

氏名	中村 心
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5926号
学位授与の日付	平成31年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	コラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子とコラーゲン基剤を用いた複合剤は水平性骨欠損における歯周組織再生を促進する
論文審査委員	吉山 昌宏 教授 窪木 拓男 教授 西田 崇 准教授

学位論文内容の要旨

論文内容の要旨（2000字程度）

【緒言】

歯周組織再生療法において、塩基性線維芽細胞増殖因子（basic Fibroblast Growth Factor ; bFGF）の臨床応用が実現した。しかし、bFGFは局所滞留性が低いため、早期に拡散し、活性を喪失するという問題がある。さらに、口腔内は歯が上皮を貫いて植立していることから創部が開放創になりやすいため、手術部位の薬剤が流失しやすい。そのため、水平性骨吸収や重度の根分岐部病変においては、bFGFを十分な濃度で維持することが困難であり、その適応は限定的である。

bFGFの問題を克服する方法として、bFGFをコラーゲンヘアンカリングさせることによって滞留性を持たせる薬物送達システム（Drug Delivery System ; DDS）に着目した。細菌性コラゲナーゼから単離したコラーゲン結合ドメイン（Collagen Binding Domain ; CBD）とbFGFから成る融合タンパク質（Collagen Binding-bFGF ; CB-bFGF）は、整形外科領域において、種々のコラーゲン材料との併用により、bFGFと比較して中胚葉由来の長管骨の骨折部の骨形成を促進すると報告されている。

そこで、CB-bFGFとコラーゲン基剤から成る複合剤を応用した新規の歯周組織再生療法を考えた。本研究では、*in vitro*と*in vivo*の評価系を作製し、本複合剤の水平骨欠損モデルにおける有効性を検討した。

【材料と方法】

1. 試料 : CB-bFGF は、Glutathion-S-Transferase (GST) との融合タンパク質として生産した。発現プラスミド pCHC302-hbFGF で形質転換した大腸菌 BL21 CondonPlus RIL 株を培養し、融合タンパク質を生産し、Glutathione Sepharose を用いてアフィニティ精製した。Thrombin により GST タグを切断後、再度アフィニティ精製した。CB-bFGF のコラーゲン結合活性は、コラーゲンパウダー (CP) への結合を SDS ポリアクリルアミド電気泳動法で確認した。
2. 細胞増殖活性の評価 : ラット由来の歯根膜細胞を樹立し、継代して 4-5 代目を使用した。96 穴マイクロプレートに 1.0×10^3 cells/well で播種し、5 時間培養後に、CB-bFGF または bFGF を 0, 1, 10, 100, そして 1,000 pM の濃度で添加した。72 時間培養後に WST-8 assay で評価した。
3. コラーゲンシート (CS) における滞留性評価 : bFGF および CB-bFGF を Alexa Fluor 594 dye で標識した。5 mm × 5 mm × 2 mm の CS に標識した CB-bFGF または bFGF (0.58 nmol) を反応させ、1 mL の α MEM を加えた 12 穴プレートに静置した。0, 1, 3, 5, 10, そして 14 日後に IVIS system を用いて蛍光測定し、その表面積を Image J で定量した。
4. 骨欠損モデルでの評価 : 9 週齢の雄性 SD ラットの上顎口蓋側歯肉を切開・剥離し、第一大臼歯近心

から第二大臼歯近心の歯槽骨を口蓋骨底部まで削除した。CB-bFGFをCPと混和（終濃度 0.58 nmol / 5 mg）し、欠損部へ填入した。対照群として未填入（Control）群，リン酸緩衝生理食塩水/CP群，bFGF/CP群を設定した。4，8週後に安楽死処置を行い，上顎骨を摘出した。4%リン酸緩衝パラホルムアルデヒド溶液で72時間，浸漬固定した。

