

論 文 内 容 要 旨

| | | | | |
|---|--|---------|-----|-------|
| 受 付 番 号 | (甲) 乙 | 第 430 号 | 氏 名 | 近藤 雄三 |
| 論文審査委員 | (主 査) 朝日大学歯学部 教授 永原 國央 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 近藤 信夫 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 永山 元彦 | | | |
| 論 文 題 目 | 炭酸含有アパタイトによる骨芽細胞増殖分化の特性解析 | | | |
| <p>(論文内容の要旨)</p> <p>【目的】</p> <p>歯科インプラント治療では、骨量の不足した症例に対してしばしばメンブレンを用いた GBR 法による骨増生術が施されるが、さらに多くの骨増生を必要とする症例では、骨補填剤が適用される。骨増生のための移植材料としては自家骨移植が最も信頼性の高い手法であるが、移植に伴う骨採取には健常部位への手術侵襲が必要なことから、患者の負担は大きく時には受け入れられない場合もある。このため人工骨補填材料として、水酸化アパタイト(HA)と、β-リン酸三カルシウム(β-TCP)が臨床応用されているが、これらについては吸収性など生体親和性に関する様々な問題が指摘されている。この様な背景から、炭酸含有アパタイト(CA)が Doi らによって開発され、700 °Cで焼結したCAは骨と同等の炭酸を含有しており、弱酸性溶液中で骨と同程度の溶解性を示した。またCAはラット頭蓋骨欠損モデルにおいて骨伝導能を有することが示されているが、その生体親和性や生理活性に関する細胞生物学的な検討は十分になされていない。そこで本研究では、ラット頭蓋冠由来骨芽細胞培養系を用いて、CA が増殖や分化に及ぼす影響を観察して HA や β-TCP など既存の人工骨補填材との間で比較し、その生理活性を支持するシグナル伝達経路について検討した。さらに、ラット大腿骨骨欠損モデルを用いて、これらの人工骨補填材に対する組織の反応性について比較検討した。</p> <p>【材料および方法】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ラット頭蓋冠由来骨芽細胞の採取と培養： 朝日大学歯学部動物実験倫理委員会の承認(14-024号)を得た後、胎生20.5日のWistar/STラット頭蓋冠より骨芽細胞(rOB)を採取した。 2. 各種実験材料の合成および焼結： Doi らの方法に従ってCA, HAおよびβ-TCPを合成した。CAは700 °Cで焼結した後粉碎して、38~74 μmに整粒した。 3. 骨補填材上でのrOBの接着、増殖評価： 整粒した骨補填材を4mg/cm²でコーティングした培養プレート、または無コーティングの培養プレートをコントロール(NC)とし、rOBをDMEM培地に播種培養し、6時間で接着した細胞数を評価し、72時間で増殖した細胞を計測した。 | | | | |

4. 骨補填材上での rOB の分化評価： 3 種の骨補填材上, あるいは NC に rOB を播種し, 7 日間 DMEM 培地で分化誘導を行わずに培養した後, ALP 染色, アリザリンレッド染色を行い観察をした。さらに, 同様に培養した rOB の ALP 活性を測定した。
5. ウェスタンブロット解析： 播種後 12 時間の rOB よりタンパク試料を抽出し, リン酸化 ERK1/2, リン酸化 p38, リン酸化 JNK を検出した。
6. p38MAPK 阻害剤存在下での rOB の動態評価： 3 種の骨補填材上, p38MAPK 阻害剤存在下で rOB を培養し, 細胞接着, 増殖, ALP 活性, 石灰化について検討した。
7. ラット骨欠損モデルを用いた組織学的検討： 12 週齢雄性 Wistar/ST ラット 12 匹を 4 群に分け, 大腿骨骨頭付近に直径 2.4 mm 深さ 2 mm の骨欠損を作製し, 対照群 (NC), CA 填入群, HA 填入群, β -TCP 填入群とした。それぞれを術後 3 週間で屠殺し, 術部のパラフィン包埋切片を作製し, HE 染色を行って組織の応答を検討した。
8. 蛍光免疫染色： 骨芽細胞のマーカーの 1 つであるオステリックスとリン酸化 p38MAPK の局在を検討するため, 両者の蛍光免疫二重染色を行った。

【結果】

CA 上での rOB の接着と増殖は NC と同等であったが, HA, β -TCP は rOB の接着と増殖を阻害した。rOB の分化の検討では, CA 上に rOB は有意に高い ALP 活性を示し, ALP 染色性では CA, HA により多数の ALP 活性陽性細胞が観察された。さらに石灰化度の比較では, ALP 活性と正の相関を示した。ウェスタンブロット解析では, CA 上の rOB で p38MAPK のリン酸化が顕著であった。そこで p38MAPK 阻害剤存在下での rOB の接着, 増殖, 分化を検討したところ, 接着と増殖は骨補填材の種類, 有無にかかわらず, 有意な差は認められなかったが, ALP 活性では特に CA 上の rOB における ALP 活性が他の実験群と比較して著しく低下した。石灰化でも CA における染色性が顕著に低下した。ラット大腿骨骨欠損モデルを用いた組織学的な検討から, CA および HA を欠損部に填入した群で新生骨の形成が顕著であった。蛍光免疫染色の結果から, CA を填入した組織では, 新生骨と顆粒の間にオステリックス, リン酸化 p38 が共に陽性の細胞が多数認められた。

【考察】

CA は rOB の接着, 増殖を阻害せず, HA, β -TCP と比較して有意に rOB の分化を促進した。また, CA 上で培養した rOB では, p38MAPK のリン酸化が顕著であり, この経路を阻害すると CA の ALP 活性, 石灰化促進能が著しく阻害された。また, ラット骨欠損モデルで組織の応答を検討した結果, CA 填入群でオステリックス, リン酸化 p38 共に陽性細胞が顆粒と新生骨周囲に多数認められたことから, CA の rOB 分化促進能には p38MAPK 経路が関与していると考えられた。

【結論】

CA は, 既存の骨補填材である HA や β -TCP と比較して, rOB の親和性と分化促進に優れた材料であり, CA 単体での骨補填材としての応用のみならず, 細胞移植を併用した骨再生療法においてもその有用性が確認された。さらに, これらの CA による rOB に対する刺激は p38MAPK を介した反応であることが判明したことにより, 臨床的応用への有用性もより具体的に示された。

