

BMP-2 処理した象牙質表面における セメント質様硬組織形成のビスフォスフォネートによる抑制

学位論文内容の要旨

緒言

近年、様々な成長因子を歯周組織再生療法に応用する研究が行われている。特に Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) は骨芽細胞に対する強力な分化誘導作用や骨誘導能を有することが明らかになっており、歯槽骨の再生への有効性が報告されている。Miyaji ら、天雲らは BMP-2 で処理した象牙質片をラット結合組織に移植し、象牙質上にセメント質様硬組織が形成され、この硬組織の形成には象牙質面の吸収を伴わずにセメント質様硬組織が形成される場合と、象牙質の吸収窩にセメント質様硬組織が形成される場合があることを報告している。

一般に、骨組織では破骨細胞と骨芽細胞のカップリング現象によってリモデリングが行われていることが知られている。BMP-2 は骨芽細胞の分化誘導だけでなく、破骨細胞の発現を活性化し、破骨細胞前駆細胞に直接作用して破骨細胞の吸収能を活性化させることが報告されている。また、BMP-2 による破骨細胞の発現と吸収能は、濃度依存的、経時的に活性化することも報告されている。したがって BMP-2 による硬組織形成は、骨芽細胞の分化誘導を直接的に引き起こすだけでなく、破骨細胞と骨芽細胞が関与したカップリングによるリモデリングも重要な因子となっている可能性が考えられ、これを解明することは BMP-2 を用いた再生療法を発展させるために重要と考えられる。

ビスフォスフォネートは、一般に分化した破骨細胞に取り込まれて不活性化することで破骨細胞の機能を抑制し、骨吸収抑制作用を発揮することが明らかになっている。したがって、ビスフォスフォネートで破骨細胞を抑制することにより、BMP-2 による硬組織形成における破骨細胞の関与を明らかにできると思われる。

本研究の目的は、ラットにビスフォスフォネートを投与して破骨細胞の機能を抑制し、BMP-2 処理した象牙質表面におけるセメント質様硬組織形成や象牙質吸収がどのような影響を受けるかを組織学的に評価することである。

材料と方法

1) 試験片の作製

Wistar 系雄性ラットより採取した切歯を、エナメル質、セメント質を除去し、歯根中央部付近の象牙質から砥石を用いて $1 \times 1 \times 0.3 \text{ mm}$ の大きさに 180 個を作製した。作製した象牙質片は 24% EDTA (pH 7.0) で 3 分間脱灰処理した後、数回洗浄した。その後、象牙質片を洗浄し、0, 100 および 400 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に調製したリコンビナントヒト BMP-2 (アステラス製薬株式会社、東京) 溶液に 10 分間浸漬処理した。

2) ビスフォスフォネートの調整と投与方法

10週齢の Wistar 系雄性ラットを実験群 90 匹と対照群 90 匹に分け、実験群には手術2週間前よりビスフォスフォネート(インカドロネート, $1\mu\text{g/kg/day}$, アステラス製薬株式会社, 東京)を1週間に3回の頻度で観察期間終了まで腹腔内投与を継続して行い、対照群は生理食塩水を同様に腹腔内投与した。

3) 象牙質片の埋植手術方法

全身麻酔下で口蓋粘膜を部分層弁で剥離し、口蓋部結合組織内に BMP-2 処理した各象牙質片を移植して縫合した。

4) 病理組織学的観察と組織学的計測

2,4,8 週の観察期間終了後に、移植象牙質片と周辺組織を1塊として摘出し、通法に従いパラフィン包埋を行った。その後、前頭面断で厚さ $5\mu\text{m}$ の連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン重染色と酒石酸耐性フォスファターゼ (TRAP) 染色および、オステオカルシン免疫染色を行い、光学顕微鏡下にて組織学的観察を行った。オステオカルシン免疫染色は、ヒストファイン SAB-PO(M)キット(ニチレイ, 東京)を用いて行った。

