

学 位 論 文 題 名

顎骨欠損に対するポリリン酸の治癒促進効果

学位論文内容の要旨

緒言

腫瘍や嚢胞を外科的に摘出した際に生じる顎骨欠損は修復・再生に時間を要するだけでなく、本来備わっていた形態への復元が困難なことが多く、口腔の機能や審美性に重大な影響を及ぼすことが少なくない。そのため歯科・口腔外科領域においても、生体材料の埋入や分化誘導因子の応用により、骨組織をより効果的に再生させる方法が試みられている。

ポリリン酸は多数の正リン酸残基からなる直鎖状のポリマーで、広い範囲での生物の組織や細胞に存在するが、真核細胞での機能は不明な点が多い。これまでの研究において、ポリリン酸は線維芽細胞において FGF - 2 を安定化し、組織再生において重要な役割を演じているという報告や、MC3T3E-1 細胞において石灰化を促進するという報告がある。また、同様の細胞において *polyphosphatase* を活性化することによって、ポリリン酸自体が無機リン酸の供給源として石灰化に関与する可能性が示唆されている。これらの報告から、ポリリン酸の生体応用により、骨組織の分化、増殖、あるいは再生が促進する可能性が考えられる。

そこで本研究ではラットの上顎骨に大きな骨欠損を形成し、欠損内にポリリン酸を用いた実験モデルでの治癒経過について検討した。

材料と方法

試薬の調整法：平均鎖長 40 のポリリン酸に蒸留水とゼラチンを加え、ポリリン酸濃度が 100 mM で、2%あるいは4%のゼラチンを含んだポリリン酸ゲル（以下それぞれを、2%ゼラチン・ポリリン酸ゲル、4%ゼラチン・ポリリン酸ゲルとする）を調整した。また、ポリリン酸を含まない 2%あるいは 4%ゼラチンをコントロールゲル（以下それぞれを 2%ゼラチンゲル、4%ゼラチンゲルとする）として調整した。

骨欠損モデルの作製：96 匹の 4 週齢 Wistar 系雄ラットを、ポリリン酸ゲルを用いる実験群と、コントロールゲルを用いるコントロール群の 2 群に分けた。

ラットの右側上顎第一臼歯を抜歯し、その抜歯窩内に残存する根間中隔と上顎骨の一部を直径 2.5 mm のラウンドバーで骨削し、おおよそ長径 4 mm×短径 2.5 mm×深さ 2.5 mm の骨欠損を形成した。

ポリリン酸ゲルとコントロールゲルは、術直後の填入の際には骨欠損の形態にあわせやすく、かつその部位に留めやすいことから、4%ゼラチン・ポリリン酸ゲルあるいは 4%ゼラチンゲルを使用し、翌日から屠殺前日までは骨欠損部へのシリンジによる注入が行いやすいことから、2%ゼラチン・ポリリン酸ゲルあるいは 2%ゼラチンゲルを使用した。これによりポリリン酸は創部に留まり、確実に効果を及ぼしたものと思われた。

病理組織学的検索：両群とも、術後 1、3、5、7、10、14 日目にそれぞれ 3 匹ずつ屠殺し、骨欠損部の組織片を採取した。それらの sample は骨欠損部の矢状断面で連続切片を作製し、HE 染色を行い、病理組織像を観察した。

再生組織での遺伝子発現の検索：病理組織学的検索と同様の間隔でそれぞれ 5 匹ずつ屠殺し、骨欠損部の組織片を採取した。それらの sample から total RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。

希釈した cDNA を template とし、骨関連タンパクである Core binding factor alpha 1 (Cbfa1) と、ALPase の遺伝子発現について real-time PCR により、それぞれの mRNA 発現量を定量化した。

結果

病理組織学的検索結果：術後 3 日目の実験群では、コントロール群に比べ骨欠損底部の広範囲で幼弱な肉芽組織による置換がみられ、器質化が進行していた。

術後 5 日目の実験群では、コントロール群に比べ大型で成熟した骨芽細胞が骨欠損底部で密に増殖し、活発な骨新生像が認められた。

術後 7 日目の実験群では、コントロール群に比べ器質化が進行し、骨欠損底部から伸展した新生骨梁はより成熟していた。また、コントロール群の創部表層には、依然として炎症性細胞が残存していたのに対し、実験群の創部表層では上皮の伸展が認められた。

