

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 真喜志 佐奈子  
学位 博士(歯学)  
学位記番号 新大院博(歯)第494号  
学位授与の日付 令和3年9月21日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
博士論文名 Osteopontin on the dental implant surface promotes direct osteogenesis in osseointegration  
(デンタルインプラント表面のオステオポンチンはオッセオインテグレーションにおける直接性骨形成を促進する)

論文審査委員 主査 教授 魚島 勝美  
副査 教授 小林 正治  
副査 教授 大島 勇人

博士論文の要旨

【目的】 歯科インプラント植立後の細胞レベルでのオッセオインテグレーション(骨性結合:インプラント体と骨が一体化した状態)形成過程では、埋入後、インプラント体表面から直接骨が形成される直接性骨形成 direct osteogenesis と損傷を受けた既存の骨から骨形成が進行する間接性骨形成 indirect osteogenesis の二種類の様式がある。オステオポンチン(OPN)は石灰化した細胞外基質の重要な構成要素であり、ハイドロキシアパタイト(HA)結合サイトに加え、インテグリンと結合し細胞接着に関与する RGD 配列や SLAYGLR 配列(マウス)を含む骨タンパクである。骨周囲組織においてはその生産細胞として破骨細胞や骨芽細胞、線維芽細胞、炎症性細胞などが挙げられ、さらにはサイトカインとして免疫反応にも重要な役割を果たしている。OPN は骨リモデリングの過程において、骨吸収と骨形成が逆転する reversal line に集積するため、破骨細胞と骨芽細胞の機能発現に深く関わっている可能性が報告されているが、その詳細はまだ解明されていない。さらに興味深いことに、野生型マウス顎骨への HA プラスティングチタンインプラント(HAB-imp)埋入後にはインプラント表面に OPN が集積し、その後、同部位から直接性骨形成が生じることが、また *Opn* 遺伝子欠損(KO)マウスを用いた機能喪失実験 loss of function では、その後生じる直接性骨形成が有意に阻害されるが、間接性骨形成には影響が出ないことが我々の研究により明らかになっている。しかしながら、OPN の機能獲得実験 gain of function における直接性骨形成への効果も未だ明らかになっていない。本研究では、前回の機能喪失実験 loss of function に対し、OPN を模倣した4種類のタンパク/ペプチド被覆 HAB-imp 用いた機能獲得実験 gain of function を行い、マウス組み換え OPN (rOPN)、RGDS ペプチド(RGDS)、RGD 配列と SLAYGLR 配列を有する OPN 合成ペプチド(OPNpep)、HA 結合ペプチドと OPN 合成ペプチドの融合分子(HABP-OPNpep)のオッセオインテグレーション獲得過程、特に直接性骨形成への効果を検証した。

【材料と方法】 深麻酔科にて *Opn* KO マウスと野生型マウスの上顎第一臼歯を抜去後、専用のドリルを用いて抜歯窩に窩洞形成を行い、止血を確認した。その後、rOPN、RGDS、OPNpep、HABP-OPNpep、コントロールとして PBS を導入した HAB-imp を、窩洞に各溶液を満たした後同部に埋入した。術後1日~2週後にマウスの還流固定を行い、HAB-imp をスクリーにて周囲組織を破壊しないよう慎重に除去し、脱灰後、通法に従いパラフィン切片を作製、その後 HE・Azan 染色、OPN・Ki67 免疫組織化学、TRAP 酵素組織化学を行い、光顕にて解析した。

【結果と考察】 *Opn* KO マウスにおいては埋入2週目になっても炎症期が持続し、遺伝子欠損により免疫反応が正常に機能せず、治癒過程において炎症期に続く分化期・形成期への移行が行われなかったことが示唆された。また、その機能がインプラント表面の OPN を模倣したタンパ

ク/ペプチド被覆によってレスキューされる所見は観察されなかった。野生型マウスにおいて、治癒過程初期における増殖活性はHABP-OPN<sub>pep</sub>群がコントロール群よりも有意に高い値を示した。rOPN群は埋入2週目に、RGDS群と比較してインプラント周囲のOPN陽性反応率が有意に増加したが、これは本来OPNと結合する受容体がRGDSペプチドによってブロックされ、骨生産細胞へのOPN接着とそれに付随した機能発現が阻害されたことが示唆された。さらにrOPNは術後2週目には、コントロール群4週目と同等の直接性骨形成率を示し、直接性骨形成を早める効果が観察された。

