

Streptozotocin 誘発糖尿病が rhBMP - 2 による
骨形成に及ぼす影響
学位論文内容の要旨

【緒言】

食生活の高脂肪食化や運動不足など、いわゆるライフスタイルの変化に伴い、糖尿病患者はますます増加する傾向にある。糖尿病は、インスリン分泌不全やインスリンの作用不全などによる慢性の高血糖を主徴とし、これによる代謝異常の長期間にわたる持続は、種々の器官に影響を及ぼす。糖尿病と骨代謝異常との関連も検討され、糖尿病では、骨芽細胞の機能低下を主因とする低代謝回転型の骨減少症が起きていることが明らかになってきている。

口腔内に現れる症状としては、感染の危険性の増大、創傷治癒の遅延、歯周疾患などがあげ、とりわけ、歯周疾患については糖尿病の6番目の合併症とする報告も見られるほどその関係が重視され、様々な研究や調査が行われてきた。一般に、糖尿病患者では歯周病の罹患率が高く、歯周病の重症化傾向が見られ、特に、血糖コントロールが不良であると歯槽骨吸収がより高度に進行する傾向にあることが示唆されている。これらの原因には、感染防御の低下とともに、インスリン作用不足による骨芽細胞の機能低下、持続的高血糖が引き起こすタンパクの糖化によるコラーゲン代謝や骨代謝の変化、炎症性サイトカインの上昇や成長因子の減少が関与していると考えられる。

現在、歯槽骨の再生が期待できる治療の一つとして考えられているのが Bone Morphogenetic Protein (BMP)の応用である。BMPは外科的骨欠損や実験的歯周炎の組織再生、特に歯槽骨の再生治療に有効であることが報告されている。また、骨代謝が低下している高齢の動物においても有効であることが報告されている。

そこで本研究では、streptozotocin(STZ)誘発糖尿病状態において、BMP 投与による骨新生が有効であるかどうかを明らかにするために、STZ 誘発糖尿病ラットに rhBMP-2 を埋入して生じる骨新生を、正常ラットおよびインスリンを投与した STZ 誘発糖尿病ラットの場合と比較して、病理組織学的に検索した。

【材料と方法】

- ・ 実験動物および部位：Wister 系雄性ラットの口蓋部骨膜下口蓋溝
- ・ 移植材料：rhBMP-2 (4.0 μg)
 ポリ乳酸グルコール酸共重合体/ゼラチンスポンジ複合体 (PGS)
- ・ 実験群の分類：正常ラットに担体の PGS を移植した群を nonDM-PGS 群、PGS に rhBMP-2 を配合して移植した群を nonDM-BMP 群とした。同様に、糖尿病ラットを用いた DM-PGS 群、DM-BMP 群、糖尿病ラットにインスリンを投与した INS-DM-PGS 群、INS-DM-BMP 群に分類した。
- ・ 糖尿病の誘発およびインスリン投与：STZ (65mg/kg) を 0.1M クエン酸・クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) で溶解して生理食塩水で調整し、7 週齢の時点で投与。投与 2 日後から 2 週間持続して血糖値が平均 300mg/dl 以上のラットを糖尿病ラットとした。INS-DM-PGS 群、INS-DM-BMP 群では、STZ 投与 2 週間後にインスリンを連日腹腔内投与した。
- ・ 移植材の埋入および観察方法：10 週齢の時点でラットの口蓋粘膜を全層弁剥離し、口蓋部骨膜下口蓋溝に移植材を埋入した。観察期間は移植後 6 週間とした。期間終了後、通法に従い標本作製し、H・E 染色を行い、光学顕微鏡にて病理組織学的観察と組織学的計測を行った。組織学的計測は、既存骨と新生骨を区別するためのマーカーとして置いたナイロン線維より口腔側の骨を新生骨と判定した。

【結果】

実験期間中、すべての群で体重は増加傾向を示した。DM-PGS 群、DM-BMP 群、INS-DM-PGS 群、INS-DM-BMP 群では STZ 投与後に一旦、若干の体重減少が見られたが、その後、増加率は少ないが増加した。血糖値は、DM-PGS 群、DM-BMP 群、INS-DM-PGS 群、INS-DM-BMP 群では STZ 投与 2 日後に 330mg/dl 以上の急激な血糖値の上昇が見られた。INS-DM-PGS 群、INS-DM-BMP 群ではインスリン投与後から経時的に血糖値の下降が見られ、13 週目以降には nonDM-PGS 群、nonDM-BMP 群と同程度となった。

