

論文要旨等報告書

氏	大島 正充
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3 8 3 0 号
学位授与の日付	平成 2 1 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	bFGF局所投与による下顎骨骨質改善効果の検討 -神経提由来骨髄細胞と中胚葉由来骨髄細胞の骨芽細胞分化ならびに破骨細胞分化の相違とbFGFへの反応性-
論文審査委員	教授 山本 敏男 教授 滝川 正春 教授 窪木 拓男

学位論文内容の要旨

【緒言】

口腔インプラント治療の短期的・長期的予後には埋入局所の骨質が関与していることが知られているため、埋入部位の顎骨骨質を改善する試みが多くなされてきた。しかし、生物学的に顎骨骨質を改善する有効な方法は未だ確立されていない。塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic Fibroblast Growth Factor; bFGF) は、各種組織再生に関与しており、大腿骨や腸骨に注入した場合、局所の骨質改善に有効であるとの報告がなされている。したがって、bFGF は顎骨においても骨質改善効果を有することが期待されるが、その効果はいまだ明らかとなっていない。

そこで本研究では、ウサギをモデルとして、bFGF が下顎骨の骨質改善に有効かどうかを明らかにすることを目的とし、bFGF を下顎骨に単回投与した際の組織学的変化を検討した。次いで、下顎骨骨髄から血球系ならびに間葉系細胞を分離し、その挙動に与える bFGF の効果を *in vitro* で検討した。

【材料および方法】

すべての動物実験ならびに細胞実験は、12 週齢雄性日本白色ウサギ (体重 2.5-3.0kg) を用いて行った (岡山大学動物実験倫理委員会, 承認番号: OKU2007-227)。

1. bFGF 骨髄内局所単回投与: ウサギの下顎骨骨髄腔に bFGF 100 μ g を注入し、4 週後の骨髄海綿骨の変化を組織学的に検討した。対照には脛骨を用い、比較、検討した。下顎骨に関しては μ CT 撮影を行い、骨形態計測学的にも評価した。

2. 骨髄間質細胞に対する bFGF の影響: ウサギの下顎骨、腸骨、脛骨を対象とし、それぞれの骨髄から骨髄間質細胞を分離し、以下の項目を比較、検討した。

2-1) 細胞増殖: 0, 10^{-12} M, 10^{-9} M の bFGF を含む培地で細胞を培養し、1 日目、5 日目の生細胞数を MTS 法にて評価した。

2-2) 細胞遊走: FBS 非添加培地に 0, 10^{-12} M, 10^{-9} M の bFGF を添加し、30 時間培養後の細胞の遊走距離を scratch assay にて評価した。

2-3) 骨芽細胞分化: 石灰化誘導培地に 0, 10^{-12} M, 10^{-9} M の bFGF を添加し、各細胞の石灰化結節形成能、アルカリフォスファターゼの活性ならびに遺伝子発現を評価した。

3. 骨髄細胞培養における破骨細胞形成とその活性に対する bFGF の影響: ウサギの下顎骨、腸骨、脛骨骨髄から分離した骨髄細胞を、 10^{-8} M の Vitamin D₃ (VD₃) ならびに 0, 10^{-12} M, 10^{-9} M の bFGF を添加した培地で培養した。14 日後に TRAP 染色を行い、破骨細胞形成を評価した。吸収活性の評価は、カルシウムコートされた培養プレート上に形成される吸収窩の面積を計測した。

4.骨髄間質細胞の破骨細胞形成支持能の評価：ウサギ脾臓から分離した細胞を，下顎骨，腸骨，脛骨骨髄から分離した骨髄間質細胞と共培養した。14日後のTRAP陽性多核細胞の数と吸収窩面積を，実験3と同様に評価し，それぞれの破骨細胞形成支持能を評価した。また，それぞれの骨髄間質細胞において，破骨細胞形成に関連する因子であるRANKLならびにM-CSF遺伝子の発現量をRT-PCR法を用いて半定量的に評価した。

5.統計解析

各データの統計学的有意性は，paired-*t*検定，ならびに一元配置分散分析と多重比較検定を用いて評価した。

【結果および考察】

1.bFGF骨髄内局所単回投与による骨の形態学的変化：骨髄腔内へのbFGF注入4週間後には，下顎骨では明らかな新生骨形成を認めた。しかし，脛骨での骨形成は認めなかった。下顎骨の骨形態計測を行ったところ，骨梁体積比，骨梁幅，骨梁数ともに生理食塩水注入群と比較して有意に高い値を示した。

