

学位論文題名

Effect of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and bone morphogenetic protein-2 application to demineralized dentin on early periodontal ligament cell response

(脱灰処理した歯根表面に rhPDGF-BB, rhBMP-2 を
応用した場合の歯根膜細胞の初期反応に対する効果)

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯周組織の再生は歯周治療の大きな目標である。現在、歯周組織再生に成長因子を応用することが検討されており、とくにPDGF-BBとBMP-2が着目されている。PDGF-BBは歯根膜細胞の走化性や分裂を促進し、BMP-2は歯槽骨やセメント質、結合組織性付着を増加させるとされている。また、PDGF-BBとBMP-2はコラーゲン基質に結合することから、歯根象牙質表面を脱灰することは、コラーゲン基質を露出させて表面積が増加し、生理活性物質を今表面に付着させるのに有利になると考えられる。歯根表面に付着させた生理活性物質は、細胞の付着や走化性、増殖、分化、基質合成などを増強できる可能性があり、PDGF-BBとBMP-2を脱灰した根面に用いることは、歯周組織再生に有効に働く可能性が考えられる。

一方、根面の脱灰には従来酸性脱灰液が用いられてきたが、酸性脱灰液は露出したコラーゲンや周囲歯周組織を変性、壊死させることが報告されている。これに対してEDTAは中性で作用するため、周囲歯周組織に損傷を与えることなく、コラーゲン基質を露出させて細胞の付着や遊走を促進する可能性があると思われる。そこで本研究の目的は、EDTAで脱灰した象牙質面にrhPDGF-BBとrhBMP-2を応用した場合に、歯根膜細胞の増殖やアルカリ性フォスファターゼ活性に効果があるかを検討することである。

【材料と方法】

(1) ヒト歯根膜細胞(HPLC)の培養

歯根膜細胞は13歳女性の矯正で便宜抜歯した左下第一小臼歯から培養した細胞を用いた。培養は10% FBS, 抗生物質 (Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml)を添加したDulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)で、37℃、95% air、5% CO₂の条件下で行い、3継代した細胞をアルカリ性フォスファター

ゼ活性と総蛋白量の定量に供し、4継代した細胞を付着細胞椎の計測に使用した。

(2) ヒト象牙質ブロックの作製

歯周炎で抜歯したヒトの歯から、歯周治療の既往がなく根の2/3以上付着を喪失している50本を選んだ。抜去歯の根中央部1/3から、歯根膜、セメント質を除去し、1×3×4mmの大きさの象牙質ブロックを作製した。24%EDTA (pH7.02) で3分間脱灰、水洗した後、1000 U/ml penicillin, 1000 µg/ml streptomycin に一晚浸漬した。

(3) rhPDGF-BBとrhBMP-2溶液の調整

rhPDGF-BBは0.5 µg/ml と1 µg/ml、rhBMP-2は1 µg/ml と3 µg/ml の濃度に0.1%FBS、100U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin含有のMEMを用いて希釈した。

(4) アルカリ性フォスファターゼ活性と総蛋白量の計測

120個の象牙質ブロックを24個づつ次の5群に分け、それぞれの溶液に浸漬した。対照群は0.1%FBS含有MEMに、PDGF0.5群は0.5 µg/ml のrhPDGF-BBに、PDGF1群は1 µg/ml のrhPDGF-BBに、BMP1群は1 µg/ml のrhBMP-2に、BMP3群は3 µg/ml のrhBMP-2に浸漬した。10分後ブロックを取り出し乾燥した後、24well培養dishに静置し、HPLCを 4.8×10^5 cell/mlの密度に調整して1.5mlを播種し37℃、5%CO₂で培養を行った。2、4、7日後に各群8個づつの象牙質ブロックを取り出し、象牙質ブロック上に付着増殖した歯根膜細胞のアルカリ性フォスファターゼ(ALP)活性を、Besseyらの方法を改変して行った。さらに、ALP活性測定後に総蛋白量をLowryらの方法を用いて計測した。

(5) 付着増殖したHPLC数の計測

54個の象牙質ブロックを各群18個づつ次の3群に分け、次の溶液に浸漬した。対照群は0.1%FBS含有MEM、PDGF1群は1 µg/ml のrhPDGF-BBに、BMP3群は3 µg/ml のrhBMP-2に浸漬した。10分後ブロックを取り出して乾燥し、24well培養dishに静置し、HPLCを 5×10^5 cell/mlの密度に調整して1.5ml播種し、37℃、5%CO₂で培養を行った。2、4、7日後に各群8個づつの象牙質ブロックを取り出し、ギムザ染色を行って象牙質ブロック上に付着増殖した歯根膜細胞を光顕下で計測した。