組織学的計測には連続切片中央部の標本とその前後 $200\mu\text{m}$ 離れた標本の3枚を選択し、象牙質吸収率、総硬組織形成率、吸収形成率、非吸収形成率、吸収面に対する吸収形成率、非吸収面に対する非吸収形成率、TRAP 陽性細胞数を計測した。

各測定値の統計学的分析には、Mann-Whitney の U 検定を用いた。

結果

1) 組織学的観察結果

BMP-2 濃度 $0\mu\text{g/ml}$ ではすべての観察期間で実験群、対照群とも象牙質上への硬組織形成はなく、象牙質表面の吸収はきわめて表在性でその量もわずかであった。一方、BMP-2 濃度 100, $400\mu\text{g/ml}$ では、対照群において象牙質表面の吸収は経時的に進行し、4,8 週では一部の吸収面に有細胞性のセメント質様硬組織の形成が見られ、周囲には骨芽細胞様細胞、破骨細胞様細胞が観察された。実験群では吸収面へのセメント質様硬組織の形成は少なく、骨芽細胞様細胞もわずかであった。象牙質非吸収面への硬組織形成は両群とも同様に観察された。

2) 組織学的計測結果

象牙質吸収率は BMP-2 濃度 $0\mu\text{g/ml}$ では 4, 8 週後の実験群で 4~5%であり、対照群が 7~8%で実験群が有意に低く($P<0.01$)、BMP-2 濃度 $100\mu\text{g/ml}$ では 2, 4, 8 週後に対照群が 15~20%なのに対し、実験群は 5~10%で、 $400\mu\text{g/ml}$ では 4, 8 週後に対照群が 33~45%程度で、実験群は 15%程度で対照群に比較して有意に低かった($P<0.01$)。硬組織形成率は BMP-2 濃度 $100\mu\text{g/ml}$ の対照群では 4 週後で 15%、8 週後で 35%であったのに対し、実験群では 4 及び 8 週後で 10%程度であり、 $400\mu\text{g/ml}$ では 8 週後で対照群が 12%であり、実験群が 5%で対照群に比較して有意に低かった($P<0.01$)。吸収面の硬組織形成率は実験群が有意に低かったが非吸収面では有意差がなかった。TRAP 陽性細胞率は BMP-2 濃度 0, $100\mu\text{g/ml}$ の全実験期間で両群間に有意差はなかった。

考察

BMP-2 濃度 $0\mu\text{g/ml}$ のビスフォスフォネートを投与すると、投与しなかった場合に比較して象牙質吸収は有意に少なかった。したがってビスフォスフォネートは破骨細胞様細胞の機能を十分に抑制していたと考えられた。

本研究の結果、BMP-2 を塗布した象牙質表面におけるセメント質様硬組織形成は象牙質が一層吸収された後に硬組織が形成されているものと、吸収されていない象牙質表面に硬組織が形成されているものが観察され、Miyaji ら天雲らの報告に一致していた。総硬組織形成のうち BMP-2 濃度 $100\mu\text{g/ml}$ の対照群では非吸収面の硬組織形成は 20%程度、吸収面の硬組織形成は 80%程度であり、BMP-2 濃度 $400\mu\text{g/ml}$ の対照群では非吸収面の硬組織形成は 30%程度、吸収面の硬組織形成は 70%程度であったことから、BMP-2 処理した象牙質

表面の硬組織形成には破骨細胞様細胞による象牙質面の吸収が大きく関与していることが示唆された。

BMP-2 による象牙質表面のセメント質様硬組織形成は、吸収面に形成される硬組織が大部分を占めていることが明らかになり、さらにビスフォスフォネート投与によって破骨細胞様細胞の機能を抑制することで象牙質吸収面の硬組織形成が抑制されたことから、BMP-2によるセメント質様硬組織形成は破骨細胞様細胞が重要な役割を有することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 浪 雅 光