5. **マイクロCTによる定量**：マイクロCT画像を撮影し，骨体積と骨塩量を定量した。
6. **組織学的形態計測**：10%ギ酸で10日間脱灰し，厚さ4 μ mの組織切片を作製した。ヘマトキシリン-エオジン（H-E）染色とAzan染色を行い，新生骨面積と上皮性付着の長さを計測した。
7. **免疫組織学化学染色による解析**：Osteocalcin（OCN），Proliferating Cell Nuclear Antigen（PCNA），そしてOsteopontin（OPN）陽性細胞の局在と細胞数の定量を行った。
8. **統計解析**：2群間以上の差の検定にはone-way analysis of variance（one-way ANOVA），多重比較検定にはTukey/Kramer testを用いた。2群間の差の検定にはStudent t-testを用いた。p値が0.05未満の場合を有意差ありと判定した。

【結果】

1. ***in vitro*におけるCB-bFGFの性質評価**：精製したCB-bFGFは，コラーゲン結合活性を示した。CB-bFGFのラットの歯根膜細胞に対する細胞増殖活性は，0～1,000 pMの範囲でbFGFと同程度であった。また，CB-bFGFはbFGFと比較してCS中により長期にわたって保持されていた。
2. ***in vivo*における骨体積と骨塩量の評価**：術後4週において，CB-bFGF/CP群では骨体積および骨塩量がControl群と比較して有意に増加した。術後8週において，CB-bFGF/CP群では骨体積および骨塩量が対照群と比較して有意に増加した。
3. **新生骨面積と上皮性付着の長さの評価**：術後4週において，CB-bFGF/CP群では新生骨面積がControl群と比較して有意に増加した。術後8週において，CB-bFGF/CP群では新生骨面積が対照群と比較して有意に増加した。また，術後4，8週において，CB-bFGF/CP群では上皮性付着の長さが，Control群と比較して有意に短かった。
4. **骨欠損部におけるOCN，PCNA，OPN陽性細胞の局在と定量**：OCN陽性細胞は新生骨表面で確認され，術後4週において，対照群と比較して有意に増加した。PCNA陽性細胞は新生骨周囲の結合組織中で確認され，術後4週において対照群と比較して有意に増加した。OPN陽性細胞は新生骨表面および周囲の結合組織中で確認され，術後4週において対照群と比較して有意に増加した。その後の術後8週では，術後4週よりもいずれも陽性細胞数が減少していた。

【考察】

*in vitro*モデルにおいて，歯周組織再生において重要な役割を担う歯根膜細胞に対するCB-bFGFの細胞増殖活性を確認した。また，CB-bFGFがコラーゲンに結合し，bFGFと比較してより長期にわたってコラーゲン基剤中に滞留することを示した。これらの結果から，本複合剤の有効性がコラーゲン基剤中に滞留し徐放されることによって発揮されることが示唆された。

*in vivo*モデルにおいて，CB-bFGF/CPは，術後8週において骨形成を促進し，さらに上皮のダウングロースを抑制した。CB-bFGF/CPが歯周組織局所に滞留することによって，bFGFの生理活性が持続的に発揮されたと考えられる。また，免疫組織化学染色の結果から，CB-bFGF/CPは，術後4週において，骨のリモデリングを始めとする歯周組織の再生反応が促進して骨形成を進行させ，その結果が術後8週における骨形成量の増加として示されたと考えられる。

本研究において，CB-bFGF複合剤のラットの水平性骨欠損モデルにおける有効性が示された。本CB-bFGF複合剤は新規のDDSとして，bFGFの歯周組織再生療法の適応症の拡大に繋がると期待される。CB-bFGF複合剤は，基剤によって歯周組織再生のスペースを確保しながら増殖因子を徐放することで，内在性の幹細胞の分化・増殖を刺激し，理想的な歯周組織再生を導くと期待される。すなわち，CB-bFGFが基剤に結合することで局所組織中に長期間滞留し，徐放されることで，bFGFの生理活性が持続して発揮されることが考えられる。また，CB-bFGFが徐放されたのち，周囲の歯槽骨や細胞外基質中のコラーゲン線維に結合し，さらに持続して作用することも考えられる。今後の臨床応用を目指すためには，歯周組織再生研究のスタンダードとされる中型動物を用いて本複合剤の有効性を明らかにすることと，安全性の評価のためにCB-bFGF/CPの薬物動態を明らかにすることが必要である。