術後 10 日目以降、コントロール群でも骨欠損部の器質化が進行し、骨梁の伸展がみられたが、術後 14 日目の実験群では、コントロール群に比べその成熟度が高く、修復は促進していた。

定量 RT-PCR による mRNA 発現の検索結果：Cbfa1 mRNA 発現は術後 3 日目の両群において発現が亢進し、とくに実験群ではコントロール群に比べ約 2 倍の発現量を示し、術後 5 日目に両群の発現量はピークに到達した。

ALPase mRNA 発現は実験群では術後 5 日目まで、コントロール群では術後 7 日目まで発現量が増加し、とくに術後 3、5 日目では、実験群の発現量はコントロール群と比べそれぞれ約 1.7 倍と 1.6 倍であり、術後 5 日目では、有意に多い発現量を示した。術後 7 日目では、コントロール群の発現量は実験群と比べ約 2 倍であり、有意に多い発現量を示した。

考察

Cbfa1 は間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を決定する主要な転写因子であることが知られている。これまでに Cbfa1 ノックアウトマウス、トランスジェニックマウスの研究によって、Cbfa1 は骨芽細胞の分化過程において早期分化を促進し、後期分化を抑制することが明らかにされており、in vitro で Cbfa1 を強制発現された培養細胞は ALPase、osteopontin、osteocalcin 等の発現を誘導することが知られている。成人では、骨芽細胞系列での Cbfa1 の発現は低く保たれており、骨芽細胞分化はゆっくりと生じているが、いったん骨折等の刺激が加わると、Cbfa1 の発現が強く誘導され、骨芽細胞が一気に増加すると考えられている。

術後 5 日目で認められた実験群骨欠損底部における密集した大型で成熟した骨芽細胞の出現と活発な骨新生は、術後 3 日目での Cbfa1 の mRNA 高発現によって間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化が促進された結果と考えられ、顎骨の大きな骨欠損においても、ポリリン酸が Cbfa1 の発現亢進を介して早期に間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化させる機能を発揮したことを示唆するものと考えられた。

術後 5 日目以降も、実験群ではコントロール群に比べて、活発な骨新生と骨梁の成熟が認められた。このような形態的所見は、実験群における術後 5 日目での ALPase mRNA の有意な発現亢進と関連しているものと思われる。ALPase は細胞膜に存在する糖タンパクであり、骨型 ALPase の発現は活動的な骨芽細胞において多くみられ、石灰化局所において、有機リン酸エステルを分解し、無機リン酸塩濃度を高めることや、ハイドロキシアパタイト結晶の形成を阻害するピロリン酸を分解することによって、石灰化をうながし、骨形成を促進していると考えられている。また、ALPase は骨形成過程において石灰化初期の骨芽細胞の分化の指標とされており、実験群での ALPase mRNA の発現量が、術後 5 日目までの骨再生の早い段階でピークに到達したことは、in vitro での培養細胞系の分化マーカーに関する報告と矛盾せず、このような mRNA の発現亢進は病理組織学的にみられた骨再生の促進と関連しているものと考えられた。

実験群とコントロール群とにおける創傷治癒と骨再生の違いは術後 14 日目まで観察され、ポリリン酸が骨再生において創傷治癒の時間的短縮に寄与していることが示唆された。

結語

ラットの上顎骨欠損実験モデルを作製し、骨欠損部にポリリン酸を用いることによる創傷治癒、骨組織再生への効果を検索し以下の結果を得た。

1. 病理組織学的に、ポリリン酸を用いた実験群では顎骨欠損に対して治癒の促進効果がみられた。
2. 実験群では、術後早期に *Cbfa1*、ALPase mRNA の発現亢進が認められ、組織学的検索結果と一致していた。
3. これらの所見は、ポリリン酸は顎骨に生じた大きな欠損に対しても活発な骨新生を誘導し、骨再生にとって有益な材料となる可能性があることを示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則

副 査 教 授 進 藤 正 信

副 査 教 授 北 川 善 政

学 位 論 文 題 名

顎骨欠損に対するポリリン酸の治癒促進効果

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。

本研究は、骨欠損の創傷治癒ならびに骨組織再生におけるポリリン酸の効果を明らかにする目的で、ラットの上顎骨に形成した大きな骨欠損にポリリン酸を填入し、治癒経過を病理組織学的に観察するとともに、骨関連タンパクの遺伝子発現との関連について検討したものである。