副 査 教 授 田 村 正 人

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

BMP-2 処理した象牙質表面における

セメント質様硬組織形成のビスフォスフォネートによる抑制

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。

これまで我々は、BMP-2 を塗布した象牙質片をラット結合組織内に移植すると、吸収されていない象牙質表面に硬組織が形成されているものと、象牙質が一層吸収された後に硬組織が形成されるものが観察されたことを報告した。また骨形成は吸収と形成のカップリングが重要であり、bisphosphonate は吸収を担う破骨細胞の細胞骨格の破壊やアポトーシスを誘導することが明らかになっている。したがって、破骨細胞も bisphosphonate によって抑制され、BMP-2 による象牙質吸収のみならず硬組織形成にも影響を及ぼす可能性がある。本研究では、bisphosphonate をラットに投与することで、BMP-2 で処理した象牙質を移植した場合の硬組織形成と象牙質吸収に与える影響を組織学的に評価した。

ラット象牙質から試験片(1×1×0.3 mm)を 180 個作製、24%EDTA (pH7) で 3 分間脱灰処理し3群に分け、60 個は 100 μ g/ml に調整した rhBMP-2 溶液(アステラス製薬)、60 個は 400 μ g/ml の rhBMP-2 溶液、最後の 60 個は 0 μ g/ml の rhBMP-2 溶液に 10 分間浸漬処理した。ウィスター系ラット(10 週齢)180 匹を 2 群にわけ、実験群はインカドロン(アステラス製薬)を 1 μ g/kg/日、3 回/週、腹腔より投与し、観察期間終了まで継続した。対照群は生理食塩水を同様に投与した。投与開始2週間後にラットの口蓋部結合組織内に各試験片を埋植した。2、4、8 週後に通法に従い組織標本を作製して HE 重染色および TRAP 染色を行い、組織学的観察を行うとともに、象牙質上に形成された硬組織形成率、象牙質表面の吸収率、TRAP 陽性細胞率の計測を行うとともに、硬組織形成率は象牙質吸収面に形成された硬組織と非吸収面に形成された硬組織に分けて計測した。各測定値の統計学的分析には、Mann-Whitney U 検定を用いた。

象牙質吸収率は実験群が対照群に比較して有意に低かった($p<0.01$)。硬組織形成率も同様に実験群が対照群に比較して有意に低かった($p<0.01$)。硬組織形成のうち80%程度が吸収面に形成され、20%程度が非吸収面に形成されていた。また、TRAP 陽性細胞率は BMP-2 濃度 0、100、400 μ g/ml の全実験期間で両群間に有意差はなかった。

以上の結果から、ビスフォスフォネートを投与すると、BMP-2 処理した象牙質片において破骨細胞様細胞の機能を抑制し、象牙質の吸収が減少するとともに、硬組織形成も抑制することが明らかになり

BMP-2 による象牙質表面への硬組織形成には破骨細胞様細胞が重要な役割を有することが示唆された。

引き続き審査担当者と申請者の間で、論文内容及び関連事項について質疑応答がなされた。主な質問事項として、

①24%EDTA 溶液を使用した根拠

②形成された硬組織をセメント質様と判断した根拠

③ラット口蓋結合組織のように硬組織形成能がない細胞しか存在しないところに、硬組織が形成されることに対する考察

④BMP-2 100 μ g/ml の方が、400 μ g/ml より硬組織形成が多かったことに対する考察

⑤ビスフォスフォネートの投与方法として局所投与は考えられるか

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。本研究はビスフォスフォネートを投与すると、BMP-2 処理した象牙質片において、破骨細胞様細胞の機能を抑制し、象牙質の吸収が減少するとともに、硬組織形成も抑制することが明らかになり、BMP-2 による象牙質表面への硬組織形成には破骨細胞様細胞が重要な役割を有することが示唆され、歯周組織再生療法への応用に対して重要な指針を与えたことが高く評価された。本研究の内容は、歯科医学の発展に貢献するものであり、審査担当者全員は、学位申請者が博士(歯学)の学位を授与するのに値するものと認めた。