【結果】

(1) 総蛋白量

HPLCの総蛋白量は、PDGF0.5群と1群が、培養2、4、7日目に対照群、両BMP群より有意に高い値を示した。PDGF0.5群と1群の間には有意差はなかった。BMP群1群と3群は7日目までほぼ同様の値を示し、対照群と有意差はなかった。

(2) ALP活性

2日目のALP活性は、BMP1群が対照群に比べて有意に高い値になり、BMP3群も対照群や両PDGF群に比べて有意に高い値を示した。BMP3群と1群を比較するとBMP3群が高かった。両PDGF群は対照群より高かったが有意差はなかった。

4 日目は、BMP1群と3群は対照群と両BMP群に比べて有意に高い値になった。一方、PDGF0.5群は対照群とほぼ同様の値を示し、PDGF1群は対照群より低い値であった。

7 日目は、BMP3群は高い値を維持していたが、BMP1群はやや低下した。両PDGF0.5群と1群は対照群より低い値であった。

(3) 付着HPLC数

対照群の付着細胞数は時間の経過とともにわずかな増加が見られた。PDGF1群は実験期間を通して対照群やBMP3群に比べて有意に高い細胞数であった。BMP3群は対照群とほぼ同様でほとんど増加が見られなかった。

【考察および結論】

近年rhPDGF-BBやrhBMP-2を応用することにより歯周組織を再生する研究が行われている。しかし、PDGF-BBやBMP-2のHPLCに対する効果や、適切な担体、濃度などは十分に明確にされてはいない。PDGF-BBやBMP-2を用いるには一般に担体を必要とするが、担体は細胞間の相互作用を阻害したり、初期の細胞の集合や線維の発達を阻害する可能性があり、さらに炎症や免疫反応を起こす可能性もある。また、担体が必要な形態を維持することが困難な場合には、歯周治療への応用が制限される場合もある。そこで、担体を用いずにEDTAで脱灰して露出した歯根象牙質表面にPDGF-BBやBMP-2を応用し、歯根膜細胞を播種して培養し、歯根表面に付着した細胞の増殖やALP活性を評価した。

本研究の結果、PDGF-BBを使用した群の総蛋白量を付着細胞数は、実験期間中を通して対照群より有意に高い値を示した。これらの結果から、EDTAで脱灰した象牙質面はPDGF-BBを結合させた後、徐々に放出して、歯根表面のHPLCの増殖を促進すると考えられる。したがってPDGF-BBを根面に応用することは、歯根膜細胞の根面への付着増殖を促し歯周組織再生に役立つと思われる。しかし、ALP活性はむしろ低下したことから、細胞の増殖は亢進させるが骨原生細胞への分化を阻害すると思われる。

一方、BMP-2を用いた群はHPLCの増殖活性は生じなかったが、ALP活性が高まった。これらの結果からBMP-2を脱灰根面に応用することは、根表面に早期に石灰化物の形成を促進するのに有効であると思われ、これは歯周組織の再生を促進することに効果的であると思われた。しかし、両BMP群ともALP活性を7日間上昇し続けることはなかったことから、長期間HPLCに効果を与えるには、さらに高濃度のBMPを用いることや他の処理法との併用も考慮する必要があると思われる。

本研究の結果は、rhPDGF-BBやrhBMP-2をEDTAで脱灰した根面に応用することにより、歯根膜細胞の増殖や文化を促進することが可能であることを示している。この方法は臨床応用が比較的簡単であり、PDGF-BBやBMP-2を臨床応用するのに、従来必要とされた担体を使用せずに歯根表面をdelivery systemとして用いることができる可能性を示しており、さらに他の再生療法との組み合わせも可能であることから、歯周組織の再生をより向上させるのに役立つと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 熙

副 査 教 授 久保木 芳 徳

副 査 教 授 向 後 隆 男

学 位 論 文 題 名

Effect of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and bone morphogenetic protein-2 application to demineralized dentin on early periodontal ligament cell response

(脱灰処理した歯根表面に rhPDGF-BB, rhBMP-2 を
応用した場合の歯根膜細胞の初期反応に対する効果)

審査は主査、副査全員が一同に会して口頭で行った。はじめに申請者に対し本論文の要旨の説明を求めたところ、以下の内容について論述した。

現在、歯周組織再生に様々な成長因子を応用することが検討され、とくに、rhPDGF-BBとrhBMP-2は担体を用いて生体内に移植すると、細胞の走化性や分裂を促進したり石灰化能を向上させる作用があり着目されている。rhPDGF-BBとrhBMP-2はコラーゲン基質に結合するため、担体を用いずに歯根象牙質表面を脱灰してコラーゲン基質を露出させることにより付着しやすくなり、歯周組織再生に有効に働く可能性が考えられる。そこで本研究の目的は、脱灰した象牙質面にrhPDGF-BBとrhBMP-2を応用した場合に、歯根膜細胞の増殖やアルカリ性フォスファターゼ(ALP)活性にどのような影響を与えるかを検討することである。