新生骨の形成は、いずれの群においても既存骨とほとんど一体化して観察されたが、新生骨の厚さに違いが見られた。各群における骨新生厚さは nonDM-PGS 群 $146.55 \pm 40.29 \mu\text{m}$ 、nonDM-BMP 群 $324.32 \pm 131.00 \mu\text{m}$ 、DM-PGS 群 $47.67 \pm 49.70 \mu\text{m}$ 、DM-BMP 群 $224.74 \pm 103.50 \mu\text{m}$ 、INS-DM-PGS 群 $99.82 \pm 49.60 \mu\text{m}$ 、INS-DM-BMP 群 $275.24 \pm 71.06 \mu\text{m}$ であった。Mann-Whitney の *U* 検定でそれぞれの群を比較したところ、PGS を埋入した 3 群間では DM-PGS 群が有意に小さかった。rhBMP-2 を埋入した群と PGS を埋入した群を比較した場合、nonDM-BMP 群、DM-BMP 群、INS-DM-BMP 群は、それぞれ nonDM-PGS 群、DM-PGS 群、INS-DM-PGS 群より有意に大きかった。rhBMP-2 を埋入した 3 群間を比較した場合では有意差は見られなかった。

【考察】

インスリン投与群 (INS-DM-PGS 群、INS-DM-BMP 群) では、持続的な高血糖は改善され、多飲・多食および多尿や体重増加率の改善が見られた。13 週目以降には正常ラット (nonDM-PGS 群、nonDM-BMP 群) と同程度の血糖値を得ることができたので、血糖コントロールが良好に行われたと考えられた。

BMP を移植した nonDM-BMP 群、DM-BMP 群、INS-DM-BMP 群では多量の新生骨の形成が見られ、PGS のみを移植した nonDM-PGS 群、DM-PGS 群、INS-DM-PGS 群でも少量の新生骨が形成された。PGS のみを移植した 3 群間における骨新生厚さを比較すると、DM-PGS 群では nonDM-PGS 群および INS-DM-PGS 群に比べ有意に骨新生厚さが減少していた。このことは、これまでの論文で報告されているように、インスリン欠乏による高血糖状態によって骨形成が低下しているものと考えられ、本モデルが骨代謝に影響する糖尿病実験モデルとして、有効であったと考えられた。BMP を移植した nonDM-BMP 群、DM-BMP 群、INS-DM-BMP 群をそれぞれ、nonDM-PGS 群、DM-PGS 群、INS-DM-PGS 群の骨新生厚さと比較すると、BMP を移植したすべての群で有意に大きかった。また、BMP を移植した 3 群間における骨新生厚さの比較をすると有意差はなかった。このことは、BMP による骨新生の増加はインスリン欠乏による高血糖状態においても生じることを示している。

本研究の nonDM-BMP 群、DM-BMP 群、INS-DM-BMP 群では埋入した BMP による刺激で生じた新生骨以外に、ラットの成長や骨膜剥離による骨膜刺激によって生じた新生骨も含まれている。そこで、埋入した BMP に反応して形成された骨新生厚さを考える目安として、nonDM-BMP 群の平均値と nonDM-PGS 群の平均値の差、DM-BMP 群の平均値と DM-PGS 群の平均値の差および INS-DM-BMP 群の平均値と INS-DM-PGS 群の平均値の差を比較した。その結果、埋入した BMP により形成された骨新生厚さはほぼ同等の大きさとなった。これは、インスリン欠乏や高血糖状態の影響がほとんど無いことを示している。

BMP は未分化間葉系細胞を骨芽細胞へ分化させる強力なサイトカインであるが、その活性は細胞外、受容体、細胞内のレベルで制御されている。本実験の結果から、STZ 誘発糖尿病状態においても BMP による骨の増加作用が認められたため、高血糖状態においても BMP のレセプターへの結合は阻害されず、BMP とインスリンとの相互作用もないことが考えられる。骨の形成は主として骨芽細胞により調節されて、PTH、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 、エストロゲン、サイトカイン、成長因子などの調節因子の刺激を受け、基質タンパク質、成長因子およびサイトカインの産生・分泌、基質の石灰化の機能をその分化の段階に応じて果たしている。骨芽細胞は様々な因子の影響を受けていて、インスリン欠乏による高血糖状態では、前述の因子以外にも形質転換増殖因子- β (TGF- β)、線維芽細胞増殖因子- β

