

学位論文題名

Enhancement of graft bone healing by intermittent administration of human parathyroid hormone (1-34) in a rat spinal arthrodesis model

(ラット脊椎固定モデルを用いた副甲状腺ホルモン製剤間欠投与による移植骨治癒過程促進効果)

学位論文内容の要旨

【Background and Objectives】 Bone grafting is commonly used to treat skeletal disorders such as bone tumor, trauma, pseudoarthrosis, and destructive spine or joint diseases. The efficacy of this procedure in treating large bone defects or unstable joints has gained it wide acceptance. It can take several months, however, to achieve a solid union and bony fusion is sometimes delayed or fails, especially in osteoporosis patients. Intermittent administration of parathyroid hormone (PTH) has potent anabolic effects on bone remodeling. Because intermittent PTH treatment increases bone mass and reduces the risk for osteoporotic vertebral fractures, recombinant human PTH(1-34) has already been approved as a treatment for severe osteoporosis in the United States and in European countries. The results of recent animal studies suggest that intermittent administration of PTH(1-34) enhances the bone healing process and also decreases the length of time needed for bone consolidation in fracture model. Therefore, we hypothesized that intermittent PTH treatment would enhance graft bone healing. The objectives of this study were to elucidate whether intermittent administration of PTH(1-34) enhances graft bone healing and to gain insight into the effect of intermittent administration of PTH on graft bone metabolism in a rat spinal arthrodesis model.

【Materials and Methods】 Eighty-two male Sprague-Dawley rats underwent posterolateral spinal arthrodesis surgery using autologous bone grafts. Animals were given daily subcutaneous injections of hPTH(1-34) (40 µg/kg/day PTH group) or 0.9% saline vehicle (control group) from immediately after surgery till death. Five rats each were killed 2, 4, 7, and 14 days after the surgery, and mRNA expression analysis of bone related genes (insulin-like growth factor 1: IGF-1, bone morphogenetic protein -2, -4 and -7: BMP-2, 4, and 7, alkaline phosphatase: ALP, osteocalcin: OC, osteonectin: ON, type I collagen: COL1A1, type II collagen: COL2A1, type X collagen: COL10A1, receptor activator of NFκB Ligand: RANKL, osteoprotegerin: OPG, tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP, calcitonin receptor: CTR) was performed on harvested grafted bone. Seven rats each were killed 14, 28, and 42 days after the surgery, and the lumbar spine, which contained the grafted spinal segment, was subjected to fusion assessment, microstructural analysis using three-dimensional micro-computed tomography. Histomorphometric analysis was performed to evaluate the fusion status and remodeling condition of the fusion mass. Mineral apposition rate (MAR) and mineralized surface/bone surface (MS/BS) was calculated to evaluate bone formation activity, and Osteoclast surface (Oc.S/BS) was calculated to evaluate bone resorption

activity. Blood samples were collected for analyzing serum bone metabolism markers. Osteocalcin and type I collagen crosslinked C-telopeptides (CTX) levels in the serum were assayed using an ELISA.

**[Results]** The results indicated that PTH administration decreased the time required for graft bone healing and provided a structurally superior fusion mass in the rat spinal arthrodesis model. PTH administration increased the fusion rate on day 14 (14% in the control group and 57% in the PTH group), accelerated grafted bone resorption, and produced a larger and denser fusion mass compared to control. mRNA expression of both osteoblast- and osteoclast-related genes was upregulated by PTH treatment. There were significant differences in IGF-1 levels on days 4 and 7, BMP-2 on days 4 and 14, BMP-4 on day 4, BMP-7 on day 7, ALP on day 14, OC on day 14, ON on days 4, 7, and 14, COL1A1 on days 7 and 14, COL2A1 on days 7 and 14, TRAP on days 7 and 14, and CTR on days 7 and 14. Serum bone formation (OC) and resorption (CTX) marker levels were also higher in the PTH group than in the control group. Bone histomorphometry indicated that the MAR and MS/BS values were significantly higher in the PTH group on both days 28 and 42. The Oc.S/BS values were also significantly higher in the PTH group on both days 28 and 42. These findings suggest that intermittent administration of PTH(1-34) enhanced bone turn over dominantly on bone formation at the graft site, leading to acceleration of the spinal fusion.

**[Discussion and conclusion]** PTH has a unique mechanism of action on bone: continuous administration of PTH leads to a decrease in bone volume (catabolic effect), and intermittent administration of PTH leads to the formation of increased amounts of trabecular bone (anabolic effect). In this study using a rat spinal arthrodesis model, we provide evidence that intermittent administration of PTH(1-34) accelerates and enhances the healing process of bone grafts.

PTH-treated animals attained a fusion mass with a larger and denser trabecular volume at an earlier time point compared to vehicle-treated animals. In the bone graft healing process in normal rat, trabecular volume reaches a peak at day 28, and thereafter gradually declines in a similar manner to that which is observed during fracture callus remodeling. The same tendency was observed in PTH-treated animals; however, the trabecular volume peaked at day 14. Furthermore, the trabecular volume in PTH-treated animals was greater than that in vehicle-treated animals throughout the observation period. These findings indicate that PTH(1-34) decreased the modeling and remodeling period as well as generated a larger area of trabecular bone in the bone graft surgery.

These anabolic effects of intermittent PTH administration on graft bone healing must derive from the predominant effect of PTH on bone formation. Increased mRNA expression of osteoblastic bone matrix proteins, higher MAR and MS/BS values, and consistently higher serum OC levels as systemic bone formation markers in the PTH group support this idea.