2.骨髄間質細胞の挙動に与えるbFGFの影響：下顎骨，腸骨，脛骨骨髄から分離した骨髄間質細胞の増殖と遊走は，bFGF濃度依存的に促進され，下顎骨骨髄間質細胞は腸骨，脛骨骨髄間質細胞と比較して，高い増殖能，遊走能を示した。すべての骨髄間質細胞においてbFGF濃度依存的に骨芽細胞分化（石灰化結節形成，アルカリフォスファターゼ活性ならびに遺伝子発現）は抑制された。

3.骨髄細胞培養における破骨細胞形成とその活性に対するbFGFの影響：VD₃存在下における骨髄細胞培養では，すべての骨髄培養においてbFGF濃度依存的に破骨細胞形成が抑制された。しかし，抑制前後ともに，腸骨，脛骨骨髄細胞の方が，下顎骨骨髄細胞よりも，破骨細胞数，吸収活性ともに高かった。

4.骨髄間質細胞の破骨細胞形成支持能の評価：VD₃存在下における骨髄間質細胞と脾臓細胞との共培養においても，bFGF濃度依存的に破骨細胞形成が抑制された。脛骨骨髄間質細胞が最も高い破骨細胞形成支持能を有し，下顎骨・腸骨骨髄間質細胞の支持能は低かった。VD₃刺激下における脛骨骨髄間質細胞のRANKL遺伝子発現量は，下顎骨，腸骨骨髄間質細胞と比較して有意に高く，共培養における結果を支持するものであった。一方，M-CSF遺伝子発現量は各細胞間で差を認めなかった。

以上から，下顎骨骨髄腔内へのbFGF注入により，注入局所の骨質の改善が得られる可能性が示唆された。また，このメカニズムは，bFGF注入により骨髄間質細胞の増殖と遊走が高度に促進され，骨形成を担う細胞が多量に蓄積されることにより骨再生環境が整えられること，また下顎骨では，破骨細胞形成能が低調であるのに加えて，bFGFにより破骨細胞形成が抑制されるため，骨髄腔内に新生骨が形成・維持されたものと推測された。

【結論】

骨髄内へのbFGF局所注入4週間後の骨を組織学的に評価すると，下顎骨では明らかな新生骨形成を認めたが，脛骨では認めなかった。

下顎骨，腸骨，脛骨骨髄から分離した骨髄間質細胞において，神経堤由来の下顎骨由来細胞は，中胚葉由来の腸骨ならびに脛骨由来細胞とは明らかに異なる性質を有していた。すなわち，増殖能，遊走能は下顎骨骨髄間質細胞が最も高く，骨芽細胞分化能，破骨細胞形成支持能は脛骨骨髄間質細胞が最も高かった。

論文審査結果の要旨

口腔インプラント治療の短期的・長期的予後には埋入局所の骨質が関与していることが知られているため、埋入部位の顎骨骨質を改善する試みが多くなされてきた。塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic Fibroblast Growth Factor; bFGF) は、各種組織再生に関与しており、大腿骨や腸骨に直接注入した場合、局所の骨質改善に有効であるとの報告がなされている。したがって、bFGF は顎骨においても骨質改善効果を有することが期待されるが、その効果はいまだ明らかとなっていない。

本研究は、ウサギモデルを用いて、bFGF が下顎骨の骨質改善に有効かどうかを明らかにすることを目的とし、bFGF を下顎骨に単回投与した際の組織学的変化を検討したものである。また、下顎骨骨髓、ならびに腸骨・脛骨骨髓から骨髓間質細胞を分離し、その細胞に対する bFGF の効果を *in vitro* で比較・検討をおこなっている。

その結果、明らかとなったこととして以下の点を挙げている。

1. 骨髓内への bFGF 局所注入 4 週後の骨を組織学的に評価すると、下顎骨では明らかな新生骨形成を認めしたが、脛骨では認めなかった。
2. 下顎骨、腸骨、脛骨骨髓から分離した骨髓間質細胞において、神経堤由来の下顎骨由来細胞は、中胚葉由来の腸骨ならびに脛骨由来細胞とは明らかに異なる性質を有していた。すなわち、増殖能、遊走能は下顎骨骨髓間質細胞が最も高く、骨芽細胞分化能、破骨細胞形成支持能は脛骨骨髓間質細胞が最も高かった。

これらの知見は、bFGF が局所的な下顎骨の骨質改善に有効であること、ならびに各骨髓由来細胞はその採取部位によって性質が異なることを明らかとしたものである。本結果は、成長因子を応用したインプラント治療適応拡大に向け、非常に示唆に富む研究業績と考えられる。また、実験計画および実験手法も適切であった。したがって本申請論文は博士 (歯学) の学位授与に十分値するものと判断した。