【結論】

CB-bFGF とコラーゲン基剤から成る複合剤は、ラットの水平性骨欠損モデルにおいて、bFGF に比較して歯周組織再生をより高く促進することが示された。

論文審査結果の要旨

重症化した歯周病の進行に対する歯周組織再生療法として、塩基性線維芽細胞成長因子（basic Fibroblast Growth Factor : bFGF）の臨床応用が開始された。しかし、bFGFは局所滞留性が低いため、その適応症は垂直性骨欠損に限定されている。その解決策として、細菌性コラゲナーゼ由来のコラーゲン結合ドメイン（Collagen Binding Domain : CBD）を用いて、成長因子をコラーゲン基剤に結合させ、局所滞留性を付与する薬物送達システムを考えた。本研究では、bFGFとCBDからなる融合タンパク質（Collagen binding bFGF : CB-bFGF）を精製し、そのコラーゲン結合活性と細胞増殖活性を確認した。また、コラーゲンシート（collagen sheet : CS）中における滞留性を蛍光イメージングで評価した。さらに、ラットの水平性骨欠損モデルを作製して、CB-bFGFとコラーゲン粉末（collagen powder : CP）を填入し、その有効性を放射線学的、組織学的、免疫組織化学的に評価した（岡山大学動物実験委員会承認番号：OKU-2017054）。対照群は、非填入群（Control）、PBS/CP群、bFGF/CP群であった。得られた結果は以下の通りである。

- 1) CB-bFGFの細胞増殖活性：歯根膜細胞に対する細胞増殖活性は、bFGFと同程度であった。
- 2) CB-bFGFのコラーゲン結合活性：CB-bFGFのCPに対する結合活性を確認した。
- 3) CB-bFGFのCS中における滞留性：CB-bFGFでは、実験開始後14日間蛍光反応が検出され、bFGFと比較してコラーゲン基剤中に長期に滞留していることが示された。
- 4) CB-bFGFの水平性骨欠損に対する歯周組織再生療法における有効性：micro CT画像の解析結果から、CB-bFGF/CP群は、対照群と比較して、術後8週において骨量と骨塩量を有意に増加させた。Hematoxylin-Eosin (H-E)染色の結果から、CB-bFGF/CP群は、対照群と比較して、術後8週において歯槽骨表面積を有意に増加させた。Azan染色の結果から、CB-bFGF/CP群は、Control群と比較して、術後4週において有意に上皮組織長を減少させた。抗osteocalcin抗体、抗proliferating cell nuclear antigen抗体、そして抗osteopontin抗体を用いた免疫組織化学染色の結果から、CB-bFGF/CP群は、対照群と比較して、術後4週において陽性細胞数を増加させた。それぞれの陽性細胞は、術後4週において新生歯槽骨表面および周囲の結合組織中で顕著に観察された。

以上のことから、CB-bFGFは、コラーゲン基剤中に滞留し徐放されることで、bFGFと比較して水平性骨欠損における歯周組織再生を促進することが示唆された。

本研究では、これまでbFGFでは歯周組織再生療法が困難であると考えられてきた水平性骨欠損に対して、CB-bFGFの特徴である局所滞留性を利用することで、その有効性を報告している。本研究によって得られた結果は、歯周組織再生療法の適応症の拡大の可能性を示唆するものであり、今後の歯科医療の発展に大いに貢献するものである。

よって、本審査委員会は、本申請論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。