切片を作製した。これらのパラフィン切片を用いて、H-E 染色、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（Tartrate-Resistant Acid Phosphatase: TRAP）染色、cathepsin K, alkaline phosphatase: ALP, PHOSPHO1 免疫染色を実施するとともに、骨形態計測（骨量：BV/TV, 骨梁幅：Tb. Th, 骨梁数：Tb. N, 骨梁間隙：Tb. Sp）、組織量・骨量当たりの 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、MMA 樹脂に包埋したのち未脱灰樹脂切片を作成し、カルセイン標識による骨形成速度（BFR/BS）、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 ㎛（幅）×1200 ㎛（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 ㎛（幅）×1200 ㎛（高さ）の領域を、成長板軟骨直下 600 ㎛×600 ㎛の範囲（近位部）とその遠位の 600 ㎛×600 ㎛の範囲（遠位部）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、BV/TV, Tb.Th, Tb.N が有意に増加する一方、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 群では、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 TRAP 陽性/cathepsin K 陽性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。一方、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寄り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 週後の骨量当たりの値を除き、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、骨量を増加させた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、骨幹端近位部・遠位部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 週後で近位部・遠位部ともに OVX+ABL 群が有意に高い値を示すこと、また、OVX+ABL 群の BFR/BS は、遠位部では投与 2 週から、近位部では投与 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近位部でのみ増加していたが、モデリングによる骨形成面は近位部・遠位部の両方において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。