平均鎖長 40 のポリリン酸に蒸留水とゼラチンを加え、ポリリン酸濃度が 100 mM で、2% および 4% のゼラチンを含んだポリリン酸ゲルを調整した。また、コントロールとして、ポリリン酸を含まない 2% および 4% ゼラチンゲルを調整した。4 週齢 Wistar 系雄ラット 96 匹を、ポリリン酸ゲルを用いる実験群と、コントロールゲルを用いるコントロール群の 2 群に分けた。ラットの右側上顎第一臼歯を抜歯し、抜歯窩周囲の骨をラウンドバーで骨削し、長径 4 mm×短径 2.5 mm×深さ 2.5 mm の骨欠損を形成した。術直後は、骨欠損内に 4% ポリリン酸ゲルないし 4% ゼラチンゲルを填入し、翌日から屠殺前日まではシリンジを用いて 2% ポリリン酸ゲルないし 2% ゼラチンゲルを填入した。術後 1、3、5、7、10、14 日目にそれぞれ 3 匹ずつ屠殺し、骨欠損部の組織片を採取した。それらは骨欠損部の矢状断面で連続切片を作製し、HE 染色を行い、病理組織像を観察した。同様の間隔でそれぞれ 5 匹ずつ屠殺し、骨欠損部の組織片を採取した。それらの sample から total RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。希釈した cDNA を template とし、骨関連タンパクである Core binding factor alpha 1 (Cbfa1) と、ALPase の遺伝子発現について real-time PCR 法を用いて検索し、またそれぞれの mRNA 発現量を定量化して解析した。

実験群では、術後 3 日目に、骨欠損底部の広い範囲で幼弱な肉芽組織による置換がみられ、器質化が進行していた。術後 5 日目には、大型で成熟した骨芽細胞が骨欠損底部で密に増殖し、活発な骨新生像が認められ、術後 7 日目では、器質化が進行し、骨欠損底部から伸展した新生骨梁の成熟がみられた。また、創部表層では上皮の伸展が認められた。

術後 10 日目以降は、コントロール群でも、骨欠損部の器質化が進行し、骨梁の伸展がみられたが、実験群では、その成熟度が高く、修復が促進していた。Cbfal mRNA 発現は、術後 3 日目において両群で発現が亢進し、とくに実験群ではコントロール群の約 2 倍の発現量を示した。また、両群で術後 5 日目に発現量がピークに到達した。ALPase mRNA 発現は、実験群では術後 5 日目まで、コントロール群では術後 7 日目まで発現量が増加し、術後 3 日目と 5 日目では、実験群の発現量はコントロール群に比べてそれぞれ約 1.7 倍と 1.6 倍と高く、術後 5 日目では、有意に多い発現量を示した。逆に、術後 7 日目では、コントロール群の発現量が実験群の約 2 倍と、有意に多い発現量を示した。

術後 5 日目に大型で成熟した骨芽細胞が密集して出現し活発な骨新生がみられたことは、術後 3 日目での Cbfal の mRNA 高発現によって間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化が促進された結果と考えられ、顎骨の大きな骨欠損においても、ポリリン酸が Cbfal の発現亢進を介して早期に間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化させることを示唆するものと考えられた。その後も、実験群ではコントロール群に比べて、活発な骨新生と骨梁の成熟が認められた。このような形態的所見は、実験群における術後 5 日目での ALPase mRNA の有意な発現亢進と関連しているものと思われる。ALPase は骨形成過程において石灰化初期の骨芽細胞の分化の指標とされており、実験群での ALPase mRNA の発現量が、術後 5 日目までの骨再生の早い段階でピークに到達したことは、in vitro での培養細胞系の分化マーカーに関する報告と合致している。実験群とコントロール群とにおける創傷治癒と骨再生の違いは術後 14 日目まで観察され、ポリリン酸が骨再生において創傷治癒の時間的短縮に寄与していることが示唆された。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。これらの質問に対して、申請者から適切かつ明快な回答が得られ、研究の立案と実行、結果の収集とその評価について十分な能力のあることが確認された。また本研究に必要な定量 RT-PCR 解析に関する知識と技術を含め、関連分野に対して幅広い知識を有していることが認められ、本研究をもとにして、今後さらに研究を発展させていく可能性が高いと判断された。本研究において、ポリリン酸は顎骨に生じた大きな欠損に対して骨新生を活発に誘導することを明らかにし、骨再生にとって有益な材料となる可能性があることを示唆したことが高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。