Graft bone resorption is essential for subsequent new bone formation and remodeling in bone graft healing. In this study, we showed that intermittent PTH treatment accelerated graft bone resorption in the early phase of healing. Micro-CT observation indicated that the graft bone fragment was resorbed and replaced with newly formed bone up to day 28 in PTH-treated animals, whereas it was still visible on day 28 in control animals. It is possible that this phenomenon derived from the PTH-stimulated enhancement of bone resorbing activity. Increased expression of both TRAP and CTR as osteoclast marker genes, the higher serum CTX levels, and the higher Oc.S/BS values in PTH-treated animals support this idea.

We conclude that intermittent administration of human PTH(1-34) decreased the period of time required for graft bone healing and produced a more solid fusion mass in the rat posterolateral spinal arthrodesis model. We expect that intermittent administration of PTH(1-34) might be an efficient adjuvant intervention for spinal arthrodesis surgery and all other orthopaedic surgeries requiring bone grafts.

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 和 則  
副 査 教 授 藤 堂 省  
副 査 教 授 三 浪 明 男

学 位 論 文 題 名

## Enhancement of graft bone healing by intermittent administration of human parathyroid hormone (1-34) in a rat spinal arthrodesis model

(ラット脊椎固定モデルを用いた副甲状腺ホルモン製剤間欠投与による  
・移植骨治癒過程促進効果)

本研究の目的は副甲状腺ホルモン製剤 (PTH1-34) 間欠投与が脊椎固定術における移植骨治癒を短縮するか否かをラットモデルを用いて検討することである。SD ラットに自家腸骨を用いた腰椎後側方固定術を施行し、コントロール群(生食皮下投与)と PTH 群(リコンビナント PTH(1-34)皮下投与)の 2 群における効果を検討した。投与後 14 日までの早期において、移植骨中の骨形成関連遺伝子(IGF-1、BMP、ALP、Osteocalcin、Type1-2-10 collagen)および骨吸収関連遺伝子(TRAP、CTR)の両者が PTH 群で有意に亢進していることが Real-time RT-PCR により示された。投与後 14 日から 42 日の観察では、骨癒合率はコントロールが 14%、PTH 群が 57%と PTH 群が高いことが示された。3D-micro CT による骨形態計測においては、移植骨片吸収は PTH 群では速く、PTH 投与により皮質骨形成速度が速くなり、海綿骨骨量と骨梁連結性も、PTH 群で早期に高いピーク値を認めることが示された。組織標本を用いた骨形成関連項目(骨形成速度・骨形成面)および骨吸収関連項目(骨吸収面)の評価においても、PTH 群で各項目の有意な高値を認めた。血清骨代謝マーカー測定の結果も同様に骨形成・吸収の亢進が認められた。

これらの結果から、PTH 製剤間欠投与による骨代謝亢進作用は既報の骨粗鬆症や骨折治癒過程と同様に、移植骨治癒過程にも促進的に作用したと考えられた。そのメカニズムは本実験において骨関連遺伝子発現や骨代謝パラメーターが示すように、骨形成優位な骨代謝回転の亢進によると推察され、これにより移植骨吸収・海綿骨モデリング-リモデリング過程・皮質骨形成の促進がおり、移植骨治癒期間の短縮をもたらしたと考察される。本研究により、PTH 製剤間欠投与が脊椎固定術や骨移植を必要とする手術において治癒までの期間を短縮させる有用な補助療法になる可能性が示された。

審査にあたり副査藤堂教授から薬剤投与方法の定義と効果メカニズム、についての質問と、臨床応用における他の方法に対する優位性についての質問があった。申請者は臨床研究における薬効動態と標的シグナル分子に関する基礎研究を引用して間欠投与におけるメカニズムを回答し、分子生物学的および現象観察の結果が、現在までに解明されている PTH の作用メカニズムに矛盾無く当てはまり、研究仮説を証明しうることを回答した。また、

骨形成誘導因子移植などの既存の方法は手術時に計画的に用いられるのに対して、PTH 投与は手術手技そのものに変更の必要がなく、手術後あるいは手術効果不良例に追加投与の型式で用いることが可能なことから臨床応用の簡便さと応用の広さを持つと回答した。次いで主査安田教授から膜性骨化と内軟骨性骨化の違いという観点からの、このモデルでの移植骨治癒形態とそれに対する PTH の効果についての質問と、全身投与による他の部位の骨に対する影響やホルモン恒常性への影響についての質問があった。申請者は、自家海綿骨移植治癒過程が膜性骨化と内軟骨性骨化の二つの骨化形式を有することと、既報の基礎研究から PTH がその両方に作用することを引用して回答した。臨床試験結果から、PTH 長期投与が有害な副作用をもたらさず、カルシウム濃度変化や PTH そのものが副甲状腺機能に Negative feedback を与えないことを引用して回答した。次いで副査三浪教授から骨代謝回転亢進が骨形成優位であるという証明の方法論に対する質問があった。骨形成の骨吸収に対する優位性は観察結果からの現象論的解釈であり本実験の評価系の限界であるが、実際の骨形成が何れの項目においても亢進されている事実が PTH の有利な治療的効果を証明していること、また投与方法と治療効果判定に臨床使用中の評価法を用いることで、臨床が要求する効果水準を満たしていることから、本研究が目指した骨移植手術補助療法としての実現可能性が高いことを回答した。

この論文は PTH 製剤の移植骨治癒への影響を、臨床に即したモデルを使用して力学的、骨形態学的、および組織学的手法を用いて評価を行い、そのメカニズムに関して分子生物学的手法を用いた検討まで行った独創的な研究であり、骨移植手術への臨床応用により治療成績の向上が期待される。

審査員一同はこれらの成果を評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受ける資格を有すると判定した。