【結論】以上より、HAB-imp表面のrOPNはOPN陽性反応率と共に直接性骨形成を促進し、オッセオインテグレーションの早期獲得に貢献することが示唆された。しかしながら、今回の研究において他のペプチド群では、逆にネガティブな効果が観察されたため、引き続きrOPNのほかの部位を模倣したペプチドにて効果を検証する必要がある。今後は、rOPNに含まれる直接性骨形成に関与するようなアミノ酸配列を特定し、その合成ペプチドを応用してコスト削減を目指すことが求められる。将来的には、この一連の研究は「直接性骨形成促進材料」と呼ぶべき新規インプラント材料の開発に繋がることが予想され、さらには歯科界だけに留まらず、骨折の治癒など他分野の新規治療法にも繋がる可能性がある。

#### 審査結果の要旨

硬組織工学は、損傷組織の治癒過程を改善し、機能の回復や維持に関わる材料を作製することを目的とするが、一般に生体における治癒過程を模倣して材料を開発する。細胞外マトリックス (ECM) は、硬組織の形成や石灰化過程において、足場として、タンパク質の吸着、細胞接着、シグナル伝達に重要な役割を果たす。歯科硬組織工学においては、骨伝導性からヒドロキシアパタイト (HA) が応用されてきたが、ECMタンパクの効果については十分な検証がなされてこなかった。

歯科インプラント植立後の細胞レベルでのオッセオインテグレーション形成過程では、インプラント体表面から直接骨が形成される直接性 (接触性) 骨形成と既存の骨から骨形成が進行する間接性 (遠隔性) 骨形成の二種類の様式があり、インプラント体表面のHAの存在が直接性骨形成の引き金になることが明らかになっている。著者らの研究グループは、多様な遺伝子改変動物が利用できるマウスを用いた顎骨への即時埋入インプラント植立実験系を世界で初めて確立した。一方、骨のリモデリング過程において、破骨細胞と骨芽細胞の分化・機能発現にオステオポンチン (OPN) が重要な役割を果たすと考えられている。OPNは接着性骨基質タンパクであり、その局在・発現パターンから骨形成過程において重要な役割を担うと考えられてきたが、*Opn* 遺伝子欠損マウスで骨格系に明らかな異常が見られないことから、骨代謝におけるOPNの役割は未解決の問題である。著者らはloss of function研究 (*Opn* 遺伝子欠損マウス) を用いて、OPNの欠如が直接性骨形成を有意に減少させることを明らかにしている。本研究では、HAブラストインプラントの表面へのOPN修飾タンパク/ペプチドの作用 (gain of function 実験) が直接性骨形成に及ぼす影響を検証している。

本研究は、HA結合ペプチドOPN模倣ペプチド融合 (HABP-OPN<sub>pep</sub>) 群で対照群に比し細胞増殖活性が有意に増加すること、組換えマウスOPN (rOPN) 群でRGDS群に比しインプラント表面へのOPN沈着率が有意に増加すること、rOPN群で対照群に比し早期に直接性骨形成を獲得することを明らかにした。一方、*Opn* 遺伝子欠損マウスで、OPN修飾タンパク/ペプチドは直接性骨形成不全をレスキューできなかった。

この所見は、*in vivo* 実験系を用いて顎骨へのHAブラストインプラント即時埋入後のオッセオインテグレーション獲得過程において、rOPNが直接性骨形成を促進することを示した初めての報告である。過去の*in vitro* 研究では、石灰化過程において、OPNのネガティブ効果が報告されているが、著者らは、*in vitro* と *in vivo* 間の結果の不一致はOPNのリン酸化や濃度の違いに起因していると考えられているが、更なる検証が必要であろう。一方、rOPN群でRGDS群に比しインプラント表面へのOPN沈着率が有意に増加することは、破骨細胞系細胞によるインプラント表面へのOPN分泌がインテグリンを介して抑制されていると考えられる。OPNのアミ

ノ酸配列の別の部位が OPN 分泌を含む破骨細胞の機能に影響を与えていると考えられる。また、HABP-OPN<sub>pep</sub> 群で細胞増殖活性が有意に増加するのに関わらず、直接性骨形成には影響しないことは興味深い。細胞増殖活性の過度の増加は創傷治癒の次の段階（細胞分化）への移行を妨げるのかも知れない。rOPN のあるアミノ酸配列が適切な細胞増殖・遊走・分化、骨形成、リモデリングにポジティブに作用していると考えられる。今後は、直接性骨形成に最大限に効果のあるアミノ酸配列が解明されることが期待される。

以上、本研究結果は、即時埋入 HA ブラストインプラント植立後の骨・インプラント界面の治癒過程における OPN の役割を gain of function の実験系で明らかにしており、オッセオインテグレーション獲得過程における直接性骨形成に最大限に効果のあるアミノ酸配列解明の糸口となる重要な知見を提示しており、歯科インプラント研究への貢献度が極めて高いので、学位論文としての価値を認める。