【材料と方法】

(1) 象牙質面に付着増殖したHPLCの総蛋白量とALP活性の計測
歯周炎で抜歯したヒトの歯根から4×3×1mmの大きさの象牙質ブロック

を作製し、24%EDTAで脱灰した。これを 5 群に分け0.5 μ g/mlと1 μ g/mlのrhPDGF-BB、1 μ g/mlと3 μ g/mlのrhBMP-2、成長因子を含有しないMEMの溶液に浸漬した。10分後ブロックを取り出して乾燥し、矯正で便宜抜歯した上顎第一小臼歯の歯根から採取した歯根膜からoutgrowth法により得た細胞を、4継代培養したヒト歯根膜細胞(HPLC)を4.8 $\times$ 10⁵cell/mlの密度に調整して1.5ml播種した。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で2、4、7日間培養後、象牙質ブロック上に付着増殖した歯根膜細胞のALP活性を、Besseyらの方法を改変して計測した。さらに、総蛋白量をLowryらの方法を用いて計測した。

(2) 象牙質面に付着増殖したHPLC数の計測

(1)と同様の方法で作製した象牙質ブロックを3群に分け、1 μ g/mlのrhPDGF-BB、3 μ g/mlのrhBMP-2、成長因子を含有しないMEMの溶液に浸漬した。10分後ブロックを取り出して乾燥し、HPLCを4.8 $\times$ 10⁵cell/mlの密度に調整して1.5ml播種した。培養2、4、7日後に各群8個ずつの象牙質ブロックを取り出し、ギムザ染色を行って象牙質ブロック上に付着増殖した歯根膜細胞数を光顕下で計測した。

【結果】

(1) 総蛋白量とALP活性

HPLCの総蛋白量は、rhPDGF-BBに浸漬した2群が培養2、4、7日目に他の3群より有意に高い値を示した。しかしrhPDGF-BBの濃度による差はなかった。

ALP活性は、rhBMP-2に浸漬した2群が他の3群に比べて2日目から有意に高い値になった。rhBMP-2の濃度による比較では、3 μ g/mlのrhBMP-2に浸漬した群は7日目まで高いALP活性を維持したのに対し、1 μ g/mlのrhBMP-2に浸漬した群は7日目には低下した。

(2) 付着増殖したHPLC数の計測

付着細胞数は、rhPDGF-BBに浸漬した2群は実験期間を通して他の3群に比べて有意に高い値を示した。rhPDGF-BBに浸漬した2群は成長因子に浸漬しなかった群とほぼ同様で、ほとんど増加が見られなかった。

【考察および結論】

EDTAで脱灰した後にrhPDGF-BBやrhBMP-2を浸漬させた歯根象牙質上

で歯根膜細胞を培養し、根表面に付着増殖した細胞のALP活性を検討した結果、rhPDGF-BBを使用した群では総蛋白量と付着細胞数が対照群より有意に高い値を示した。このことは、EDTAで脱灰した象牙質面にはrhPDGF-BBが付着し、徐々に放出して根表面にHPLCの増殖を促進したと考えられた。一方、rhBMP-2を用いた群では、HPLCの増殖はみられなかったがALP活性が高まった。このことから、rhBMP-2を脱灰根面に用いることは、根表面に存在するHPLCに作用して早期に石灰化物の形成を促進するのに有効であると思われる。根面を脱灰してrhPDGF-BBやrhBMP-2を付着させる方法により、歯根膜細胞の増殖能や石灰化能が高まったことは、従来必要とされた担体を使用せずに歯根表面をdelivery systemとして用いることができる可能性があることを示しており、さらに他の再生療法との組み合わせも可能であることから、歯周組織の再生をより高度化させるのに役立つと考えられる。

引き続き審査担当者と申請者のあいだで、論文内容および関連事項について質疑応答がなされたが、いずれの質問にも明快な回答が得られた。本研究は、象牙質の表面にrhPDGF-BBやrhBMP-2を応用することにより、歯根膜細胞のALP活性と付着細胞数におよぼす影響について詳細に検討し、脱灰象牙質面にrhPDGF-BBやrhBMP-2を作用させると、歯根膜細胞の増殖や石灰化能が向上することから、歯周組織の再生療法に応用できる可能性が高いことを明らかにした点が高く評価された。本研究の内容は、歯科医学の発展に十分貢献するものであり、博士（歯学）の学位を授与するに価するものと認められた。