(FGF- β)などの骨の成長因子の低下が見られる。BMPも低下していることが考えられるが未だ明らかではない。本研究で、STZ誘発糖尿病状態が埋入したBMPによる骨新生厚さに影響を及ぼさなかった原因としては、高血糖状態やインスリン欠乏による骨芽細胞の機能低下を補う以上に、外因性BMPによる骨芽細胞の分化が高められたためと考えられる。

本研究では、STZ誘発糖尿病状態においてもrhBMP-2による歯槽骨の増大には有効であると考えられるが、臨床応用することを考えると、高血糖状態で歯周炎を惹起した状態において、BMPの歯根膜、セメント質および歯槽骨再生に対する影響を調べる必要があると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査 教授 川 浪 雅 光
副査 教授 向 後 隆 男
副査 教授 田 村 正 人

学位論文題名

Streptozotocin 誘発糖尿病が rhBMP - 2 による 骨形成に及ぼす影響

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て本論文の要旨を求めたところ、以下の内容について論述した。

糖尿病罹患患者では歯周病の罹患率が高く、歯周病の重症化傾向が見られる。特に血糖コントロールが不良である糖尿病患者では歯周組織が大きく破壊される傾向が見られる。この原因のひとつとして、インスリン作用不足による骨芽細胞の機能低下、骨代謝に関与するサイトカインの減少、持続的高血糖が引き起こすタンパクの糖化によるコラーゲン代謝や骨代謝の変化が関与しているためと考えられているが、このような状態下で rhBMP-2 が骨形成を誘導できるかどうかは不明である。

本研究の目的は、streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病ラットに骨誘導能を持つ rhBMP-2 を応用した場合の骨新生を観察し、正常ラットの場合と比較検討することである。

実験には Wister 系雄性ラット 54 匹を用いた。

担体はポリ乳酸グリコール酸共重合体/ゼラチンスポンジ複合体 (PGS) を用い、正常ラット、STZ 誘発糖尿病ラットおよびインスリンを投与した STZ 誘発糖尿病ラットの口蓋部骨膜下を実験部位 (N=54) として、PGS のみを埋入した群 (nonDM-PGS 群、DM-PGS 群、INS-DM-PGS 群)、rhBMP-2 配合 PGS を埋入した群 (nonDM-BMP 群、DM-BMP 群、INS-DM-BMP 群) に分けて実験を行った。6 週後に病理組織学的観察を行うとともに、新生骨の厚さを組織学的に計測した。

その結果、いずれの群においても既存骨とほとんど一体化して新生骨の形成が観察されたが、新生骨の厚さに違いが見られた。骨新生厚さを比較すると、PGSを埋入した3群間では、DM-PGS群が有意に小さかった。rhBMP-2を埋入した群とPGSを埋入した群を比較した場合、nonDM-BMP群、DM-BMP群、INS-DM-BMP群は、それぞれnonDM-PGS群、DM-PGS群、INS-DM-PGS群より有意に大きかった。rhBMP-2を埋入した3群間を比較した場合には有意差は見られなかった。

以上の結果から、STZ誘発糖尿病状態では創傷治癒時の骨新生は低下するが、rhBMP-2の骨新生増加作用は影響を受けず、既存骨と連続して新生骨を添加・増生させることが示唆された。

引き続き、審査担当者と申請者との間で、論文内容および関連事項について質疑応答が行われた。

主な質問事項は、

- (1) ラット口蓋部の解剖学的形態および術式について
- (2) 正常ラットと糖尿病ラットのosteoblastの形態や数の違いについて
- (3) 高血糖による影響について
- (4) rhBMP-2濃度について
- (5) rhBMP-2による骨の増加量や形態の違いについて
- (6) 長期的観察した場合の新生骨の変化について
- (7) rhBMP-2を用いた歯周組織再生（特に歯槽骨）について

などであった。

これらの質問に対し、申請者は適切な説明によって回答し、本研究の内容を中心とした専門分野はもとより、関連分野についても十分な理解と学識を有していることが確認された。

本研究は、STZ誘発糖尿病状態においても、rhBMP-2による骨新生増加作用は影響を受けず、新生骨を再生できる可能性があることを明確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）の学位を授与するのに値するものと認められた。